

Expression of recombinant Cry 1Ac protein in potato plant cell suspension culture: Establishment of culture and optimization of biomass and protein production by nitrogen supply

Carlos Julio Nova-López, Jorge Mario Muñoz-Pérez, Luisa Fernanda Granger-Serrano,
Mario Evelio Arias-Zabala & Rafael Eduardo Arango-Isaza

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia. cjnova@unal.edu.co, jmmunozp@unal.edu.co,
lfrangers@unal.edu.co, marioari@unal.edu.co, rearango@unal.edu.co

Received: August 31th, 2016. Received in revised form: March 22th, 2017. Accepted: Abril 6th, 2017.

Abstract

Plant cell suspension cultures have been proposed as alternative platforms for the expression of recombinant proteins with therapeutic application because of its potential advantages over traditional bacterial and mammalian cells-based platforms. In this work, a protocol for the establishment of potato suspensions (*S. tuberosum*) genetically modified with *Cry 1Ac* gene was obtained and the kinetics of biomass and recombinant protein production were characterized. Internodal explants and MS medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ of 2,4-D showed the best response in terms of callus formation. The maximum specific growth rate for suspensions was 0.12 d⁻¹, with a maximum biomass concentration of 1.41 g L⁻¹ at the end of exponential phase. This biomass concentration was improved to 3.94 g L⁻¹ by doubling the concentration of NO₃⁻ and NH₄⁺ in the culture medium.

Keywords: Plant cell suspension culture; recombinant proteins; *Solanum tuberosum*.

Expresión de la proteína recombinante Cry 1Ac en cultivos de células de papa en suspensión: Establecimiento del cultivo y optimización de la producción de la biomasa y la proteína mediante la adición de nitrógeno

Resumen

Los cultivos *in vitro* de células vegetales en suspensión se han propuesto como plataformas alternativas de expresión de proteínas recombinantes con aplicación terapéutica por las ventajas que ofrecen sobre los sistemas tradicionales de expresión en células bacterianas y de mamíferos. En este trabajo se determinó un protocolo para el establecimiento de suspensiones de papa (*S. tuberosum*) genéticamente modificadas con el gen de la proteína *Cry 1Ac* y se caracterizaron las cinéticas de producción de la biomasa y la proteína recombinante. Los entrenudos y el medio MS suplementado con 2.0 mg L⁻¹ de 2,4-D, mostraron los mejores porcentajes de formación de callo. La tasa máxima de crecimiento específico calculada para las suspensiones fue 0.12 d⁻¹, con una concentración máxima de biomasa de 1.41 g L⁻¹ al final de la fase exponencial, la cual logró aumentarse hasta 3.94 g L⁻¹ duplicando la concentración de NO₃⁻ y NH₄⁺ en el medio de cultivo.

Palabras clave: Cultivo de células vegetales en suspensión; proteínas recombinantes; *Solanum tuberosum*

1. Introducción

Por años, los cultivos *in vitro* de células vegetales en suspensión han sido considerados como una opción para la

producción de sustancias de interés para las industrias química, farmacéutica, cosmética y de alimentos [1,2]. Debido a que las plantas son una fábrica natural de moléculas de alto valor, los cultivos de células vegetales inicialmente se

How to cite: Nova-López, C. J., Muñoz-Pérez, J. M., Granger-Serrano, L. F., Arias-Zabala, M. E. and Arango-Isaza, R. E. Expresión de la proteína recombinante Cry 1Ac en cultivos de células de papa en suspensión: Establecimiento del cultivo y optimización de la producción de la biomasa y la proteína mediante la adición de nitrógeno DYNA 84 (201) pp. 34-41, 2017.

perfilaron como una plataforma promisoría para producción a gran escala de metabolitos secundarios. Sin embargo, y pese a que se han logrado establecer con éxito algunos procesos industriales, problemas asociados principalmente a los bajos rendimientos en la producción de los metabolitos han limitado el uso de esta tecnología [3].

Las técnicas modernas de la biología molecular permiten la inserción foránea de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos de interés. El uso de estos cultivos transformados puede eventualmente contribuir a aumentar los rendimientos en la producción de los metabolitos [4,5], pero el desconocimiento de la mayoría de las rutas metabólicas en las plantas restringe la implementación de esta estrategia [6].

Un enfoque más reciente contempla el uso de sistemas vegetales para la producción de proteínas recombinantes de aplicación industrial [7-9]. Bajo esta nueva perspectiva, en la que confluyen desarrollos alcanzados con las técnicas del ADN recombinante, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, los métodos tradicionales de la agricultura y las fermentaciones industriales, se utilizan plantas o cultivos vegetales *in vitro* (células o tejidos) genéticamente modificados para expresar proteínas de alto valor agregado, especialmente aquellas que tienen aplicación terapéutica.

Actualmente, la mayoría de estas proteínas utilizadas como medicamentos biológicos son sintetizadas utilizando hospederos microbianos y células de mamífero [10]. Sin embargo, las plantas se han propuesto como alternativa de expresión debido a la capacidad que tienen de introducir patrones de plegamiento y modificaciones postraduccionales que los sistemas bacterianos son incapaces de proporcionar, los bajos costos de producción en comparación con las células de mamífero, y las garantías de bioseguridad que ofrecen al no ser blanco de contaminación con patógenos humanos [7-9,11-13].

Los cultivos de células vegetales en suspensión reúnen los beneficios que ofrecen los sistemas vegetales para la expresión de proteínas terapéuticas con aquellos proporcionados por las fermentaciones industriales. La posibilidad de utilizar biorreactores hace más simple el escalado de los procesos al permitir la manipulación de variables que garantizan la consistencia del producto y facilitar las etapas de separación y purificación. Adicionalmente, con el manejo de células en suspensión se eliminan los problemas asociados a la propiedad de tierras y las regulaciones que restringen el cultivo a campo abierto de plantas transgénicas [14-16]. Lo anterior ha propiciado la exploración de diferentes especies vegetales como plataforma de producción. Cultivos de células en suspensión de tabaco, arroz y maíz se han establecido para la expresión de anticuerpos, hormonas y enzimas terapéuticas [17-22]. Un sistema de producción basado en el cultivo de células de zanahoria consiguió en los últimos años alcanzar fases de comercialización, con la apertura de varias plantas de producción [23].

Los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) han sido ampliamente estudiados a nivel *in vitro*. La importancia agronómica de esta planta ha hecho que se haya acumulado gran cantidad de información sobre las técnicas de cultivo *in vitro* y de manipulación genética. Se ha reportado el crecimiento de las células en suspensión en diferentes medios y con composiciones hormonales que varían significativamente

de una investigación a otra [24-26]. Además, se han desarrollado numerosos estudios de transformación para el mejoramiento genético de variedades silvestres, por lo que estos métodos son bien conocidos. De la misma forma, diferentes investigaciones reportan el uso de plantas de papa para la expresión de proteínas terapéuticas [20,27-30].

El objetivo del presente trabajo fue explorar el potencial del cultivo de células en suspensión de papa como plataforma de producción de proteínas recombinantes. Para tal fin, utilizamos la variedad androestéril Pastusa suprema y la proteína Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* como proteína modelo. Se presenta una metodología rápida y sencilla para el establecimiento de las suspensiones a partir de las plantas transformadas y las cinéticas de crecimiento de biomasa y producción de la proteína bajo diferentes concentraciones de nitrato y amonio en el medio de cultivo.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal transformado

Se utilizaron plantas *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* subsp. andígena var. Pastusa suprema) transformadas con el gen *cry 1Ac* de *B. thuringiensis*. La información sobre los métodos, vectores de transformación y rutinas de mantenimiento y subcultivo utilizados para obtener y conservar las plantas transgénicas se presenta en un trabajo previo [31].

2.2. Inducción de callos y establecimiento de suspensiones

Se utilizaron segmentos jóvenes de nudos, entrenudos y hojas como explantes para la inducción de callos. Los explantes se cultivaron en medio Murashige and Skoog (MS) [32] 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2,0 g L⁻¹ de fitagel, pH 5.8, suplementado con diferentes concentraciones hormonales de 2,4-D y quinina. Los explantes se conservaron a 21 °C y en completa oscuridad durante 24 días. Después de este tiempo se registraron los porcentajes de formación de callo, organogénesis y fenolización. El tipo de explante y la concentración hormonal se consideraron como factores experimentales. Para cada uno de los tratamientos se sembraron 10 explantes en el medio de cultivo, y todos los tratamientos se corrieron por triplicado.

Para el establecimiento de las suspensiones celulares se transfirieron los explantes con mayor porcentaje de inducción de callos a matraces de 100 mL que contenían 20 mL de medio MS líquido con la misma composición utilizada en la etapa anterior. Los cultivos se mantuvieron a una velocidad de agitación de 110 rpm, a 19°C y con tapón de papel aluminio. Luego de 7 días, una vez se observó suficiente crecimiento de células en forma de suspensión, los explantes se retiraron de los cultivos manualmente. Las suspensiones se subcultivaron en medio fresco cada 14 días hasta establecer cultivos en matraces de 100 y 200 mL.

2.3. Cinética de crecimiento y viabilidad celular

Para la determinación de las curvas de crecimiento de la biomasa se inocularon matraces de 100 mL con aproximadamente 0.2 g L⁻¹ de biomasa seca, utilizando una

suspensión madre de concentración conocida y en fase de crecimiento exponencial. Las condiciones de cultivo de las suspensiones se mantuvieron como se describieron anteriormente. El crecimiento celular se determinó registrando el peso seco cada 2 días durante 20 días. Para esto, se filtró el contenido de cada matraz utilizando papel filtro con tamaño de poro de 12-15 μm . La biomasa fresca se lavó tres veces con agua destilada y se secó a 60°C durante 48 h. El experimento se realizó por triplicado. Se calcularon la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}) y el índice de crecimiento (IC) de acuerdo con las ecuaciones 1 y 2:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{max}} \cdot X \quad (1)$$

$$\text{IC} = \frac{X_f - X_i}{X_f} \quad (2)$$

En donde X es la concentración de biomasa (g L^{-1}) para un tiempo t de cultivo en días (d), X_f y X_i son las concentraciones de biomasa en los días 20 y 0, y $\frac{dX}{dt}$ es la velocidad de crecimiento de la biomasa durante la fase de crecimiento exponencial ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$).

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó una adaptación del método de reducción del MTT [33]. Se tomaron entre 60 y 80 mg de biomasa fresca y se incubaron en tubos eppendorf durante cuatro horas con 500 μL de una solución de 5 mg L^{-1} de MTT. Los cristales de formazán se disolvieron agregando 750 μL de isopropanol ácido (0,1 % HCL, 10 % Tween 20). Luego de 30 minutos, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 300 μL y se transfirieron a micropozos de cultivo para registrar la absorbancia a 590 nm. La actividad metabólica se registró como la absorbancia específica obtenida para cada uno de los días de muestreo (Unidades de absorbancia/g de peso fresco).

2.4. Cinética de producción de la proteína recombinante Cry 1Ac

El perfil de producción de la proteína Cry 1Ac a lo largo del cultivo se determinó mediante inmunoensayo de ELISA, utilizando el kit comercial Bt-Cry 1Ab/1Ac® (PSP 06200, Agdia, Elkhart, IN, EEUU). Para la extracción de la proteína se tomaron 200 mg de biomasa fresca y se trataron con 200 μL del buffer de extracción proporcionado por el kit. Luego de una etapa de maceración mecánica, las muestras se llevaron a centrifugación por 10 minutos a 5000 rpm. Se siguieron las instrucciones del fabricante y finalmente se registraron las absorbancias a 650 nm, utilizando un lector de microplacas de ELISA (Bio-rad modelo 680, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). Se utilizó el control positivo suministrado por el fabricante, y como controles negativos se utilizaron plantas y callos de *S. tuberosum* no transformados. Se consideraron valores positivos aquellos que registraron absorbancias superiores a 0.100.

2.5. Efecto de la concentración de nitrato y amonio sobre el crecimiento celular y la producción de la proteína Cry 1Ac

Se inocularon 0.2 g L^{-1} de células en 5 medios de cultivo

a los que se les modificó la concentración de KNO_3 y NH_4NO_3 con relación a la concentración en el medio MS original (18.8 mM y 20.6 mM, respectivamente). Se formularon medios con las siguientes relaciones de nitrato y amonio ($\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$): MS1 (0: 39.4); MS2 (9.4:10.3); MS3 (9.8:29.5); MS4 (29.5:9.85); MS5 (37.6:41.2); MS6 (39.4:0). Se analizó el crecimiento de la biomasa y la producción de la proteína Cry 1Ac a los 20 días de cultivo mediante los métodos descritos anteriormente.

2.6. Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS. Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los datos. Para la comparación de medias se utilizaron pruebas de Tukey con 5% de nivel de significancia. Las pruebas de normalidad y homocedasticidad se realizaron utilizando los estadísticos de Shapiro Wilk y Levene, respectivamente.

3. Resultados y discusión

3.1. Inducción de callos

En resultados previos se determinó que la adición de quineta no tenía efectos favorables sobre la proliferación celular, y que la inducción de callos se favorecía únicamente con la adición de 2,4-D en el medio de cultivo (resultados no mostrados). El tratamiento consistente en entrenudos cultivados con 2.0 mg L^{-1} de 2,4-D presentó la mejor combinación en términos de porcentajes de formación de callo (90 %), fenolización (0 %) y organogénesis (6.6 %) (Tabla 1, Fig. 1 B), por lo que se utilizó posteriormente para establecer las suspensiones celulares.

Los mayores porcentajes de formación de callo se obtuvieron cuando se utilizaron nudos y entrenudos como explante. Sin embargo, los callos obtenidos con los nudos presentaron mayor grado de fenolización (Tabla 1). En general, para el establecimiento de suspensiones vegetales son deseables callos friables compuestos por células desdiferenciadas en activo crecimiento y con alta viabilidad. La composición hormonal y el tipo de explante utilizado determinan la cantidad, el tipo y la calidad de callo obtenido. Callos con elevado grado de fenolización dificultan el establecimiento de las suspensiones celulares porque inhiben el crecimiento celular. Así mismo, callos que contienen células embriogénicas o diferenciadas no son deseables para estos propósitos.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los de otros autores que también reportan las mayores eficiencias en la inducción de callo para diferentes variedades de *S. tuberosum* cuando se utilizan entrenudos como explante y 2,4-D como fuente hormonal [34], y que en general observan una respuesta pobre de las hojas en la promoción de la callogénesis [35] en comparación con la obtenida cuando se utilizan otros tipos de explante, como por ejemplo nudos [36]. Así mismo, se ha observado que las hojas tienden a formar callos que entran en organogénesis luego de un periodo de cultivo en 2,4-D [37], tal como se obtuvo en este estudio (Tabla 1, Fig. 1.E).

Tabla 1. Efecto del tipo de explante y concentración de 2,4-D sobre la formación de callo, la fenolización y la organogénesis en cultivos de *S. tuberosum*.

	Concentración	%	%	%
	2,4-D (g L ⁻¹)	Formación de callo	Fenolización	Organogénesis
Nudo	1.5	84.4 ^a	14.8	9.4
	2.0	68.4 ^b	92.3	31.6
	2.5	90.0 ^c	11.1	3.7
	3.5	28.5 ^d	37.5	71.4
Entrenudo	1.5	48.4 ^e	0	0
	2.0	90.0 ^c	0	10.0
	2.5	50.0 ^e	0	6.6
	3.5	63.3 ^f	5.2	5.2
Hoja	1.5	31.6 ^g	0	68.4
	2.0	10.3 ^h	66.6	55.2
	2.5	51.7 ^e	33.3	24.13
	3.5	67.9 ^b	36.8	28.5

Fuente: Los autores.

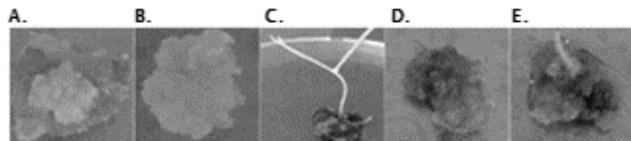


Figura 1. Formación de callos en diferentes tipos de explantes y concentraciones hormonales de 2,4-D. Nudo + 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D (A). Entrenudo + 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D (B). Nudo + 3.5mg L⁻¹ 2,4-D (C). Hoja + 3.5 mg L⁻¹ 2,4-D (D). Hoja + 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D (E). Todos los explantes se cultivaron en medio MS durante 24 días.

Fuente: Los autores.

3.2. Establecimiento de suspensiones celulares

A pesar de que es una práctica común raspar los explantes para separar las células y transferirlas a medios de cultivo frescos para obtener grandes cantidades de callo que luego son cultivados en medio líquido [38], en este caso encontramos que es posible establecer las suspensiones sin pasar por una etapa de raspado. Debido a la friabilidad de los callos obtenidos, las células se liberan fácilmente al medio por la agitación del cultivo, lo que permite obtener células que, al no someterse al estrés mecánico asociado al raspado, poseen elevados niveles de viabilidad y división celular. La aplicación de esta estrategia permite reducir los tiempos y recursos necesarios para la obtención de los cultivos celulares.

3.3. Cinética de crecimiento y viabilidad celular

Como se muestra en la Fig. 2, las suspensiones presentaron una etapa de crecimiento exponencial que se extiende desde el inicio del cultivo hasta el día 10, seguida de una fase estacionaria hasta el día 20, en la que la biomasa permanece aproximadamente constante. La curva de crecimiento de la biomasa sugiere que las células consumen los nutrientes presentes en el medio y lo utilizan para la división, síntesis y mantenimiento de estructuras celulares. Aunque la presencia de fases de adaptación y de muerte celular son comunes en los cultivos de células vegetales [39],

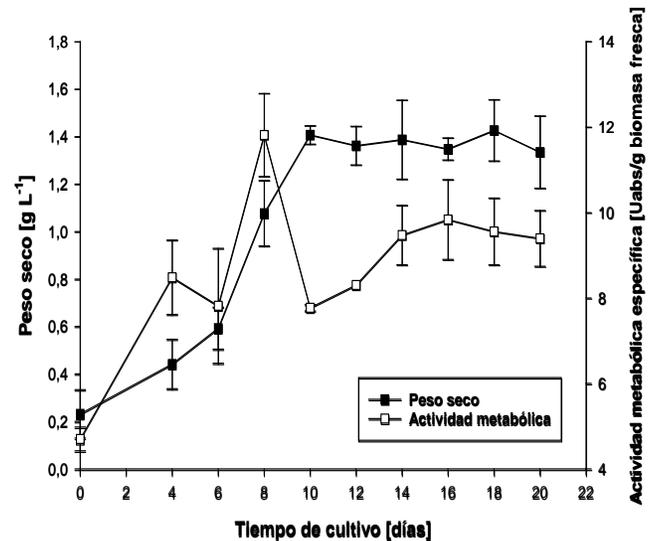


Figura 2. Perfil de crecimiento de biomasa para cultivos transformados de *S. tuberosum* en suspensión

Fuente: Los autores.

existen casos en los que éstas pueden estar ausentes. En ese caso, este comportamiento probablemente está asociado al estado fisiológico del inóculo, que provenía de una suspensión madre en fase de crecimiento exponencial. En este estado, las células están en su capacidad máxima de crecimiento, adaptándose fácilmente a las condiciones que impone el cambio a un medio de cultivo fresco más rico en nutrientes.

La evolución de la viabilidad celular obtenida por la reducción del MTT (Fig. 2) es consistente con el perfil de crecimiento. Se observa un aumento en la actividad metabólica desde el inicio del cultivo hasta el día 8. En el día 10, que coincide con la finalización de la fase de crecimiento exponencial, la actividad metabólica disminuye para luego estabilizarse hasta el último día de cultivo, un comportamiento estacionario similar al de la curva de crecimiento. La reducción del MTT tiene lugar en la mitocondria e involucra una oxidoreductasa dependiente de NADP(H) importante en la generación de ATP, por lo que es un buen estimador de la actividad y el estado metabólico de los cultivos [40,41].

Los parámetros μ_{max} e IC calculados para las suspensiones fueron de 0.12 d⁻¹ y 4.76, respectivamente. En la Tabla 2 se comparan estos parámetros con los reportados para el cultivo de células en suspensión de otras especies vegetales utilizadas tradicionalmente para la expresión de proteínas terapéuticas o metabolitos secundarios. Se observa que las suspensiones de *S. tuberosum* alcanzan, bajo las condiciones de cultivo empleadas en este estudio, velocidades máximas específicas e índices crecimiento comparables a los de plataformas modelo más estudiadas.

3.3. Producción de la proteína Cry IAc

La Fig. 3 muestra la evolución de la expresión de la proteína Cry IAc durante el tiempo de cultivo. Las

absorbancias específicas obtenidas con el ensayo ELISA para las suspensiones en los días 6 y 12 (1,29 y 1,34 Uabs/g biomasa seca, respectivamente) fueron comparables a las obtenidas para la proteína pura proporcionada por el Kit (1,47 Uabs/g biomasa seca) (datos no mostrados), lo que sugiere una buena capacidad del sistema para expresar la proteína. La concentración de la proteína aumenta desde el día 0 hasta alcanzar su valor máximo en el día 12, tiempo después del cual se observa una disminución en la producción.

En términos generales, los niveles de expresión de proteínas heterólogas dependen de diversos factores, como lo son el tipo de promotor utilizado en el vector de transformación, el sitio y número de veces en el que se inserta la secuencia foránea en el genoma del hospedero, las condiciones de cultivo, entre otros [14]. Los resultados del ensayo ELISA comprueban que bajo las condiciones en las que se realizó este estudio, las células no pierden la capacidad de expresión de la proteína al pasar del estado de diferenciación en las plantas al estado desdiferenciado propio de las células en suspensión. Este fenómeno es recurrente en cultivos celulares que se utilizan para la expresión de metabolitos secundarios, en los que se requiere la presencia de tejidos especializados para la síntesis de determinados metabolitos [45].

Tabla 2.

Tasas de crecimiento específico máxima reportadas para cultivos en suspensión de diferentes especies vegetales de importancia farmacéutica.

Especie	Producto	I.C	μ_{max} (d ⁻¹)	Referencia
<i>N. tabacum</i>	Fosfatasa alcalina, lactoferrina	10.0-19.0	0.43-1.1	[17], [42] [43]
<i>O. sativa</i>	Butirilcolinesterasa humana	7.1-21.8	0.15-0.24	[22]
<i>T. chinensis</i>	Taxol	0.22	0.12	[44]
<i>T. peruviana</i>	Peruvósido	2.1-3.2	0.17	[39]
<i>S. tuberosum</i>	Proteína Cry IAc	4.8-17.6	0.12	Este trabajo

Fuente: Los autores

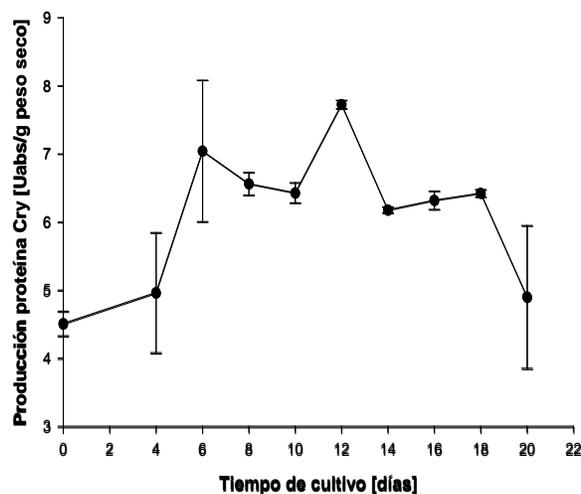


Figura 3. Cinética de producción intracelular de la proteína recombinante Cry I Ac por ELISA.

Fuente: Los autores.

3.4. Efecto de la concentración de nitrato y amonio sobre el crecimiento celular y la producción de la proteína Cry I Ac

Los medios MS1, MS4 y M5 mostraron efectos significativos sobre la producción de la biomasa con relación al medio MS (Fig. 4). La concentración total de nitrógeno aportada por el KNO₃ y el NH₄NO₃ en los medios MS1 y MS4 es la misma que en el MS (39.4 mM), mientras que en el medio M5 es del doble (78.8 mM). Para el medio MS1 se registró una reducción del 43% en la producción de biomasa, en tanto que para los medios MS4 y MS5 se registraron aumentos del 66 y el 193%, respectivamente. La reducción en el crecimiento celular obtenido en el medio MS1 es el resultado de la ausencia de nitrato en este medio. Otros autores han reportado reducciones en la capacidad de crecimiento cuando se cultivan células en medios que no contienen este ion y en los que la única fuente de nitrógeno es el amonio [46-48].

No sólo la presencia de nitrato en el medio de cultivo es un factor importante para promover el crecimiento celular, sino que el suministro de concentraciones crecientes de este ion también puede provocar aumentos considerables de la biomasa. En los medios MS4 y MS5 las concentraciones de nitrato son 1.6 y 2.0 veces mayores que en la del MS, lo que explica los incrementos sustanciales en la biomasa en estos medios. Particularmente, el medio MS5 fue el medio en el que se obtuvo el mayor aumento en el crecimiento de la biomasa. El IC calculado para este medio fue de 17.6, en comparación con el obtenido para el MS, que presentó un IC de 4.76.

Los pesos de la biomasa seca obtenidos para los medios MS2, MS3 y MS6 no difieren estadísticamente de los del MS, pero sí de los obtenidos con el MS4 y el MS5, los cuales presentaron concentraciones mayores de biomasa (Fig. 4). Estos dos últimos medios contienen concentraciones mayores de NO₃⁻, lo que refuerza la hipótesis del efecto favorable de la adición de KNO₃ a los medios de cultivo.

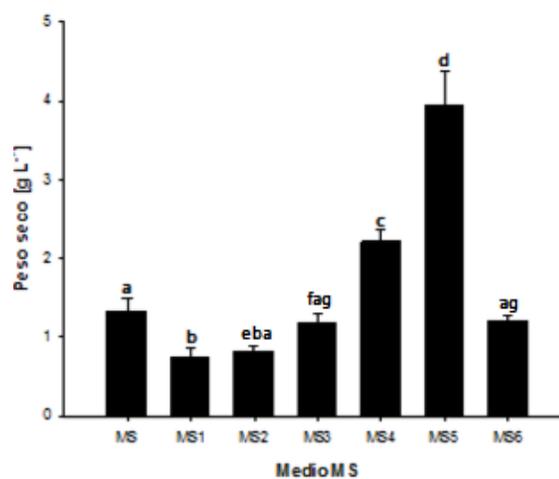


Figura 4. Comparación del peso seco obtenido en 6 medios de cultivo con distintas concentraciones y relaciones (NO₃⁻:NH₄⁺): MS (20.6:18.8), MS1 (0:39.4), MS2 (9.4:10.3), MS3 (9.8:29.5), MS4 (29.5:9.85), MS5 (37.6:41.2) y MS6 (39.4:0). Las medidas corresponden a la biomasa en el día 20 de cultivo. Barras con letras distintas indican diferencias significativas entre las medias de los datos (p<0.05).

Fuente: Los autores.

En resultados similares, Holland y colaboradores reportan aumentos en la concentración de biomasa en cultivos celulares transformados de tabaco al suplementar el medio MS con HNO_3 [20], mientras que Zhang y colaboradores reportan aumentos en la biomasa al cultivar células de *Panax notoginseng* en medios con concentraciones crecientes de KNO_3 [46].

Con relación al efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de expresión de la proteína Cry1Ac, la Fig. 5 muestra que ninguno de los medios probado contribuyó al aumento de la producción de la proteína, al menos en el día 20 de cultivo. La cinética de producción presentada en la Fig. 3 muestra fluctuaciones en la expresión de la proteína a lo largo del cultivo, por lo que es posible que en días anteriores al día 20 se hayan presentado concentraciones mayores en algunos de los medios ensayados. Son necesarios perfiles de expresión completos o muestreos en días intermedios para establecer con mayor certeza si los medios empleados tienen o no efectos favorables sobre los niveles de producción en comparación al MS.

Concentraciones mayores de nitrógeno en el medio de cultivo suponen una mayor disponibilidad de sustrato para la síntesis de aminoácidos y otras moléculas importantes en la biosíntesis de proteínas, razón por la cual, el enriquecimiento de los medios con fuentes adicionales de nitrógeno ha probado ser una estrategia exitosa para aumentar los rendimientos en la producción de proteínas recombinantes en plantas y células vegetales [20,39]. Sin embargo, la respuesta a las diferentes condiciones de nitrato y otras fuentes de nitrógenos está regulada a nivel genético [36,51], por lo que éstas dependerán del hospedero utilizado, la naturaleza de la proteína heteróloga, el constructo utilizado y los eventos particulares de transcripción. En nuestro caso, en todos los medios ensayados se presentaron menores niveles de expresión en comparación con el medio MS en el día 20 de cultivo. La confirmación de la capacidad de las suspensiones aquí estudiadas para expresar la proteína recombinante abre la posibilidad para probar diferentes estrategias para la optimización de la expresión.

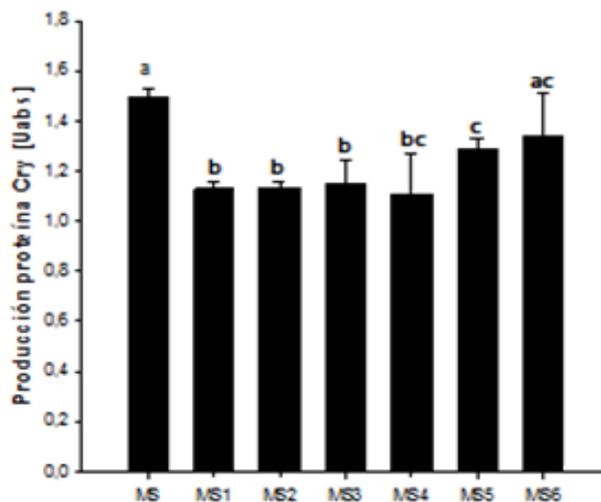


Figura 5. Comparación de la expresión de la proteína recombinante Cry 1Ac en 6 medios de cultivo con distintas concentraciones y radios (NO_3^- : NH_4^+): MS (20.6:18.8), MS1 (0:39.4), MS2 (9.4:10.3), MS3 (9.8:29.5), MS4 (29.5:9.85), MS5 (37.6:41.2) y MS6 (39.4:0). Las medidas corresponden a la expresión de la proteína el día 20 de cultivo. Barras con letras distintas indican diferencias significativas entre las medias de los datos ($p < 0.05$). Fuente: Los autores.

4. Conclusiones

En este trabajo se propone el uso de cultivos *in vitro* de células en suspensión de papa (*S. tuberosum*) como plataforma de expresión de proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento más efectivo para la inducción de callos fue aquél en el que se utilizaron entrenudos cultivados en medio MS suplementado con 2.0 mg L^{-1} de 2,4-D. Con esta combinación se obtuvieron los mayores porcentajes de formación de callo friable (90%) y los menores niveles de organogénesis (0%) y fenolización (10%). Para el establecimiento de las suspensiones celulares se encontró que la supresión de la etapa del raspado de los callos es una buena estrategia para aumentar la eficiencia del proceso de obtención de los cultivos. Con el protocolo que se propone es posible obtener suspensiones en aproximadamente 40 días.

La cinética de crecimiento mostró una tasa máxima de crecimiento específico de 0.12 d^{-1} , con una concentración máxima de biomasa de 1.41 g L^{-1} al final de la fase exponencial. Con la suplementación de nitrógeno, en especial con la adición de KNO_3 , fue posible aumentar la producción de biomasa hasta en un 193%.

Finalmente, la expresión de la proteína Cry 1 Ac se mantuvo a lo largo del tiempo de cultivo, demostrando que el sistema es capaz de expresar proteínas heterólogas. Los resultados anteriores constituyen los primeros pasos en la exploración de este sistema biológico como instrumento para la producción de proteínas recombinantes de interés industrial.

Agradecimientos

Esta investigación estuvo financiada por el Departamento de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (Código HERMES del Proyecto: 25828), por la Gobernación del Atlántico y el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), mediante el Programa para la Formación de Capital Humano de alto nivel, en la modalidad Jóvenes investigadores e innovadores (Convocatoria 673 de 2014).

Referencias

- [1] Smetanska, I., Production of secondary metabolites using plant cell cultures, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 111(1), pp. 187-228, 2008. DOI: 10.1007/10_2008_103
- [2] Yue, W., Ming, Q.-L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.-J., Han, T. and Qin, L.-P., Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36(2), pp. 215-232, 2016. DOI: 10.3109/07388551.2014.923986
- [3] Zhang, W., Franco, C., Curtin, C. and Conn, S., To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a case study, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004(5), pp. 264-271, 2004. DOI: 10.1155/S1110724304404148
- [4] Kovacs, K., Zhang, L., Linforth, R.S.T., Whittaker, B., Hayes, C.J. and Fray, R.G., Redirection of carotenoid metabolism for the efficient production of taxadiene [taxa-4(5),11(12)-diene] in transgenic tomato fruit, *Transgenic Res.*, 16(1), pp. 121-126, 2006. DOI: 10.1007/s11248-006-9039-x
- [5] Ikram, N.K., Zhan, X., Pan, X.-W., King, B.C. and Simonsen, H.T., Stable heterologous expression of biologically active terpenoids in

- green plant cells, *Front. Plant. Sci.*, 6(1), pp. 1-10, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00129
- [6] Wilson, S.A. and Roberts, S.C., Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol. J.*, 10(3), pp. 249-268, 2012. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x
- [7] Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. and Fischer, R., Molecular farming in plants: Host systems and expression technology, *Trends Biotechnol.*, 21(12), pp. 570-578, 2003. DOI: 10.1016/j.tibtech.2003.10.002
- [8] Horn, M.E., Woodard, S.L. and Howard, J.A., Plant molecular farming: Systems and products, *Plant. Cell. Rep.*, 22(10), pp. 711-720, 2004. DOI: 10.1007/s00299-004-0767-1
- [9] Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S. and Reddy, S.V., Advances in plant molecular farming, *Biotechnol. Adv.*, 29(2), pp. 210-222, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.11.004
- [10] Dingermann, T., Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges, *Biotechnol. J.*, 3(1), pp. 90-97, 2008. DOI: 10.1002/biot.200700214
- [11] Jacobs, P.P. and Callewaert, N., N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems, *Curr. Mol. Med.*, 9(7) pp. 774-800, 2009. DOI: 10.2174/156652409789105552
- [12] Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. and Carter, A., Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals, *Nat. Biotechnol.*, 8(11) pp. 1151-1155, 2000. DOI: 10.1038/81132
- [13] Karg, S.R. and Kallio, P.T., *Biotechnol. Adv.*, 27(6), pp. 879-894, 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.07.002
- [14] Huang, T.-K. and McDonald, K.A., Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures, *Biochem. Eng. J.*, 45(3), pp. 168-184, 2009. DOI: 10.1016/j.bej.2009.02.008
- [15] Xu, J., Ge, X. and Dolan, M.C., Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures, *Biotechnol. Adv.*, 29(3), pp. 278-299, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.002
- [16] Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M. and Fischer, R., Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nat. Biotechnol.*, 22(11), pp. 1415-1422, 2004. DOI: 10.1038/nbt1027
- [17] Becerra-Arteaga, A., Mason, H.S. and Shuler, M.L., Production, secretion, and stability of human secreted alkaline phosphatase in tobacco NT1 cell suspension cultures, *Biotechnol. Prog.*, 22(6), pp. 1643-1649, 2006. DOI: 10.1021/bp060151r
- [18] Andrews, L.B. and Curtis, W.R., Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture, *Biotechnol. Prog.*, 21(3), pp. 946-952, 2005. DOI: 10.1021/bp049569k
- [19] Xu, J., Okada, S., Tan, L., Goodrum, K.J., Kopchick, J.J. and Kieliszewski, M.J., Human growth hormone expressed in tobacco cells as an arabinogalactan-protein fusion glycoprotein has a prolonged serum life, *Transgenic Res.*, 19(5), pp. 849-867, 2010. DOI: 10.1007/s11248-010-9367-8
- [20] Holland, T., Sack, M., Rademacher, T., Schmale, K., Altmann, F., Stadlmann, J., Fischer, R. and Hellwig, S., Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture, *Biotechnol. Bioeng.*, 107(2), pp. 278-289, 2010. DOI: 10.1002/bit.2280
- [21] Park, C.-I., Lee, S.-J., Kang, S.-H., Jung, H.-S., Kim, D.-I. and Lim, S.-M., Fed-batch cultivation of transgenic rice cells for the production of hCTLA4Ig using concentrated amino acids, *Process Biochem.*, 45(1), pp. 67-74, 2010. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.08.004
- [22] Corbin, J.M., Hashimoto, B.I., Karuppanan, K., Kyser, Z.R., Wu, L., Roberts, B.A., Noe, A.R., Rodriguez, R.L., McDonald, K.A. and Nandi, S., Semicontinuous bioreactor production of recombinant butyrylcholinesterase in transgenic rice cell suspension cultures, *Plant Biotechnol.*, 7(1), pp. 1-10, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00412
- [23] Fox, J.L., First plant-made biologic approved, *Nat. Biotechnol.*, 30(6), pp. 472-472, 2012. DOI: 10.1038/nbt0612-472
- [24] Torabi, F., Majad, A., Ehsanpour, A.A., Plant regeneration from cell suspension culture of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Pak. J. Biol. Sci. PJBS*, 11(5) pp. 778-782, 2008.
- [25] Sapko, O.A., Utarbaeva, A.S. and Makulbek, S., Effect of fusaric acid on prooxidant and antioxidant properties of the potato cell suspension culture, *Russ. J. Plant Physiol.*, 58(5), pp. 828-835, 2011. DOI: 10.1134/S1021443711050190
- [26] Sabbah, S. and Tal, M., Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress, *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 21(2), pp. 119-128, 1990. DOI: 10.1007/BF00033430
- [27] Rukavtsova, E.B., Rudenko, N.V., Puchko, E.N., Zakharchenko, N.S. and Buryanov, Y.I., Study of the immunogenicity of hepatitis B surface antigen synthesized in transgenic potato plants with increased biosafety, *J. Biotechnol.*, 203(1), pp. 84-88, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.03.019
- [28] Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., Hnatuszko-Konka, K., Luchniak, P. and Kononowicz, A.K., Expression of recombinant staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator of bacterial origin, in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28(3), pp. 1115-1123, 2012. DOI: 10.1007/s11274-011-0912-2
- [29] Park, Y. and Cheong, H., Expression and production of recombinant human interleukin-2 in potato plants, *Protein Expr. Purif.*, 25(1), pp. 160-165, 2002. DOI: 10.1006/prep.2002.1622
- [30] He, D.-M., Qian, K.-X., Shen, G.-F., Li, Y.-N., Zhang, Z.-F., Su, Z.-L. and Shao, H.-B., Stable expression of foot-and-mouth disease virus protein VP1 fused with cholera toxin B subunit in the potato (*Solanum tuberosum*), *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 55(2), pp. 159-163, 2007. DOI: 10.1006/prep.2002.162210.1016/j.colsurfb.2006.11.043
- [31] Villalobos, E.S.T., Torres, J., Moreno, C. and Arango, R., Development of transgenic lines from a male-sterile potato variety, with potential resistance to *Tecia solanivora* Povolny. *Agron. Colomb.*, 30(2), pp. 163-171, 2012.
- [32] Murashige, T. and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15(3) pp. 473-497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- [33] Castro-Concha, L., Escobedo, R. and de Miranda-Ham, M., Measurement of cell viability in vitro cultures, in: Loyola-Vargas, V. and Vázquez-Flota, F. Eds., *Plant Cell Culture Protocols*, Humana Press, 2006, pp. 71-76. DOI: 10.1385/1-59259-959-1:071
- [34] Farzana, S., Hossain, M., Kabir, M.F., Roy, M. and Sarker, S.R., Callus induction and plant regeneration from internodal and leaf explants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars, *World J. Agric. Sci*, 3(1), pp. 1-6, 2007.
- [35] Chakravarty, B., Wang-Pruski, G., Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influencing Agrobacterium-mediated transformation, *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 1 (5), pp. 409-416, 2010. <https://doi.org/10.4236/abb.2010.15054>
- [36] Kumlay, A.M. and Ercisli, S., Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 29(6), pp. 1075-1084, 2015. DOI: 10.1080/13102818.2015.1077685
- [37] Kumar, V., Rashmi, D. and Banerjee, M., Callus induction and plant regeneration in *Solanum tuberosum* L. cultivars (Kufri Chipsona 3 and MP-97/644) via leaf explants, *Int. Res. J. Biol. Sci.*, 3(6), pp. 66-72, 2014.
- [38] Mustafa, N.R., de Winter, W., van Iren, F. and Verpoorte, R., Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures, *Nat. Protoc.*, 6(6), pp. 715-742, 2011. DOI: 10.1038/nprot.2010.144
- [39] Zabala, M.A., Angarita, M., Restrepo, J.M., Caicedo, L.A. and Perea, M., Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*, *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, 46(3), pp. 233-238, 2009. DOI: 10.1007/s11627-009-9249-z
- [40] Byth, H.A., Mchunu, B.I., Dubery, I.A. and Bornman, L., Assessment of a simple, non-toxic Alamar blue cell survival assay to monitor tomato cell viability, *Phytochem. Anal. PCA*, 12(5), pp. 340-346, 2001. DOI: 10.1002/pca.595
- [41] Wucherpfennig, T., Schulz, A., Pimentel, J.A., Corkidi, G., Sieblitz, D., Pump, M., Gorr, G., Schütte, K., Wittmann, C. and Krull, R., Viability characterization of *Taxus chinensis* plant cell suspension cultures by rapid colorimetric- and image analysis-based techniques, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37(9), pp. 1799-1808, 2014. DOI: 10.1007/s00449-014-1153-

- [42] Choi, S.-M., Lee, O.-S., Kwon, S.-Y., Kwak, S.-S., Yu, D.-Y. and Lee, H.-S., High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures, *Biotechnol. Lett.*, 25(3), pp. 213-218, 2003.
- [43] Gao, J. and Lee, J.M., Effect of oxygen supply on the suspension culture of genetically modified tobacco cells, *Biotechnol. Prog.*, 8(4), pp. 285-290, 1992. DOI: 10.1021/bp00016a004
- [44] Dong, H.-D. and Zhong, J.-J., Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation, sucrose feeding and ethylene incorporation, *Enzyme Microb. Technol.*, 31(1-2), pp. 116-121, 2002. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00079-0
- [45] Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z. and Saeed, M., Current approaches toward production of secondary plant metabolites, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 4(1), pp. 10-20, 2012. DOI: 10.4103/0975-7406.92725
- [46] Zhang, Y.-H., Zhong, J.-J. and Yu, J.-T., Effect of nitrogen source on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of panax notoginseng, *Biotechnol. Prog.*, 12(4), pp. 567-571, 1996. DOI: 10.1021/bp9600391
- [47] Panda, A.K., Bisaria, V.S. and Mishra, S., Alkaloid production by plant cell cultures of *Holarrhena antidysenterica*: II. Effect of precursor feeding and cultivation in stirred tank bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 39(10), pp. 1052-1057, 1992. DOI: 10.1002/bit.260391009
- [48] Kaul, K. and Hoffman, S.A., Ammonium ion inhibition of *Pinus strobus* L. callus growth, *Plant Sci.*, 8(2), pp. 169-173, 1993. DOI: 10.1016/0168-9452(93)90088-H
- [49] Fujiuchi, N., Matsuda, R., Matoba, N. and Fujiwara, K., Effect of nitrate concentration in nutrient solution on hemagglutinin content of *Nicotiana benthamiana* leaves in a viral vector-mediated transient gene expression system, *Plant Tissue Cult. Lett.*, 31(3), pp. 207-211, 2014.
- [50] Peng, M., Bi, Y.-M., Zhu, T. and Rothstein, S.J., Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA, *Plant Mol. Biol.*, 65(6), pp. 775-797, 2007. DOI: 10.1007/s11103-007-9241-0
- [51] Gutiérrez, R.A., Lejay, L.V., Dean, A., Chiaromonte, F., Shasha, D.E. and Coruzzi, G.M., Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*, *Genome Biol.*, 8(1), pp. R7, 2007. DOI: 10.1186/gb-2007-8-1-r7

R.E Arango-Isaza, es Médico de la Universidad CES, PhD en Biología molecular del Instituto Weizmann de Ciencias, Israel. Profesor asociado de la Escuela de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Su campo de investigación está centrado en la biología molecular aplicada a la agricultura.
ORCID: 0000-0002-7276-6035



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE MINAS

Área Curricular de Ingeniería
Química e Ingeniería de Petróleos

Oferta de Posgrados

Maestría en Ingeniería - Ingeniería Química
Maestría en Ingeniería - Ingeniería de Petróleos
Doctorado en Ingeniería - Sistemas Energéticos

Mayor información:

E-mail: qcaypet_med@unal.edu.co
Teléfono: (57-4) 425 5317

C.J. Nova-López, recibió su título en Ingeniería Biológica de la Universidad Nacional de Colombia en 2014. Actualmente se desempeña como becario del programa jóvenes investigadores de Colciencias y adelanta estudios de Maestría en Biotecnología. Su área de actuación se centra en la biotecnología vegetal y animal.

ORCID: 0000-0003-3128-4539

J.M Muñoz-Pérez, recibió su título en Ingeniería Biológica de la Universidad Nacional de Colombia en 2012. Esp. en Gestión Ambiental de la Facultad de Minas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y estudiante de Maestría en Biotecnología en la misma. Su área de actuación se centra en la biotecnología vegetal y la simulación de bioprocesos.

ORCID: 0000-0001-5403-0369

L.F. Granger-Serrano, recibió su título en Ingeniería Biológica de la Universidad Nacional de Colombia en 2012. MSc. en Biotecnología en la misma Universidad. Su área de actuación se concentra en la biotecnología vegetal y la citogenética.

ORCID: 0000-0001-8426-924X

M.E Arias-Zabala, es Ing. Químico de la Universidad de Antioquia, PhD en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Actualmente se desempeña como profesor asociado de la Escuela de química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y es director del área curricular de biotecnología de la misma. Su área de investigación está centrada en las fermentaciones industriales.

ORCID: 0000-0001-8190-7760.