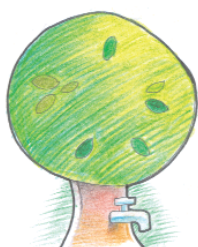


Ingeniería metabólica: controlando la química vegetal



Muchas plantas producen sustancias de interés para el hombre. La ingeniería genética puede manipular la forma en que las fabrican, aumentando su eficiencia y logrando que produzcan compuestos según nuestras necesidades.

Felipe A. Vázquez Flota y María de Lourdes Miranda Ham

INTRODUCCIÓN

Las plantas son fuente de un gran número de productos útiles. Además de suministrar alimentos, combustibles y materiales de construcción, nos proveen de aromas, colores, medicinas y sabores, gracias a su capacidad para producir compuestos denominados *metabolitos secundarios*.

Los metabolitos secundarios, también llamados *productos naturales*, se definen como compuestos de bajo peso molecular, con una distribución limitada y que no intervienen de manera directa en el crecimiento y desarrollo de las plantas que los producen. No obstante, representan una interfase química entre las plantas y su entorno, puesto que cumplen funciones en la atracción de polinizadores y en la defensa contra patógenos y herbívoros. Cada

planta cuenta con un arsenal propio de metabolitos secundarios que le permiten llevar a cabo este tipo de interacciones. Se conocen cerca de 110 mil ejemplos, divididos en diferentes grupos de acuerdo a la forma en que los fabrica la planta y a su estructura química. Los terpenoides, derivados del pirofosfato de isopentenilo, son los compuestos más abundantes, seguidos por los alcaloides y los fenilpropanoides. Se estima que anualmente se descubren cerca de 5 mil nuevos compuestos.

Además de las funciones ecológicas descritas, los metabolitos secundarios tienen una gran importancia comercial e industrial, ya que se utilizan en la elaboración de colorantes, insecticidas, perfumes, medicamentos y otros productos de consumo. Sólo por citar un caso concreto, se estima que en los Estados Unidos el 25 por ciento de las formulaciones farmacéuticas en el mercado contienen al menos un producto de origen vegetal. Por ello, desde hace muchos años se ha intentado incrementar los rendimientos de estos productos en las plantas de donde se obtienen. No obstante, debido a sus funciones, la síntesis de metabolitos secundarios es muy sensible a las condiciones ambientales, lo que dificulta esta tarea.

Durante los años sesenta, con el desarrollo de la tecnología del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se generaron líneas celulares a partir de varias especies productoras de metabolitos. La independencia de las condiciones ambientales en este sistema, junto con la ya entonces demostrada totipotencialidad de las células vegetales, hizo albergar esperanzas de que la capacidad de síntesis se mantendría intacta, aun en las condiciones de desorganización de los tejidos que se presentan en el cultivo *in vitro*. Estrategias similares a las que habían sido exitosas para incrementar la producción de metabolitos en microorganismos, como esquemas para la selección de cepas sobreproductoras y la optimización de la composición de medio de cultivo, también se aplicaron a los cultivos *in vitro* de células vegetales. No obstante, en muy pocos casos se obtuvieron líneas celulares capaces de acumular compuestos químicos en niveles similares a los observados en las plantas.

Estos trabajos, sin embargo, fueron importantes para comprender algunos aspectos de la síntesis de metabolitos secundarios, como que su formación en muchos casos requiere de cierto grado de organización de los tejidos.

La síntesis química de precursores marcados radiactivamente en posiciones precisas, junto con el perfeccionamiento de las técnicas de purificación de proteínas y de análisis cromatográfico, ayudaron a demostrar que los metabolitos secundarios se forman por acción de enzimas muy particulares. Las enzimas son catalizadores biológicos con una gran especificidad tanto para los sustratos que utilizan como para los productos que generan. Los avances de la tecnología del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante han elucidado los complicados sistemas de regulación que operan sobre las vías de síntesis de estos compuestos, de tal modo que actualmente se acepta que la síntesis de metabolitos secundarios representa una forma de especialización bioquímica.

El esclarecimiento de los procesos que gobiernan la síntesis de metabolitos secundarios, junto con el aislamiento de algunos de los genes involucrados en el proceso, han despertado un nuevo interés en ellos, no sólo por el reto intelectual que significa definir sus funciones específicas, sino también con miras a nuevas formas de explotación comercial mediante la aplicación de una rama de la biotecnología de reciente desarrollo, la *ingeniería metabólica*.

Durante los años sesenta,
con el desarrollo de
la tecnología del cultivo *in vitro*
de tejidos vegetales,
se generaron líneas celulares
a partir de varias especies
productoras de metabolitos

LA INGENIERÍA METABÓLICA COMO ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES

La biotecnología aplicada a las plantas pretende mejorar los rendimientos y la calidad de sus productos derivados. Algunas de las metas relacionadas con los metabolitos secundarios incluyen el aumento en los rendimientos de compuestos químicos de interés industrial, la obtención de flores con nuevos colores, la producción de alimentos y bebidas no sólo de mejor calidad nutritiva, sino también con aromas y sabores nuevos, y la generación de plantas con una mayor resistencia a plagas y enfermedades, entre otras.

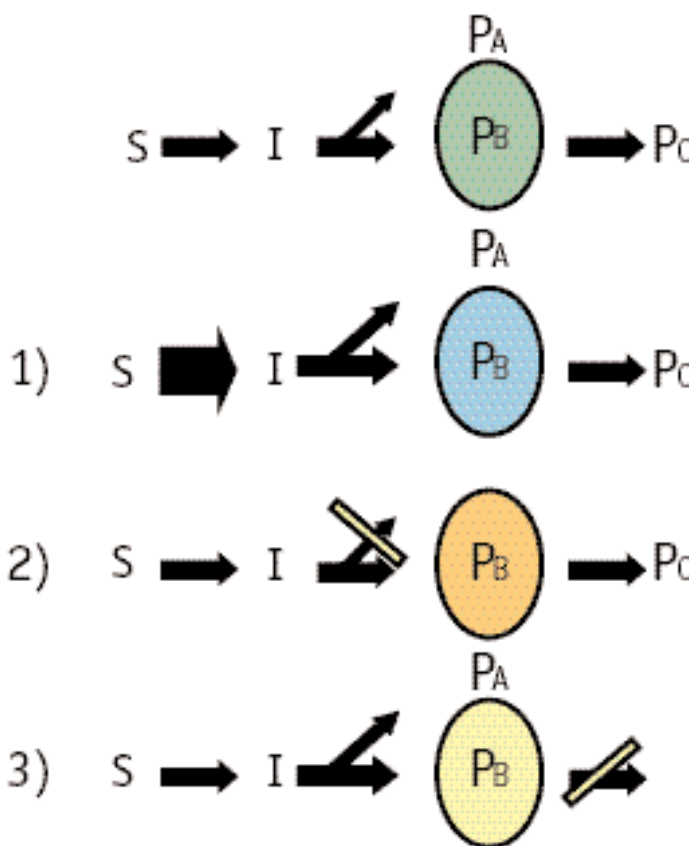


Figura 1. Estrategias para aumentar la acumulación de carbono en un producto determinado. El sustrato S da lugar al intermediario I que es común para la síntesis de PA y PB. PB está sujeto, además, a otra modificación para formar PC. Existen tres posibilidades para incrementar la formación de PB: 1) aumentar el flujo de S en toda la vía, 2) bloquear el paso que conduce a la formación de PA, y 3) bloquear el paso que lleva a la formación de PC.

La ingeniería metabólica busca el mejoramiento de la actividad celular mediante la manipulación del metabolismo, utilizando la tecnología del ADN recombinante (Bailey, 1991). Conceptualmente, el objetivo de la ingeniería metabólica es aumentar la cantidad de carbono que en el metabolismo se destina a la formación de un producto de interés. Para ello, se requiere de un profundo conocimiento de la ruta metabólica que conduce a la formación de dicho producto, así como de la relación que ésta guarda con otras que utilicen intermediarios comunes. La tarea no es sencilla, ya que en el medio celular pueden ocurrir más de mil reacciones enzimáticas simultáneas, en coordinación con complejos sistemas membranales de transporte. De manera general, el objetivo descrito puede alcanzarse mediante dos estrategias relacionadas entre sí y que involucran la manipulación de algunas de las enzimas de la ruta metabólica.

La primera de estas estrategias contempla el aumento del flujo de carbono hacia el producto de interés. Esto puede lograrse dirigiendo una mayor cantidad de este elemento hacia toda la ruta, o bien bloqueando los pasos que desvían los intermediarios hacia productos alternos (Figura 1). Esto, a su vez, se consigue aumentando la actividad de una enzima clave o bien reduciendo la de otras enzimas que utilizan a los mismos intermediarios para la formación de productos diferentes al de interés (Figura 1). La segunda estrategia tiene que ver con el bloqueo de las enzimas involucradas en la degradación del producto, o bien de aquellas que lo utilizan en la síntesis de otros derivados (Figura 1). Debe notarse que en ambos casos se propone modificar de manera específica la actividad de una enzima bien definida, y que la diferencia radica en la posición que dicha enzima ocupa, antes o después de la reacción que genera el producto de interés. La selección de una u otra alternativa dependerá del conocimiento del que se disponga sobre esa ruta.

La primera de estas estrategias contempla el aumento del flujo de carbono hacia el producto de interés. Esto puede lograrse dirigiendo una mayor cantidad de este elemento hacia toda la ruta, o bien bloqueando los pasos que desvían los intermediarios hacia productos alternos (Figura 1). Esto, a su vez, se consigue aumentando la actividad de una enzima clave o bien reduciendo la de otras enzimas que utilizan a los mismos intermediarios para la formación de productos diferentes al de interés (Figura 1). La segunda estrategia tiene que ver con el bloqueo de las enzimas involucradas en la degradación del producto, o bien de aquellas que lo utilizan en la síntesis de otros derivados (Figura 1). Debe notarse que en ambos casos se propone modificar de manera específica la actividad de una enzima bien definida, y que la diferencia radica en la posición que dicha enzima ocupa, antes o después de la reacción que genera el producto de interés. La selección de una u otra alternativa dependerá del conocimiento del que se disponga sobre esa ruta.

lo utilicen en la síntesis de otros derivados (Figura 1). Debe notarse que en ambos casos se propone modificar de manera específica la actividad de una enzima bien definida, y que la diferencia radica en la posición que dicha enzima ocupa, antes o después de la reacción que genera el producto de interés. La selección de una u otra alternativa dependerá del conocimiento del que se disponga sobre esa ruta.

BASES TEÓRICAS PARA EL DISEÑO DE UN PROGRAMA DE INGENIERÍA METABÓLICA

Sólo se conocen con detalle unas cuantas rutas de síntesis de metabolitos secundarios, y en muchos casos este conocimiento se reduce a la identidad de los intermediarios. Además de esto,

el diseño de un esquema de ingeniería metabólica requiere la identificación de las enzimas involucradas en esa ruta, especialmente de las implicadas en los pasos limitantes. La forma más evidente para incrementar el nivel de actividad de una enzima es aumentar varias veces la cantidad de la misma, para que ocurra una catálisis continua. No obstante, algunos factores que deben conocerse antes de iniciar esta empresa incluyen la arquitectura de la ruta metabólica, el tipo de regulación que opera sobre las enzimas que participan, y su distribución en el interior de la célula y a través de los diferentes tejidos de la planta.

La *arquitectura de una ruta metabólica* se refiere a las ramificaciones que la ruta presenta, y que puede variar desde rutas lineales, relativamente sencillas, hasta intrincadas redes metabólicas. Puesto que los metabolitos secundarios son derivados del metabolismo primario, la mayoría de las rutas que conducen a su síntesis son complejas, con diferentes grados de ramificación y por ello con frecuencia un mismo intermediario puede ser utilizado por dos o más enzimas, generando productos diferentes que seguirán rutas metabólicas distintas. En estos casos, el aumento en la eficiencia de la enzima que canaliza dicho sustrato hacia la rama de interés puede dar como resultado una mayor producción del metabolito. Como ejemplo, el dihidrokaempferol (Figura 2) puede ser el sustrato tanto para la dihidrokaempferol 4-reductasa, como para la flavonoide-3'-hidroxilasa. El producto de la primera enzima es la leucopelarqonidina, un precursor para la síntesis de antocianinas, pigmentos de las flores, mientras que la flavonoide-3'-hidroxilasa genera la dihidroquercetina, un intermediario para la síntesis de catequinas (Figura 2), compuestos con efectos antioxidantes y que al conjugarse entre sí forman los taninos (los cuales tienen importancia comercial en la industria de los alimentos y para el curtido de pieles). De este modo, dependiendo del producto que se pretenda obtener, pigmentos o taninos, puede modificarse la actividad de una u otra enzima.

Es importante recordar que, en ocasiones, para lograr una mayor catálisis no basta una mayor cantidad de la enzima. Fre-

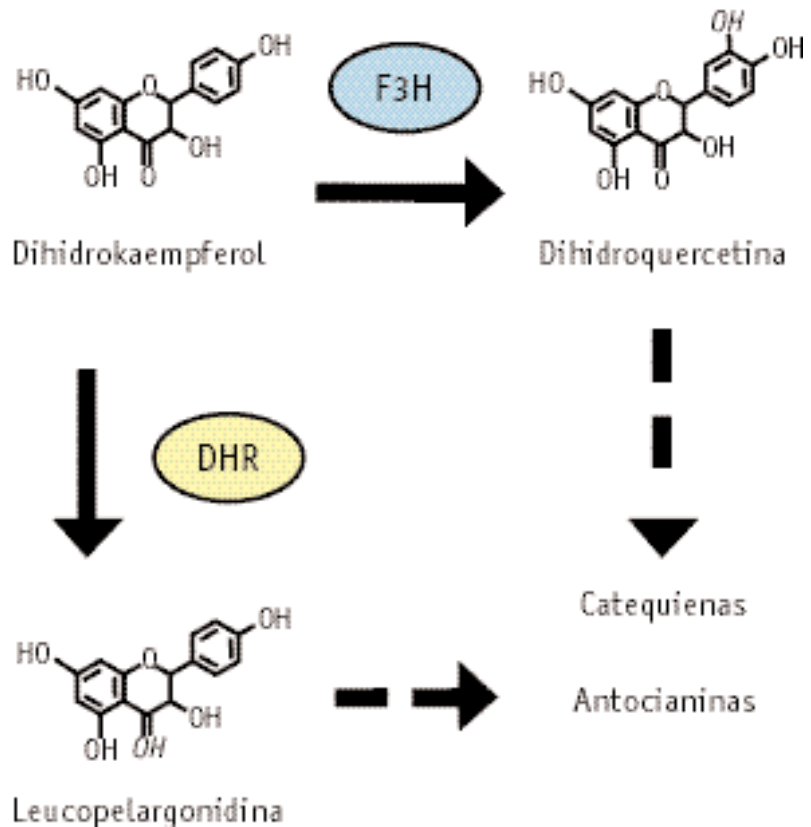


Figura 2. Un mismo intermediario (dihidrokaempferol) puede dar lugar a dos tipos de productos diferentes: antocianinas, vía leucopelarqonidina, o catequinas, vía dihidroquercetina, dependiendo de la eficiencia de las enzimas que lo utilizan: **DHR**, dihidrokaempferol 4-reductasa; **F3H**, flavonol 3'-hidroxilasa.

Además de estos aspectos relacionados con el funcionamiento propio de las enzimas, una de las características del metabolismo secundario es que generalmente está restringido a ciertos tipos de células especializadas

cuentemente la regulación de la actividad de una enzima se da al nivel de la proteína misma. Tal es el caso de la inhibición por retroalimentación, donde el producto de la reacción modula la actividad de la enzima. Este mecanismo es de gran importancia en la regulación de la síntesis de los aminoácidos aromáticos, como se discute a continuación. El último intermediario común para la síntesis de triptofano, fenilalanina y tirosina es el corismato, el cual es sustrato tanto de la corismato mutasa como de la antranilato sintasa. El producto de la corismato mutasa es el prefrenato, un intermediario para la síntesis de tirosina y fenilalanina, mientras que el antranilato, formado por la antranilato sintasa, dará lugar al triptofano. El triptofano es precursor de un gran número de metabolitos secundarios, como los alcaloides indólicos, y una estrategia atractiva para aumentar la síntesis de éstos sería incrementar la formación del aminoácido mediante el incremento en la actividad de la antranilato sintasa. No obstante, esta enzima deja de funcionar cuando hay una acumulación excesiva de triptofano. De este modo, si las enzimas que canalizan el triptofano hacia la síntesis de alcaloides no lo utilizan con la misma velocidad con la que se produce, la acumulación del aminoácido conducirá a la inhibición de la antranilato sintasa, impidiendo así que su síntesis continúe. Aunque algunas antranilato sintasas bacterianas son insensibles a la inhibición por triptofano, la expresión de estas enzimas en células vegetales no solucionaría el problema, ya que el exceso de triptofano también da lugar a la activación de la corismato mutasa, lo que disminuiría la cantidad de corismato disponible para la antranilato sintasa y la síntesis de triptofano. Por tanto, la existencia de este tipo de regulación debe considerarse cuidadosamente antes del diseño de una estrategia de ingeniería metabólica.

Además de estos aspectos relacionados con el funcionamiento propio de las enzimas, una de las características del metabolismo secundario es que generalmente está restringido a ciertos tipos de células especializadas. En ocasiones, las enzimas que participan en la síntesis de un compuesto pueden estar distribuidas en más de un tipo celular. Un ejemplo de lo intrincado que puede llegar a ser esta distribución es la síntesis del alcaloide vindolina en *Catharanthus roseus* (St-Pierre *et al.*, 1999). En las hojas de esta planta, las enzimas involucradas en los dos primeros pasos de síntesis, la triptofano descarboxilasa y la estricotidina sintasa, se encuentran localizadas exclusivamente en las células de la epidermis, mientras que aquellas involucradas en las dos últimas reacciones, la desacetoxivindolina 4-hidroxilasa y la desacetilvindolina acetiltransferasa sólo se encuen-

tran en ciertos tipos celulares denominados idioblastos y células laticíferas. La distribución de estas enzimas implica que los intermediarios están por tanto distribuidos en tipos celulares distintos. De este modo, para que una enzima pueda utilizar uno de estos intermediarios será necesario dirigir su expresión al tipo celular correspondiente. Más aún, en muchos casos estas enzimas están distribuidas en diferentes organelos dentro de una misma célula. Por ejemplo, las enzimas de la síntesis de los alcaloides de *Catharanthus* se hallan distribuidas en el citoplasma, la vacuola, el tonoplasto, el retículo endoplásmico y el cloroplasto. Este tipo de distribución apunta a la existencia de sistemas para el transporte de los intermediarios por lo que, aunado a los niveles de actividad enzimática, la eficiencia de estos sistemas puede resultar un factor limitante.

HERRAMIENTAS DE LA INGENIERÍA METABÓLICA

De acuerdo a su definición, la ingeniería metabólica utiliza la tecnología del ADN recombinante para la modificación de la actividad enzimática (Bailey, 1991). Los esquemas de ingeniería metabólica pueden requerir tanto del aumento como de la disminución de la actividad de una enzima, si bien en ocasiones será necesario introducir una actividad nueva o modificada. La expresión de un gen involucra la formación de una molécula de ácido ribonucleico (ARN) a partir de la secuencia de ADN que ese gen representa (transcripción), así como la posterior formación de la proteína funcional a partir del ARN (traducción). La expresión del gen se encuentra bajo el control del promotor, que es un segmento de ADN al que se une la enzima polimerasa de ARN para iniciar el proceso de la transcripción. La rapidez y frecuencia con que la polimerasa inicia la transcripción están moduladas por ciertas proteínas reguladoras denominadas factores transcripcionales. La unión de estos factores a sitios específicos dentro del promotor controla la expresión génica en tejidos específicos, o bien ésta se ajusta a las condiciones ambientales y de desarrollo. No obstante, existen algunos promotores que pueden mantener la expresión continua de un gen en todos los tejidos de una planta y bajo cualquier condición. Éstos reciben el nombre de promotores constitutivos, y representan una valiosa herramienta para la ingeniería genética. El promotor constitutivo más empleado en plantas es el 35S del virus del mosaico de la coliflor. Este promotor es, por lo general, suficiente para garantizar la expresión constante de un gen en todos los tejidos. Sin embargo, en ocasiones es deseable restringir la expresión de un gen a un órgano específico. Esto

Los esquemas de ingeniería metabólica pueden requerir tanto del aumento como de la disminución de la actividad de una enzima, si bien en ocasiones será necesario introducir una actividad nueva o modificada

puede lograrse construyendo promotores quiméricos que contengan, además de las secuencias del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, las secuencias que dirijan la expresión de dicho gen al tejido o célula donde sea necesario. Puesto que la mayoría de estas secuencias son universales, es posible combinar las que ya se conozcan, aún proviniendo de especies diferentes. Más aún, en ocasiones se requiere dirigir la expresión a un compartimento subcelular en particular. Esto puede lograrse mediante la adición de secuencias que codifiquen para péptidos de tránsito, que permiten dirigir algunas proteínas hacia un organelo específico. Más adelante se presentan ejemplos que ilustran el poder de esta tecnología.

Tan importante como la tecnología para diseñar y construir estos genes quiméricos es la que permite transferirlos a plantas huéspedes. Para ello, se requiere insertar de manera estable el nuevo gen en los cromosomas. Esto se logra aprovechando la capacidad que tiene

De hecho, entre los primeros objetivos de esta estrategia estuvo la obtención de flores de nuevos colores, manipulando los genes para la síntesis de antocianinas

Agrobacterium tumefaciens, bacteria frecuentemente encontrada en los suelos, para insertar segmentos de ADN en el genoma de las plantas que infecta, o bien, bombardeando células con partículas metálicas recubiertas con ADN. En ambos casos, solamente unas cuantas células del tejido empleado resultarán genéticamente modificadas, por lo que será necesario generar individuos completos a partir de las células que ahora contienen la nueva información. Esto es posible gracias a las técnicas del cultivo de células *in vitro*, que permiten controlar el grado de organización que presentan. Así, la culminación exitosa de un proceso de ingeniería metabólica depende de la eficiencia de estas tres tecnologías complementarias.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN DE LA INGENIERÍA METABÓLICA PARA OBTENER METABOLITOS SECUNDARIOS

A continuación se presentan algunos de logros obtenidos cuando se aplicó la ingeniería metabólica a las vías de síntesis de productos naturales. Esta lista aumenta día con día, conforme se avanza en el conocimiento de las características y la regulación de las enzimas involucradas en estas vías.

1. La síntesis de flavonoides es un ejemplo del éxito de la ingeniería metabólica, dado el profundo conocimiento que se tiene de esta vía. De hecho, entre los primeros objetivos de esta estrategia estuvo la obtención de flores de nuevos colores, manipulando los genes para la síntesis de antocianinas. El primer resultado fue la obtención de plantas de petunia con flores rojas, al introducir el gen para la dihidrokaempferol 4-reductasa de maíz en mutantes de petunia que producían flores blancas, pues carecían de pelargonidina (figura 2). El producto de la dihidrokaempferol 4-reductasa es la leucopelargonidina que, mediante dos hidroxilaciones, se convierte en pelargonidina (Meyer *et al.*, 1987).

2. Los carotenoides son compuestos derivados del pirofosfato de isopentenilo que se producen en los plástidos. Dan color a los frutos y funcionan como pigmentos auxiliares en la fotosíntesis. Sus rutas de síntesis se conocen ampliamente, y por ello se encuentran entre los blancos de la ingeniería metabólica. La *astaxantina* es un ceto-carotenoide hidroxilado que se adiciona al alimento utilizado en las granjas de salmón para que su carne se tiña del típico color rosa-naranja. Este pigmento se obtiene de manera comercial por medio de un costoso proceso de síntesis química, mientras que los peces en su hábitat natural adquieren este color particular al ingerir el alga unicelular

Haematococcus pluvialis. Recientemente, se logró la síntesis de astaxantina en tabaco a partir del beta-caroteno. Los nectarios de las flores en esta planta contienen cromoplastos que sintetizan beta-caroteno y xantofilas, pero no ceto-carotenoides (Figura 3a). Dado que estos tejidos tienen una actividad intrínseca de caroteno hidroxilasa, la expresión del gen de la beta-caroteno cetolasa de *H. pluvialis* en ellos fue suficiente para obtener la astaxantina (Figura 3). La acumulación del pigmento provocó un cambio de color en los nectarios: de amarillo a rojo. La expresión exclusiva en los cromoplastos de este tejido se logró fusionando el péptido de tránsito de la fitoeno desaturasa de tomate al gen de la beta-caroteno cetolasa y dejando esta construcción bajo el control del promotor del gen de la fitoeno desaturasa de tomate, que sólo se expresa en frutos y flores (Mann *et al.*, 2000).

3. En regiones muy pobres de Asia, África y Latinoamérica, millones de niños sufren de severas deficiencias de vitamina A, puesto que dependen casi por completo del arroz como alimento y este grano no es capaz de sintetizar beta-caroteno, precursor de esta vitamina. El beta-caroteno se sintetiza a partir del fitoeno, el cual es producto del geranylgeranyl pirofosfato, por acción de la fitoeno sintasa. La introducción de cuatro dobles enlaces al fitoeno da lugar al licopeno, y mediante la licopeno ciclasa se genera el beta-caroteno (Figura 3b). En plantas, se requiere de la acción de dos desaturasas para la formación de los cuatro dobles enlaces, mientras que en bacterias una sola enzima, la caroteno desaturasa, cataliza su formación. El endospermo inmaduro del arroz puede formar geranylgeranyl pirofosfato, y haciendo uso de la tecnología del ADN recombinante se logró introducir la capacidad de síntesis del beta-caroteno al insertar el gen correspondiente a la caroteno desaturasa de la bacteria *Erwinia uredovora*, y los genes de la fitoeno sintasa y de la licopeno ciclasa de narciso. Para ello, fue necesario construir genes quiméricos

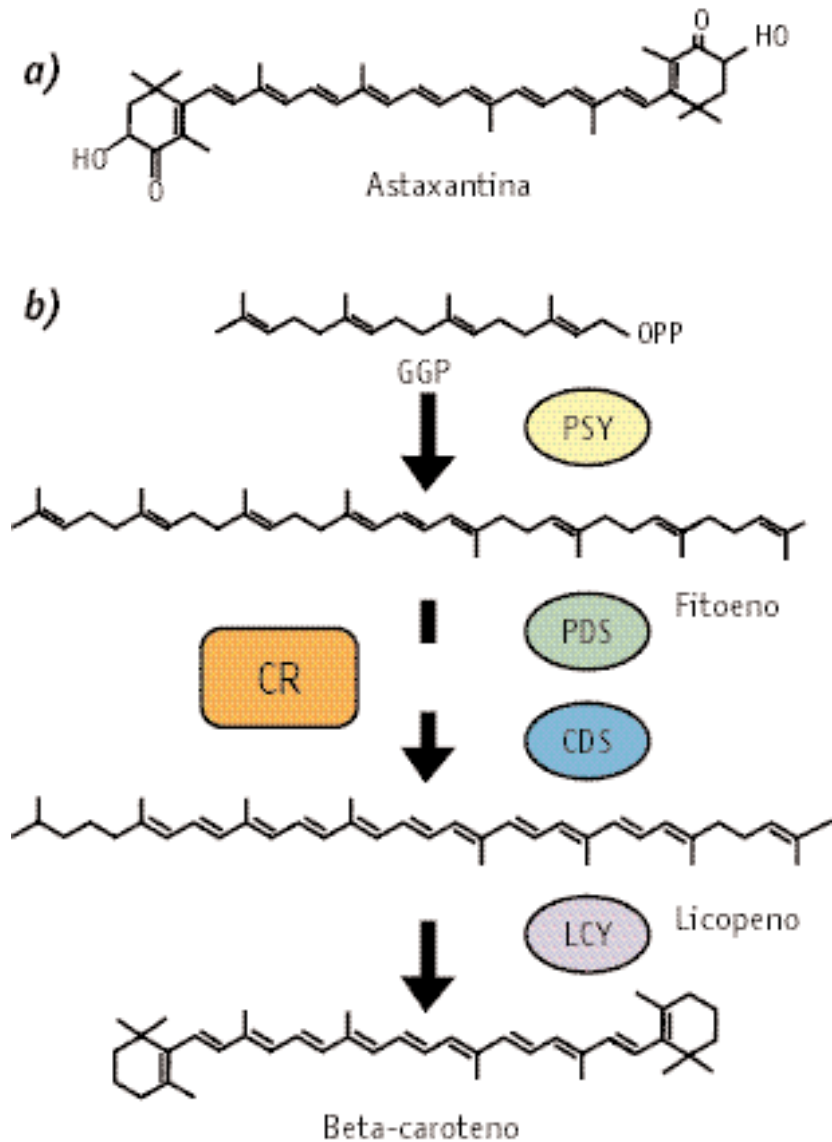


Figura 3. a) Estructura del ceto-carotenoide astaxantina; b) Ruta de síntesis del beta-caroteno. GGP, geranylgeranyl pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; CDS, caroteno desaturasa; LCY, licopeno sintasa; CR, caroteno reductasa. La introducción de la capacidad de síntesis del beta-caroteno en el endospermo de arroz se logró insertando los genes para la PSY y LCY de narciso y el correspondiente a la CR de *Erwinia*.

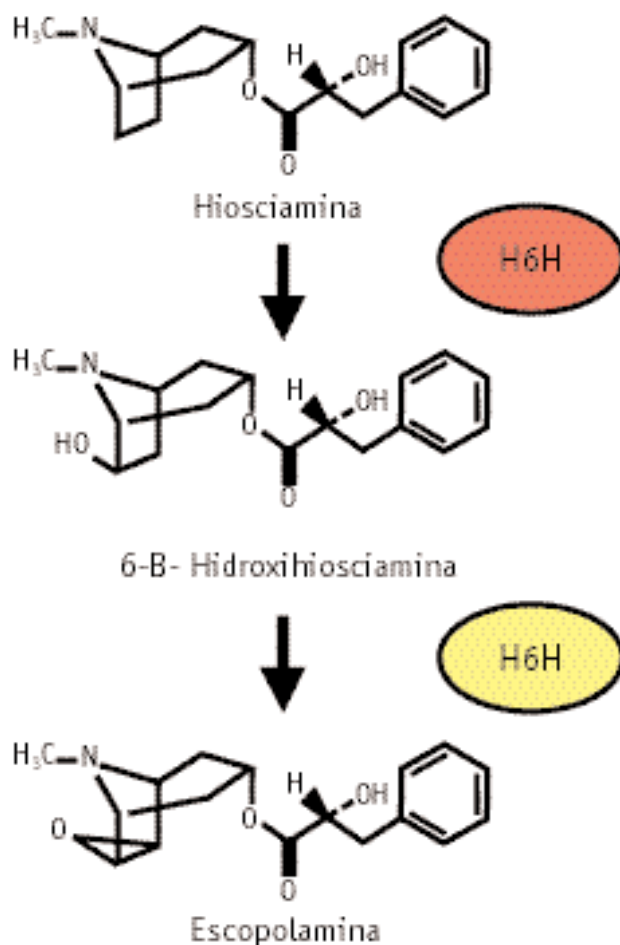


Figura 4. Transformación de la hiosciamina en escopolamina. H6H, hiosciamina 6 beta-hidroxilasa.

fusionando promotores y secuencias para péptidos de tránsito que pudieran dirigir su expresión a los cromoplastos del endospermo. Estos experimentos dieron como resultado granos de arroz con un característico color dorado y con una mejor calidad alimenticia, atribuida a la presencia del beta-caroteno (Ye *et al.*, 2000).

4. La pasta residual de la extracción del aceite de las semillas del nabo (*Brassica napus*) es rica en proteínas. Sin embargo, la presencia de glucosinolatos indólicos limita su uso como alimento para el ganado vacuno. Los glucosinolatos son derivados sulfurados de la glucosa y de ciertos aminoácidos, que le confieren resistencia contra diferentes insectos a las plantas. En *Brassica*, estos compuestos se derivan principalmente del triptófano. De este modo, al impedir la acumulación de este aminoácido en las semillas se bloquearía la formación de los glucosinolatos. En un apartado anterior, se hizo referencia a la enzima triptófano descarboxilasa de *C. roseus*, que produce triptamina a partir de la descarboxilación del triptófano. La introducción del gen de la triptófano descarboxilasa en *Brassica* eliminó casi por completo la acumulación de los glucosinolatos en las semillas, ya que el triptófano era rápidamente transformado en triptamina, la cual no participa en la síntesis de estos compuestos (Chavadej *et al.*, 1994).

5. Los cultivos *in vitro* de raíces de algunas Solanáceas, como *Atropa belladonna* y *Hyoscyamus niger*, producen alcaloides derivados del tropano. Estos compuestos tienen usos médicos como agentes anticolinérgicos, siendo la escopolamina el más poderoso. La escopolamina se forma por la hidroxilación y posterior epoxidación de la hiosciamina. Ambas reacciones son catalizadas por la hiosciamina 6-beta-hidroxilasa, que sólo se encuentra en el género *Hyoscyamus* (Figura 4). Los cultivos de raíces de *Atropa* acumulan grandes cantidades de hiosciamina (atropina) y la inserción en ellos del gen de la hiosciamina 6-beta-hidroxilasa produjo su conversión a escopolamina (Sato *et al.*, 2001). Es importante enfatizar que en este caso la formación de plantas completas no fue necesaria.

6. El ácido salicílico (Figura 5) es un mediador importante en los mecanismos de resistencia de las plantas a diferentes patógenos. Se ha propuesto que en plantas este compuesto se forma a partir de la fenilalanina mediante la acción de seis enzimas. Sin embargo, algunas bacterias pueden formarlo a partir

6. El ácido salicílico (Figura 5) es un mediador importante en los mecanismos de resistencia de las plantas a diferentes patógenos. Se ha propuesto que en plantas este compuesto se forma a partir de la fenilalanina mediante la acción de seis enzimas. Sin embargo, algunas bacterias pueden formarlo a partir

del corismato, por medio de las reacciones secuenciales catalizadas por la isocorismato sintasa y la isocorismato piruvato liasa. La expresión en cloroplastos de tabaco de los genes para la isocorismato sintasa y la isocorismato piruvato liasa de *E. coli* y *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente, dio lugar a plantas con niveles elevados de ácido salicílico, que también fueron resistentes a infecciones virales (Verbene *et al.*, 2000).

PERSPECTIVAS

En los casos presentados, las rutas metabólicas se modificaron mediante la inserción de genes estructurales, es decir, genes que codifican para proteínas con funciones enzimáticas. En comparación con el metabolismo intermediario, la regulación de las rutas del metabolismo secundario es aún poco conocida. No obstante, en los últimos años se han logrado identificar y aislar genes regulatorios involucrados en la síntesis de las antocianinas y de los alcaloides indólicos (von Endt *et al.*, 2002). Los genes regulatorios codifican factores transcripcionales que “encienden” de manera coordinada y concertada a los genes estructurales. La identificación de un número mayor de estos genes representará una herramienta extremadamente valiosa, ya que la inserción de uno sólo de estos genes podría llevar a la activación de una vía metabólica completa. La aplicación de las disciplinas de rápido desarrollo, como la genómica y la proteómica, a plantas productoras de metabolitos secundarios indudablemente acelerará la identificación de estos elementos regulatorios.

¿Qué perspectivas ofrece esta tecnología para nuestro país? La flora de México es la tercera en el mundo en diversidad. Esta diversidad, junto con la herencia herbolaria prehispánica y la presencia de excelentes grupos de investigación en botánica y química ha dado como resultado la caracterización fitoquímica de muchos de los ejemplares más interesantes de esta flora. Dentro de este cuadro, aún carecemos de la información bioquímica sobre la síntesis de los principios activos de las plantas medicinales, por ejemplo. Esta información es indispensable

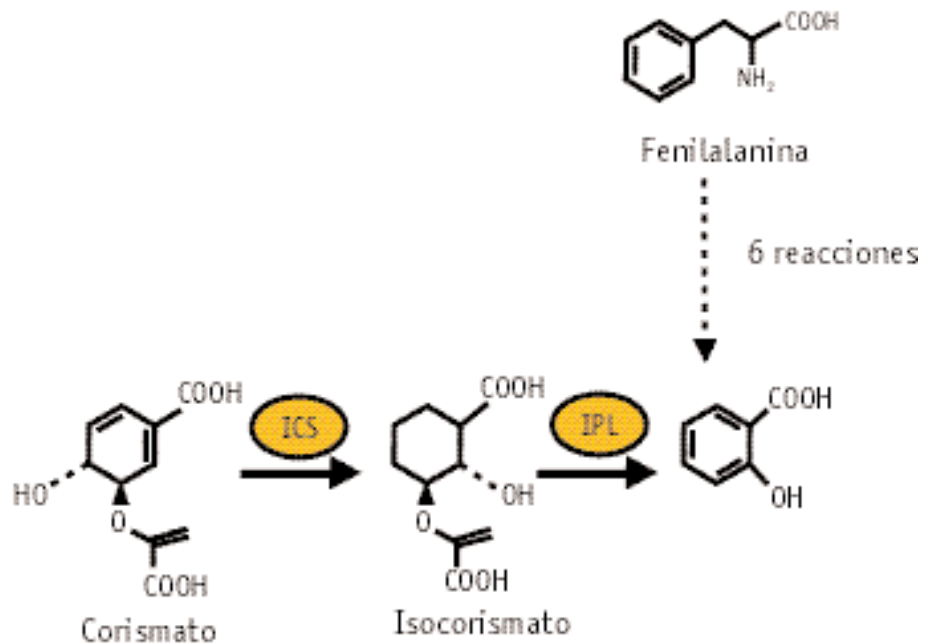


Figura 5. La síntesis de ácido salicílico, a partir de fenilalanina, requiere de seis reacciones enzimáticas en plantas, mientras que en bacterias la formación de este compuesto, a partir del corismato, sólo requiere dos reacciones catalizadas por la isocorismato sintasa (ICS) y la isocorismato piruvato liasa (IPL).

Las rutas metabólicas se modificaron mediante la inserción de genes estructurales, es decir, genes que codifican para proteínas con funciones enzimáticas

Esta tecnología puede no requerir el establecimiento de plantas en el campo, ya que los cultivos de células y tejidos *in vitro* podrían aportar el material necesario

para poder aplicar la ingeniería metabólica a nuestros vastos recursos.

Es importante recalcar que la obtención de productos naturales mediante esta tecnología puede no requerir el establecimiento de plantas en el campo, ya que los cultivos de células y tejidos *in vitro* podrían aportar el material necesario (Sato *et al.*, 2001). De este modo, la posible contaminación de los materiales silvestres con materiales genéticamente modificados estaría completamente controlada.

Agradecimientos

Se agradece la participación de Lizbeth Castro Concha y de Mildred Carrillo Pech en la preparación de este manuscrito. Los autores desean agradecer al Conacyt (31608-B) por financiar la elaboración de este trabajo.

Bibliografía

- Bailey, J. E. (1991), "Towards a science of metabolic engineering", *Science*, 252, 1668-1681.
- Chavadej, S., N. Brisson, J. McNeil, y V. De Luca (1994), "Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola", *PNAS*, 91, 2166-2170.
- Mann, V., M. Harker, I. Pecker, y J. Hirschberg (2000), "Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers", *Nature Biotech.*, 18, 888-892.
- Meyer, P., I. Heidmann, G. Forkmann, y H. Saedler (1987), "A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene", *Nature*, 330: 677-678.
- Sato, F., T. Hashimoto, A. Hachiya, K. Tamura, K. Choi, T. Morishige, H. Fujimoto, y Y. Yamada (2001), "Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis", *PNAS*, 98, 367-372.
- St-Pierre, B., F. Vázquez-Flota, y V. De Luca (1999), "Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate", *Plant Cell*, 11, 887-900.
- Verbene, M. C., R. Verpoorte, J. F. Bol., J. Mercado-Blanco, y H. J. M. Linthorst (2000), "Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance", *Nature Biotech.*, 18, 779-783.
- Von Endt, D., J. W. Kijne, y J. Memelink (2002), "Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators?", *Phytochemistry*, 61, 107-114.
- Ye, X., S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, e I. Potrykus (2000), "Engineering the provitamin A (b-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm", *Science*, 287, 303-305.

María de Lourdes Miranda Ham es doctora en ciencias químicas con especialidad en Bioquímica. Es investigador nacional del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) y miembro de la Academia Mexicana de Ciencias. Actualmente es investigadora titular en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular y docente del Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Su interés central es la investigación sobre los procesos bioquímicos y moleculares que tienen lugar en las plantas durante sus interacciones con el medio ambiente.
mirham@cicy.mx

Felipe Vázquez Flota, es químico biólogo agropecuario por la Escuela de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán. Hizo la maestría en Biotecnología en Procesos Vegetales del Instituto Tecnológico de Mérida y el Doctorado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Montreal en 1998. Es investigador titular en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, donde trabaja sobre la regulación de la síntesis de alcaloides en cultivos *in vitro*. Es autor de 14 artículos internacionales e investigador nacional del SNI.
felipe@cicy.mx