La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico

Rodrigo Arturo Rivera Solís, Santy Peraza Echeverría y Virginia Aurora Herrera Valencia

Actualmente, la demanda de productos encaminados a mejorar la calidad de vida de los seres humanos va de la mano con el incremento de la población y la necesidad de tratar enfermedades que afectan su bienestar.

Hasta hace algunos años, los medicamentos empleados para combatir estas enfermedades se obtenían principalmente de fuentes naturales. Sin embargo, con el incremento de la población las fuentes naturales se han visto superadas, por lo que se ha recurrido a la biotecnología.

Un ejemplo es la molécula de taxol, empleada en el tratamiento contra el cáncer. Originalmente, este compuesto era extraído de la corteza del árbol del tejo (*Taxus brevifolia*). Se necesitaban aproximadamente mil toneladas para obtener 130 kilos de taxol, lo que tenía el costo ecológico de talar aproximadamente 500 mil árboles. Existen métodos menos destructivos para obtener una molécula relacionada al taxol y realizar su conversión química; sin embargo, sigue siendo muy costosa. Recientemente, Ajikumar y colaboradores (2010) sintetizaron un precursor del taxol en la bacteria *Escherichia coli*, lo cual significa un avance importante en la obtención de esta molécula usando cultivos bacterianos, lo que disminuiría tanto su costo económico como ambiental.

La biotecnología también ha tenido un fuerte impacto en la producción de proteínas recombinantes (es decir, obtenidas por la tecnología de ADN recombinante) de interés médico, cuya demanda generó tan sólo en 2006 ventas por aproximadamente 40 mil millones de dólares en los Estados Unidos, con una tasa de crecimiento anual del 20 por ciento entre 2001 y 2006. Para finales de 2010 las ventas estimadas de esta clase de productos habrían alcanzado los 53 mil millones de dólares.

Esta demanda difícilmente se podría satisfacer de no ser por la tecnología del ADN recombinante, mediante la cual se ha logrado la manipulación genética de diversos organismos para producir una mayor cantidad de proteínas de interés médico que la que se podría obtener de las fuentes originales.

Entre los organismos modificados que actúan como "reactores biológicos" capaces de sintetizar proteínas recombinantes hay bacterias, levaduras, insectos, plantas y mamíferos, así como líneas celulares derivadas de los tres últimos. Cada sistema de producción posee diferentes características en términos de rendimiento proteico, facilidad de manipulación y costos de producción, por lo que cada uno tiene diferentes ventajas y desventajas.

Recientemente, las microalgas verdes, y en particular la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, han surgido como una alternativa nueva y atractiva para la producción de proteínas recombinantes, debido principalmente a su cultivo fácil y económico, su gran capacidad para acumular biomasa y a que son generalmente consideradas como inocuas para el ser humano. En el cuadro 1 se hace una comparación de las características que presentan los organismos empleados comúnmente como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes, incluyendo a las microalgas como una nueva alternativa para este fin.

Cuadro 1. Comparación de las características de los sistemas de producción de proteínas recombinantes tradicionales con las de las microalgas propuestas como biorreactores

	Características						
Organismo	*Costo de producción*	*Tiempo de producción*	*Capacidad de escalamiento*	*Calidad del producto*	*Capacidad de glucosilación*	*Riesgo de contaminación*	*Costo de almacenamiento*
Bacterias	Bajo	Corto	Alto	Bajo	No	Endotoxinas	Moderado
Levaduras	Medio	Medio	Alto	Medio	Sí	Bajo	Moderado
Células de insectos	Alto	Medio	Medio	Alto	Sí	Alto	Costoso
Células de mamíferos	Alto	Largo	Muy bajo	Muy alto	Sí	Virus-Priones	Costoso
Animales	Alto	Muy largo	Bajo	Muy alto	Sí	Virus-Priones	Costoso
Células de plantas	Bajo	Corto	Alto	Alto	Sí	Bajo	Poco costoso
Plantas	Muy Bajo	Largo	Muy alto	Alto	Núcleo: Sí Cloroplasto: No	Bajo	Poco costoso
Microalgas	Muy Bajo	Corto	Muy alto	Alto	Núcleo: Sí Cloroplasto: No	Bajo	Poco costoso

Como se puede observar en el cuadro 1, las microalgas presentan varias características ventajosas respecto a los sistemas convencionales de producción de proteínas recombinantes, que las hacen muy atractivas como biorreactores: tiempo corto de producción, bajo riesgo de patogenicidad (no se conocen patógenos o toxinas que pudieran causar contaminación en el producto final, como en el caso de bacterias y células de mamíferos), y se ha demostrado su capacidad para sintetizar proteínas complejas de origen humano.

A nivel industrial, existe infraestructura desarrollada para explotar a estos organismos con el fin de obtener diversos compuestos de interés biotecnológico, por ejemplo pigmentos como el beta-caroteno, con utilidad en la industria alimenticia y cosmética, y los ácidos grasos, empleados en la industria alimentaria y de los biocombustibles. Algunas microalgas presentan potencial para ser manipuladas genéticamente; sin embargo, en la actualidad la única microalga para cuya manipulación genética se cuenta con una gama completa de herramientas moleculares es C. *reinhardtii*, lo que incrementa aún más su valor como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes de interés médico.

Chlamydomonas reinhardtii

C. *reinhardtii* es una microalga verde eucarionte (clorofita) que ha sido empleada por casi sesenta años como modelo en estudios fisiológicos como la fotosíntesis, la biogénesis (formación) del cloroplasto y la función de los flagelos.

Se ha hecho referencia a esta microalga como "la levadura verde" debido a su rápida multiplicación y su fácil manipulación en cultivos de laboratorio. La cepa silvestre de C. *reinhardtii* presenta una morfología ovoide de aproximadamente 10 micrómetros de largo por 3 de ancho, y en su extremo anterior posee dos flagelos que le proporcionan movilidad, además de estar involucrados en la reproducción sexual.

La mayor parte de su espacio intracelular (40 por ciento) está ocupado por un único cloroplasto con forma de copa, el cual posee aproximadamente 80 copias de su genoma.

C. *reinhardtii* es capaz de desarrollarse mixotróficamente; es decir, de forma autótrofa (puede producir su propio alimento) o heterótrofa (obtiene su alimento de fuentes externas), según la disponibilidad de compuestos orgánicos y la intensidad lumínica. Su transformación genética (la introducción de material

genético externo a la célula) es relativamente fácil, tanto a nivel nuclear como de cloroplasto, y el tiempo entre la transformación de la microalga hasta la producción de una proteína recombinante puede ser de sólo seis semanas, con el potencial de alcanzar un escalamiento de hasta 64 mil litros en cuatro semanas más.

Recientemente se han explorado aplicaciones de C. *reinhardtii* enfocadas a resolver diversas necesidades humanas. Por ejemplo, su uso en la producción de biocombustibles (lípidos para biodiesel), en el área de la biorremediación (sustracción de metales pesados en cuerpos de agua), en la producción de pigmentos (carotenoides) y, como se mencionó anteriormente, como biorreactor de proteínas recombinantes de uso médico. A continuación se hará una revisión más profunda de esta aplicación.

Producción de proteínas recombinantes de interés médico

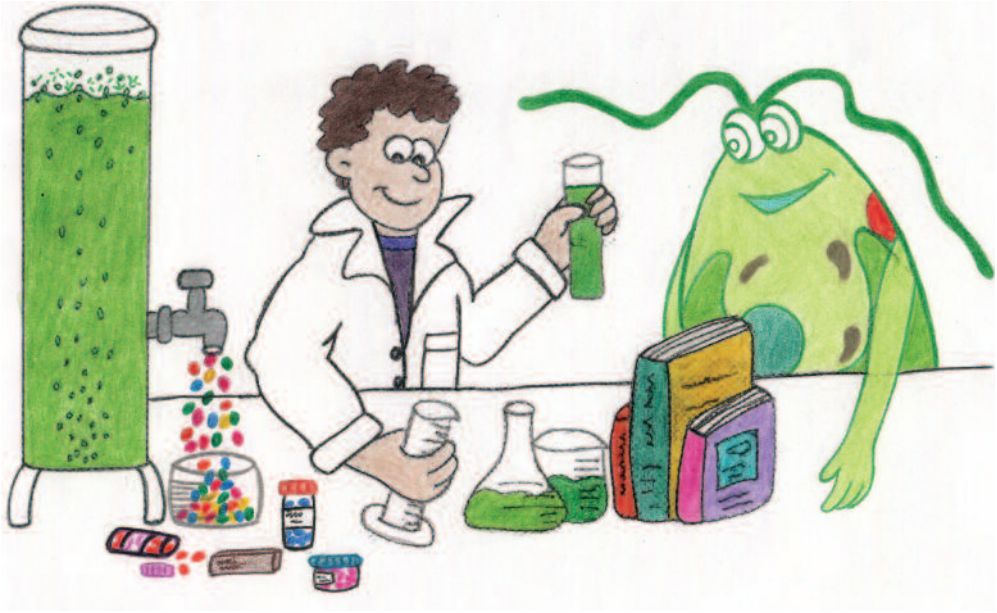
Las proteínas recombinantes de uso médico se pueden dividir en tres clases: anticuerpos monoclonales, antígenos para vacunas y proteínas terapéuticas. Estas tres clases de proteínas han sido producidas de manera exitosa en el cloroplasto de plantas superiores, con rendimientos que van del 6 al 16 por ciento de proteína soluble total en el caso de proteínas terapéuticas, alrededor del 31 por ciento en antígenos para vacunas y más del 70 por ciento en el caso de péptidos antimicrobianos.

Recientemente ha surgido un interés especial en la producción de proteínas recombinantes de interés médico en el cloroplasto de C. *reinhardtii*, en el que ya se han producido varias de estas proteínas, como veremos más adelante. Con respecto a proteínas recombinantes de interés médico a nivel nuclear en esta microalga, sólo se conoce la producción de la proteína eritropoyetina humana, con un rendimiento aproximado de 100 microgramos por litro de cultivo. Cabe señalar que el mecanismo de inserción del transgen en el núcleo se da al azar, lo que incrementa la posibilidad de silenciamiento génico, a diferencia del cloroplasto, donde la inserción se da de manera dirigida en un sitio preciso mediante un proceso de recombinación homóloga.

A continuación se presenta una compilación de las proteínas de interés médico producidas hasta el momento en el cloroplasto de C. *reinhardtii*.

Anticuerpos monoclonales

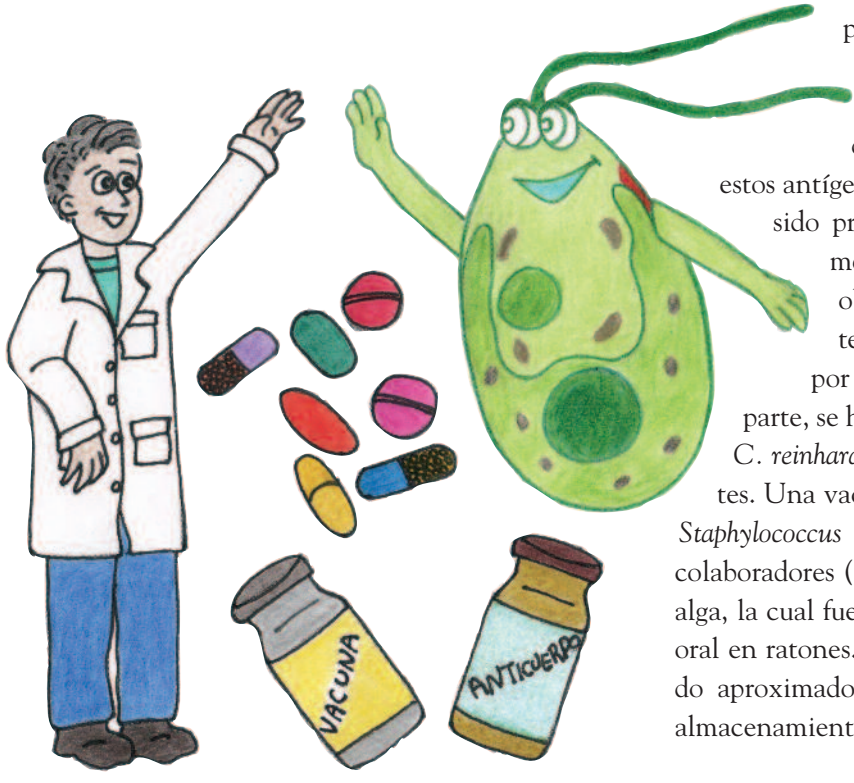
Los anticuerpos monoclonales tienen aplicación en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el



La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* en la investigación científica, y el desarrollo de proteínas recombinantes de interés médico.

cáncer, enfermedad de Chron y artritis reumatoide, entre otras, o en la investigación biomédica para el desarrollo de vacunas para prevenir enfermedades o en la cuantificación de la expresión génica. Un anticuerpo monoclonal es una molécula proteica capaz de reconocer un epítope único (un sitio específico dentro de otra molécula). Actualmente la forma más eficiente para la producción de anticuerpos monoclonales es mediante la creación de *hibridomas*, que consisten en la fusión de una célula normal (capaz de producir anticuerpos) con una célula cancerígena (capaz de multiplicarse indefinidamente), con lo que se logra producir anticuerpos monoclonales de manera constante. La desventaja de esta metodología es que es costosa y necesita de personal altamente capacitado.

En C. *reinhardtii* se ha logrado la producción de anticuerpos monoclonales; como ejemplo de ello tenemos el trabajo realizado por Mayfield y colaboradores (2003), donde se logró exitosamente la producción del anticuerpo monoclonal denominado HSV8-lsc, el cual presenta actividad contra la glucoproteína D del virus del herpes simple. En este trabajo se demostró la capacidad del cloroplasto de esta microalga para formar correctamente puentes disulfuro en el interior de la estructura proteica, que son de gran relevancia para la producción de proteínas recombinantes de origen eucarionte. Tran y colaboradores (2009) lograron ensamblar el anticuerpo monoclonal 83K7C (derivado de la IgG1 humana), que tendría aplicación contra el ántrax, y que demostró una actividad similar a los anticuerpos obtenidos en mamíferos. Estos mismos autores produjeron tres anticuerpos monoclonales más en el cloroplasto de C. *reinhardtii*, confirmando su capacidad como biorreactor para producir este tipo de anticuerpos, semejantes a aquellos producidos en otros sistemas eucariontes.



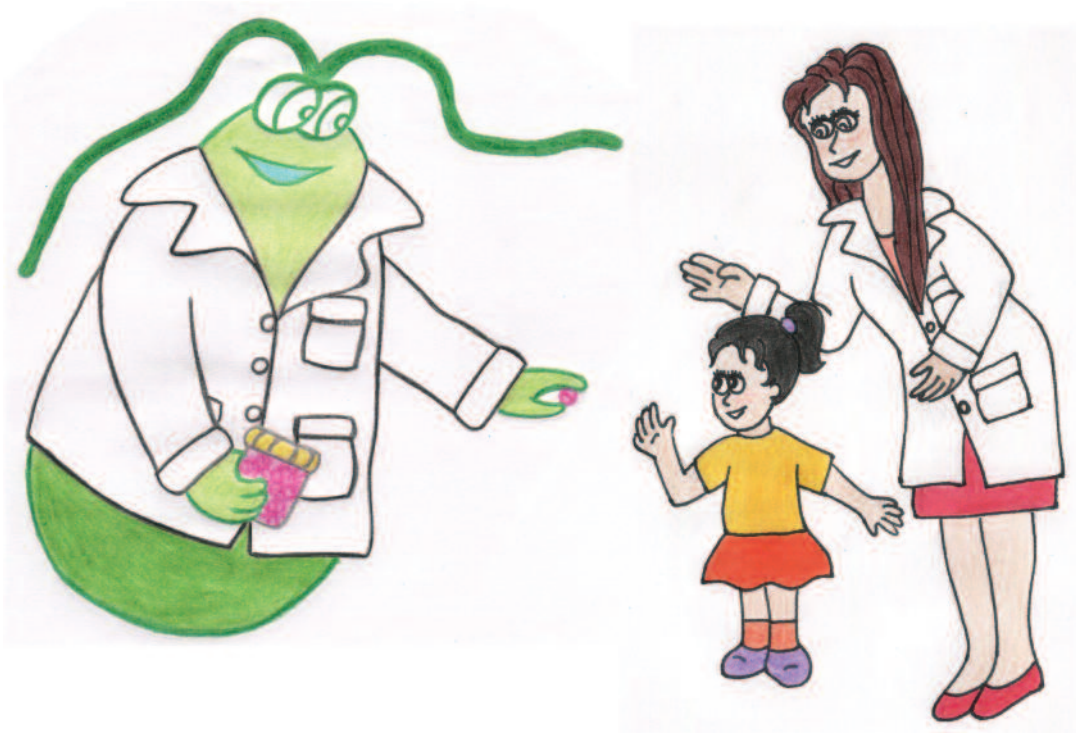
Productos biotecnológicos (proteínas recombinantes de interés médico), producidos en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii.*

Vacunas

Las vacunas originalmente se desarrollaron como suspensiones de microorganismos atenuados o muertos (bacterias, hongos o virus) que eran administradas para prevenir, disminuir o tratar infecciones u otras enfermedades. Actualmente las vacunas pueden consistir en proteínas antigénicas derivadas de estos microorganismos o de construcciones sintéticas que tienen la información para fabricar estos antígenos. Desde sus inicios, las vacunas han sido producidas en animales, pero recientemente se ha demostrado que pueden ser obtenidas en sistemas vegetales mediante la tecnología del ADN recombinante, por ejemplo en tabaco o arroz. Por su parte, se ha demostrado también la capacidad de C. *reinhardtii* para producir vacunas recombinantes. Una vacuna contra la infección de la bacteria *Staphylococcus aureus* fue producida por Dressen y colaboradores (2010) en el cloroplasto de esta microalga, la cual fue capaz de provocar inmunidad por vía oral en ratones. Esta vacuna fue estable por un periodo aproximado de año y medio en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente.

Proteínas terapéuticas

Las proteínas terapéuticas están enfocadas a remediar o prevenir alguna enfermedad. Se incluye en esta cate-



Impacto en la sociedad de los productos biotecnológicos (proteínas recombinantes de interés médico), producidos en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*.

goría a las proteínas empleadas directamente como fármacos, así como aquellas involucradas en la producción de dichos fármacos. En el cloroplasto de C. *reinhardtii* se han producido algunas proteínas recombinantes terapéuticas. Un ejemplo es un suero amiloide asociado a las glándulas mamarias (M-SAA), producido por Manuell y colaboradores (2007); esta proteína se encuentra de manera natural en el calostro bovino, y es capaz de estimular las células epiteliales humanas para producir mucina intestinal, la cual actúa como agente profiláctico contra las infecciones virales y bacterianas. Otro ejemplo es la enzima descarboxilasa de ácido glutámico (GAD65) producida por Wang y colaboradores (2008); esta enzima puede ser usada como un autoantígeno, ya que muchos de los pacientes que presentan diabetes tipo I de reciente aparición presentan anticuerpos contra GAD65, los cuales pueden servir para predecir y dar un diagnóstico temprano de la diabetes tipo I, enfermedad autoinmune resultante de la destrucción de las células productoras de insulina en el páncreas.

Rasala y colaboradores (2010) evaluaron la producción de siete proteínas que son o presentan potencial como agentes terapéuticos humanos. Entre las proteínas evaluadas, se encuentran la eritropoyetina (regulador de la síntesis de eritrocitos), las proteínas 10FN3 y 14FN3 (dominios de la fibronectina que tienen función en la adhesión celular), el interferón humano beta-1 (mejora la integridad de la barrera hematoencefálica), la proinsulina humana (hormona que regula los niveles de azúcar en la sangre), el factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF; que estimula la angiogénesis) y la proteína B1 del grupo de alta movilidad (HMGB1; mediadora en la curación de heridas mediante la activación de células endoteliales).

Cuatro de las proteínas evaluadas (10FN3, 14FN3, VEGF y HMGB1) fueron producidas con éxito, ya que se obtuvieron rendimientos de entre 2 y 3 por ciento de proteína soluble total en el cloroplasto de C. *reinhardtii*. En el cuadro 2 se hace un resumen de las proteínas recombinantes que han sido producidas en el cloroplasto de C. *reinhardtii*, incluyendo sus rendimientos proteicos, así como los elementos reguladores de la expresión génica (Promotor + 5'UTR/3'UTR) con los que se ha logrado dicha producción.

Cuadro 2. **Proteínas recombinantes de uso médico producidas en el cloroplasto de *C. reinhardtii***

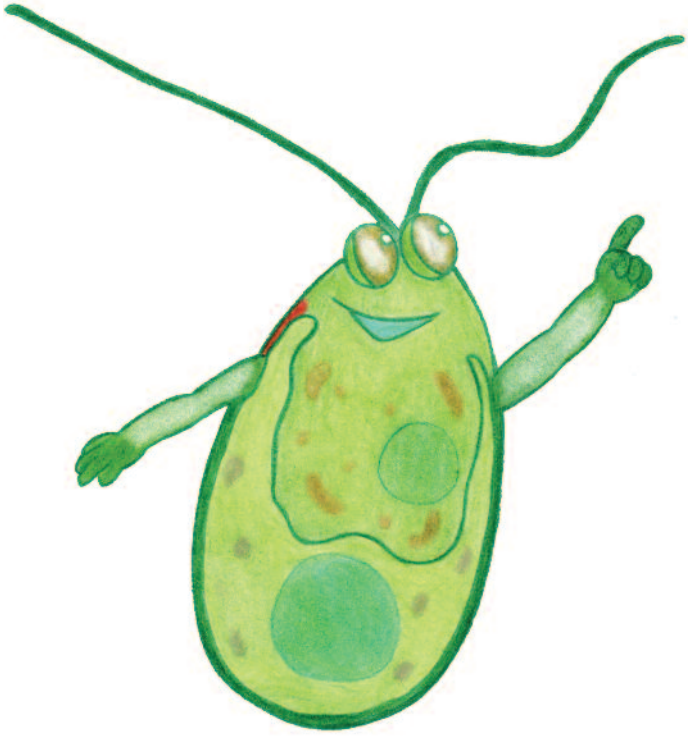
Gen expresado	*Tipo de proteína*	*Función*	*Promotor + 5'UTR/3'UTR*	*Rendimiento (proteína soluble total, PST)*	*Aplicación*	*Referencia*
HSV8-lsc	Anticuerpo	Actividad contra la glicoproteína D del virus herpes simple	*atpA/rbcL*	0.5% PST	Anticuerpos monoclonales	Mayfield *et al.*, 2003
83K7C	Anticuerpo derivado de IgG1	Actividad contra el antígeno PA83 del ántrax	LC: *psbA/rbcL* HC: *psbA/psbA*	0.1 % de biomasa seca	Anticuerpos monoclonales	Tran *et al.*, 2009
CTB-D2	Toxina B del cólera fusionada con el dominio D2 de la proteína de unión a la fibronectina	Vacuna oral contra *S. aureus*	*rbcL/rbcL*	0.7% PST	Vacuna oral	Dressen *et al.*, 2010
hTRAIL	Factor de necrosis tumoral	Tratamiento del cáncer	*atpA/rbcL*	0.43%-0.67%	Terapéutico	Yang et al., 2006
M-SAA	Suero bovino amiloide asociado a las glándulas mamarias	Estimulación de la producción de mucina en el intestino para inmunizar a recién nacidos	*psbA/psbA*	5.0% PST	Terapéutico	Manuell *et al.*, 2007
hGAD65	Descarboxilasa de ácido glutámico humana 65	Diagnóstico temprano de la diabetes tipo I	*rbcL/rbcL*	0.25-0.3% PST	Terapéutico	Wang *et al.*, 2008
M-SAA-10NF3	10° dominio de la fibronectina III humana	Símil de anticuerpo	*psbA/psbA*	~3.0% PST	Terapéutico	Rasala *et al.*, 2010
14NF3	14° dominio de la fibronectina III humana	Símil de anticuerpo	*psbA/psbA*	3% PST	Terapéutico	Rasala *et al.*, 2010
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular humano	Tratamiento del enfisema pulmonar y de la disfunción eréctil; antidepresivo	*psbA/psbA*	2% PST	Terapéutico	Rasala *et al.*, 2010
HMGB1	Proteína B1 del grupo de alta movilidad	Curación de heridas mediante la activación de células endoteliales	*psbA/psbA*	2.5% PST	Terapéutico	Rasala *et al.*, 2010

Producción de proteínas recombinantes de interés médico a nivel mundial

Alrededor del mundo existen compañías dedicadas a la producción de proteínas recombinantes empleando diversos hospederos como biorreactores. Las grandes transnacionales ya tienen productos en el mercado que emplean a *E. coli* o células de ovario de ratón como biorreactores. Por otro lado, existen también compañías involucradas en el desarrollo de proteínas recombinantes empleando plantas como plataformas de expresión. De estas compañías, dos son las más avanzadas: Protalix Biotherapeutics, que cuenta con la enzima glucocerebrosidasa para el tratamien-

to de la enfermedad de Gaucher, que ya ha concluido la fase clínica III, y Biolex therapeutics, que cuenta con un interferón para el tratamiento de la hepatitis C listo para iniciar fase clínica III; ambas se encuentran muy cerca de la comercialización de sus productos. Hay que mencionar también a Icon genetics, adquirido por Bayer en el 2006, y su sistema denominado "Magnifection", mediante el cual es posible la transformación (introducción de material genético externo) temporal de plantas de tabaco para producir proteínas recombinantes, y que actualmente cuenta con algunas de éstas en fase clínica I.

En el caso de las microalgas, *C. reinhardtii* ha recibido mucha atención para el desarrollo de una plataforma de expresión de proteínas recombinantes. Dado que esta atención comenzó recientemente, existen por el momento sólo dos compañías involucradas en el desarrollo de proteínas recombinantes de interés médico: una es Phycobiologics –compañía estadounidense enfocada principalmente al desarrollo de proteínas recombinantes de interés veterinario, usando como biorreactor al cloroplasto de *C. reinhardtii*–, que actualmente está desarrollando un proceso para producir proteínas recombinantes de interés médico.



Protelica es la otra compañía estadounidense dedicada al diseño de proteínas recombinantes que recientemente ha mostrado interés en usar al cloroplasto de *C. reinhardtii* para producir estas proteínas en colaboración con el grupo de Stephen Mayfield, del San Diego Center for Algae Biotechnology, en Estados Unidos.

En el caso de México, entre las compañías que se dedican a la producción y desarrollo de proteínas recombinantes de interés médico podemos mencionar a Probiomed, que utiliza células de mamíferos como plataforma de expresión para producir proteínas como la eritropoyetina y el interferón beta-1a, las cuales se utilizan para el tratamiento de anemia por insuficiencia renal crónica y de la esclerosis múltiple respectivamente. Otro ejemplo es Cryopharma, que utiliza células de ovario de hámster chino como sistema de expresión de la eritropoyetina humana enfocada a la terapia hematológica. También cabe mencionar a Bioclon, que utiliza a *E. coli* en la producción de antígenos utilizados en el proceso de elaboración de faboterápicos (antivenenos). Estas empresas son casos de éxito en el área nacional y empresas reconocidas a nivel mundial.

Las ventajas que presenta *C. reinhardtii* como biorreactor la hacen una alternativa muy atractiva para que empresas como las antes mencionadas adopten a este organismo para producir proteínas recombinantes o bien para la creación de nuevas empresas interesadas en ingresar al mercado de la producción de proteínas recombinantes de interés médico.

Conclusión

Chlamydomonas reinhardtii ha demostrado ser un organismo muy versátil que puede ser usado tanto en estudios de ciencia básica como en diversas aplicaciones biotecnológicas, y que es una alternativa muy atractiva para la producción de proteínas recombinantes con aplicación médica. Hemos descrito las características que la hacen apropiada para su uso como biorreactor y que han permitido su uso para la obtención de anticuerpos monoclonales, vacunas y compuestos terapéuticos de interés médico con resultados satisfactorios. Lo anterior nos permite considerar que *C. reinhardtii* ha pasado de ser una promesa a ser una realidad como biorreactor de proteínas recombi-

nantes, con el potencial de contribuir a resolver algunos de los problemas médicos que afectan actualmente a la humanidad e influir en la bioeconomía del siglo XXI.

Rodrigo Arturo Rivera Solís es químico biólogo agropecuario por la Universidad Autónoma de Yucatán. Actualmente es becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y se encuentra cursando las etapas finales del programa de Doctorado del Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

Santy Peraza Echeverría es licenciado en biología por la Universidad Autónoma de Yucatán, maestro en ciencias y biotecnología de plantas por el CICY y doctor por la Queensland University of Technology (Australia). Es profesor-investigador en la Unidad de Biotecnología del CICY.

Virginia Aurora Herrera Valencia es licenciada en biología por la Universidad Autónoma de Yucatán, maestra en ciencias y biotecnología de plantas por el CICY y doctora por la Queensland University of Technology (Australia). Actualmente es profesora-investigadora en la Unidad de Biotecnología del CICY.

Lecturas recomendadas

Ajikumar, P., W. Xiao, K. Tyo, Y. Wang, F. Simeon, E. Leonard, O. Mucha, T. Phon, B. Pfeifer y G. Stephanopoulos (2010), "Isoprenoid pathway optmimization for taxol precursor overproduction in *E. coli*", *Science*, 330 (6000), 70-73.

Dressen, I., G. Charpin El-Hamri y M. Fussenegger (2010), "Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection", *Journal of biotechnology*, 145, 273-280.

Manuell, A., M. Beligni, J. Elder, D. Siefker, M. Tran, A. Webber, T. McDonald y S. Mayfield (2007), "Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast", *Plant biotechnology journal*. 5: 402-412.

Mayfield, S., S. Franklin y R. Lerner (2003), "Expression and assembly of a fully active antibody in algae", *PNAS*, 100(2), 438-442.

Mayfield, S. y S. Franklin (2005), "Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae" *Vaccine*, 23, 1828-1832.

Rasala, B., M. Muto, P. Lee, M. Jager, R. Cardoso, C. Behnke, P. Kirk, C. A. Hokanson, R. Crea, M. Mendez y S. Mayfiels (2010), "Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant biotechnology journal*, 8, 1-15.

Tran, M., B. Zhon, P. Petterson, M. González y S. Mayfield (2009), "Synthesis and assembly of a full-lenght human monoclonal antibody in algal chloroplasts", *Biotechnology and bioengineering* 104 (4), 663-673.

Wang, X., M. Brandsma, M. Tremblay, D. Maxwell, A. Jevnikar, N. Huner y S. Ma (2008), "A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65)", *BMC biotechnology*, 8(87).