



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**POTENCIAL DE LOS CULTIVOS EN**  
**SUSPENSIÓN DE CÉLULAS VEGETALES**

Autor: Alberto de la Cuadra Grande

Fecha: Junio de 2020

Tutor: Margarita Torres Muñoz

## ÍNDICE

1	RESUMEN .....	2
2	INTRODUCCIÓN .....	2
3	OBJETIVOS .....	5
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
5.1	METABOLITOS SECUNDARIOS .....	6
5.2	OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS VEGETALES.....	8
6	CONCLUSIONES .....	17
7	BIBLIOGRAFÍA .....	17

## 1 RESUMEN

Las plantas como importantes productores de metabolitos secundarios son foco de atención de la industria farmacéutica, cosmética y agroalimentaria. La complejidad del metabolismo secundario y los numerosos factores internos y externos que afectan a la producción de metabolitos secundarios contribuyen a que los procesos biotecnológicos sean una alternativa eficiente y sostenible para atender la demanda regular y continua del mercado. La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* (células, tejidos y órganos) en condiciones controladas aporta la gran ventaja de la independencia de los factores externos, pero se necesita un mayor conocimiento sobre las rutas metabólicas y las bases moleculares de la producción de metabolitos secundarios obtenidos *in vitro*. El progreso de la ingeniería metabólica, a través de sus diferentes estrategias experimentales, está contribuyendo, de una forma decisiva, a conseguir ese entendimiento. El cultivo *in vitro* puede realizarse en medio sólido y líquido, pero cuando se trata de cultivar células aisladas preferentemente se emplea el medio líquido, lo que se conoce como cultivo en suspensión, que permite el empleo de biorreactores para la producción industrial de metabolitos secundarios y la inducción de la embriogénesis somática para obtener embriones somáticos a través de los cuales se puede regenerar una planta idéntica a la planta madre o generar semillas sintéticas. El cultivo en suspensión no está exento de dificultades, entre otras, la formación de agregados celulares o la coordinación del crecimiento celular y la producción metabólica, por lo que se requiere optimizar el proceso de producción a través de la selección de líneas celulares, optimización de las condiciones de cultivo, producción a gran escala en biorreactor y el uso de estrategias como adición de precursores, elicitación o transformaciones génicas.

**PALABRAS CLAVE:** Cultivo celular en suspensión; Metabolito secundario; Optimización; Producción

## 2 INTRODUCCIÓN

Desde la Antigüedad, el hombre ha sido capaz, de una manera intuitiva, de transformar y elaborar productos alimenticios derivados de los cereales y la leche, y utilizar también las plantas por sus propiedades curativas. Sin embargo, con el discurrir del tiempo el hombre ha ido, afortunadamente, desarrollando sus ideas con un enfoque científico, lo que ha permitido, principalmente, a partir del siglo XX el inmenso avance de numerosas ciencias, entre otras, Fisiología, Bioquímica, Biología Molecular, Química Analítica, Genética Molecular y Microbiología, que han contribuido al verdadero desarrollo de la Biotecnología. No se pueden olvidar las aportaciones de las Ciencias Ómicas, entre ellas la metabolómica, herramienta básica para conocer mejor el metabolismo vegetal, que es complementaria de la transcriptómica y la proteómica, y está considerada como la pieza esencial en la integración de las tecnologías “ómicas” contribuyendo a tener una visión general de los sistemas biológicos, ni tampoco el progreso del conjunto de conocimientos de técnicas ingenieriles esenciales para el uso eficaz y sostenible de los recursos naturales y de la actividad industrial.

En un escenario multidisciplinar, la biotecnología tiene sus límites en la investigación y desarrollo de “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”. Por analogía de tratamiento, la biotecnología vegetal comprende “la aplicación de cualquier técnica que use a los organismos de origen vegetal vivos, o parte de los

mismos, para elaborar o modificar productos, mejorar plantas o desarrollar procesos con fines y usos específicos” y centra sus esfuerzos en tres sectores diferenciados: farmacéutico, medio ambiente y agroalimentación.

En cualquier de los casos, el punto de partida está en la aplicación de la técnica del cultivo *in vitro* de plantas, es decir, en el proceso que permite el mantenimiento del cultivo del material vegetal en condiciones artificiales y asépticas conservando al máximo sus características genéticas, bioquímicas y fisiológicas. Desde los primeros ensayos experimentales llevados a cabo por Haberlandt a principios del siglo pasado y tras el descubrimiento por Went en 1926 de la auxina -la fitohormona por excelencia- básica para el establecimiento de cultivos *in vitro*, se empiezan a establecer las bases fisiológicas del desarrollo de las plantas y la importancia de la auxina en la división celular, lo que permitió estudiar otros factores relevantes para el cultivo *in vitro*, tales como luz, temperatura, requerimientos nutricionales o el papel de otras hormonas como las citoquininas (Bourgaud *et al.*, 2001).

Cuando se pretende realizar un cultivo vegetal *in vitro* resulta muy importante tener presente que una cualidad singular de la célula vegetal es la totipotencia o capacidad de regenerar una planta completa a partir de un pequeño fragmento. Además, las células vegetales diferenciadas tienen también la capacidad de regresar al estado meristemático o desdiferenciarse al estado en el que producirán el crecimiento vegetal. No obstante, tales capacidades no son suficientes para llevar a cabo un cultivo vegetal *in vitro* con éxito. Dicho proceso requiere preparar un medio de cultivo artificial en condiciones asépticas que contenga nutrientes (macro y micronutrientes) en proporciones adecuadas; fuentes de Carbono (sacarosa, glucosa, fructosa o maltosa) y de Nitrógeno orgánico (aminoácidos como glicina, fenilalanina, glutamina, etc.); fitohormonas, específicamente auxinas y citoquinas para regular el crecimiento, o la adición de otros componentes como antibióticos, fungicidas etc. (Davey *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2018; Serrano y Piñol, 2007). Por tanto, no se puede extrapolar el comportamiento de un cultivo *in vitro* sin considerar su origen biológico (**Tabla 1**), puesto que hay diferencias sustanciales entre células vegetales, animales o microorganismos que condicionan todo el proceso.

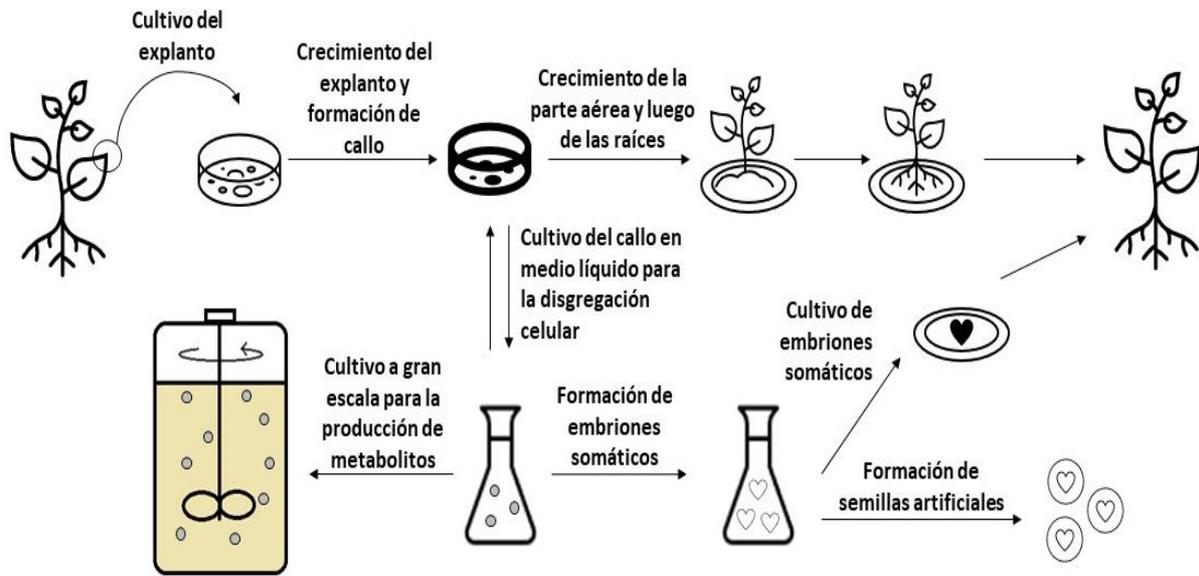
En la **Figura 1** se presenta el procedimiento general para realizar un cultivo *in vitro* de plantas, que se inicia con la selección del material vegetal constituido por un pequeño fragmento de la planta madre. El material vegetal de partida recibe el nombre de **explanto** y por las características de totipotencia de las células vegetales puede proceder de diversos tejidos, habitualmente meristémico y mesófilo, pudiéndose llevar a cabo también con órganos (tallos, hojas y raíces). Dicho explanto se coloca en condiciones asépticas en un medio sólido (con agar solidificado) o líquido estériles y los componentes básicos para el crecimiento celular señalados en el párrafo anterior, cuya composición cuali y cuantitativa se suele adaptar a la finalidad concreta que se quiere obtener con un determinado cultivo *in vitro*. Una vez sembrado el explanto, en pocos días comienza un proceso de división de las células de este, generándose una masa de células desdiferenciadas denominada **callo**, que constituye la base de los cultivos vegetales *in vitro* (Yeoman y Yeoman, 1996; Bourgaud *et al.*, 2001; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Martín *et al.*, 2018).

**Tabla 1.** Caracterización comparativa entre los distintos tipos de cultivo *in vitro* utilizados en biotecnología, según el origen vegetal, animal (mamíferos) o microorganismo cultivado. Fuente: Guillén y Herrera, 2018; Martín *et al.*, 2018; Molina, 2018.

CARACTERIZACIÓN	CÉLULAS VEGETALES	CÉLULAS ANIMALES	MICROORGANISMOS
DESDFERENCIACIÓN	SI. Espontánea	NO. Inducida, solo para generar células IPs	NO
REGENERACIÓN	SI. Organismo completo	NO. Solo órganos.	NO
MEDIO DE CULTIVO	Composición compleja Sólido (placas agar) Líquido	Composición muy compleja Cultivo sobre superficie sólida	Composición sencilla Sólido (placas agar) Líquido
CONDICIONES DEL CULTIVO	Estable Fácil contaminación Condiciones exigentes	Inestable Fácil contaminación Condiciones muy exigentes	Muy estable Contaminación difícil Condiciones menos exigentes

El callo formado comenzará a desarrollarse para dar lugar a un **callo friable** de aspecto heterogéneo y laxo, que posteriormente irá adoptando un aspecto homogéneo. A partir de este momento se iniciará la organogénesis (desarrollo de órganos), con el concurso de las hormonas auxinas y citoquininas, comenzando por las partes aéreas y después las raíces hasta regenerar una nueva planta, idéntica a la planta de partida (madre) de la cual se obtuvo el explanto, lo que permite la realización de micropropagación o el proceso de clonar en poco tiempo un elevado número de ejemplares en condiciones ambientales controladas. Este proceso resulta muy útil para el cultivo de plantas medicinales, de difícil propagación y/o cultivo, y para evitar la extinción de muchas especies, lo que es esencial para la sostenibilidad y el mantenimiento de la biodiversidad.

También las células del callo friable se pueden transferir, en condiciones asépticas, a un medio líquido estéril para la realización de **cultivos celulares en suspensión**, dado que su dispersión en medio líquido está favorecida por la débil asociación entre células, siempre con agitación continua para favorecer este proceso. A partir de estas células en suspensión (**Fig. 1**) se presentan dos opciones de ejecución diferenciadas. La primera implica optimizar el medio de cultivo para la realización del escalado del cultivo en biorreactor para la producción de metabolitos secundarios, mientras que la segunda implica modificar el medio de cultivo adicionando hormonas como la auxina para inducir la embriogénesis somática con la consiguiente obtención de embriones somáticos, a partir de los cuales se pueden producir semillas artificiales o bien cultivarlos directamente en un medio sólido para la regeneración de una planta idéntica a la planta madre inicial (Evans *et al.*, 2003; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Torres *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Representación esquemática del proceso de un cultivo vegetal *in vitro* en medio sólido y líquido. Adaptado de Bourgaud *et al.* (2001).

Además del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos se utilizan técnicas de ingeniería genética para la obtención de plantas transformadas, es decir, modificadas genéticamente, que se conocen como plantas transgénicas, mediante sistemas de transferencia de ADN directa o con vectores biológicos. Las aplicaciones de las plantas modificadas están orientadas, una vez superadas y aceptadas todas las exigencias de los organismos reguladores, a un aumento de la productividad, resistencia a patógenos, tolerancia a la sequía, maduración controlada de frutos, aumento de la supervivencia de flores cortadas o a la producción de compuestos de interés industrial con un elevado potencial económico y ambiental como bioplásticos, biocombustibles o aceites industriales biodegradables.

Especial interés tiene el uso de plantas transgénicas en lo que se denomina “Plant Molecular Pharming” (Agricultura Molecular) como sistemas de producción de productos biofarmacéuticos (productos farmacéuticos biotecnológicos), proteínas terapéuticas, vacunas comestibles, anticuerpos monoclonales o enzimas expresadas en plantas de tabaco, maíz, soja, colza, guisante y arroz, de interés para diversas actividades industriales, entre otras, fabricación textil o la elaboración de papel, detergentes, piensos, zumos y vinos. Igualmente interesante es el uso de protoplastos (células vegetales desprovistas de pared celular, capaces de dividirse, de regenerar la pared celular y formar un callo en condiciones adecuadas en cultivo *in vitro*) porque constituyen el material idóneo para estudios de transporte de metabolitos, división celular, morfogénesis, mutagénesis, evaluación de la toxicidad y la resistencia a patógenos y por su capacidad de fusión se emplean para la producción de híbridos somáticos (Martín *et al.*, 2018).

### 3 OBJETIVOS

En este trabajo se plantea revisar algunos aspectos del cultivo *in vitro* de células vegetales como una estrategia alternativa, eficiente y sostenible para la producción de metabolitos secundarios de interés para la industria farmacéutica.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

Teniendo en cuenta el carácter bibliográfico del trabajo que se presenta, se ha recurrido, en primer lugar, a libros de biotecnología recomendados para estudiantes pregraduados (Evans *et al*, 2003; Serrano y Piñol, 2007; Martín *et al*, 2018) y de disciplinas afines (Bruneton, 2001), cuya consulta está plenamente justificada para centrar el tema de una manera general y, en segundo lugar, a la búsqueda de artículos científicos y de revisión relacionados con el tema del trabajo. Para ello se han realizado búsquedas bibliográficas utilizando como motor de búsqueda PubMed, de libre acceso a la base de datos Medline, y CABS Abstracts que procesa desde revisiones hasta boletines e informes técnicos sobre un amplio espectro de ámbitos de ciencias de la vida, encontrando, entre ellos, distintos aspectos de biotecnología vegetal, cubriendo áreas como ingeniería genética, genética molecular, cultivo *in vitro* y plantas transgénicas, especialmente a través de AgBiotechNet, Ag Biotech News and Information y Plant Sciences, y más concretamente Review of Aromatic and Medicinal Plants.

La información científica buscada estuvo relacionada con los siguientes términos (solos o cruzados): Biotecnología farmacéutica; Cultivo *in vitro* de plantas; Cultivo en suspensión; Metabolito secundario; Planta medicinal. Del resultado de las búsquedas se seleccionaron, preferentemente, los artículos cuyas fechas de publicación estuvieran comprendidas entre los años 2000 y 2020, y entre estos aquellos que de manera más directa y específica estuviesen relacionados con el objetivo del presente trabajo, priorizando como criterio de inclusión de las publicaciones encontradas aquellos que fueron accesibles en su totalidad y los de mayor número de citas. Lo que no excluye la incorporación de algunos artículos de años anteriores considerados de alta calidad.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

Uno de los grandes focos de actuación de la biotecnología vegetal, como se ha indicado en la introducción, es el interés de la industria farmacéutica por compuestos con aplicaciones farmacológicas producidos por distintos organismos. Baste señalar el riguroso trabajo de Newman y Cragg (2016) en el que presentan una exhaustiva lista de pequeñas moléculas aprobadas por los organismos reguladores durante el período 1981-2014, indicando que los productos naturales y/o sus estructuras juegan un significativo papel en el descubrimiento de drogas y procesos de desarrollo de fármacos y señalando que durante el período 1940-2014 de las 175 moléculas aprobadas para el tratamiento del cáncer, 49 % corresponde al grupo de productos naturales. Otras industrias como la alimentaria y la dermocosmética manifiestan su interés en diversos compuestos por sus aplicaciones como saborizantes, colorantes, gelificantes, conservantes o despigmentantes. Por ello, en un sentido amplio, podría ser más adecuado emplear la denominación de plantas productoras de compuestos de interés industrial, lo que englobaría a las plantas medicinales, aromáticas y condimentarias (Martín *et al.*, 2018).

Conviene precisar que las plantas son grandes productoras de productos naturales, representados por moléculas pequeñas que se caracterizan por una gran heterogeneidad estructural y una distribución muy restringida, lo que permite realizar clasificaciones

quimiotaxonómicas y farmacológicas. El metabolismo vegetal produce, por una parte, los denominados **metabolitos primarios**, necesarios para ejercer las funciones esenciales, que se originan en rutas biosintéticas básicas, y por otra, los **metabolitos secundarios**, necesarios para realizar funciones asociadas a respuestas ecofisiológicas frente a condiciones de estrés (físico, químico y biológico) y adaptaciones al entorno (atracción o disuasión de animales), que se originan a partir de los metabolitos primarios en rutas biosintéticas complejas, pero no son ni intermediarios ni productos finales del metabolismo, reservando el nombre de principio activo para aquellos metabolitos secundarios con actividad farmacológica.

No obstante, resulta pertinente centrar la terminología para evitar confusiones. De acuerdo con lo anterior, el término **producto natural** hace referencia al origen biológico, mientras que el término **metabolito secundario** se refiere a su origen biosintético. Sin embargo, hay metabolitos que tienen una distribución ubicua, carecen de actividad farmacológica y se sintetizan a partir de los metabolitos primarios. En sentido literal, estos últimos compuestos hacen referencia a ambos orígenes, pero no se ajustan a las características señaladas anteriormente, lo cual puede inducir a error. Compuestos como lignina, fitol, giberelina, ácido abscísico o carotenos, entre otros, ejercen funciones esenciales en todas las plantas, por lo que deben ser considerados como **metabolitos secundarios fisiológicamente primarios** (Martín *et al.*, 2018), lo cual no significa que no sean objeto de atención de la biotecnología. A título de ejemplo, baste señalar la importancia de la eliminación de la lignina para la producción de biocombustibles eficientes (Tatsis y O'Connors, 2016).

Atendiendo a su origen biosintético, los metabolitos secundarios se clasifican en tres principales grupos (Bruneton, 2001):

- Terpenos: compuestos derivados del isopreno activo. Se sintetizan mayoritariamente por la vía del acetato-mevalonato.
- Fenoles: compuestos con uno o más anillos aromáticos hidroxilados. Se sintetizan por la vía del ácido siquímico y por la vía del acetato-malonato.
- Alcaloides: compuestos nitrogenados. Se sintetizan a partir de aminoácidos (tirosina, fenilalanina, lisina, ornitina, triptófano, entre otros).

La producción de estos metabolitos secundarios en las plantas está relacionada con estructuras especializadas y con las etapas del ciclo ontogénico (vital) de la especie productora, lo que puede condicionar también la calidad de los metabolitos secundarios producidos y por tanto los requerimientos esenciales impuestos por las exigencias de un mercado legalmente regulado, lo que favorece la producción biotecnológica para atender la demanda regular de estos compuestos como alternativa al cultivo tradicional de plantas productoras.

La producción de metabolitos secundarios está regulada además por factores internos (genéticos, hormonales y enzimáticos) y externos (nutricionales, edafoclimáticos y culturales). La biosíntesis de metabolitos secundarios no es un proceso que se produce en una localización concreta y definida de la planta. La variedad de enzimas implicadas en las distintas reacciones bioquímicas y la diversa naturaleza de los compuestos que se generan pueden conducir a que la producción metabólica esté compartimentada, es decir, no todas las reacciones suceden en el mismo compartimento celular (un metabolito de carácter lipófilo se dispondrá en la membrana plasmática, mientras que uno hidrófilo lo hará en el citosol o en una vacuola), e incluso en el mismo órgano pueden existir células productoras y

células receptoras de un mismo metabolito secundario, existiendo, por tanto, una separación espacial que requiere mecanismos de transporte y que afecta a los procesos de transformación y acumulación de los metabolitos secundarios, como se ha descrito para la vincristina, alcaloide presente en las hojas de *Catharanthus roseus* (*Vinca roseus*) (St-Pierre *et al.*, 1999).

La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en condiciones controladas aporta la gran ventaja de la independencia de los factores externos, pero se necesita un mayor conocimiento de las rutas metabólicas y las bases moleculares de la producción de metabolitos secundarios obtenidos *in vitro*. El progreso de la ingeniería metabólica o metabolómica, a través de sus diferentes estrategias experimentales (Fiehn, 2002; Tassis & O'Connor, 2016), contribuye a conseguir este objetivo, por lo que se ha convertido en una herramienta esencial (Torres *et al.*, 2018) que centra su atención en tres aspectos básicos: 1) sobreexpresión de enzimas; 2) desviación del flujo metabólico hacia nuevos productos de interés; y 3) creación de nuevas rutas en las redes metabólicas.

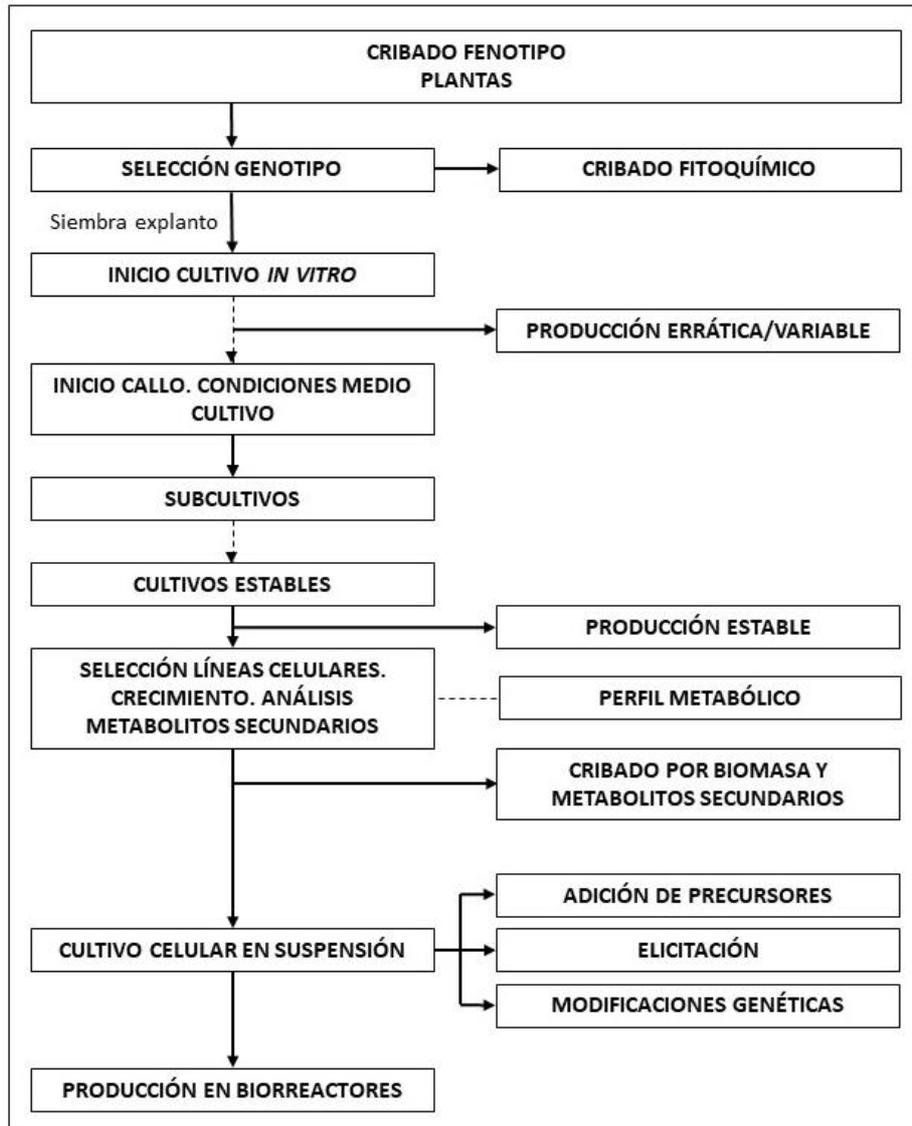
## 5.2 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS VEGETALES

Al hilo de lo expuesto en el apartado anterior, el avance de la metabolómica y sus importantes aportaciones no impide la implementación de estrategias para optimizar la producción *in vitro* a gran escala que garanticen la calidad y cantidad de los metabolitos secundarios acoplados a los intereses industriales (Karuppusamy, 2009), lo que no excluye su complejidad dado el número de factores que afectan a la producción.

El proceso de la optimización de la producción de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro* se ajusta a un esquema de cribado y prospección (**Fig. 2**) que conlleva la realización de distintas etapas, que se comentan a continuación:

- Etapa 1: Selección de la especie vegetal (planta madre) para la obtención del explanto.

En la selección óptima del material vegetal hay que partir de una planta madre de alto rendimiento y hay que tener en cuenta tanto las características fenotípicas como el estado fisiológico y el grado de diferenciación celular, ya que son factores determinantes para la producción de metabolitos secundarios. Una vez realizado el cribado por el que se reconoce la planta con algún rasgo distintivo, se requiere seleccionar, en condiciones asépticas, el explanto, que puede proceder de ápices (raíz y tallo), peciolo, hojas y tallos jóvenes, tejido meristemático o embriones u otros órganos o tejidos con capacidad reproductiva. El explanto seleccionado se transfiere, manteniendo las mismas condiciones de asepsia, a un medio de cultivo sólido, cuya composición básica (nutrientes y hormonas) debe ser equilibrada para el establecimiento del cultivo *in vitro* hasta la formación del callo (Evans *et al.*, 2003). Las células del callo son inestables, por lo que se requiere realizar varios ciclos de subcultivos hasta alcanzar la estabilidad genética, para transferirlas a un medio líquido en auxinas con lo que se consigue la proliferación de células y la formación de un callo friable. Este último se cultiva en el medio líquido en agitación para dispersar las células en unidades independientes o en pequeños agregados celulares. Una vez dispersadas las células, se cultivan en suspensión en un medio líquido con bajas concentraciones de auxina. Estas suspensiones se utilizan para la selección de colonias y para la obtención de pequeños inóculos de células que se siembran en placas petri en medio solidificado con agar para la selección de colonias aisladas (Bourgau *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Esquema del procedimiento para la producción de metabolitos secundarios mediante un cultivo de células en suspensión. Fuente: elaboración propia.

- Etapa 2: Selección de líneas celulares.

En los cultivos celulares se pueden seleccionar las células que presenten un carácter distintivo y detectar si estas han sufrido alguna modificación, p.e. una mutación o un cambio epigenético, que pueden inducir la síntesis de un metabolito secundario. Las células seleccionadas son las **líneas celulares**. Considerando que el proceso persigue obtener líneas celulares estables, de alto rendimiento, lo primero, que se realiza es el cribado. El proceso requiere realizar diversas determinaciones como exámenes microscópicos, análisis químico y medida de la biomasa o simplemente la selección visual cuando las células son fácilmente identificables por presentar algún tipo de pigmento (antocianinas, naftoquinonas, betacianinas, carotenos, etc.). El resultado de los análisis realizados determina la selección final de colonias que se cultivarán en suspensión para la producción de metabolitos secundarios, la realización de subcultivos y estudios del perfil transcriptómico y metabólico para la obtención de líneas celulares

transgéncias como se ha descrito para la producción biotecnológica de taxanos en cultivos celulares (Cusidó *et al.*, 2014)

- Etapa 3: Optimización de las condiciones de cultivo.

Esta etapa es esencial para la iniciación del callo y el establecimiento del cultivo. Se requiere controlar factores físicos y químicos como luz, temperatura, aireación, pH, nutrientes, relación C/N, hormonas (auxina y citoquininas) y otros reguladores de crecimiento. Sin embargo, no existe una composición química universal y aunque existen numerosas formulaciones comerciales, en muchos casos cada laboratorio adapta los medios de cultivo a sus propios intereses. No obstante, el medio base más generalizado es el diseñado, ensayado y utilizado por Murashige y Skoog (1962), investigadores de reconocido prestigio y pioneros en este campo. Este medio base se suele acomodar a las condiciones y peculiaridades de cada trabajo, por lo que se suplementan con diversos compuestos, especialmente vitaminas, hormonas y reguladores de crecimiento, que han sido exhaustivamente revisados para el cultivo *in vitro* (en todas sus modalidades) de más de doscientas treinta especies medicinales, de los cuales un 30 % se corresponden con cultivos en suspensión. (Karuppusamy, 2009).

- Etapa 4: Cultivo de células en suspensión.

El término **cultivo *in vitro*** hace referencia fundamentalmente a tres tipos diferenciados de cultivos en condiciones asépticas controladas: tejidos y órganos, células en suspensión (suspensiones celulares) y células inmovilizadas. El tipo de cultivo *in vitro* influye en la formación de biomasa y de productos de interés y condiciona el sistema técnico a utilizar para la producción a gran escala.

Teniendo en cuenta los comentarios señalados en las etapas anteriores, el cultivo de células en suspensión se realiza en medio líquido en agitación, lo que permite distribuir de una forma más o menos homogénea las células de manera individualizada en el medio de cultivo, facilitando la transferencia de nutrientes y oxígeno. Este tipo de cultivo permite también controlar con facilidad algunos factores (oxígeno, pH o temperatura, etc.), pero pueden presentarse cambios en la diferenciación celular y en la compartimentación intercelular, lo que implicaría modificaciones de las características propias de las células y probablemente un descenso de la producción de metabolitos secundarios.

Por otra parte, en un cultivo en suspensión se pueden producir agregados celulares que podrían interferir o limitar la transferencia de nutrientes y oxígeno al interior de todas las células del agregado, que, junto con un aumento de la comunicación intercelular, podrían facilitar el intercambio de algunos compuestos limitando la síntesis de otros metabolitos deseados. Las dificultades que, en ocasiones, presentan los agregados celulares pueden reducirse con el uso de pectinasas para la hidrólisis de la pectina de la lámina media de la pared celular, lo que permitiría la separación de las células agregadas.

No obstante, a pesar de las dificultades que pueden presentarse en este tipo de cultivos, en comparación con el cultivo de la planta en condiciones naturales, existen algunas ventajas muy relevantes que les confieren un alto valor. Entre estos beneficios se encuentran los siguientes:

- Producción más segura y predecible.

- Extracción de los metabolitos secundarios más rápida y eficiente.
- Producción de un determinado metabolito en grandes volúmenes.
- Producción en continuo al ser independiente de las condiciones edafoclimáticas.
- Potencial para producir un compuesto de mayor valor comercial.
- Producción de metabolitos en menor tiempo independiente del ciclo ontogénico de la planta.
- Producción exenta de limitaciones administrativas relacionadas con la conservación de algunas especies o de los metabolitos que producen.
- Producción ajena a las barreras geográficas.
- Producción menos agresiva para el medio ambiente

A título ilustrativo, se pueden citar algunos metabolitos cuya producción se incrementa en cultivos celulares, tales como: ácido rosmarínico (*Salvia officinalis*, *Coleus blumei*), antraquinona (*Morinda citrifolia*), berberina (*Coptis japonica*) y sanguinaria (*Papever somniferum*) (Ramachandra Rao y Ravishhanker, 2002) y paclitaxel (*Taxus baccata*) (Malik *et al.*, 2011).

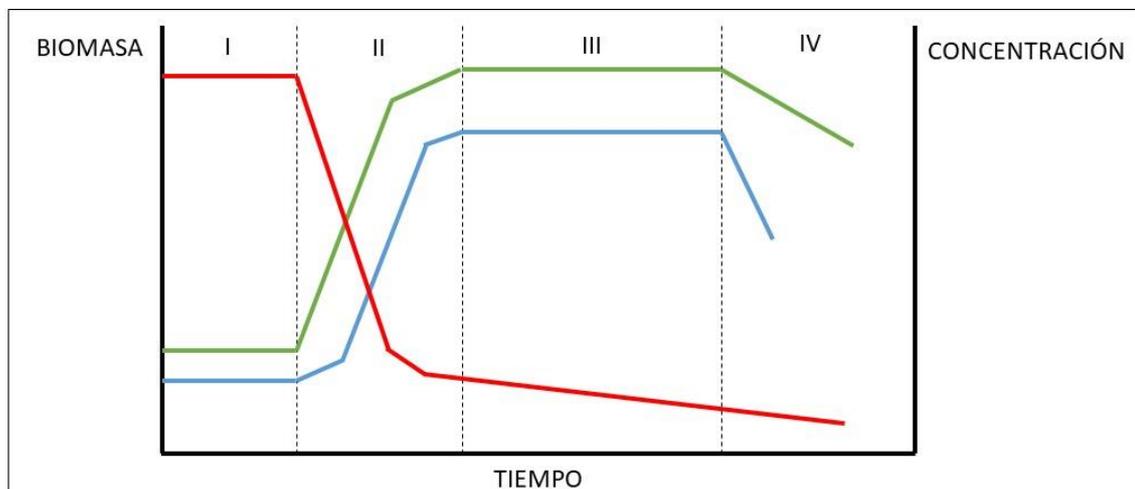
Un cultivo de células en suspensión de las líneas celulares se puede realizar a una mayor escala en biorreactores. Estos equipos están inspirados en los fermentadores que se usan en Microbiología, pero teniendo presente las diferencias entre las células vegetales y los microorganismos (**Tabla 2**) y el binomio crecimiento celular-producción de metabolitos secundarios.

**Tabla 2.** Caracterización comparativa entre células microbianas y vegetales y su incidencia en cultivo *in vitro* a gran escala. Fuente: Scraag, 1992.

CARACTERIZACIÓN	CÉLULAS MICROBIANA	CÉLULAS VEGETALES	CONSECUENCIAS CULTIVOS A GRAN ESCALA
TAMAÑO/FORMA	INDIVIDUAL 2-10 µm	AGREGADOS 10 – 200 µm a 2 mm	Sedimentación rápida. Sensibilidad a fuerzas de corte Formación de gradientes. Dificultad toma de muestras
VELOCIDAD CRECIMIENTO	RÁPIDA td ~ 1 – 2 h	LENTA td ~ 2 – 5 días	Largos tiempos de proceso. Baja productividad
DENSIDAD DE INOCULACIÓN	PEQUEÑA	5 – 20 %	Necesidad de grandes cantidades de inóculo Escalado más largo
SENSIBILIDAD A FUERZAS DE CORTE	INSENSIBLE	SENSIBLE/TOLERANTE	Bajas velocidades de agitación
AIREACIÓN	ALTA	BAJA	Baja demanda de oxígeno: fermentadores con baja transferencia de oxígeno
ACUMULACIÓN DEL PRODUCTO	EXTRACELULAR	INTRACELULAR A VECES EXTRACELULAR	Permeabilización. Remoción <i>in situ</i>

Con carácter previo, hay que señalar que en la producción a gran escala resulta inevitable controlar tres variables esenciales para el éxito del proceso: evolución de la biomasa, consumo de sustrato y producción metabólica. Estas variables siguen un patrón que se presenta en la **Figura 3** y que transcurre en cuatro fases (Torres *et al.*, 2018):

- Fase I o de latencia: Se produce tras el traslado de las células al biorreactor. Se caracteriza por la ausencia de crecimiento, o si existiera, es muy pequeño.
- Fase II o de crecimiento exponencial: Se caracteriza por un crecimiento y división celular rápidos, lo que conlleva un gran aumento en la producción de metabolitos primarios con el consecuente aumento de consumo de sustrato.
- Fase III o estacionaria: Se caracteriza por un mantenimiento de la biomasa debido a la limitación de nutrientes y a la máxima producción de metabolitos secundarios.
- Fase IV o de caída: Se produce una disminución de la biomasa por el agotamiento de los nutrientes y la disminución de la biosíntesis de producto de interés debido a la lisis celular.

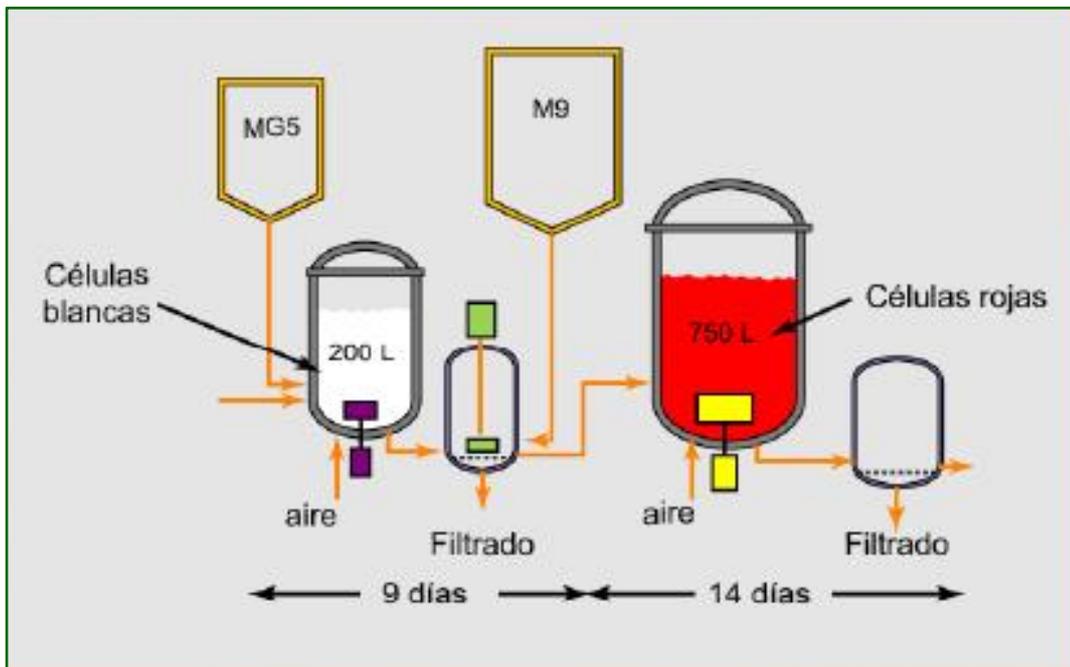


**Figura 3.** Evolución de la biomasa (verde), sustrato (rojo) y producción de metabolitos (azul). Fases: I, de latencia; II, exponencial; III, estacionaria; IV, de caída. Adaptado de Torres *et al.* (2018)

Como se muestra en la **Figura 3**, el patrón de producción de metabolitos secundarios en el biorreactor es similar al patrón de crecimiento, alcanzándose el máximo estable de producción al final de la fase exponencial (fase II), pero teniendo en cuenta que se utilizan medios diferentes. El medio de crecimiento es el medio nutritivo (medio de cultivo) y el medio de producción de metabolitos (medio de producción). Por tanto, se emplea el medio de cultivo para una rápida proliferación celular y obtención de biomasa y luego se realiza la transferencia de células a otro biorreactor con el medio de producción.

Esta estrategia se conoce como **sistema de cultivo en dos etapas**. En la **Figura 4** se presenta este sistema que se utilizó con éxito para la producción a gran escala de siconina, primer metabolito secundario comercializado obtenido en biorreactor a partir de cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, lo que supone un hito en la historia de la biotecnología de las plantas, junto con la producción de paclitaxel a partir de cultivos celulares de *Taxus spp.*

La siconina se usa por su acción antimicrobiana y colorante para cosméticos, alimentos y telas. Es una naftoquinona, de color rojo o magenta, que se localiza y sintetiza en la raíz de la especie señalada y otros géneros como *Arnebia*, *Echium*, *Onosma* o *Alkanna* con tasas similares de producción. La producción de siconina de plantas cultivadas (1,4% en 48 meses) comparada con la producida por cultivo celular (20% en 0,8 meses) es 800 veces inferior en el cultivo tradicional en el medio natural. Un biorreactor con un tanque 750 L que contenga 600 L de medio de producción puede generar 2 g/L/2 semanas de siconina. Además, la secreción del metabolito al exterior de las células es significativa, lo que supone una ventaja añadida a la hora de obtener el producto (Yazaki, 2017). Recientemente se han revisado diferentes métodos para incrementar los niveles de siconina de las células, entre los que se incluyen selección de líneas celulares, optimización de las condiciones de cultivo, retirada del producto *in situ* y otras estrategias de optimización de la producción como la elicitación, transformación génica e ingeniería metabólica (Malik *et al.*, 2016), lo cual es muy interesante para mantener una producción regular y sostenida para abastecer la demanda de este metabolito secundario en un mercado altamente regulado y exigente.



**Figura 4.** Producción de siconina a partir de un cultivo celular de *Lithospermum erythrorhizon* Sieb et Zucc. mediante un sistema de cultivo en dos etapas. Etapa 1, crecimiento rápido: formación de biomasa (9 días); Etapa 2, crecimiento lento y división: alta producción de siconina (14 días); Medio de cultivo; MG5 medio LS optimizado; Medio de producción, M9 medio bajo en nutrientes. LS, medio Linsmaier y Skoog (1965). Adaptada de Yazaki, 2017.

Respecto del paclitaxel, comercializado como Taxol®, cabe comentar que es un potente fármaco antitumoral que ha tenido un uso muy extendido en terapéutica. Se obtiene de la corteza de *Taxus spp.*. Se aisló por primera vez de *T. brevifolia*, pero el lento crecimiento de esta especie arbórea y la baja producción disminuye la rentabilidad del

proceso por métodos fitoquímicos. Por ello se ha recurrido a su producción mediante cultivos de células vegetales *in vitro*. Los últimos avances en la producción de este fármaco se basan en la identificación de elicitores, favorecer la secreción del producto al exterior de la célula para evitar una potencial toxicidad y en la identificación de genes clave en la biosíntesis del metabolito (Cusidó *et al.*, 2014).

En consonancia con lo anterior, un biorreactor, según Kintzios (2010), es un sistema automatizado de cultivo cuya función principal es controlar el medio para conseguir las mejores condiciones para el crecimiento celular y/o formación de metabolitos de interés. Los factores que influyen en el correcto funcionamiento de un biorreactor son la concentración de biomasa, el mantenimiento de condiciones de esterilidad, la distribución uniforme de nutrientes, el calor, la mezcla (condiciones de corte de las células) y transferencia de oxígeno.

Conviene señalar que no existe un biorreactor universal, sino que se necesita la adaptación apropiada a cada tipo de cultivo *in vitro*. Desde un punto de vista técnico, los principales tipos son los de agitación mecánica y los de agitación neumática (Kintzios, 2010; Torres *et al.*, 2018).

Los biorreactores de agitación mecánica emplean la energía mecánica producida por la rotación de unas palas para la homogenización del medio y pueden disponer de tanques de agitación con rotor o turbina. Los primeros alcanzan velocidades de hasta 100 rpm y en algunos casos presentan difusores para insuflar aire al sistema, mientras que los segundos producen una rotación de 90 a 120 rpm pudiendo llegar hasta 300 rpm (cuando se emplean palas más grandes, planas o inclinadas) si fuera necesario en medios de mayor viscosidad.

Por otro lado, los biorreactores de agitación neumática producen agitación por la transferencia de aire al medio y su posterior expansión en el mismo y pueden distinguirse entre columnas de borboteo y *airlifts*:

- Columnas de borboteo: Se caracterizan por formar burbujas.
- *Airlifts* o dispositivos de circulación del aire: Su mecanismo de mezcla consiste en inyectar aire u otra fase gaseosa en el medio para propiciar la movilización de las fases más densas hacia las otras zonas. Así se genera una circulación de estas fases por el tanque de dos formas, las denominadas de circulación interna empleando un tubo interior por el que puede subir o bajar esta fase y producir el movimiento contrario por la zona que rodea dicho tubo o bien las de circulación externa donde existe un tabique separando las dos zonas con flujo. Existen modelos de pequeño tamaño comerciales como son el reactor de inmersión temporal RITA o el LifeReactor.

En cultivos celulares en suspensión de *Nicotiana tabacum* y *Ruta vulgaris* se ha utilizado la columna de borboteo y el tanque con turbina, respectivamente. Sin embargo, la producción de metabolitos secundarios a nivel industrial es un proceso complejo, más aún si se tienen en cuenta todos los problemas que pueden ocurrir. Algunos ejemplos son la formación de agregados celulares, la biogénesis de cloroplastos u otras estructuras más complejas, la activación o modificación de determinados genes, los cambios de compartimentación, los incrementos de sustratos para otras vías, la secreción del producto al exterior de la célula, la degradación de precursores por

enzimas extracelulares o el efecto de corte en los biorreactores con agitación mecánica (Tang *et al.*, 2010).

El tiempo que hay que mantener un cultivo depende del metabolito y de la especie que está siendo cultivada. El tiempo, así mismo, se verá modificado según el tipo de precursor que se añada y el momento en el que se añada. Esto se ha observado en la producción de hipericina y flavonoides por *Hypericum perforatum* al añadir benziladenina y ácido naftalenacético para períodos de cultivo de 30 y 100 días (de Andrade Figueiró *et al.*, 2010).

El proceso de obtención de metabolitos consta de tres pasos (Tang *et al.*, 2010):

1. Preparación de la muestra preliminar homogénea para facilitar la extracción que viene a continuación. Se realiza mediante un secado y homogenización, salvo que el producto sea volátil, en ese caso se deberá realizar una destilación.
2. Extracción mediante distintas técnicas según las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos, por ejemplo, mediante solventes de distinta polaridad que propicien el paso del producto a este líquido.
3. Análisis cualitativo y cuantitativo del producto obtenido. Se pueden emplear distintas técnicas que aprovechan la presencia de grupos cromóforos en la molécula, de grupos funcionales o su peso molecular. Estas técnicas son la resonancia magnética nuclear, la espectroscopía de masas (MS) u otras que permiten separar analitos y analizarlos simultáneamente como la LC-MS (una MS asociada a una cromatografía). La técnica más empleada en los laboratorios es la HPLC, pero debemos disponer de un estándar del analito.

- Etapa 5: Adición de precursores.

Los precursores son moléculas que se incorporan en las rutas biosintéticas de metabolitos primarios o secundarios para que, mediante distintas reacciones enzimáticas, transformarse en estos. Lo que se espera de un precursor es que sea de bajo coste, tenga baja o nula toxicidad y sea análogo estructural al producto que deseamos obtener, ya sean de la propia ruta o no. Esta herramienta permite dirigir el metabolismo de las células hacia el producto que deseamos obtener y aumentar la eficiencia del proceso, pudiendo, en algunos casos, ser los precursores inductores de la síntesis del metabolito secundario de interés. Así, por ejemplo, la adición de aminoácidos al medio de cultivo favorece la síntesis de alcaloides porque pueden actuar tanto como precursores metabólicos como inductores (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

- Etapa 6: Elicitación.

La síntesis de metabolitos secundarios responde a la necesidad de defensa de las plantas antes situación de estrés (condiciones adversas), generalmente del medio externo. Esta respuesta ecofisiológica se conoce como **elicitación** y se basa en inducir la expresión de genes que codifican enzimas del metabolismo secundario por la exposición de las células del cultivo al agente que produce el estrés, denominado como elicitador (Pérez-Alonso *et al.*, 2011; Karuppusamy, 2009). No obstante, la respuesta depende de la especificidad y concentración del elicitador, del tiempo de contacto de la célula con el elicitador, del medio y condiciones del cultivo.

Según el origen del elicitor se distingue dos grandes grupos:

- Elicitores abióticos: pueden ser físicos (temperaturas extremas, radiaciones luminosas, daño mecánico, etc) o químicos (moléculas inorgánicas que supongan un estrés iónico o nutricional, salinidad, elementos contaminantes, etc). Un ejemplo muy claro de la elicitación abiótica es el efecto del daño mecánico producido por un herbívoro. Este proceso está mediado por el MJ, que produce un aumento de metabolitos secundarios y depleción de carbohidratos.
- Elicitores bióticos: son compuestos de naturaleza definida, entre otros, pectina, celulosa, quitina, quitosan, metiljasmonato, o glucanos y otros de composición compleja como esporas fúngicas y extractos de bacterias, levaduras y hongos. Los extractos bacterianos o fúngicos se emplean cuando se desconoce qué molécula tiene la acción elicitora, como por ejemplo la aplicación de extractos bacterianos en la obtención de ginkgólidos en un cultivo de células en suspensión de *G. biloba* con un extracto de *S. aureus* (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016).

- Etapa 7: Transformaciones genéticas.

La transformación genética consiste optimizar una característica celular mediante la transferencia, adición o deleción de genes, con el fin de mejorar la producción del metabolito de interés. Los métodos de transformación génica se han convertido en herramientas muy necesarias y relevantes. El resultado de estos métodos es la introducción de un ADN ajeno al genoma vegetal y el organismo receptor se conoce como transgénico.

La aplicación de esta tecnología al cultivo *in vitro* procede del reconocimiento de enfermedades de las plantas producidas por bacterias del suelo, gram negativas, en concreto *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*. La primera causa la enfermedad de las agallas de corona, que se manifiesta por un crecimiento tumoral formando células indiferenciadas, mientras que la segunda produce en la zona de infección un desarrollo desmesurado de raíces, conocido como raíces en cabellera ("hairy roots") que constituyen un tipo de cultivo *in vitro* muy eficaz.

Durante el proceso de infección estas bacterias son capaces de transferir un fragmento del plásmido que albergan, denominado T-ADN (ADN transferencia), al genoma de la célula vegetal originando la transformación. La expresión de oncogenes del fragmento T-ADN produce la proliferación masiva de las células causando la enfermedad. No obstante, la transformación génica producida por *A. tumefaciens* requiere un método eficiente para la regeneración de la planta y un sistema de selección de adecuado de las células transformadas (Bourras *et al.*, 2015).

Además de la tecnología del ADN recombinante mediante el uso de vectores biológicos, existen métodos denominados directos, tales como: 1) la electroporación para la fusión de protoplastos, 2) el método biolístico o de disparo de microproyectiles con ADN y 3) la microinyección de ADN mediada por liposomas, que entran en las células por endocitosis.

## 6 CONCLUSIONES

- La biotecnología vegetal puede convertirse para la producción de metabolitos secundarios en una alternativa eficaz y sostenible al cultivo tradicional de plantas productoras y a la síntesis química en la industria farmacéutica, sobre todo considerando los avances de las estrategias experimentales de las ingenierías genética y metabólica en este ámbito.
- Se requiere avanzar en los procesos de optimización de cultivos celulares en suspensión para la producción a gran escala de metabolitos de interés farmacológico e industrial, lo que implica profundizar en el conocimiento del funcionamiento de las células en cultivo *in vitro*.
- La producción de fármacos mediante cultivos de células vegetales todavía plantea inconvenientes para la industria, que dificultan la implementación de un programa de innovación y desarrollo en paralelo al actual modelo de negocio de industria farmacéutica. Se requiere ir solventando inconvenientes la variabilidad de la producción, las infraestructuras necesarias, la ausencia de procedimientos normalizados o el coste, entre otros.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

Bourgau F., Gravot A., Milesi S. & Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Sci.* 161: 839–851.

Bourras S., Rouxel T. & Meyer M. 2015. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: How a Plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology.* 105: 1288–1301.

Bruneton J. 2001. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. 2ª Edición. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Cusidó, R.M., Onrubia, M., Sabater-Jara, A.B., Moyano, E., Bonfill, M., Goossens, A., Pedreño, M. & Palazón, J. 2014. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus spp.* *Biotechnology Advances* 32, 1157-1167.

Davey, M. R., & Anthony, P 2010. Plant Cell Culture: Essential Methods. Chichester: John-Wiley & Sons Ltd.

De Andrade Figueiró, A., Manira Correa, C., Vieira Astarira,, L., Romanato Santarém, E. 2009. Long Term Maintenance of *in vitro* cultures affects growth and secondary metabolism of St. Johns's Wort. *Ciencia Rural.* 40: 2115 – 2121.

Evans D. E., Coleman J. O. D & Kearns A. 2003. Plant Cell Culture. 1ª Edición. Taylor & Francis, Londres.

Fiehn, O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48, 155-171.

Guillén C., Herrera B. Aspectos Básicos de la Manipulación *in vitro* de Células de Mamífero. En: Humberto Martín Brieva (coord.). 2018. Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica. 1ª Edición. Madrid: Dextra Editorial S.L. 407-436.

Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants bu in vitro tissue, organ and cell cultures. *J. Med. Plant. Res.*, 3: 1222-1239.

Kintzios S. 2010. Bioreactors, 282-296. Michael R. Davey & Paul Anthony (eds). Plant Cell Culture: Essential Methods. 1st Edition. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.

Linsmaier, E.M. & Skoog, F. (1965) Organic growth factor requeriments of tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 18: 100-127.

Malik, S., Cusidó, R.M., Mirjalili, M.H., Moyano, E., Palazon, J. y Bonfill, M. 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochemistry*, 46: 23-34.

Malik, S., Bhushan, S., Sharma, M. & Abuja, P.S. 2016. Biotechnological approaches to the production of shikonins: A critical review with recent updates. *J. Cri. Rev. Biotechnol.*, 36: 327-340.

Martín S., Torres M. & Saco D. 2018. Biotecnología vegetal, Cultivos vegetales *in vitro*, Obtención de Productos de interés farmacéutico. 353-375. En: H. Martín Brieva (coord.), Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica. 1ª Edición. Dextra Editorial S.L. Madrid.

Molina M. 2018. Expresión Heteróloga de Proteínas en Microorganismos Procarióticos y Eucarióticos, 201-240. En: H. Martín Brieva (coord.), Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica. 1ª Edición. Dextra Editorial S.L. Madrid.

Murashige T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.

Newman, D.J. & Cragg, D.J. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79: 629-661.

Pérez-Alonso N. & Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*. 11: 195-211.

Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A. (2002) «Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites». *Biotechnology Advances*, 20: 101-153.

Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*. 21: 182-206.

Scaagg, A.H. 1992. Bioreactors for the Mass Cultivation of Plant Cells. 45-64. En: Michel H. Fowler & Grahon S. Warren (eds.), Plant Biotechnology. Pergamon Press Ltd., London.

Serrano García, M. & Piñol Serra, M. T. 1991. *Biotecnología Vegetal*. Ed. Síntesis. Madrid.

St-Pierre, B., Vázquez-Flota, F.A., De Luca, V. 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intracellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, 11: 887-900.

Tatsis E.C. & O'Connor S.E. 2016. New developments in engineering plant metabolic pathways. *Current Opinion in Biotechnology* 42, 126-132

Tang K., Zhang L., Chen J., Xiao Y., Chen W. & Sun X. 2010. Secondary products. 297-315. En: Michael R. Davey & Paul Anthony. (eds.), *Plant Cell Culture: Essential Methods*. 1st Edition. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

Torres M., Martín S. & Saco D. 2018. Biotecnología vegetal, Optimización de la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico en cultivos *in vitro*, 377-406. En: H. Martín Brieva (coord.), *Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica*. 1ª Edición. Dextra Editorial S.L., Madrid.

Yazaki K. 2017. *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures: Present and future aspects. *Plant Biotechnol.* 34: 131–142.

Yeoman, M. M. & Yeoman, C. L. 1996. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytol.* 134: 553–569.