



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
EL CULTIVO *IN VITRO* COMO FUENTE DE
PRODUCCIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS**

Autor: Kristin Chavdarova Kamenova

Fecha: Julio 2019

Tutor: Margarita Torres Muñoz

ÍNDICE

Resumen	2
1. Introducción	3
2. Objetivos	4
3. Material y métodos	4
4. Resultados y discusión	4
4.1. Tipos de cultivo <i>in vitro</i>	7
4.1.1. Cultivo de callos	7
4.1.2. Cultivo de células en suspensión	7
4.1.3. Cultivo de órganos	9
4.2. Optimización: Estrategias para aumentar la producción de metabolitos	10
4.2.1. Obtención del explanto	10
4.2.2. Optimización de la composición del medio y las condiciones de cultivo	11
4.2.3. Selección de líneas celulares	12
4.2.4. Adición de precursores	12
4.2.5. Elicitación	13
4.2.6. Inmovilización celular	14
4.2.7. Permeabilización y recuperación del producto <i>in situ</i>	14
4.2.8. Biotransformación	15
4.2.9. Escalado de la producción	15
4.2.10. Transformación genética	17
5. Conclusiones	17
6. Bibliografía	18

RESUMEN

Este trabajo examina la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico a través del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales. Esta técnica permite el control de las condiciones experimentales, lo que es especialmente interesante en los casos en que el cultivo de la planta dependa de numerosos factores externos, requiera mucho tiempo para desarrollarse, o la obtención de metabolitos secundarios sea baja por los métodos de extracción o síntesis habituales.

Se describen diversas técnicas de optimización del proceso, que tienen como finalidad mejorar la estabilidad genética del cultivo, aumentar la producción de biomasa, obtener mayor cantidad del producto de interés o conseguir generar nuevos compuestos. En definitiva, el cultivo *in vitro* tiene un gran potencial para convertirse en un importante sistema de producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. La mejora del rendimiento y la reducción de los costes propios del proceso contribuirán a fomentar el empleo del cultivo *in vitro* y a ampliar sus aplicaciones.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*; metabolitos secundarios; suspensión celular; raíces en cabellera; optimización.

ABSTRACT

This review examines the production of secondary metabolites of pharmaceutical interest through *in vitro* culture of plant cells, tissues and organs. This technique allows the control of the experimental conditions, which is especially interesting in the cases in which the plant culture depends on several external factors, requires a long time to develop, or the formation of secondary metabolites is low when using the usual extraction or synthesis methods.

A number of process optimization techniques are described, whose purpose is to improve the genetic stability of the culture, increase the biomass production, get higher amounts of the product of interest, or manage to produce new compounds. Ultimately, *in vitro* culture has a great potential to become an important system for the production of secondary metabolites of pharmaceutical interest. Improvement of the yield and reduction of the costs of the process will contribute to encourage the use of *in vitro* culture and expand its application.

Key words: *In vitro* culture; secondary metabolites; cell suspension; hairy roots; optimization.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido históricamente empleadas como fuente de obtención de diversos tipos de compuestos, por sus aplicaciones como saborizantes, colorantes, aromatizantes e incluso venenos. Sin duda, el foco de atención tradicionalmente se ha centrado en los compuestos con actividad farmacológica producidos por las plantas medicinales. Estos compuestos son los denominados principios activos, pertenecientes al grupo de metabolitos secundarios, caracterizado por una enorme diversidad estructural, lo que amplía el interés de la industria farmacéutica. En la actualidad, algunos de estos principios activos pueden obtenerse mediante síntesis o hemisíntesis química. No obstante, la extracción química también tiene desventajas ya que, en algunos casos, las sustancias de interés, se obtienen en concentraciones demasiado bajas, lo que condiciona y limita la rentabilidad de este proceso, por lo que no es infrecuente que la extracción desde la propia planta sea el método más seguro y económico (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Una alternativa al cultivo tradicional de plantas y a la extracción química de metabolitos que va ganando protagonismo es el cultivo *in vitro* de células vegetales con el fin de obtener metabolitos secundarios de interés en farmacia. Esta práctica resulta especialmente ventajosa en el caso de plantas cuyo cultivo es dificultoso, por requerir condiciones muy exigentes o necesitar largos periodos para desarrollarse, en muchos casos, sin conocer los ciclos ontogénicos y la relación productividad-desarrollo. En otros casos, la limitación está condicionada por un rendimiento demasiado bajo de los metabolitos de interés obtenidos o porque no existe la posibilidad de obtenerlos por síntesis química. En el cultivo *in vitro* es posible controlar las condiciones del medio de cara a alcanzar un mayor rendimiento y calidad del producto final, así como preservar la biodiversidad cuando las plantas objeto de interés estén en peligro de extinción (Martín *et al.*, 2018).

Los inicios del cultivo *in vitro* se remontan a principios del siglo XX, con los estudios realizados por el fisiólogo alemán Haberlandt sobre el aislamiento y cultivo de células y tejidos de plantas superiores. En sus investigaciones acerca de la diferenciación celular aisló células vegetales y las colocó en soluciones nutritivas para su crecimiento y posterior estudio. Más tarde, en 1926, el descubrimiento por Went de la auxina (ácido 3-indolacético) y de su identificación como regulador de crecimiento fue uno de los hallazgos que más impacto tuvo sobre el conocimiento y desarrollo del cultivo de células y tejidos vegetales. Una revisión histórica sobre el cultivo de tejidos a lo largo del siglo XX (Krikorian y Berquam, 2003) y de la utilización de técnicas de cultivo *in vitro* para el estudio y producción de metabolitos secundarios (Bourgand *et al.*, 2001) son ejemplos muy ilustrativos de los logros conseguidos y del interés y potencial de los sistemas *in vitro*.

La técnica del cultivo vegetal *in vitro* de callo, suspensiones celulares, embriones somáticos u órganos se lleva a cabo en medios artificiales y en condiciones asépticas. Está basada en la totipotencia y desdiferenciación de la célula vegetal; esto es, en su capacidad para volver al estado meristemático y regenerar la planta completa, pues las células cultivadas por este método contienen la misma información genética que la planta madre de procedencia. De esta forma, se pueden cultivar células vegetales a gran escala bajo condiciones controladas, con el fin de obtener compuestos de interés o aumentar la producción de estos (Martín *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es exponer las características del cultivo *in vitro* y examinar su estado como alternativa al cultivo vegetal tradicional para la producción de metabolitos secundarios.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando artículos científicos, artículos de revisión y libros especializados en biotecnología vegetal y farmacéutica. Los estudios publicados sobre cultivo *in vitro* se han hallado a través de la base de datos Medline (mediante el motor de búsqueda PubMed), ScienceDirect, el buscador Google Académico y a partir de las referencias de artículos considerados relevantes.

La estrategia de búsqueda ha consistido en utilizar los términos: *cultivo in vitro*; *metabolitos secundarios*; *callo*; *raíces en cabellera*; *biorreactores*. El criterio de selección de la bibliografía ha sido que estuviese escrita en español o en inglés, priorizando aquella con mayor número de citaciones, de acuerdo con los datos de Citation Google Scholar. Las consultas bibliográficas directas en formato físico se han realizado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios se producen en tejidos específicos de las plantas. Las células cultivadas *in vitro* pueden producir estos metabolitos independientemente de los tejidos originales, ya que cada célula conserva la información genética de la planta original y puede expresarla bajo las condiciones adecuadas (Furusaki y Takeda, 2011).

La importancia del cultivo *in vitro* como fuente de metabolitos secundarios reside principalmente en que representa una estrategia rentable para suplir las potenciales demandas del mercado mundial y frente al cultivo tradicional presentan diversas ventajas, tales como:

- Independencia de factores ambientales
- No necesita la aplicación de pesticidas ni herbicidas, lo que contribuye a la sostenibilidad
- Control de las condiciones del proceso
- Obtención de metabolitos secundarios a gran escala
- Producción de metabolitos de calidad
- Buen rendimiento del proceso
- Mantenimiento regular de una producción previsible capaz de satisfacer las exigencias del mercado
- Posibilidad de obtener compuestos de interés no existentes en la planta silvestre o cultivada
- Periodo de desarrollo de la planta más corto
- Alternativa para reducir el riesgo de extinción de especies vegetales

En el caso de algunos cultivos, los procesos de extracción, purificación, identificación y cuantificación de los productos pueden ser más simples, lo que representa una ventaja añadida. Además, su aplicación supondrá reducir los tiempos de producción y los costes del proceso (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Atanasov *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2018)

Asimismo, el cultivo *in vitro* resulta una opción interesante en el desarrollo de investigaciones sobre procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas. Esta opción será un hecho con la ayuda de la metabolómica, ciencia “ómica” emergente, cuya finalidad es caracterizar la actividad del metabolismo celular detectando y cuantificando metabolitos en un sistema biológico. De esta forma, permite conocer el perfil metabólico, lo que proporciona información de la realidad del sistema biológico en estudio. Por ello, la ingeniería metabólica contribuirá a conocer la complejidad del metabolismo secundario, la compartimentación celular de los metabolitos secundarios y los posibles mecanismos implicados en su transporte, dado que las reacciones de biosíntesis, transformación, degradación y acumulación no siempre tienen lugar en la misma célula. Así, a través de la metabolómica y con el apoyo de las demás ciencias “ómicas” (genómica, transcriptómica y proteómica), se podrán conocer las rutas biosintéticas, sus respectivos compuestos finales y optimizar los procesos de producción de metabolitos secundarios de alta calidad con un mayor rendimiento (Bhatia, 2015; Liu y Locasale, 2017; Martín *et al.*, 2018).

Cualquier especie vegetal es susceptible de cultivarse *in vitro* (Tabla 1) si bien, en la práctica, la industria farmacéutica es la que determina qué especies se seleccionan para cultivarse en sistemas *in vitro*. Ante las numerosas posibilidades, en general, se opta por las especies de mayor productividad en un principio activo de interés. No obstante, para poder competir con los productos de plantas obtenidos por los métodos tradicionales, el cultivo *in vitro* de células vegetales debe disminuir los costes de producción, las células cultivadas deben ser genéticamente estables y el precio de los productos obtenidos debe estar acorde con su calidad y rendimiento.

En la actualidad, la producción más exitosa es la de paclitaxel, un fármaco de alto valor económico efectivo en varios tipos de cáncer. Este compuesto y sus precursores son producidos únicamente en plantas, mientras que los cultivos celulares de *Taxus* producen ambos. Otra realidad industrial es el caso del cultivo *in vitro* de células vegetales de *Panax ginseng*, que contiene unas saponinas llamadas ginsenósidos, cuyas propiedades han convertido al ginseng en un componente clave en complementos alimenticios para consumo humano (Furosaki y Takeda, 2011).

Tabla 1. Algunos metabolitos secundarios con aplicaciones farmacológicas que pueden obtenerse por cultivo *in vitro*.

Metabolito	Especie productora	Efecto farmacológico	Tipo de cultivo
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antihipertensivo	Callo
Berberina	<i>Coptis japonica,</i> <i>Thalictrum minus</i>	Antiinflamatorio, hipoglucemiante	Células en suspensión
Vincristina	<i>Catharantus roseus</i>	Anticancerígeno	Células en suspensión
Digitoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico	Células inmovilizadas
Atropina	<i>Atropa belladona</i>	Anticolinérgico	Brotos
Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i>	Antidepresivo	Brotos
Hiosciamina	<i>Hyoscyamus albus</i>	Anticolinérgico, antiespasmódico	Raíces
Ginsenósidos	<i>Panax ginseng</i>	Adaptógeno, tónico, hipoglucemiante	Raíces en cabellera
Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Antibacteriano, antiinflamatorio, anti-VIH	Raíces en cabellera

Adaptado de Rao y Ravishankar (2002); Bhatia y Bera (2015); Wang *et al.* (2017).

Según el estudio de Newman y Cragg (2012), entre 1981 y 2010 se aprobaron 1355 nuevos fármacos. (Fig. 1), de los cuales un 29% fueron obtenidos exclusivamente por síntesis química, mientras que más de la mitad eran derivados o estaban inspirados en compuestos de origen natural. Un grupo de fármacos derivados de plantas de especial interés es el de los anticancerosos, como paclitaxel, vinblastina y vincristina, cuyo valor en el mercado es muy elevado (600.000, 1 millón y 2 millones \$/kg, respectivamente). Esto pone de manifiesto la importancia de la búsqueda o síntesis de nuevos compuestos de interés en Farmacia (Rao y Ravishankar, 2002; Atanasov *et al.*, 2015).

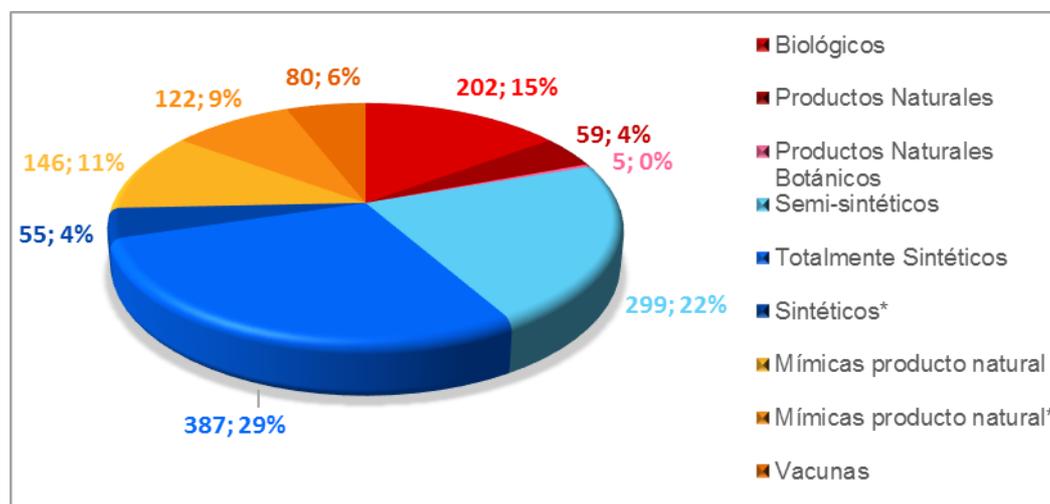


Figura 1. Nuevos fármacos aprobados entre 1981 y 2010. n =1355. Newman y Cragg (2012).

4.1 TIPOS DE CULTIVO *IN VITRO*

4.1.1. Cultivo de callos

El callo es una formación de células morfológicamente indiferenciadas que se dividen de forma desordenada. Su crecimiento es irregular y tiene potencial para formar raíces, brotes y embriones, pudiendo dar lugar finalmente al desarrollo de una plántula.

El callo se forma al colocar una pequeña porción de un tejido vegetal, denominada explanto, en un medio de cultivo sólido, y es el punto de partida del cultivo *in vitro*. Los medios de cultivo más utilizados son el MS (Murashige & Skoog, 1962) y el B5 (medio basal de Gamborg, 1975), pero la elección del medio más apropiado depende de varios factores, como la especie vegetal que se esté cultivando.

Tras la formación del callo se induce la organogénesis, el cultivo atraviesa una fase de aclimatación y, finalmente, acaba regenerándose la planta completa (Fig. 2). El callo es, además, el paso previo al cultivo en medio líquido, ya que a partir de él se pueden obtener suspensiones celulares, embriones somáticos y protoplastos, y permite realizar transformaciones genéticas.

El medio de cultivo debe contener la proporción adecuada de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas), fuentes de carbono y de nitrógeno orgánico y un determinado pH. La elección de los componentes concretos y su concentración en el medio nutritivo dependerá del tipo de cultivo *in vitro* que se quiera realizar, además de la especie vegetal y el tipo de tejido inicial (Furusaki y Takeda, 2011; Martín *et al.*, 2018).

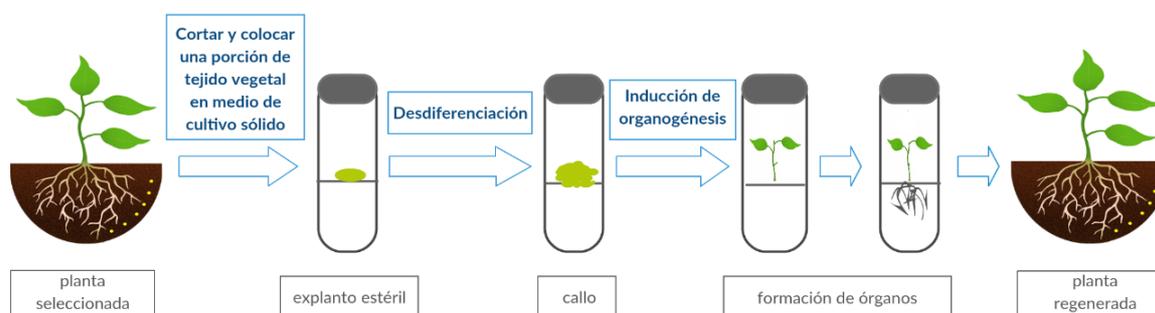


Figura 2. Proceso de cultivo *in vitro* en medio sólido mediante formación de callo. Adaptado de Muñoz de Malajovich (2012).

4.1.2. Cultivo de células en suspensión

Los cultivos a gran escala de células en suspensión tienen mucha importancia industrial como fuente de producción de metabolitos secundarios. El primer paso en este proceso es aislar las células, partiendo de un explanto de la planta seleccionada o de un callo friable, cuyas células están asociadas de forma laxa, permitiendo una mayor dispersión celular. Cuando un número suficiente de células ha proliferado en el medio sólido de partida, las células se transfieren a un medio de cultivo líquido, generando una suspensión celular fina (Fig. 3).

Para producir compuestos de interés a gran escala a partir de suspensiones celulares, las células deben transferirse a un biorreactor. Los biorreactores son recipientes utilizados en procesos biotecnológicos con el fin de optimizar el crecimiento y la actividad metabólica de las células de un cultivo. Existen diferentes tipos de biorreactores apropiados para cada tipo de cultivo y naturaleza de las células, y su volumen puede ser de varios miles de litros.

Los cultivos celulares también pueden utilizarse para inducir embriogénesis somática y obtener semillas sintéticas o para regenerar la planta completa. En el cultivo, el aumento de células tiene lugar durante un período de tiempo. Cuando se utiliza un volumen finito de medio durante todo el cultivo, administrando una cantidad limitada de nutrientes, el crecimiento celular se detiene cuando estos se agotan: es entonces cuando se recolectan los productos generados por las células. El objetivo es aumentar la acumulación de los compuestos deseados para obtener una alta producción.

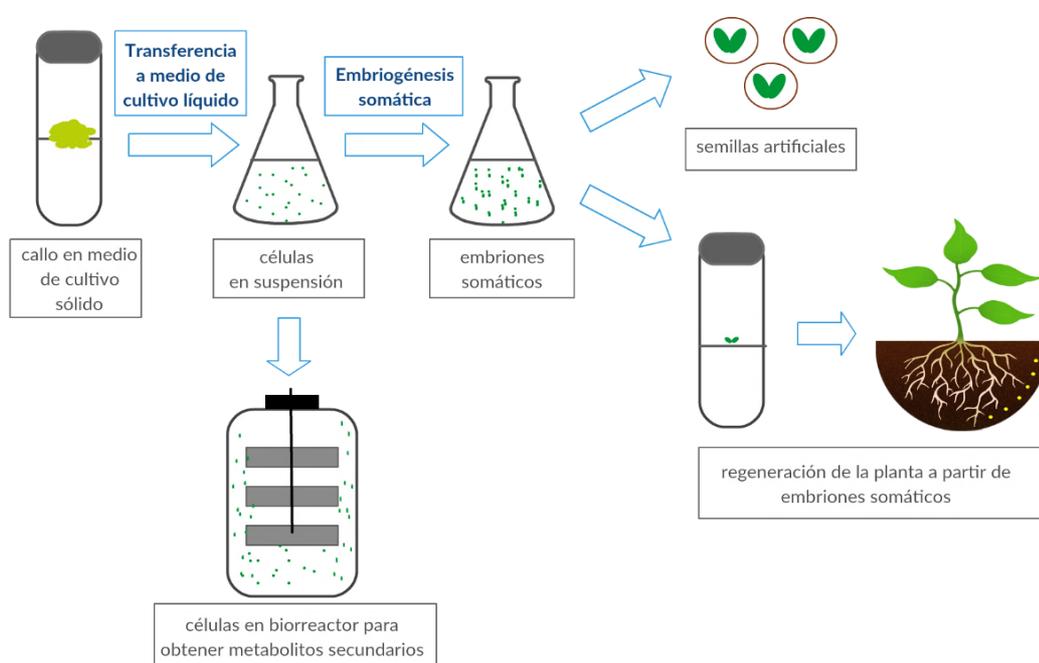


Figura 3. Proceso de cultivo *in vitro* en medio líquido. Adaptado de Muñoz de Malajovich (2012).

En las suspensiones celulares, puede ser que no todos los compuestos producidos se generen en igual cantidad y calidad que en las plantas madres. Esto se puede deber a distintos motivos: puede existir inestabilidad genética y fisiológica, muchos metabolitos se sintetizan ligados a la diferenciación celular, y puede haber pérdida de producto con el tiempo. No obstante, se pueden encontrar líneas celulares que producen metabolitos en igual o superior cantidad a la obtenida en condiciones naturales, y una estrategia para aumentar el rendimiento del proceso consiste en identificar y seleccionar estas líneas celulares para establecer el cultivo *in vitro*.

También se han detectado nuevas sustancias no sintetizadas por las plantas en su hábitat natural, lo cual pone de manifiesto la relevancia del cultivo *in vitro* de células para obtener nuevos metabolitos secundarios (Furusaki y Takeda, 2011; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Martín *et al.*, 2018).

4.1.3. Cultivo de órganos

Muchos metabolitos secundarios se acumulan a nivel celular en compartimentos específicos, relacionadas con el lugar en que se encuentran sus moléculas precursoras y las enzimas implicadas en su biosíntesis. Por tanto, la diferenciación celular y la formación de metabolitos secundarios están estrechamente ligados, pues algunos metabolitos solo se producen en estructuras especializadas, o alcanzan mayores concentraciones en determinados tejidos. Debido a esta relación y a la mayor estabilidad genética frente al cultivo de callo y a las suspensiones celulares, el cultivo de órganos representa una importante herramienta para la producción de metabolitos secundarios, siendo los brotes y las raíces los órganos más interesantes para cultivarse *in vitro* debido a que posibilitan el cultivo a gran escala.

El cultivo *in vitro* de raíces se establece a partir de ápices de raíces primarias o laterales, obtenidos de semillas germinadas en condiciones asépticas, que constituyen el explanto. Tras la siembra del explanto, las raíces se cultivan independientemente de los tejidos del brote. En este tipo de cultivo es preferible usar un medio líquido para posibilitar una mayor disponibilidad de sales y un mejor requerimiento de oxígeno.

En el caso de ciertas plantas, como el género *Datura*, el cultivo puede mantenerse durante largos períodos, permitiendo la realización de subcultivos; en otros casos, la formación de raíces laterales no es suficiente para producir los explantos necesarios para hacer subcultivos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Martín *et al.*, 2018).

El cultivo de raíces en cabellera (*hairy roots*) es el más empleado para producir metabolitos secundarios de forma industrial. Generalmente, crecen más rápido y tienen mayor productividad que las células de callos, y a menudo no requieren fitohormonas para desarrollarse. Este cultivo se basa en la infección del explanto con *Agrobacterium rhizogenes*, resultando en el desarrollo de raíces aéreas ramificadas en el sitio de infección (Fig. 4). Su ventaja es su rápida multiplicación y que no necesitan la aplicación de reguladores de crecimiento, por lo que su cultivo es ideal para estudios metabólicos y posibilita el escalado de la producción en biorreactores.

El cultivo de raíces, específicamente el de las transformadas, muestra buen crecimiento *in vitro* y producción de metabolitos secundarios en cantidades equivalentes o mayores a las producidas por plantas cultivadas en condiciones naturales (Furusaki y Takeda, 2011; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

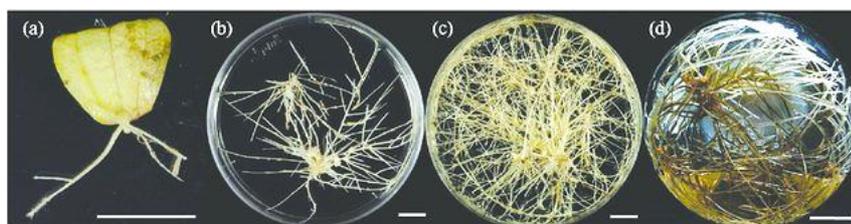


Figura 4. Cultivo de raíces en cabellera de *Gentiana scabra* mediado por *Agrobacterium rhizogenes*. (a) Inducción de raíces en cabellera a partir de una punta de hoja; (b) cultivo en medio sólido WPM durante 4 semanas; (c) cultivo en medio sólido WPM durante 8 semanas y (d) cultivo en medio líquido B5 durante 4 semanas. Tomado de Huang *et al.* (2014).

Tal como viene resumido en la Tabla 2, cada tipo de cultivo *in vitro* presenta una serie de características que pueden representar ventajas o desventajas respecto a las demás alternativas, y se elegirá el más apropiado de acuerdo a los fines que se persigan.

Tabla 2. Características de los distintos tipos de cultivo *in vitro*.

Tipo de cultivo	Estabilidad genética	Crecimiento	Posibilidad de escalado	Producción de metabolitos
Callo	×	Lento y heterogéneo	×	Menor que en la planta madre
Células en suspensión	×	Rápido	✓	No uniforme en calidad y cantidad
Brotos	✓	Lento	×	No genera todos los obtenidos en hojas
Raíces en cabellera	✓	Rápido	✓	Igual o superior que en la planta madre

Adaptado de Pérez-Alonso y Jiménez (2011); Atanasov *et al.* (2015); Martín *et al.* (2018).

4.2. OPTIMIZACIÓN: Estrategias para aumentar la producción de metabolitos

Una vez elegido y establecido el sistema de cultivo *in vitro* para obtener el metabolito deseado, hace falta adoptar estrategias para mejorar el rendimiento del proceso y aumentar la productividad. Algunas de las tácticas que pueden llevarse a cabo para optimizar el proceso e incrementar la producción de metabolitos secundarios son: elegir el tipo adecuado de cultivo *in vitro*, ajustar las condiciones, elegir el medio de cultivo más apropiado, escoger el tipo de explanto, seleccionar las líneas celulares más productivas, adicionar hormonas, introducir precursores, utilizar técnicas como elicitación, inmovilización celular, permeabilización y biotransformación, hacer el escalado a biorreactores o realizar transformaciones genéticas.

4.2.1 Obtención del explanto

El cultivo celular se inicia seleccionando el explanto de la planta madre con alto contenido del producto deseado. A partir de este se induce la formación del callo para obtener líneas celulares (Rao y Ravishankar, 2002). El explanto debe obtenerse de la planta madre en condiciones asépticas y trasladarse, manteniendo esas condiciones, a un medio de cultivo sólido con la composición química y hormonal apropiada para que el cultivo de callo se establezca. A menudo, lo más apropiado es usar un explanto joven, ya que generalmente favorece una evolución más rápida del cultivo y proporciona menor probabilidad de contaminación por microorganismos (Mroginski *et al.*, 2010; Kumar y Reddy, 2011; Torres *et al.*, 2018).

4.2.2. Optimización de la composición del medio y las condiciones de cultivo

En el cultivo que se traslada al biorreactor, la evolución de biomasa (el patrón de crecimiento celular) transcurre en cuatro fases (Fig. 5):

- I. Fase de adaptación o latencia: Las células se transfieren al biorreactor con el medio de producción y se van adaptando a las condiciones del cultivo. No hay crecimiento celular.
- II. Fase exponencial: Crecimiento celular rápido. A medida que los nutrientes del medio se van consumiendo, va aumentando la concentración de metabolitos primarios. La concentración de metabolitos secundarios también aumenta significativamente.
- III. Fase estacionaria: La proliferación celular y la producción de metabolitos primarios ha mermado los nutrientes del medio. La densidad celular ha alcanzado su máximo: el crecimiento celular se mantiene constante al final de esta fase debido a que las células crecen utilizando sus propias reservas. La producción de metabolitos secundarios es máxima por lo que, en un biorreactor, es el momento óptimo para extraerlos.
- IV. Fase de muerte celular o de caída: La biomasa disminuye significativamente porque la falta de nutrientes y la acumulación de productos de desecho acaba provocando la lisis de las células y su muerte.

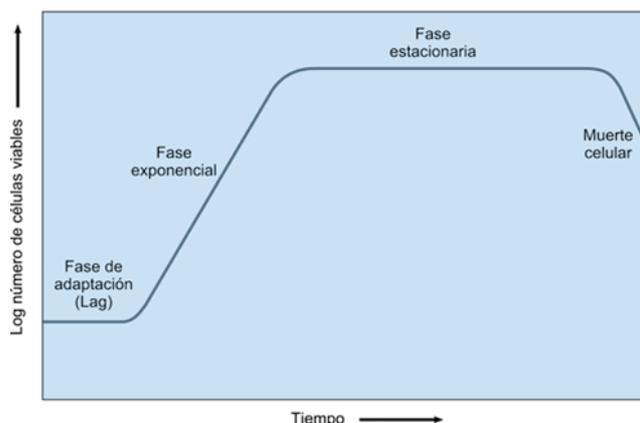


Figura 5. Fases del crecimiento celular en un medio de cultivo a lo largo del tiempo.

Las condiciones de cultivo y los nutrientes necesarios para generar biomasa no siempre coinciden con los necesarios para producir el metabolito secundario deseado. La manipulación del medio de cultivo debe hacerse de cara a aumentar la acumulación del metabolito de interés, lo cual se consigue modificando el nivel de nutrientes, los factores de estrés (elicitores), la luz y los reguladores de crecimiento (Rao y Ravishankar, 2002).

El medio de producción difiere del medio de cultivo en que contiene altas concentraciones de auxinas, que inhiben la producción de algunos metabolitos secundarios, de nitrógeno, que favorece la proliferación celular. Por otro lado, contiene bajas concentraciones de sacarosa como fuente principal de carbono, que favorecen la proliferación celular, a diferencia de lo que sucede con concentraciones superiores al 3% que, aunque propician la formación de metabolitos secundarios, ralentizan el crecimiento celular (Torres *et al.*, 2018).

Debido a estas diferencias y a que, a menudo, el aumento de la producción de metabolitos por uso de elicitores o por limitación de nutrientes detiene el crecimiento celular, se utiliza un sistema de cultivo en dos etapas: una primera que estimula el crecimiento de biomasa empleando el medio de cultivo óptimo para la rápida proliferación celular (medio de cultivo

de crecimiento), y una segunda en la cual se realiza la transferencia a un medio que favorece la síntesis del metabolito secundario en cuestión (medio de cultivo de producción) (Furusaki y Takeda, 2011; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

4.2.3 Selección de líneas celulares

Un cultivo de células acabará presentando cambios genéticos (susceptibles de originar mutantes) o epigenéticos (transmisibles por mitosis) que provocarán la heterogeneidad de la población. Es por ello que hace falta seleccionar, mediante exámenes microscópicos, macroscópicos y químicos, líneas celulares genéticamente estables con alto ritmo de crecimiento y alta producción de metabolitos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Como se muestra en la Fig. 6, la selección comienza con la siembra de las células en una placa de agar, para posteriormente elegir las líneas celulares en función de los ensayos de biomasa y rendimiento de metabolitos secundarios que se lleven a cabo. A continuación, las líneas celulares seleccionadas se cultivan en suspensión y se transfieren a un biorreactor con el medio de cultivo adecuado para su crecimiento. Finalmente, se transfieren a un biorreactor de mayor volumen con el medio de producción (Torres *et al.*, 2018).

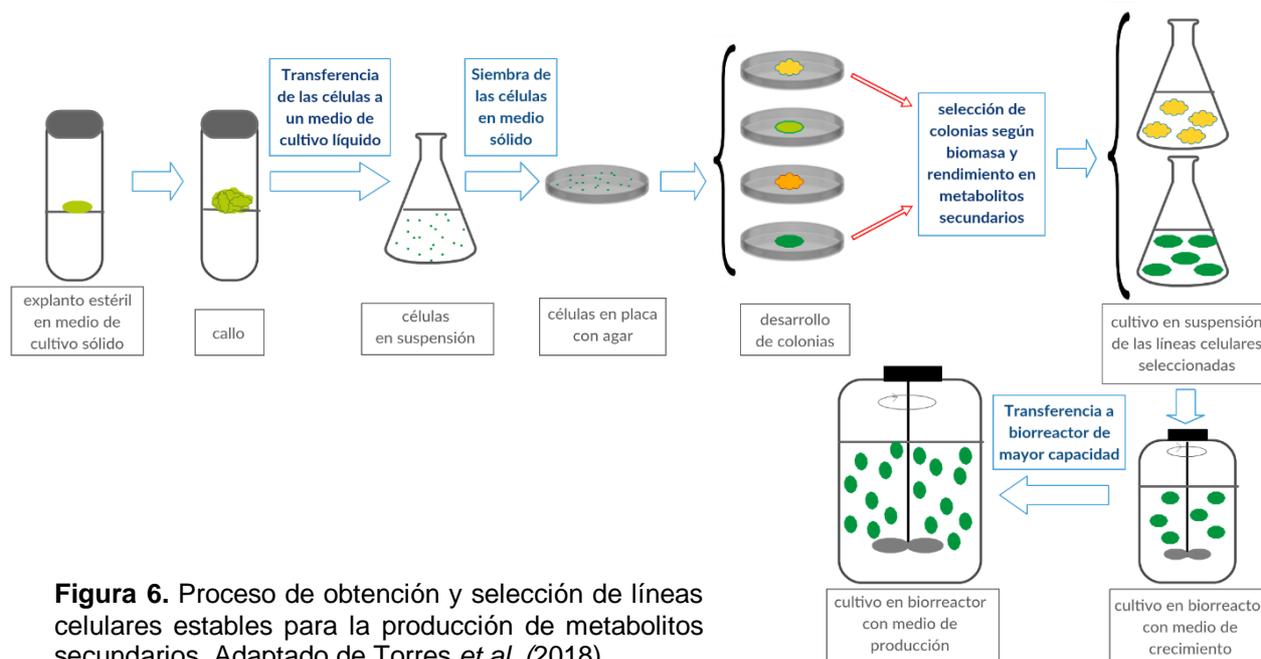


Figura 6. Proceso de obtención y selección de líneas celulares estables para la producción de metabolitos secundarios. Adaptado de Torres *et al.* (2018).

4.2.4 Adición de precursores

Los metabolitos secundarios pueden ser modulados mediante la adición de precursores de sus rutas biosintéticas. Se trata de moléculas a partir de las cuales se forman metabolitos primarios de cara a conseguir el crecimiento celular o la formación de metabolitos secundarios, dependiendo de la ruta en que se incorporen.

Los precursores deben ser compuestos poco costosos, no tóxicos y poseer una estructura similar a la del metabolito final de la ruta biosintética. Pueden ser moléculas propias de la ruta de síntesis del producto de interés o poseer algún cambio estructural.

Al añadirlos al medio de cultivo celular se consigue explotar el potencial biosintético de las enzimas del cultivo, aumentando la producción y acumulación del metabolito en el medio, en base a la idea de que cualquier compuesto precursor o intermediario en la ruta biosintética de un metabolito secundario tiene posibilidades de aumentar el rendimiento del producto final (Rao y Ravishankar, 2002; Martín *et al.*, 2018).

4.2.5 Elicitación

La elicitación es un método efectivo a gran escala para inducir la expresión de genes asociados a enzimas del metabolismo secundario. Las plantas en la naturaleza producen metabolitos secundarios como mecanismo de defensa en respuesta a condiciones adversas. Los elicitores son los causantes de estimular la formación de muchos de estos compuestos. En la Tabla 3 se presentan algunos elicitores empleados con frecuencia para mejorar la productividad de diversos productos de interés farmacéutico.

Tabla 3. Ejemplos de elicitores utilizados para aumentar la productividad de diversos metabolitos secundarios.

Tipo de estrés	Elicitor	Metabolito secundario	Especie productora del metabolito
Abiótico	Metil jasmonato	Paclitaxel	<i>Taxus sp.</i>
	Sulfato de cobre	Shikonina	<i>Lythosperma erythrorizon</i>
	Cu ²⁺ y Cd ²⁺	Alcaloides tropánicos	<i>Atropa belladonna</i>
Biótico	Oligosacáridos (manano)	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i>
	Quitina	Sanguinarina	<i>Papaver somniferum</i>
	Micelios	Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>

Adaptado de Furusaki y Takeda (2011); Bhatia y Bera (2015).

Según su origen, se clasifican en dos grupos: abióticos (físicos y químicos) y bióticos. Los primeros pueden ser, a su vez, de dos tipos:

- Elicitores físicos: Déficit hídrico, temperatura extrema, radiación luminosa excesiva o insuficiente, anaerobiosis por encharcamiento, factores mecánicos (viento, compactación del suelo y las lesiones).
- Elicitores químicos: Estrés iónico (por salinidad), estrés nutricional y contaminantes.

El estrés abiótico es el más común y generalmente en los cultivos *in vitro* se usa una combinación de varios tipos de estrés.

Por su parte, los elicitores bióticos son causados por la acción de seres vivos y virus, y los más frecuentemente utilizados para aumentar la producción de metabolitos secundarios son oligosacáridos y extractos de hongos, levaduras o bacterias (Rao y Ravishankar, 2002; Atanasov *et al.*, 2015).

4.2.6 Inmovilización celular

Las células inmovilizadas son cultivos de agregados multicelulares sostenidos por un sustrato biológico inerte. La técnica de inmovilización celular consiste en incluir la suspensión de células en un gel polimérico (por ej. alginato cálcico, carragenano, agar o agarosa), un soporte polimérico rígido y poroso (por ej. acetato de celulosa o espuma de poliuretano) o un soporte de origen biológico (por ej. chitosán o quitina).

El modo en que las células quedan inmovilizadas puede ser por oclusión en gel por red iónica, por precipitación, por polimerización o por oclusión en una estructura preformada. Las partículas que se emplean para inmovilizar las células se usan en biorreactores.

Esta estrategia tiene numerosas ventajas: alta producción de biomasa y de metabolitos secundarios, el producto puede extraerse mejor de las células, estas están más protegidas de la acción mecánica del biorreactor, el cultivo es más estable, es de fácil manipulación y puede mantenerse durante mayor tiempo en el biorreactor.

Usando esta técnica sumada a elicitación, recuperación del producto *in situ* o biotransformación se puede aumentar la producción industrial del metabolito secundario (Furusaki y Takeda, 2011; Torres *et al.*, 2018).

4.2.7 Permeabilización y recuperación del producto *in situ*

A menudo, los productos formados en un cultivo de células vegetales se almacenan en orgánulos como las vacuolas, y extraerlos de las células requiere la lisis de estas. Este procedimiento es indeseable debido a que las células crecen lentamente y obtener una gran cantidad de ellas es costoso. La permeabilización es un método basado en el uso de solventes y adsorbentes para formar poros en las membranas celulares, a través de los cuales pueden pasar moléculas al interior y exterior de la célula. Con ello se consigue aumentar la extracción de los metabolitos secundarios sin llegar a destruir las células que los contienen.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la liberación del metabolito al medio puede reducir el rendimiento del proceso por inhibición *feedback* o por degradación del producto en el medio. Para evitarlo y aumentar la producción del metabolito, el proceso de cultivo debe constar de una segunda fase específica para retener un metabolito concreto de acuerdo con su naturaleza polar o apolar, de forma que se vaya acumulando en ella.

Esta segunda fase no debe ser tóxica y no debe alterar la composición del medio, debe ser resistente al autoclave, tener alta especificidad de retención del metabolito y permitir su fácil liberación.

Una vez liberado el producto al medio, se extrae de forma rápida mediante adsorbentes, que pueden aumentar la producción de algunos metabolitos.

Las ventajas de la extracción del producto *in situ* son que estimula la biosíntesis de los metabolitos y facilita la separación de los productos (Rao y Ravishankar, 2002; Furusaki y Takeda, 2011; Torres *et al.*, 2018).

4.2.8 Biotransformación

El proceso de biotransformación hace referencia a una serie de cambios químicos producidos en un compuesto como resultado de la actividad de células vivas o enzimas.

Esta estrategia se basa en la modificación de grupos funcionales de compuestos orgánicos para originar un producto químico diferente y puede aplicarse a cultivos de suspensiones celulares, de células inmovilizadas, de raíces en cabellera y a preparaciones enzimáticas.

De esta manera, se pueden producir metabolitos conocidos de una forma más económica, esclarecer sus rutas metabólicas o producir nuevos compuestos. Para ello, el cultivo debe contener las enzimas necesarias, el precursor o sustrato no debe ser tóxico, debe alcanzar el compartimento celular correcto, y la formación del producto debe ser más rápida que su posterior metabolismo (Rao y Ravishankar, 2002; Torres *et al.*, 2018).

4.2.9 Escalado de la producción

Los biorreactores son sistemas de producción a gran escala de cultivos *in vitro* que aumentan la producción de metabolitos secundarios, y los cultivos más apropiados para el escalado son las suspensiones celulares, las células inmovilizadas y las raíces en cabellera.

Los biorreactores modificados y los sistemas de inmersión temporal pueden usarse para producir compuestos de interés farmacéutico, debido a su relación costo-beneficio y a la posibilidad de cultivar tejidos diferenciados con capacidad para sintetizar metabolitos secundarios. Además, permiten regular el ambiente *in vitro* y parámetros fundamentales que influyen en la producción de biomasa y en la acumulación de los metabolitos, como la composición química del medio, la densidad del inóculo, el periodo de iluminación y las tasas de aireación.

Los factores que mayor impacto tienen en el éxito del cultivo en biorreactor son la aireación y la agitación, si bien los biorreactores pueden clasificarse de diversas maneras: según su configuración, su forma, el modo de operación, la forma en que se suministra la energía para la agitación, etc.

Los biorreactores se clasifican, según el tipo de agitación, en dos grupos diferenciados:

- a) Biorreactores de agitación neumática: Cuando se inyecta aire en su interior se produce una agitación que homogeniza el medio. Como el aire se expande en el seno del medio se evita el riesgo de corte de las células. Pueden ser dispositivos sin circulación de aire, como por ejemplo las columnas de burbujas o borboteo, o con circulación de aire, como los tanques *airlift* (Fig. 7).
- b) Biorreactores de agitación mecánica: Las palas del agitador rotan para homogeneizar el medio. Su inconveniente es la formación de zonas de alta turbulencia en las proximidades de las palas, pero incluso las células en suspensión más alejadas de ellas no están exentas de la lisis mecánica. Pueden ser tanques de agitación con rotor o de agitación con turbina.

La existencia de tal variedad de biorreactores se debe a que el empleo de uno u otro depende de factores como el tipo de cultivo y los metabolitos que se busque obtener (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Sampayo-Maldonado *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2018).

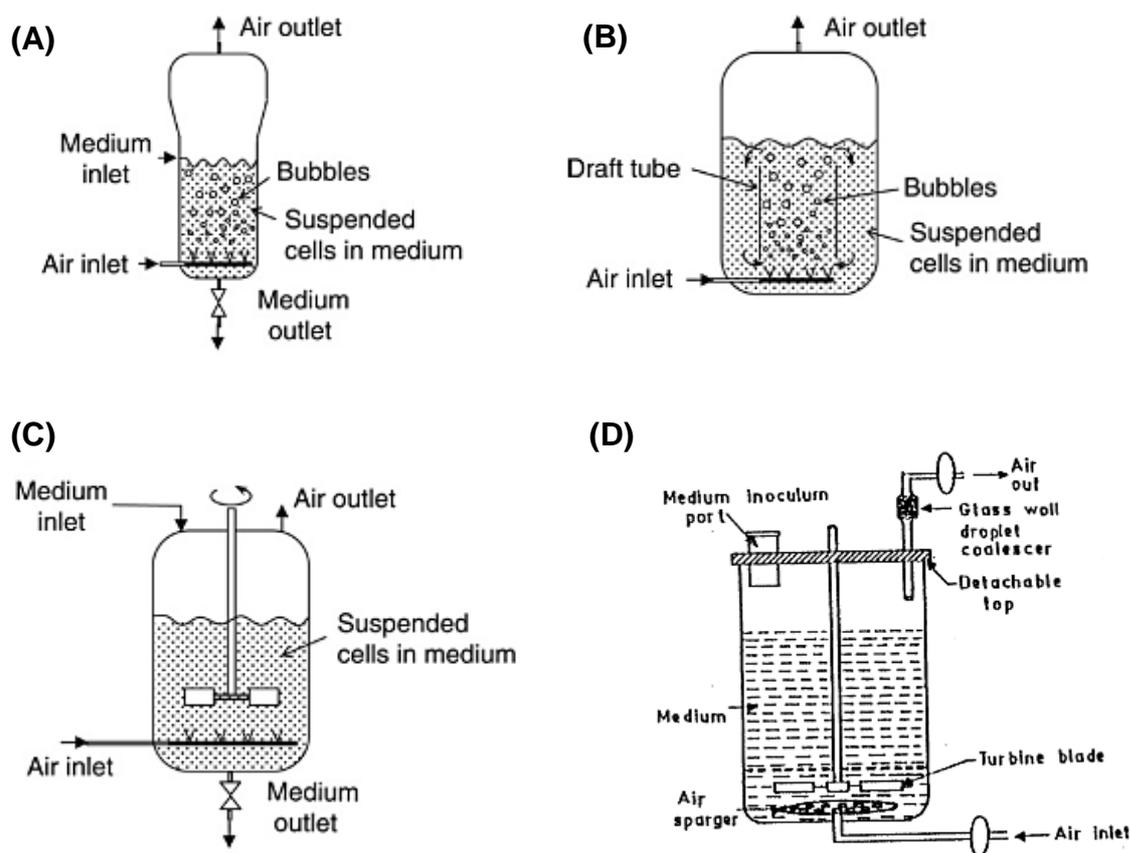


Figura 7. Biorreactores de agitación neumática: (A) Columna de burbujas; (B) Tanque *airlift*. Biorreactores de agitación mecánica: (C) Tanque de agitación con rotor; (D) Tanque de agitación con turbina. Tomado de Rao y Ravishankar (2002); Furusaki y Takeda (2011).

4.2.10 Transformación genética

Una planta transgénica es aquella que ha sido transformada genéticamente mediante la introducción de ADN ajeno a su genoma, agregándole así caracteres nuevos de interés para numerosas industrias.

Una técnica de ADN recombinante muy interesante es aquella en que se emplea *Agrobacterium tumefaciens* como vector para la transferencia de genes a una planta. *A. tumefaciens* (actualmente denominado *Rhizobium radiobacter*) es una bacteria Gram negativa que alberga el plásmido Ti (inductor de tumores). En el fragmento T-ADN (ADN de transferencia del plásmido Ti) se encuentran genes de síntesis de auxina, citoquininas y opinas. Cuando la bacteria infecta a una planta, los tumores que se forman en el sitio de infección son acúmulos de células indiferenciadas que se dividen incontrolablemente. Esta transformación genética de las células vegetales tiene lugar cuando el T-ADN del plásmido Ti se integra en el genoma vegetal, promoviendo la síntesis de auxinas. La producción endógena de auxinas provoca el crecimiento de los tumores en el sitio de infección.

Este método es interesante cuando se busca que una planta exprese algún gen que no contiene, como por ejemplo la resistencia a un antibiótico. Esto se puede conseguir sustituyendo los genes del fragmento T-ADN del plásmido Ti por los genes de resistencia al antibiótico, infectando a la planta con la bacteria transformada y cultivándola *in vitro*. Las células vegetales que integren los genes de resistencia y lo expresen serán resistentes al antibiótico. La selección de estas células y la regeneración de la planta completa a partir de ellas dará como resultado una planta transgénica con una resistencia adquirida (Gurunani *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2018).

5. CONCLUSIONES

La demanda de metabolitos secundarios de interés farmacológico producidos por cultivo *in vitro* no ha dejado de crecer en los últimos años. El cultivo vegetal *in vitro* tiene múltiples ventajas frente al cultivo tradicional de plantas, como la independencia de factores externos y el control de las condiciones, lo que favorece un mayor rendimiento en la obtención de metabolitos secundarios. Su continua optimización a través de métodos como la elicitación o la inmovilización celular aumenta su eficacia, a la par que reduce los costes derivados del proceso. El cultivo *in vitro* es, además, una herramienta esencial para elucidar las rutas metabólicas implicadas en los procesos bioquímicos de diversos compuestos, así como para entender su transporte y su compartimentación en las células vegetales.

Finalmente, los avances que se están realizando en el cultivo vegetal *in vitro* harán de este un sistema rentable y sostenible, capaz de satisfacer las crecientes demandas de metabolitos secundarios e incluso obtener compuestos no generados en la planta silvestre.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P. *et al.* (2015). *Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review*. *Biotechnology Advances*. 33(8), 1582-1614. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001
- Bhatia, S. (2015). Application of plant biotechnology, en: *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R. y Bera, T. Capítulo 5. pp. 157-207. Elsevier, Londres. ISBN: 978-0-12-802221-4
- Bhatia, S. y Bera, T. (2015). Classical and nonclassical techniques for secondary metabolite production in plant cell culture, en: *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R. y Bera, T. Capítulo 7. pp. 231-291. Elsevier, Londres. ISBN: 978-0-12-802221-4
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. y Gontier, E. (2001). *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective*. *Plant Science* 161 (5), 839-851. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00490-3
- Furusaki, S. y Takeda, T. (2011). Bioreactors for plant cell culture. En: *Comprehensive Biotechnology*, 2ª edición, volumen 2. Moo-Young, M. (editor). pp. 361-372. Elsevier, Oxford. ISBN: 9780444533524
- Gurunani, S.G., Yeole, M.P., Gholve, Y.N. y Chaple D.R. (2015). *Hairy Root Culture: An Experimental System for Secondary Metabolite Production*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 8(6), 728-730. DOI: 10.5958/0974-360X.2015.00115.8
- Huang, S. H., Vishwakarma, R. K., Lee, T. T., Chan, H. S. y Tsay, H. S. (2014). *Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant Gentiana scabra*. *Botanical Studies*. 55(17) DOI: 10.1186/1999-3110-55-17
- Krikorian A. D. y Berquam D. L. (2003). Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. En: *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Laimer M. y Rücker W. (editores) 25-54. Springer, Viena. DOI:10.1007/978-3-7091-6040-4
- Kumar, N y Reddy, M. P. (2011). *In vitro plant propagation: A review*. *Journal of Forest Science*. 27(2), pp. 61-72.
- Liu, X. y Locasale, J. W. (2017). *Metabolomics: A Primer*. *Trends in biochemical sciences*. 42(4), pp. 274-284. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.01.004
- Martín, S., Torres, M. y Saco, D. (2018). Biotecnología vegetal. Cultivos vegetales in vitro. Obtención de productos de interés farmacéutico. En: *Fundamentos de biotecnología farmacéutica*. Martín Brieva, H. (coord.). Capítulo 14. pp. 353-376. Dextra Editorial, Madrid. ISBN: 978-84-16898-51-0
- Mroginski L., Sansberro, P. y Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales, en: *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Levitus, G., Echenique,

V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (editores). Parte I, capítulo 1. pp. 17-25. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y ArgenBio.

- Muñoz de Malajovich, M. A. (2012). Cultivo de células y tejidos. En: *Biotechnología*, 2ª edición. Capítulo VII. pp. 121-134. Universidad Nacional de Quilmes Editorial, Buenos Aires. ISBN: 978-987-558-255-2
- Newman, D. J. y Cragg, G. M. (2012). *Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010*. Journal of Natural Products. 75(3), 311-335. DOI: 10.1021/np200906s
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. (2011) *Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro*. Biotechnología Vegetal. 11(4).195-211. ISSN 2074-8647
- Rao, S. R. y Ravishankar, G. A. (2002). *Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites*. Biotechnology Advances. 20(2), 101-153. ISSN: 0734-9750
- Sampayo-Maldonado, S., Montiel-Montoya, J., Cortés-Ruiz, J.A., Reyes, C., Díaz-Bautista, M., Sánchez-Herrera, L.M. *et al.* (2018). *Cultivo in vitro de raíces en matraces y biorreactores: alternativas biotecnológicas para la producción de fármacos*. Agroproductividad. (11)10, 3-9. DOI: 10.32854/agrop.v11i10.1236
- Torres, M., Martín, S. y Saco, D. (2018). Biología vegetal. Optimización de la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico en cultivos in vitro, en: *Fundamentos de biotecnología farmacéutica*. Martín Brieva, H. (coord.). Capítulo 15. pp. 377-404. Dextra Editorial, Madrid. ISBN: 978-84-16898-51-0
- Wang, H., Zhu, C., Ying, Y., Luo, L., Huang, D. y Luo, Z. (2017). *Metformin and berberine, two versatile drugs in treatment of common metabolic diseases*. Oncotarget. 9(11), 10135–10146. DOI: 10.18632/oncotarget.20807