



**FACULTAD DE FARMACIA**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**CULTIVO *IN VITRO*: ALTERNATIVA AL CULTIVO  
TRADICIONAL DE PLANTAS MEDICINALES**

Autor: Miguel Rodríguez Amaro

Tutor: Margarita Torres Muñoz

Convocatoria: Julio 2018

A lo largo de la historia numerosas culturas se han sentido atraídas por el potencial terapéutico de las plantas medicinales, este interés continúa en la actualidad y su comercio, que se valora en miles de millones de dólares, tiene previsiones de crecimiento en un futuro cercano. Esto es debido a que su uso no se limita sólo a su valor fitoterapéutico, sino que también son de interés en la tecnología farmacéutica, la hemisíntesis química, la investigación, la biología y la ecología.

Para responder a la demanda creciente de productos derivados de las plantas, la tecnología del cultivo *in vitro* se presenta como una alternativa idónea a los métodos convencionales, ya que permite aumentar enormemente la productividad, eficiencia y la calidad del producto, consiguiendo además un alto rendimiento. Si bien existen diferentes tipos de cultivo *in vitro* de plantas medicinales, debido a su alta productividad, los más empleados en la industria son la micropropagación, los cultivos de células en suspensión dentro de biorreactores y los cultivos de raíces en cabellera. Sin embargo, la alta variabilidad de especies vegetales complica la realización de protocolos de producción estándar.

El interés de esta revisión bibliográfica es por tanto repasar el estado actual del cultivo *in vitro* de plantas medicinales a través de: una descripción de las técnicas empleadas, los distintos tipos de explantos empleados en el cultivo *in vitro*, de los diferentes métodos de cultivo, resaltando aquellos más productivos, para los que se señalan sus ventajas e inconvenientes.

### Summary

Ancient cultures had always been interested in the therapeutical potential of medicinal plants and this historical interest has increased in the last centuries. It's important to portray that medicinal plants have a market value of billions of dollars and expected to grow in the near future. This is due to their multiple applications; they can be used in medicine, investigation, chemical synthesis, pharmaceutical technology, biology and ecology. This increase in the demand of plant derived products has caused conventional culture methods to be inefficient; luckily, they can be supplied using biotechnologies such as *in vitro* cultures.

There's mainly three types of *in vitro* culture propagation with most profitable results, those are: micropropagation, cell suspended cultures in bioreactors and hairy root cultures. These techniques provide the best results in terms of productivity, efficiency and product quality and allow to easily scale up the process with industrial purposes. Nevertheless, the technique used may variate to suit a specific cell culture, as they present characteristics and culture requirements, which difficult the standardization of production protocols.

It's the aim of this graduation thesis (TFG) to review the state of *in vitro* propagation techniques from a pharmaceutical point of view reviewing: the techniques used, the different explant sources for starting the culture, the general procedure of *in vitro* cultures and the use of three different medicinal plants in order to show how they can be propagated and which are the advantages and disadvantages of doing so, via *in vitro*.

---

Introducción y antecedentes:

## EL USO DE PLANTAS MEDICINALES A LO LARGO DE LA HISTORIA Y EN LA ACTUALIDAD

Los primeros documentos que tratan el uso de plantas medicinales datan de 2900-2600 A.C, en concreto el documento escrito antiguo más detallado y mejor preservado es el “Papiro de Ebers” originario del Antiguo Egipto que está fechado en 1550 A.C y describe más de 700 drogas de origen vegetal. Sería en Asia donde este tipo de recursos adquirieron mayor importancia, particularmente en la medicina tradicional china que aún hoy en día, sigue siendo utilizada por el 40% de la población. Es importante destacar, sin embargo, que esta medicina tradicional ha ido acompañada de otro tipo de remedios “mágicos” que empañan el aspecto puramente científico de las terapias naturales, dificultando separar el efecto placebo de un efecto terapéutico real.

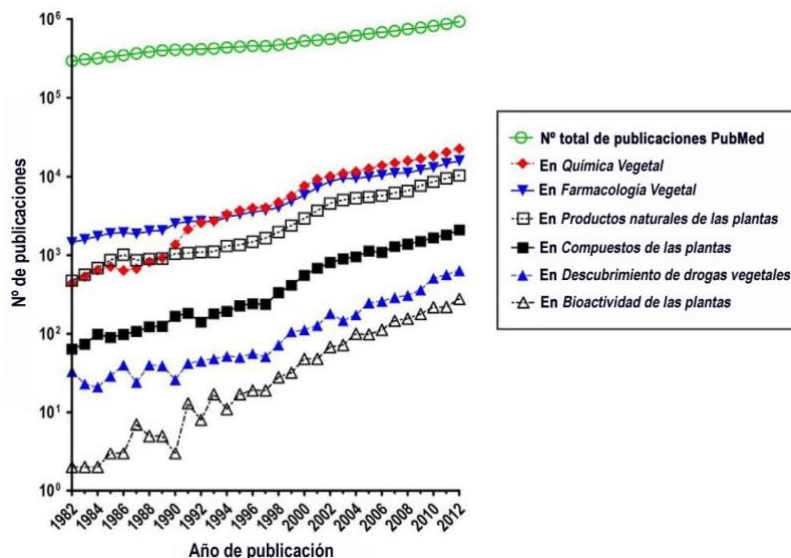
Durante la primera mitad del siglo XX se produjo una enorme evolución de la industria farmacéutica y, en paralelo al progreso de las técnicas de síntesis química, los extractos y derivados vegetales comenzaron a ser reemplazados por drogas de síntesis, consideradas de mayor calidad eficacia y seguridad.

En estas últimas décadas, ha habido un resurgimiento del interés por los productos naturales en todo el mundo, tanto en países subdesarrollados como en los países del denominado “primer mundo”. Según los datos de la OMS, la medicina natural es utilizada por altos porcentajes de la población mundial y hasta el 75% de la población rural confía en este tipo de recursos como fuente primaria para cuidados medicinales (1). Alemania es un ejemplo del uso actual de tratamientos que emplean como fuente de productos terapéuticos más de 1.500 especies de vegetales, en Sudáfrica se comercializan habitualmente 500 especies de plantas medicinales y en India existen hasta 45.000 especies, de las cuales varios cientos poseen propiedades medicinales (2,3).

El comercio de plantas medicinales ha crecido en volumen y número de exportaciones y el mercado global de fitoterapia (valorado en 60 mil millones de dólares) crece a un ritmo del 7% anual, estimándose que podrá superar los 5 billones de dólares en 2050 (2). Europa importa anualmente sobre 400.000 toneladas de plantas medicinales, desde África y Asia, y se prevé un incremento del 15 al 20% para el nuevo milenio (2). Para satisfacer esta nueva y creciente demanda, la industria

farmacéutica está llevando a cabo numerosas y diversas investigaciones encaminadas a mejorar el rendimiento y la calidad de los procesos de elaboración. A todos estos datos podría añadirse el actual movimiento ecologista occidental, que ha contribuido también al renovado el interés por la fitoterapia (fig.1).

Figura 1:  
Gráfico que refleja el aumento de citas relacionadas con plantas medicinales en la base de datos PubMed (Traducido de 4).



## APLICACIONES DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Más allá de su uso como fitoterápicos, las plantas medicinales y sus derivados (metabolitos secundarios purificados) presentan otras muchas aplicaciones:

- Su rol en la investigación farmacéutica, donde las plantas medicinales continúan siendo la fuente directa de numerosos y novedosos agentes terapéuticos.
- Su utilidad en la elaboración de compuestos químicamente complejos (hemisíntesis química). Muchas de las moléculas y principios activos actuales serían demasiado costosos o complicados de obtener por síntesis química pura, por ello se recurre a la purificación de determinados componentes naturales, los cuales constituyen el punto de inicio de la síntesis química posterior.
- Las plantas medicinales nos permiten obtener marcadores taxonómicos que sirven para dirigir la investigación y desarrollo de nuevas terapias.
- Numerosos compuestos de origen vegetal se usan como vehículos de otros principios activos ya que pueden mejorar la distribución, la selectividad o aumentar la eficacia de determinados fármacos. (5)

Las plantas medicinales no sólo contienen metabolitos secundarios farmacológicamente activos (alcaloides, terpenos, fenoles, fitoesteroles...), también presentan otro tipo de compuestos potencialmente terapéuticos, todavía sin explotar:

- Los ciclótidos: son proteínas vegetales cíclicas con una excepcional estabilidad físicoquímica y se presentan como candidatos ideales para su uso como pesticidas agrícolas menos tóxicos o como vehículos farmacéuticos de otros principios activos. Incluso se discute la existencia de determinadas propiedades terapéuticas que les permitirían ser utilizados en diferentes patologías (6). Actualmente los ciclótidos se obtienen íntegramente de la extracción directa de plantas limitadas, por ello, sería muy interesante inducir su síntesis en cultivos celulares suspendidos dentro de biorreactores.
- Los fitoecdisteroides: son drogas que pueden aparecer en algunos vegetales, como forma de protección frente a los herbívoros. Se ha descubierto que tienen un amplio rango de efectos farmacéuticos en los vertebrados, algunos de los cuales son beneficiosos para los humanos, entre otros sus efectos adaptogénicos, analógicos hipokalemiantes, hipocolesterolemiantes y antimicrobianos. Hoy en día ya se usan en complementos alimenticios que buscan aumentar la masa muscular. Por su complejidad no resulta rentable sintetizarlos químicamente, por ello se extraen directamente de los vegetales, y es aquí donde el cultivo *in vitro* puede disminuir los costes de producción y aumentar su productividad (7).

#### UN NUEVO TIPO DE CULTIVO VEGETAL: EL CULTIVO *IN VITRO*

Las plantas medicinales contienen de forma natural, multitud de compuestos y derivados moleculares de interés farmacológico, sin embargo su extracción directa desde el vegetal resulta costosa y uno de los principales retos de esta industria es mejorar su bajo cociente productividad/beneficio.

El cultivo vegetal *in vitro*, que surge como alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales, es una tecnología que permite mantener y desarrollar células vegetales, tejidos, órganos o incluso plantas completas en un medio artificial (sólido o líquido) que contiene factores de crecimiento y en unas condiciones ambientales óptimas para su desarrollo. Este tipo de cultivos involucra células con diferente grado de diferenciación. Pueden cultivarse plantas enteras, semillas, órganos o células no diferenciadas (generalmente propagadas a partir de callos) y algunos de estos tipos de cultivos pueden ser interconvertibles mediante el uso de fitohormonas.

Haberlandt fue en 1902 uno de los pioneros en el cultivo *in vitro*, si bien su trabajo no obtuvo muy buenos resultados al emplear células muy diferenciadas. Posteriormente White (1934) pudo desarrollar los primeros cultivos de órganos vegetales (empleando raíces de tomate y extracto de levadura como medio nutritivo). Cinco años después, Gautheret, Nobécourt y White consiguieron, por separado, desarrollar el primer cultivo *in vitro* de tejido vegetal. Los dos primeros con tejido de células meristemáticas de zanahoria y el último con tejido tumoral de tabaco. El éxito de sus cultivos fue debido tanto a la elección del tipo celular como a la adición de auxina AIA y vitaminas.

Los cultivos celulares indiferenciados, en especial los cultivos de órganos vegetales como raíces o brotes, pueden producir niveles de metabolitos secundarios, superiores a los del conjunto de la planta, lo cual aumenta su rentabilidad y eficiencia. Por esta razón, el cultivo vegetal *in vitro* ya se emplea en la producción de determinados metabolitos vegetales secundarios (MSs) como el paclitaxel, shikonina, escopolamina y digoxina (2). En particular el cultivo de raíces en cabellera, obtenido mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes* ha resultado muy prometedor para la producción de metabolitos secundarios a nivel industrial (8). Incluso, los metabolitos secundarios aislados directamente de cultivos *in vitro* pueden presentar una actividad terapéutica mayor que los metabolitos aislados desde una planta cultivada por métodos tradicionales, como es el caso de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de especies de lavanda (*Lavandula* spp) (9).

Sin embargo, aunque el cultivo *in vitro* de plantas medicinales se esté incrementando enormemente, sigue presentando todavía algunas dificultades como son poder predecir qué productos derivados de plantas continuarán siendo rentables, salvar impedimentos económicos en el caso de mercados pequeños y la posibilidad de una disminución brusca del margen de beneficio comercial debido a variantes abruptas de la oferta y la demanda. Por ello, a pesar de décadas de investigación en este sector, hoy en día sólo catorce sustancias derivadas de plantas se producen comercialmente, destacando el paclitaxel como el compuesto más importante de este mercado (4).

---

#### Objetivo:

El objetivo del trabajo es hacer un análisis del estado actual del cultivo *in vitro* que dé respuesta a la utilidad real de esta técnica en el mundo de la salud y específicamente en el mundo de la industria farmacéutica. Para ello se hará un repaso a través de los distintos explantos empleados en el cultivo *in vitro*, de los diferentes métodos de cultivo y de los procedimientos más comunes, haciendo énfasis en aquellos tipos de cultivo *in vitro* de mayor interés para la industria farmacéutica.

---

#### Metodología:

Para llevar a cabo la realización de este trabajo se ha recurrido a la búsqueda de artículos científicos relacionados con el tema de “producción *in vitro* de plantas medicinales” para ello se ha consultado en bases de datos como: Web of Science, Science Direct o PubMed.

Se buscaron artículos científicos relacionados con los siguientes temas: “medicinal plants and *in vitro* culture”, “culture of medicinal plants”, “advances in the culture *in vitro*”, “medicinal plants and pharmacy”, “biotechnology and plant cultures”.

De entre estos artículos científicos se escogieron aquellos cuyas fechas de publicación estuvieran comprendidas entre 1996 y 2017 de forma que la información fuera reciente y relevante en la actualidad. Después se consideraron aquellos artículos con mayor número de citas en otros artículos científicos y los de mayor importancia en los temas tratados, es decir, publicados en revistas con mayor factor de impacto científico, o citados en revisiones bibliográficas destacadas. A parte del estudio de estos artículos se procedió a consultar el libro “Biotechnology for Medicinal Plants Micropropagation and Improvement” para centrar varios de los conceptos biotecnológicos presentados.

El trabajo aquí presentado está estructurado en tres apartados: en el primero se hace una descripción de las fuentes primarias de explantos utilizadas, a ésta le sigue otra de los métodos de cultivo *in vitro* más productivos y se finaliza con un resumen de los protocolos que se emplean generalmente en los diferentes métodos de cultivo *in vitro*.

---

Resultados:

#### PRIMER PASO: FUENTES PRIMARIAS (EXPLANTOS) DE LOS CULTIVOS VEGETALES *IN VITRO*

Los cultivos vegetales *in vitro* se pueden diferenciar como:

- **Cultivos *in vitro* con un desarrollo vegetal desorganizado;** es decir, hay ausencia de estructuras vegetales reconocibles en el cultivo y existe un número limitado de tipos celulares especializados; morfológica y funcionalmente. Los explantos que permitan su desarrollo desorganizado serán los utilizados en biorreactores o en cultivos de raíz en cabellera; siendo las fuentes de materia prima preferenciales cuando la finalidad es la producción de MSs de plantas.
- **Cultivos *in vitro* con un desarrollo vegetal organizado;** es decir, con la estructura inherente al explanto. Este tipo de cultivos suelen ser de mayor interés en el campo de la biología, la observación y la agricultura, ya que permiten, gracias a la embriogénesis y organogénesis, dar lugar a estructuras diferenciadas y a clones de la planta madre. Estos explantos serán los que se usan en los cultivos que buscan una clonación masiva de plantas (objetivo de la micropropagación).

En ambos casos se emplean como fuentes primarias de explantos:

-1- **Callos:** Sólo unas pocas células encontradas en los meristemos de la planta o en su sistema vascular pueden dividirse activamente lo cual provoca que todo el resto de estructuras celulares tengan que producirse por diferenciación a partir de estos tejidos. Los cultivos con células vegetales se pueden iniciar a partir de explantos de casi cualquier parte de la planta, sin embargo, de forma tradicional se utilizan raíces, embriones y células meristemáticas de los brotes. Bajo

concentraciones determinadas de reguladores de crecimiento vegetal los explantos proliferan y forman callos de células no diferenciadas (UCCs en inglés). El callo es una masa de tejido indiferenciado que se encuentra en estado de división permanente. Constituye la fuente primaria en cultivos donde el objetivo sea la obtención masiva de un tipo celular concreto, por un interés específico debido a sus propiedades intrínsecas; siendo la materia primaria en la técnica de micropropagación. Una vez obtenidos son transferidos a medios líquidos para su posterior cultivo en suspensión bajo agitación en biorreactores o bien pueden cultivarse en medios semisólidos. Sus células se consideran totipotentes, debido a que bajo determinadas condiciones ambientales y con la influencia de auxinas o factores de crecimiento pueden dar origen a la planta adulta completa (10).

-2- **Protoplastos:** los protoplastos son células vegetales sin pared celular, siendo su pérdida ocasionada por procesos de digestión enzimática (p.e. a partir del mesófilo de la hoja de una planta o por procesos mecánicos (p.e. a partir de suspensiones celulares obtenidas de explantos). Son células mucho más sensibles al medio y por tanto proclives a ser destruidas por diferencias osmóticas con respecto al medio en el que se encuentran. Su tipo de cultivo de desarrollo desorganizado lo hace más costoso y poco práctico a la hora de trasladarlo a una producción masiva industrial. Mediante el uso de protoplastos podemos conseguir hibridaciones entre especies y hay otras especies como *Artemisa judaica* y *Echinops spinosissimus* sólo cultivables por éste método. Pese a considerarse mayoritariamente cultivos celulares con desarrollo desorganizado, es posible regenerar plantas enteras a partir de protoplastos. Las plantas resultantes pueden contener una dotación genética anormal, al desarrollarse a partir de individuos surgidos de la fusión de protoplastos de la misma especie (plantas poliploides), o de especies diferentes (plantas híbridas); presentando nuevas características (11).

-3- **Embriones:** el cultivo embrionario o embriogénesis somática es el proceso por el cual un embrión no zigótico (no obtenido a través de la fusión de la oosfera con uno de los granos de polen) es producido *in vitro*, a partir de un tejido o célula vegetal, hasta desarrollarse en una planta adulta. Por este método, se ha conseguido la regeneración completa de especies de *Aloe vera* y *Vitis vinifera* (12,13).

-4- **Microsporas o polen:** este cultivo permite el control del desarrollo de granos de polen a granos de polen maduros, a embriones (de plantas haploides) y/o a callos. Los factores desencadenantes del desarrollo de microsporas a la formación de un callo o un embrión en lugar de un grano de polen maduro son múltiples. Estos factores pueden variar en función de la especie que se desee propagar, con lo cual se deben realizar protocolos para la optimización de la producción de



cada una. Factores a considerar: el genotipo de la planta donadora, las condiciones de crecimiento de la planta donadora y el estado de desarrollo del grano de polen; también pueden tener un papel esencial los métodos de cultivo o las condiciones de cultivo de las microsporas. Para que se produzca una embriogénesis correcta es crítico determinar el estadio de desarrollo del grano de polen generalmente cuando la microspora es uni- o binuclear. La producción de callos se puede realizar desde cualquier estadio de desarrollo, aunque la mejor respuesta se produce con la utilización de microsporas uninucleadas (8).

-5- **Meristemos:** los meristemos son células totipotentes capaces de derivar en cualquier tipo de tejido vegetal. Según su localización se pueden diferenciar en tres tipos. Apicales, presentes en la punta de raíces y tallos, siendo los primeros en aparecer durante el desarrollo vegetativo de una planta vascular. Intercalares, propios de monocotiledóneas, encontrándose generalmente en la base de los tallos o de las hierbas cumpliendo una función similar a los meristemos laterales. Laterales, primeros en ser empleados en los cultivos *in vitro*, responsables del crecimiento radial, dando lugar al xilema, al floema y a los parénquimas secundario y cortical. El cultivo de meristemos tiene numerosas aplicaciones, siendo una de las más importantes la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no es afectada por estos patógenos. Otra aplicación es la multiplicación vegetal, así su potencialidad se demuestra con un ejemplo muy claro: a partir de una yema apical de un clavel, se pueden obtener 4 millones de claveles/año. La técnica permite también multiplicar especies de plantas con reproducción lenta o difícil (p.e. orquídeas), o acelerar la producción de plantas bianuales (p.e. los pensamientos o la col). Como mayor ventaja cabe destacar que los meristemos se pueden desarrollar en gran cantidad de medios de cultivo, desde el MS (Muskirage and Skoog, ver más adelante) hasta el cultivo en biorreactores. Estudios recientes indican que las células meristemáticas apicales no diferenciadas presentan una tasa de éxito mayor que las células somáticas diferenciadas en la iniciación de cultivos celulares, puesto que tienen menor tendencia a formar agregados celulares haciéndolos más productivos. Por ello son una de las mejores fuentes primarias de explantos para su uso en biorreactores (14,15).

-5.1- **Cultivos de células meristemáticas cambiales (CMCs):** El aislamiento de este tipo de células supuso uno de los mayores avances en el cultivo vegetal *in vitro*. Estas células se obtienen del cambium vascular en los meristemos secundarios de algunos tipos de plantas (no existen en monocotiledóneas ni en plantas vasculares inferiores), siendo su función la de formar el xilema y floema secundarios. A destacar que se trata de células no diferenciadas de forma innata y funcionan como células madre vegetales. Presentan características que las hacen ideales para los cultivos celulares en suspensión, al exhibir un índice de crecimiento mayor que el resto de células

no diferenciadas y tener una menor capacidad de agregación. La agregación celular es uno de los mayores inconvenientes en la producción *in vitro* de células vegetales al crear microhábitats que modifican el consumo de Oxígeno, la síntesis de MSs y el acúmulo de desechos, todo ello perjudicial para el cultivo global. Como ventajas, se ha observado un aumento en la síntesis de algunos productos metabólicos (p.e. cultivos de CMCs de *Taxus cuspidata* condujo a elevar las concentraciones de paclitaxel en comparación con sus cultivos de callos (10)), así como un aumento en la capacidad de secreción de MSs al medio exógeno o una mayor vulnerabilidad frente a la elicitación. Los elicitadores (descritos con más detalle más adelante) son moléculas capaces de inducir respuestas defensivas en la planta (generalmente producción de metabolitos) y son producidos por agentes estresantes bióticos y abióticos (8,10).

## SEGUNDO PASO: ELECCIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO: MÉTODOS DE CULTIVO *IN VITRO* MÁS PRODUCTIVOS:

Si nos centramos en los métodos de cultivos *in vitro* que aumentan exponencialmente la productividad y por tanto de mayor rentabilidad para la industria farmacéutica, tres nombres aparecen repetidamente:

### 1) LA MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación es el término que hace referencia a la técnica universal de clonación masiva de plantas. Ésta es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica, puesto que permite cultivar células de diversos tipos celulares (tejidos, órganos, semillas, embriones, etc...) produciendo plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada, gracias a la totipotencialidad de dichos tipos celulares. Los cultivos son realizados en medios enriquecidos específicos que permiten las condiciones necesarias para la embriogénesis u organogénesis, siendo necesario un estricto control de las condiciones ambientales. Además una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso y multiplicar la producción.

La micropropagación se realiza en tres fases consecutivas: Una primera **fase de desdiferenciación**, dónde se eligen aquellos explantos que presenten totipotencialidad (generalmente células meristemáticas). Una segunda **fase de inducción**, donde mediante el control de los factores externos (p.e temperatura, agua o luz) o mediante el uso de elicitadores se determina el comportamiento celular para formar un órgano u embrión. En la última fase o **fase de realización** se consigue desarrollar el órgano o el individuo en cuestión. Ésta técnica constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se puede usar

en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

Además, las plantas micropropagadas son genéticamente homogéneas, con lo cual este método de cultivo *in vitro* se puede convertir en una útil herramienta para la conservación de especies medicinales en peligro de extinción. Entre las ventajas de la micropropagación se pueden mencionar:

1. En un tiempo y espacio reducidos, podemos desarrollar gran cantidad de plantas a partir de un solo explanto.
2. Al contrario de los métodos convencionales de propagación, las plantas que necesitan unas temperaturas de desarrollo constantes a lo largo de todo el año son cultivadas de forma ininterrumpida controlando las condiciones ambientales.
3. Los cultivos celulares y tisulares están generalmente libres de colonizaciones, tanto fúngicas como bacterianas. La erradicación de virus y el mantenimiento de las muestras en un estado aséptico permanente es mucho más fácil de alcanzar con cultivos celulares.
4. La multiplicación y con ello, la productividad se incrementa enormemente; al automatizar los procesos de crecimiento y reducir los costos de trabajo.
5. En general la micropropagación nos permite obtener individuos uniformes (clones) y en el caso de los cultivos de callos los metabolitos secundarios se extraen directamente del medio de cultivo. Además facilita los estudios de procesos fisiológicos.

Sin embargo esta técnica también presenta algunas limitaciones, a destacar:

1. Es relativamente cara y puede tener un coste de mantenimiento superior al 70% del coste total.
2. Produce monocultivos genéticamente idénticos a la planta madre, pudiendo disminuir la capacidad de resistencia poblacional frente a enfermedades e infecciones.
3. Si el explanto de partida está infectado la progenie puede sufrir dicha infección. Para evitar esto, los explantos se almacenan y chequean constantemente, comprobando si se encuentran libres de patógenos.
4. No todas las plantas son susceptibles de ser micropropagadas; esto puede ser debido al desconocimiento de la composición del medio de cultivo adecuado para su crecimiento.

(1, 2)

## 2) CULTIVOS DE RAÍCES EN CABELLERA:

Actualmente el interés por los cultivos de raíces en cabellera ha ido en aumento. El término “raíz en cabellera” se aplicó al resultado natural de la infección de las raíces de las plantas por bacterias del terreno, siendo *Agrobacterium rhizogenes*, el agente infeccioso más frecuente.

Se estudiaron los mecanismos moleculares que causan esta enfermedad y se concluyó que constituyen una **forma natural de ingeniería genética**. Así, el crecimiento indiscriminado de raíces de origen neoplásico es el resultado de una infección y más específicamente, por la presencia del denominado plásmido Ri en el agente infeccioso. Este plásmido se encuentra formando un segundo anillo doble de ADN ciclico independiente de la cadena de ADN principal y contiene una información genética específica (T-DNA) que induce la proliferación radicular sin control. Durante el proceso infeccioso el plásmido se transfiere de forma natural a las células vegetales radiculares y se integra en el genoma de la planta, desde este momento usará el sistema de lectura del material genético de la célula vegetal con lo que se facilita su proliferación.

Los cultivos de raíces en cabellera poseen un crecimiento rápido (independiente del enriquecimiento hormonal del medio) y radicular en forma plagiotrópica, es decir en ángulo oblicuo debido al estímulo gravitatorio. Multitud de especies vegetales se han cultivado por esta técnica, la cual ha probado ser un útil sistema de replicación con numerosas aplicaciones en: el estudio de la fisiología radicular, la fitorremediación, la elucidación de rutas metabólicas y la producción de metabolitos secundarios. Por otro lado, este tipo de cultivo capacita la regeneración del cuerpo entero de la planta, de modo espontáneo o por la inducción con fitohormonas, presentando la planta hija una talla reducida con respecto a la planta madre. Es un hecho establecido y demostrado que la producción de metabolitos secundarios (MSs) en los cultivos de raíz en cabellera, para la mayoría de las especies infectadas, es similar o incluso mayor al de la planta madre y, especialmente, la productividad observada en los cultivos celulares no diferenciados. A parte de este hecho, al igual que en los cultivos celulares, la producción de MSs puede a menudo aumentarse a través del uso de mecanismos de elicitación.

Actualmente ya se ha conseguido producir por este tipo de cultivos: lignanos, esteroides, antraquinonas o alcaloides, lo cual señala a esta técnica de cultivo como una fuente válida para producción de metabolitos secundarios sustentable y de interés industrial.

Entre las ventajas de estos cultivos se pueden mencionar:

1. Mediante ingeniería genética se puede conseguir transferir otros genes heterólogos dentro del plásmido Ri, dotando a la célula huésped de nuevas características y/o facultándolas para la producción de proteínas recombinantes.
2. En cuanto a su aplicación comercial, la compañía suiza ROOTec desarrolla y optimiza biorreactores para el cultivo de raíces en cabellera a gran escala, potencializando la producción de compuestos farmacológicamente activos con fines industriales.
3. Se ha observado que el metabolismo secundario de los cultivos de raíces en cabellera es normalmente más intenso que el de las células no diferenciadas, aunque puede ocurrir que la estructura de las moléculas cambie y dé lugar a nuevos tipos de compuestos con diferentes

actividades. La razón de esto, puede ser el efecto de la integración de los genes transgénicos en el genoma de la planta, que interfieren con su material genético y por tanto con la expresión o regulación de genes implicados en las vías de producción de metabolitos secundarios. Así, se aislaron de entre más de 400 especies de plantas transformadas con *A. rhizogenes*, nuevas sustancias derivadas de los metabolitos secundarios originales. Este hecho supone una fuente de nuevas moléculas con aplicaciones terapéuticas inexploradas; ya que mayoritariamente este tipo de cultivos se emplean única e íntegramente para la producción de MSs ya conocidos.

Entre las desventajas de esta técnica cabe destacar:

1. El coste y mantenimiento es el más alto de todas las posibilidades expuestas.
2. La mencionada posibilidad de síntesis de metabolitos secundarios no esperados puede ser un inconveniente cuando se pretende la producción de un metabolito concreto y se obtienen MSs diferentes.

(5, 8, 16)

### 3) CULTIVOS CELULARES EN BIORREACTORES:

Los biorreactores son recipientes de distinta capacidad (desde unos pocos hasta miles de litros), diseñados para propiciar el crecimiento y/o la multiplicación de distintos tipos de células y/o órganos. Pueden utilizarse para generar embriones somáticos (la base de las semillas sintéticas), o directamente para producir MSs, y son ampliamente usados en la industria farmacéutica y alimentaria. Debido a que no todos los cultivos de células son capaces de producir los MSs de la planta madre, y que éstos se acumulan en pequeñas cantidades dentro de la célula dificultando su extracción, se les considera una poderosa herramienta en la producción comercial de MSs con un elevado coste en el mercado.

La selección del tipo de explanto a utilizar en los biorreactores debe tener en cuenta los siguientes aspectos: (1) resistencia frente al medio, (2) reactividad a la elicitación, (3) capacidad de multiplicación, (4) propensión a formar agregados. Teniendo en cuenta todos estos condicionantes, el empleo de uno u otro tipo de explanto será, en orden creciente de interés el siguiente: protoplastos < callos celulares < embriones < microsporas < meristemos apicales < raíces en cabellera < células meristemáticas cambiales.

Los biorreactores pueden clasificarse de dos formas principales: En relación a **la forma en que se encuentran las células en el cultivo** podemos distinguir:

- Reactores de células en suspensión: las células se encuentran suspendidas y se pueden mezclar libremente en el fluido, bien como células individuales o en forma de agregados. Esto tiene como ventaja que se proporciona un ambiente de cultivo uniforme y como

desventaja un bajo control sobre el tamaño del agregado de las células, lo cual puede afectar a la producción de metabolitos.

- Reactores con células inmovilizadas: las células se fijan formando una película de espesor variable. Esto tiene como ventajas que se elimina el problema del lavado en el sistema continuo y se aumenta la concentración celular.
- Reactores con biopelículas de células: permiten definir el espesor de la película de células inmovilizadas, lo cual facilita un ambiente que favorece el crecimiento de células y la formación de metabolitos secundarios (hay estudios que demuestran que el cultivo de callos celulares de plantas ricas en alcaloides aumenta la productividad de estos MSs cuando su cultivo se desarrolla en biopelículas).

En relación **al sistema de alimentación del cultivo** podemos distinguir:

- Cultivo discontinuo (“batch”): consiste en colocar dentro del biorreactor un inóculo o carga de células con su alimentación correspondiente y dejar que se lleve a cabo el proceso productivo durante el tiempo necesario (tiempo de retención).
- Cultivo semi-continuo (“fed-batch”): las poblaciones celulares (lotes) se alimentan regularmente con un sistema de entrada, lo que proporciona mayor productividad.
- Cultivo continuo: el lote se alimenta regularmente con una línea de entrada y se drena con una línea de salida o lavado, de forma que el medio de cultivo se renueva constantemente. Esto tiene como ventaja que se evita la muerte celular y la contaminación de los lotes, mucho más probable en los otros dos métodos de cultivo, y como desventaja que aumenta los costes operativos.

Como se indicó anteriormente, las células cultivadas son diferentes a las células en la planta intacta (p.e. carecen de pared celular), lo que hace necesario recurrir a la elicitación. Los elicitadores son compuestos que estimulan las defensas de la planta, promoviendo su metabolismo secundario con el objeto de proteger tanto a la célula como a la planta entera. La elicitación es uno de los procesos biotecnológicos más eficaces en la mejora de la producción de MSs. Los elicitadores se pueden dividir en bióticos o abióticos. Los abióticos suelen ser compuestos de origen inorgánico (sales o metales), aunque se han investigado poco se sabe experimentalmente que pueden aumentar la producción de MSs en suspensiones celulares, cultivos de raíces en cabellera y cultivos de meristemos radiculares. Los bióticos suelen ser compuestos orgánicos que se pueden acoplar a receptores específicos de las membranas celulares, un ejemplo de este tipo serían los patrones moleculares asociados a microbios (PMAM), que al ser reconocidos por la planta como posibles agentes invasores provocan la síntesis y liberación de MSs.

En relación con las características ya descritas para los biorreactores, podemos destacar las siguientes ventajas que los convierten en una poderosa herramienta para los cultivos *in vitro* de células vegetales:

1. Durante el proceso productivo se pueden regular y controlar las condiciones de cultivo, lo cual permite corregirlas en caso de necesidad, aumentando la productividad, seguridad y calidad en todo el proceso.
2. Los procesos de iniciación y colecta son mucho más fáciles lo que ahorra tiempo.
3. Cabe destacar el cultivo celular en suspensión que al facilitar el intercambio nutritivo entre las células y el medio, aumenta la tasa de replicación y con ello la síntesis de MSs.
4. También permite escalar la producción de cultivos celulares de una forma controlada a partir de unos parámetros establecidos para favorecer la síntesis de compuestos bioactivos.

Entre las desventajas de este método de cultivo cabe mencionar:

1. La posibilidad de contaminación de la muestra, debido por ejemplo a una muerte celular descontrolada. Esto va a afectar la calidad y seguridad del lote volviéndolo inservible para su comercialización. Es un riesgo bastante frecuente que puede aumentar mucho los costes de producción.
2. La necesidad de elegir biorreactores especializados para el tipo de explanto propagado, lo cual puede aumentar los costes de producción y disminuir su productividad. Además es posible que el tipo de tejido que se desea propagar no sea lo suficientemente rentable.
3. Esta técnica es muy adecuada para la producción de metabolitos secundarios, puesto que muchos de ellos pueden encontrarse directamente en el medio de producción, facilitando enormemente su extracción. Sin embargo para la organogénesis y embriogénesis la rentabilidad disminuye, al complicarse el facilitar la correcta nutrición de toda la planta.

(16, 17)

### TERCER PASO: PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* (1):

Una vez descritos los métodos de cultivo *in vitro* más usados así como aquellos de mayor productividad, se desarrollan a continuación las etapas del procedimiento de cultivo en general haciendo hincapié, caso de ser preciso, en cada tipo concreto.

1. Fuente del explanto: El primer paso es la elección de qué partes de la planta se van a utilizar para el proceso de iniciación. Para los cultivos celulares, puede emplearse cualquier parte de la planta (raíz, hojas, tallo...). El éxito del explanto como iniciador de propagación suele depender de la edad de la planta madre, pero no es el único factor determinante. En ocasiones los explantos

de gran tamaño aumentan las posibilidades de contaminación y pequeños explantos como los meristemales presentan menores tasas de crecimiento.

2. Esterilización: Una vez elegido el explanto a reproducir vegetativamente procedemos a su lavado y desinfección, por si la muestra presenta bacterias o agentes patógenos. El método habitual consiste en: un primer lavado con agua del grifo (15min.), para eliminar restos de materia orgánica y mineral superficial. Después se esterilizan las muestras con etanol (70% v/v) durante 30 segundos y acto seguido se someten a un segundo tratamiento esterilizante bien con cloruro de mercurio al 0,2% (6 min.) o hipoclorito sódico al 7% (20 min.). Una vez desinfectados se lavan con agua destilada hasta tres veces, se secan en papel de filtro y se llevan después al medio de cultivo. Existen sin embargo otros protocolos de esterilización (ver referencias 6 y 9).

3. Recipiente de cultivo: los explantos esterilizados se introducen en recipientes adecuados a su tamaño y tipo que varían también en función del cultivo *in vitro* al que están destinados. Se pueden utilizar botellas de cristal de borosilicato, tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer y los propios biorreactores. Los tubos de ensayo se usan generalmente en la inicialización de los cultivos por micropropagación y/o cultivos de meristemos apicales. Las botellas de borosilicato y los Erlenmeyer se emplean más frecuentemente en la inducción de callos, proliferación de estolones (brotes laterales que nacen de la base del tallo en algunas plantas herbáceas y que crece de manera epigea) y multiplicación de embriones (18).

4. Medios de cultivo y hormonas de crecimiento empleadas: contienen nutrientes esenciales para el crecimiento *in vitro* de células y tejidos vegetales. Una selección correcta es importante para obtener un cultivo celular productivo y exitoso. El medio de cultivo más empleado para la micropropagación y el cultivo de meristemos apicales es el MS (Murashige y Skoog); el medio MS contiene: una serie de macronutrientes (K, NH<sub>4</sub> mayormente), micronutrientes (sobretudo ácido bórico y sulfato de zinc) y vitaminas (siendo la que se encuentra a mayor concentración el mio-inositol con 100 mg/L) (19). Para prepararlo se pesan los ingredientes, se disuelven en agua destilada y se añaden 30 g/L de sacarosa, se agita ajusta el pH y gelifica con agar bacteriológico (19). También se usan otros como Linsmaier-Skoog (LS), Schenk and Hildebrandt (SH), Woody Plant Medium (WPM) y Nitsch-Nitsch (NN). En el caso de biorreactores el medio de cultivo depende de cómo se alimenta el cultivo y del inóculo o lote que se desea replicar, su pH suele ajustarse entre 5,7-5,8. Por ejemplo, un medio de cultivo óptimo para células vegetales tiene principalmente sacarosa, sales inorgánicas, vitaminas, fitohormonas y factores de crecimiento que pueden actuar en la producción de MSs (20).

Para optimizar la regeneración y el crecimiento de los tejidos se usan hormonas reguladoras del crecimiento (PGRs: Plant Growth Regulators) o fitohormonas, entre las cuales se destacan:



- Auxinas: mayormente participan en la división celular, en la elongación y en la diferenciación radicular. Algunas son el Ácido Indol-3-Acético (AIA), el Ácido Indol-3-Butírico (AIB), el Ácido 1-Naftalenacético (ANA) y el Ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4,-D)
- Citoquinas: propician la división celular, la inducción de brotes y el desarrollo y proliferación celular. Algunas son las Bencil-Aminopurinas (BAP), Isopentenil-Adenina (IPA o 2i-p), la kinetina y la zeatina.
- Giberelinas: participan en el crecimiento, elongación y floración de las plantas; por ejemplo la Giberelina GA3.

5. Fases del cultivo: Al ser muy variado el espectro de cultivos anteriormente desarrollados, nos centraremos en este apartado en las dos vertientes de mayor interés: la obtención de clones vegetales a partir de explantos y la obtención de MSs de interés farmacéutico y comercial.

Para la obtención de clones los cultivos de raíces en cabellera y/o micropropagación son los que ofrecen un mayor interés. El proceso de cultivo desde los explantos hasta la planta madura consta de unas etapas básicas:

- Fase de iniciación: los explantos esterilizados son transferidos al medio de cultivo. Es aconsejable el uso de productos bactericidas y fungicidas en el medio.
- Fase de multiplicación: su objetivo es incrementar el número de propágulos. Se lleva a cabo mediante sub-cultivos repetidos hasta conseguir el número deseado de plántulas.
- Fase de enraizamiento: puede desarrollarse en paralelo a la etapa anterior y precisa inducir cambios nutricionales y la adición de reguladores del crecimiento (p.e., para medio MS se utiliza 1 mg/L de auxina) que faciliten el proceso de enraizamiento en función de cada especie.
- Fase de aclimatación: el acondicionamiento a los dos factores más importantes en esta última fase: humedad e intensidad lumínica, se consigue de forma gradual y decreciente. Las plántulas se retiran del medio de cultivo y se lavan con agua destilada, a continuación se plantan en macetas con una mezcla de tierra y arena. Las plantas se conservan en una cámara de crecimiento con luz infrarroja, hasta que ya son trasladadas a invernadero.

En el caso de cultivos en biorreactores podemos diferenciar dos fases:

- Fase de latencia en la cual se introduce en el biorreactor el inóculo o lote que se desea propagar junto con su medio de cultivo.
- Fase de crecimiento en la que se produce la replicación celular de forma exponencial, paralelamente a la síntesis de metabolitos secundarios. Tanto para la obtención de embriones somáticos (como base de las semillas sintéticas) como para la recolección de los MSs de interés se requiere su extracción desde el medio de cultivo y su posterior purificación.

---

## Conclusiones

El cultivo *in vitro* de plantas medicinales presenta numerosas e interesantes ventajas con respecto a los métodos de cultivo convencionales, entre éstas cabe destacar:

En primer lugar el **aumento de la productividad**, ya que posibilita su explotación industrial consiguiendo aumentar el ratio beneficio/coste; de forma que resulta mucho más rentable desde un punto de vista económico.

En segundo lugar la producción *in vitro* **aumenta el número y la calidad de los metabolitos secundarios obtenidos**. Puesto que las células empleadas son susceptibles de mejora genética y se tiene control sobre las rutas metabólicas y por tanto su manipulación, este tipo de cultivo facilita el descubrimiento de nuevos compuestos bioquímicos que pueden ser de interés.

En tercer lugar la **seguridad de los productos que se obtienen *in vitro* es mucho mayor**, puesto que en este tipo de condiciones la propagación debe realizarse en un ambiente estéril, libre de cualquier agente patógeno que pueda afectar tanto a los vegetales productores, como a los compuestos destinados al consumidor.

Sin embargo, este tipo de cultivos también presenta algunas desventajas, siendo la principal su elevado **coste de producción**; lo cual puede provocar que la biosíntesis de algunos principios activos por este método no sea rentable. No obstante, las constantes mejoras biotecnológicas junto con la investigación que se lleva a cabo en este campo tendrán a largo plazo una incidencia positiva. A modo de conclusión final, cabe decir que el cultivo *in vitro* de plantas medicinales presenta un enorme potencial desde múltiples puntos de vista: ecológico en cuanto a la posibilidad de clonar especies en peligro de extinción, biológico en cuanto a que permite estudiar la fisiopatología de determinados vegetales, agronómico en cuanto a que permite propagar especies de interés alimenticio y sanitario a través de la obtención de productos de interés farmacéutico.

---

## Bibliografía

- (1)Rani, A. & Kumar, S. (2017). Tissue culture as a plant production technique for medicinal plants: a review. International Conference of Innovative Research in Science Technology and Management. pp. 609-620.
- (2)Debnath, M., Malik C.P. & Bisen, P.S. (2006). A Tool for the Production of High Quality Plant-based Medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology, 7: 33-49. DOI: 10.2174/138920106775789638.
- (3)Leonti, M. & Casu, L. (2013). Traditional medicine and globalization: current and future perspectives in ethnopharmacology. Frontiers in Pharmacology, 4 :92. DOI: 10.3389/fphar.2013.00092.

- (4) Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy, E.M. *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.
- (5) Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M. *et al.* (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants: process in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 42(3): 206-214. DOI: <https://doi.org/10.1079/IVP2006769>.
- (6) Narayani, M., Chadha, A. & Srivastava, S. (2017). Callus and cell suspension culture of *Viola odorants* as *in vitro* production platforms of known and novel cyclotides. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 130(2): 289–299. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1223-6>.
- (7) Thiem, B., Kikowska, M., Maliński, M.P. *et al.* (2017). Ecdysteroids: production in plant *in vitro* cultures. *Phytochemistry Reviews*, 16 (4): 603–622. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9483-z>.
- (8) Chandra, S., Lata, H. & Varma, A. (2013). *Biotechnology for Medicinal Plants Micropropagation and Improvement*. Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg). Capítulos 8 y 9 pp. 191-241. ISBN 978-3-642-29974-2.
- (9) Andrys, D., Kulpa, D., Grzeszczuk, M. *et al.* (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of *Lavandula angustifolia* Mill., field-grown and propagated *in vitro*. *Folia Horticulturae*, 29(2): 161-180. DOI: <https://doi.org/10.1515/fhort-2017-0016>.
- (10) Ochoa-Villareal, M., Howat, S., Jang, M.O. *et al.* (2015). Cambial meristematic cells: a platform for the production of plant natural products. *New Biotechnology*, 32 (6): 581-586. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.003>.
- (11) Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition. Volume 5*. Amsterdam: Elsevier. ISBN: 978-0-444-81623-8.
- (12) Garro-Monge, G., Gatica-Arias, A. & Valdez-Melara, M. (2008). Somatic embryogenesis, plant regeneration and acemannan detection in aloe (*Aloe barbadensis* MILL.). *Agronomía Costarricense*, 32 (2): 41-52. ISSN: 0377-9424 / 2008.
- (13) Morgana, C., Lorenzo, R. & Carimi, F. (2004). Somatic embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sugaone) from stigma and style culture. *Vitis*, 43(4):169-173.
- (14) Argenbio: Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología [internet] Argentina. María Eugenia Segretín [Actualizado 25 May 2018; citado 16 Abr 2018]. En: <http://www.argenbio.org> .
- (15) Kanungo, S. & Sahoo S. (2011). Direct organogenesis of *Withania somnifera* L. from apical bud. *International Research Journal of Biotechnology*, 2 (3): 58-61. <http://www.interestjournals.org/IRJOB>.

- (16) Orozco Sánchez, F., Hoyos Sánchez, R. & Arias Zabala M.E. (2002). Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios [internet]. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín ,55(1): 1473-1495. ISSN electrónico 2248-7026.
- (17) Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D. *et al.* (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 2016, 21, 182. DOI: 10.3390/molecules21020182.
- (18) Jaiswal, N., Verma, Y. & Misra, P. (2017). Micropropagation and *in vitro* elicitation of licorice (*Glycyrrhiza* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2017(53): 145–166. DOI 10.1007/s11627-017-9832-7.
- (19) Probiotec: Productos y equipos biotecnológicos [internet] CA, Estados Unidos [citado el 18 de May] En: <http://www.probiotek.com/productos/reactivos/murashige-and-skoog-ms-medium/>
- (20) Merillon, J.M. (2007). Large-scale Production in Bioreactors. In *Biotechnology, Second Edition: Secondary metabolites* (KG Ramawa and Merillon, JM, eds.) Science Publishers pp. 335-362. ISBN: 1578084288.