



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

EL CULTIVO *IN VITRO* COMO FUENTE DE PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Kristin Chavdarova Kamenova

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido históricamente empleadas como fuente de obtención de principios activos, pertenecientes al grupo de metabolitos secundarios. Frente a la síntesis química, la extracción desde la propia planta es a menudo el método más seguro y económico para obtener estos compuestos.

Una alternativa al cultivo tradicional de plantas y a la extracción química de metabolitos es el cultivo *in vitro* de células vegetales con el fin de obtener metabolitos secundarios. Es especialmente ventajoso en plantas de difícil cultivo, cuando no se pueden obtener los metabolitos por síntesis química o cuando el rendimiento es demasiado bajo.

El cultivo vegetal *in vitro* se lleva a cabo en medios artificiales y en condiciones asépticas. Se basa en la totipotencia y desdiferenciación de las células vegetales para cultivarlas a gran escala bajo condiciones controladas, con el fin de aumentar la producción de compuestos de interés.

VENTAJAS

Independencia de factores ambientales	No necesita pesticidas ni herbicidas	Control de las condiciones del proceso
Metabolitos secundarios a gran escala	Buen rendimiento	Producción regular y previsible
Posibilidad de obtener nuevos compuestos	Periodo de desarrollo más corto	Reduce riesgo de extinción de especies

OBJETIVO

Exponer las características del cultivo *in vitro* y examinar su estado como alternativa al cultivo vegetal tradicional para la producción de metabolitos secundarios.

MATERIAL Y MÉTODOS



ScienceDirect

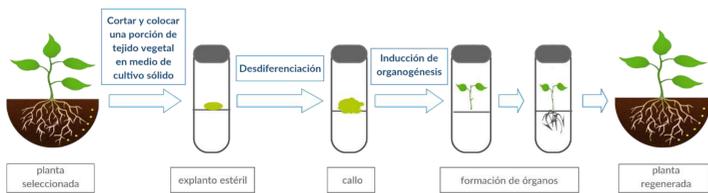


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CULTIVO DE CALLOS

- ➔ Punto de partida del cultivo *in vitro*
- ➔ Células morfológicamente indiferenciadas
- ➔ División desordenada
- ➔ Crecimiento irregular
- ➔ Potencial para formar raíces, brotes y embriones

regeneración de la planta completa



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

Obtención del explanto

- ➔ Seleccionar el explanto de planta madre con alto contenido en el metabolito deseado
- ➔ Obtener en condiciones asépticas
- ➔ Trasladar a medio de cultivo sólido de composición química y hormonal apropiada para formar callo

Composición del medio

- ➔ Sales minerales
- ➔ Reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas)
- ➔ Fuentes de carbono y de nitrógeno orgánico
- ➔ Determinado pH

su concentración depende de

tipo de cultivo *in vitro* especie vegetal tipo de explanto

Elicitación

Los elicitores inducen la expresión de genes asociados a enzimas del metabolismo secundario y estimulan la formación de metabolitos. Se dividen en bióticos y abióticos.

Inmovilización celular

Cultivos de agregados multicelulares sostenidos por un sustrato biológico inerte: gel polimérico, soporte polimérico rígido y poroso o soporte de origen biológico.

- ➔ Células más protegidas de la acción mecánica
- ➔ Alta producción de biomasa y de metabolitos secundarios
- ➔ Mejor extracción del producto de las células
- ➔ Mayor estabilidad del cultivo

Permeabilización

Uso de solventes y adsorbentes para formar poros en las membranas celulares ➔ Paso de moléculas al exterior de la célula ➔ Mayor extracción de metabolitos secundarios sin destruir las células.

Recuperación *in situ*

Retención del metabolito liberado al medio mediante una segunda fase específica en la que se va acumulando según su naturaleza polar o apolar. El metabolito se extrae después con adsorbentes.

Biotransformación

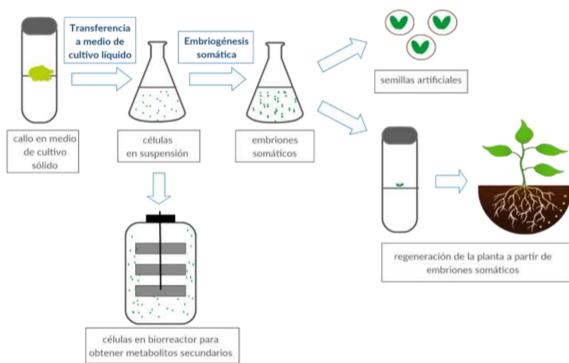
Modificación de grupos funcionales para producir metabolitos conocidos de forma más económica o generar nuevos compuestos.

- ➔ Enzimas necesarias en el cultivo
- ➔ Precursor o sustrato no tóxicos
- ➔ Alcanzar compartimento celular correcto
- ➔ Formación del producto más rápida que su metabolismo

Uso de biorreactores

- ➔ Cultivo de tejidos diferenciados
- ➔ Regulación del ambiente *in vitro*
- ➔ Regulación de parámetros que influyen en la producción de biomasa y acumulación de metabolitos
- ➔ Diferentes tipos según el cultivo y el metabolito deseado

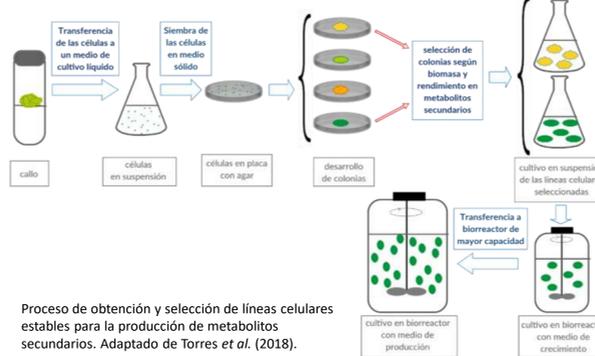
CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN



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

Selección de líneas celulares

Mediante exámenes microscópicos, macroscópicos y químicos se seleccionan líneas celulares genéticamente estables con alto ritmo de crecimiento y alta producción de metabolitos.



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

CULTIVO DE ÓRGANOS

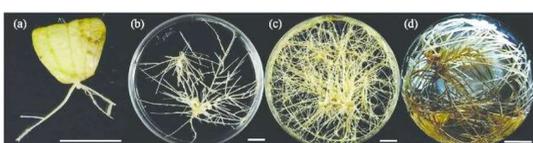
- ➔ Algunos metabolitos secundarios solo se producen en estructuras especializadas
- ➔ Mayor estabilidad genética frente al cultivo de callo y suspensiones celulares
- ➔ Brotes y raíces ➔ cultivo a gran escala

Adición de precursores

- ➔ Poco costosos
- ➔ No tóxicos
- ➔ Estructura similar a la del metabolito final de la ruta biosintética

Raíces en cabellera:

- ➔ Infección del explanto con *Agrobacterium rhizogenes* ➔ raíces ramificadas en sitio de infección
- ➔ El más empleado para producir metabolitos secundarios de forma industrial.
- ➔ Crecimiento rápido
- ➔ Alta productividad
- ➔ A menudo no requiere reguladores de crecimiento



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 BS durante 4 semanas. Tomado de Huang *et al.* (2014).

CONCLUSIONES

El cultivo vegetal *in vitro* tiene múltiples ventajas frente al tradicional, lo que favorece un mayor rendimiento en la obtención de metabolitos secundarios. Además, es esencial para elucidar las rutas metabólicas implicadas en sus procesos bioquímicos, y entender su transporte y compartimentación celular. La optimización mediante diversos métodos aumenta su eficacia y reduce los costes del proceso. Los avances en el cultivo *in vitro* harán de este un sistema rentable y sostenible, capaz de satisfacer las demandas de metabolitos secundarios y obtener compuestos no generados en la planta silvestre.

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*. Capítulo 5. pp. 157-207. Elsevier, Londres. ISBN: 978-0-12-802221-4
- Bourgand, 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
- 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
- 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). *Biología 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
- Muñoz de Malajovich, M. A. (2012). Cultivo de células y tejidos. En: *Biotecnología*, 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/np2009005
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. (2011). *Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro**. *Biología Vegetal*. 11(4), 195-211. ISSN 2074-8647
- Rao, S. R. y Ravishanker, G. A. (2002). *Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites*. *Biotechnology Advances*. 20(2), 101-153. ISSN: 0734-9750