



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Artículo original de investigación

Estrategias biotecnológicas para la producción de plantas medicinales de interés farmacológico

Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz ^{1,2,4} <https://orcid.org/0000-0003-4329-4697>, kairuzhd@uclv.edu.cu

Alina Capote Pérez ² <https://orcid.org/0000-0003-1095-9664>, alina@ibp.co.cu

Anabel Pérez Pérez ² <https://orcid.org/0000-0002-3689-0792>, anabel@ibp.co.cu

Naivy L. Pérez Alonso ^{2,3} <https://orcid.org/0000-0002-8232-2120>, naivylibet@gmail.com

Borys Chong Pérez ^{2,3} <https://orcid.org/0000-0002-0544-8985>, borys.chong@sinergiabio.com

Dionys González Hernández ^{1,2} <https://orcid.org/0000-0003-0938-7590>, dionys@uclv.cu

Geert Angenon ⁴ <https://orcid.org/0000-0001-8177-4961>, Geert.Angenon@vub.be

Alán Rivero Aragón ¹ <https://orcid.org/0000-0002-6955-332X>, alanra@uclv.edu.cu

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Cuba

² Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Cuba

³ Sociedad de Investigación y Servicios BioTECNOS Ltda., San Javier, Chile

⁴ Laboratorio de Genética de Plantas, Universidad Libre de Bruselas, Bruselas, Bélgica

*Autor para la correspondencia: kairuzhd@uclv.edu.cu

RESUMEN

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Introducción: Las plantas son fuentes de un gran número de metabolitos secundarios de interés comercial que son usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés químico. **Objetivos:** a) potenciar la biosíntesis y acumulación de cardenólidos; b) desarrollar un protocolo de propagación in vitro de *D. purpurea*; c) obtener plantas in vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni; d) comparar las plantas de *S. rebaudiana* cultivadas in vitro con aquellas propagadas mediante corte de esquejes; y e) realizar una revisión sistemática sobre las estrategias biotecnológicas aplicadas a plantas que producen edulcorantes de alta intensidad y poseen actividad antidiabética comprobada. **Métodos:** Se transformaron segmentos foliares de *D. purpurea* vía *Agrobacterium tumefaciens*. Se estudió el efecto de combinaciones de reguladores de crecimiento para la propagación masiva de líneas élites de ambas especies. Se realizaron estudios de las características morfológicas y genéticas de las plantas propagadas in vitro. Se realizó una revisión sistemática de cuatro especies de plantas medicinales con efecto antidiabético. **Resultados:** Se modificó la síntesis de cardenólidos en plantas transgénicas que expresan el gen VEP1. Fue posible regenerar 18,9 brotes por segmento de hoja vía organogénesis directa. Se confirmó la estabilidad genética y producción de metabolitos secundarios de las plantas regeneradas. Se propuso un protocolo de propagación in vitro de *S. rebaudiana*. Se obtuvieron plantas propagadas in vitro con caracteres morfológicos homogéneos y mejor estado fitosanitario. El análisis crítico de la bibliografía permitió proponer recomendaciones para futuros estudios. **Conclusiones:** Se desarrollaron 2 protocolos de cultivo in vitro para obtener plantas medicinales de forma estable y con una productividad uniforme de metabolitos secundarios. Se demostró la efectividad del empleo de estrategias biotecnológicas para potenciar la biosíntesis de metabolitos secundarios de interés farmacológico.

Biotechnological strategies to produce medicinal plants of pharmacological interest

ABSTRACT

Introduction: Plants are sources of a large number of secondary metabolites of commercial interest that are used in the pharmaceutical, food and cosmetic industries and as a source of numerous substances of chemical interest. **Objectives:** a) to enhance the biosynthesis and accumulation of cardenolides; b) to develop a protocol for the *in vitro* propagation of *D purpurea*; c) to obtain *in vitro* plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni; d) to compare *S. rebaudiana* plants grown *in vitro* with those propagated by cuttings; and e) to carry out a systematic review on biotechnological strategies applied to plants that produce high-intensity sweeteners and have proven antidiabetic activity. **Methods:** They were obtained transgenic lines carrying genes of interest from leaf segments. It was studied the effect of different combinations of growth regulators for massive *in vitro* propagation of elite lines from both plant species. They were carried out studies of the morphological and genetic characteristics of the plants propagated *in vitro*. It was carried out a systematic review of four species of medicinal plants with antidiabetic effects. **Results:** It was modified cardenolide biosynthesis in transgenic lines expressing the *VEP1* gene. It was achieved direct shoot regeneration from leaf segments with an average number of 18.9 shoots per leaf segment. Moreover, the genetic stability of regenerated plants and secondary metabolite production was confirmed. It was proposed an *in vitro* propagation protocol of *S. rebaudiana*. Plants propagated *in vitro* are characterized by having homogeneous morphological characters and better phytosanitary status. The critical analysis of the bibliography allowed us to propose recommendations for future studies. **Conclusions:** They were developed two *in vitro* culture protocols for obtaining medicinal plants with stable and uniform productivity of secondary metabolites. We demonstrated the effectiveness of biotechnological strategies to enhance the biosynthesis of secondary metabolites with pharmacological effects.

Keywords: cardenolides; *Digitalis purpurea*; digoxin; sweetener; *Stevia rebaudiana*

INTRODUCCIÓN

Las plantas son fuentes de un gran número de metabolitos secundarios de interés comercial que son usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés químico. ⁽¹⁾ La enorme demanda de productos naturales que tiene el mercado internacional le ha concedido mayor importancia al cultivo *in vitro* como fuente de metabolitos secundarios. ⁽²⁾ De igual modo, ha promovido el desarrollo de nuevas investigaciones sobre las rutas biosintéticas de estos compuestos y la implementación de nuevos enfoques para la producción de metabolitos secundarios empleando herramientas biotecnológicas. ^(3,4) Teniendo en cuenta estos aspectos se identificaron 2 especies de plantas medicinales que producen metabolitos

secundarios de interés comercial y que no son cultivadas en Cuba: *Digitalis purpurea* L. y *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Los extractos de hojas de especies de *Digitalis* han sido empleados para tratar enfermedades cardiovasculares por siglos. ⁽⁵⁾ Estas plantas pueden producir más de 30 tipos de glucósidos cardiotónicos conocidos como cardenólidos, como la digoxina y digitoxina. ⁽⁶⁾ Además, los cardenólidos derivados de *digitalis* tienen actividad antiviral, un fuerte efecto citostático frente a varios tipos de tumores y un impacto beneficioso en la fibrosis cística. ⁽⁷⁾ Las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son las principales causas de muerte a nivel mundial, por ello el desarrollo de compuestos bioactivos para tratar estas enfermedades es de alto interés a nivel mundial. ^(8,9)

Debido a que la síntesis química de los cardenólidos es económicamente inviable, las plantas de *Digitalis* e *Isoplexis*

son la única fuente para la obtención de cardenólidos, con *Digitalis purpurea* L. y *Digitalis lanata* L. como las principales fuentes de materia prima para la industria farmacéutica. ^(10,11) Sin embargo, el cultivo de estas especies está limitado por diversos factores como el ciclo bienal de la planta, las condiciones de estrés biótico y abiótico y la baja frecuencia de germinación. ⁽¹¹⁾ Además, el contenido y la acumulación de cardenólidos pueden variar en respuesta al clima, las condiciones del suelo y el genotipo. ^(12,13) Adicionalmente, las altas temperaturas y las fuertes lluvias tienen un efecto letal en las especies de *Digitalis* cultivadas en países tropicales como Cuba. ⁽¹⁴⁾

Por ello, diversos métodos biotecnológicos (organogénesis, embriogénesis somática, cultivo en biorreactor, adición de precursores biosintéticos y elicitación) han sido aplicados con el objetivo de producir biomasa y cardenólidos *in vitro*. ^(7,11,13) Sin embargo, los niveles de cardenólidos producidos *in vitro* fueron considerablemente inferiores a los obtenidos en las condiciones de campo. ⁽⁶⁾ Luego, la transformación genética ha sido señalada como una alternativa promisoría. Para su aplicación es necesario desarrollar un esquema de selección eficiente, protocolos de transformación y seleccionar genes candidatos para potenciar la ruta de biosíntesis de cardenólidos.

Stevia rebaudiana Bertoni es una especie de la familia Asteraceae, nativa de la región tropical de Sudamérica. Por sus propiedades medicinales ha alcanzado gran importancia a nivel mundial. Su cultivo y consumo se han incrementado, por el alto contenido de edulcorantes naturales no calóricos (esteviósidos y rebaudiósidos) que presenta como metabolitos secundarios. ⁽³⁾ Estos compuestos, además de presentar propiedades diuréticas y antimicrobianas, pueden ser ingeridos sin ningún tipo de peligro por pacientes con enfermedades que provocan trastornos del metabolismo de los carbohidratos como la Diabetes mellitus. ⁽¹⁵⁾

Varios autores han enfocado sus estudios en el cultivo *in vitro* de *S. rebaudiana* como método de propagación masiva. ^(3,16) Esto se debe al hecho de que el rango de germinación de las semillas es bajo, que su floración está condicionada por un descenso grande en la temperatura media y que la reproducción asexual (por brotes o esquejes) limita la producción a un bajo número de individuos. ⁽¹⁷⁾ Por lo que es necesario desarrollar una metodología de propagación *in vitro* de *S. rebaudiana* simple y adecuada a las condiciones de Cuba. Esto permitiría producir un gran número de plantas con caracteres morfológicos homogéneos y mejor estado fitosanitario, que aquellas multiplicadas de forma convencional. La propagación *in vitro* de plantas de *Stevia* seleccionadas por sus cualidades agronómicas y rendimiento de metabolitos secundarios podría ser empleada para la producción de semilla certificada con fines comerciales.

Este trabajo persiguió 5 objetivos: a) potenciar la biosíntesis y acumulación de cardenólidos en plantas transgénicas; b) desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *D. purpurea* vía organogénesis directa; c) obtener plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*; d) comparar las plantas de *S. rebaudiana* cultivadas *in vitro* con aquellas propagadas mediante corte de esquejes; y e) realizar una revisión sistemática sobre las estrategias biotecnológicas aplicadas a plantas que producen edulcorantes de alta intensidad y poseen actividad antidiabética comprobada.

MÉTODOS

Potenciación de la producción de cardenólidos en plantas transgénicas que expresan el gen VEP1

El gen codificante para la enzima progesterona-5 β -reductasa de *Arabidopsis thaliana* se expresó en plantas transgénicas de *D. purpurea*. ⁽¹⁸⁾ Para ello se realizó la construcción del vector binario y se aplicó la selección con higromicina B. ⁽¹⁹⁾ Se aplicaron técnicas basadas en PCR y secuenciación para confirmar la presencia de los transgenes en el genoma de la planta, estimar el número de copias de los genes *hpt* y *VEP1*, así como confirmar la expresión del gen *VEP1* en las líneas transgénicas. Finalmente, se cuantificó el contenido de digoxina y digitoxina en las plantas transgénicas y las plantas no transformadas. ⁽¹⁰⁾

Regeneración vía organogénesis directa, estabilidad genética y producción de metabolitos secundarios en plantas de *Digitalis purpurea* propagadas *in vitro*

Para la propagación masiva de líneas élites de plantas de *D. purpurea* se desarrolló un protocolo rápido y eficiente según se describe en Pérez-Alonso N *et al.* ⁽²⁰⁾ Se evaluó el efecto de 2 reguladores de crecimiento: ácido naftalenacético (ANA) y 6-benzilaminopurina (6-BAP) en la morfogénesis *in vitro*. Plantas regeneradas y plantas de la línea madre fueron seleccionadas al azar para realizar estudios de estabilidad genética empleando la técnica de RAPD (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*). Se realizó un análisis farmacognóstico del polvo de los extractos de hojas y la cuantificación de digoxina y digitoxina.

Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*

Con el objetivo de obtener plantas *in vitro* de *S. rebaudiana* a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro* se desarrolló un protocolo descrito en González-Hernández D *et al.* ⁽²¹⁾ Se procedió a realizar el establecimiento *in vitro* de ápices, para lo cual se evaluó el efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección. Los brotes establecidos fueron transfe-

ridos a medio de cultivo de multiplicación, donde se determinó el efecto de los reguladores de crecimiento (6BAP y AIA: 2 y 1, 4 y 1, 2 y 0, 4 y 0) mg/L y el número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación. Además, se evaluó la supervivencia de las plantas propagadas *in vitro* durante la fase de aclimatización *ex vitro* empleando diferentes combinaciones de los sustratos zeolita y *compost* de cachaza (25-75, 75-25, 50-50, 0-100, 100-0) %.

Comparación de plantas de *S. rebaudiana* obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes, empleando variables morfométricas y patrones de amplificación aleatoria de ácido desoxirribonucleico polimórfico

Para validar el protocolo propuesto, se realizaron comparaciones entre las plantas propagadas *in vitro* y las plantas multiplicadas mediante corte de esquejes. Primero se comparó la respuesta de las plantas *in vitro* en casa de cultivo con las plantas multiplicadas por esquejes empleando variables morfométricas, ⁽²¹⁾ y luego se emplearon marcadores moleculares tipo RAPD como se describe en González-Hernández D *et al.* ⁽²²⁾ Para la extracción del ADN, se evaluaron dos protocolos de aislamiento con modificaciones.

Estrategias de propagación *in vitro* y mejora biotecnológica de plantas con actividades edulcorante de alta intensidad y antidiabética

En un estudio preliminar se identificaron 4 especies de plantas con efecto antihiper glucemiante respaldado por in-

vestigaciones científicas, una previamente estudiada por el grupo de trabajo (*Stevia rebaudiana* Bertoni) y 3 menos conocidas como edulcorantes de alta intensidad (*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk, *Glycyrrhiza glabra* L. y *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex A. M. Lu y Zhi Y. Zhang). La revisión de la literatura se realizó utilizando Google Scholar y los términos de búsqueda booleanos como se describe en Kairuz E *et al.* ⁽³⁾ Para la especie *C. paliurus* se realizó una búsqueda intensiva adicional que capturó todo lo que pudiera ser relevante, porque solo se recuperaron dos artículos sobre la temática. En este caso, el término de búsqueda fue *Cyclocarya paliurus*.

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el Programa STATISTICA 10.0 para Windows.

RESULTADOS

Potenciación de la producción de cardenólidos en plantas transgénicas que expresan el gen *VEP1*

Se obtuvieron 9 líneas transgénicas resistentes a higromicina que contenían el gen codificante para la enzima progesterona-5 β -reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Estas contenían entre 1 y 3 copias del transgén según se estimó por PCR cuantitativo y PCR inverso. La expresión del gen *VEP1* se comprobó en 8 de las líneas transgénicas mediante RT-qPCR (figura 1). Los contenidos de digoxina y digitoxina fueron aumentados 3,8 (757 μ g/gPS) y 2,2 veces (199 μ g/gPS), respectivamente, en las plantas transgénicas cultivadas *in vitro*. La transformación genética permitió potenciar la producción de

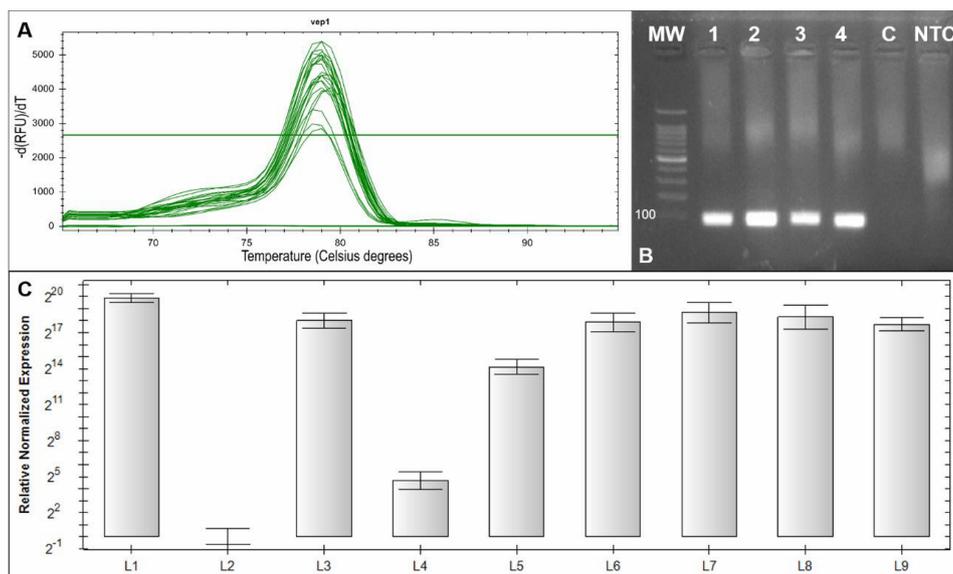


Fig. 1. Determinación del nivel de transcripción del transgén mediante RT-qPCR. A) la curva de fusión presenta un pico único para la amplificación del gen *VEP1*; B) Electroforesis en gel de agarosa del producto del gen *VEP1* en muestras de hojas de plantas transgénicas (1-4) y no transformadas (C) de *D. purpurea*. Leyenda: MW, marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega); NTC, control negativo. C: Expresión relativa normalizada del gen *VEP1* en líneas transgénicas (L1-L9). Fuente: Kairuz E *et al.* (25)

cardenólidos *in vitro* con mayor eficiencia que otras estrategias biotecnológicas publicadas hasta el momento.

Regeneración vía organogénesis directa, estabilidad genética y producción de metabolitos secundarios en plantas propagadas *in vitro*

Se desarrolló un protocolo rápido y eficiente para la propagación *in vitro* de plantas de *D. purpurea* sin afectar la estabilidad genética y la producción de compuestos bioactivos. Fue posible regenerar 18,9 brotes por segmento de hoja vía organogénesis directa en medio MS con 0,54 μM de ácido naftalenacético y 13,2 μM de 6-benzilaminopurina. También se confirmó la estabilidad genética de las plantas regeneradas mediante RAPD. Además, el polvo de hojas elaborado a partir de las plantas regeneradas cumplió con las especificaciones de calidad de la Farmacopea Británica (figura 2) y no hubo diferencias significativas entre los contenidos de cardenólidos cuantificados en las plantas regeneradas y madres (digoxina 22,6 $\mu\text{g gPS-1}$, digitoxina 220,7 $\mu\text{g gPS-1}$).

Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*

Para el establecimiento de un protocolo de propagación de plantas de *S. rebaudiana* a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*, se procedió a evaluar las condiciones de desinfección. Se evaluaron 4 concentraciones de hipoclo-

rito de sodio: (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0) v/v; durante 3 tiempos de exposición: (10, 15 y 20) min. No existieron correlaciones entre el número de explantes necrosados o contaminados y el tiempo de desinfección. De acuerdo con los porcentajes de supervivencia y desinfección analizados, se recomienda emplear el hipoclorito de sodio al 1 % como agente desinfectante.

Posteriormente, se determinó el efecto de los reguladores de crecimiento y el número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación. El empleo de las combinaciones de reguladores de crecimiento evaluadas no modificó significativamente el coeficiente de multiplicación. Durante el segundo subcultivo de los explantes, los segmentos en medio de multiplicación con reguladores de crecimiento se tornaron delgados, hiperhídricos y en algunos casos despigmentados. Mientras que en el medio de cultivo donde no se añadieron los mismos no se produjo afectación en el desarrollo de los brotes. En el tercer subcultivo se produjo un incremento considerable del coeficiente. No fue posible prolongar más de 15 días el periodo entre cada subcultivo, pues se producían afectaciones en los explantes, debido al agotamiento del medio de cultivo. Si se prolongaba este tiempo o se superaba el quinto subcultivo, los brotes mostraban signos de delgadez general y marchitez en las hojas y en los brotes nuevos.

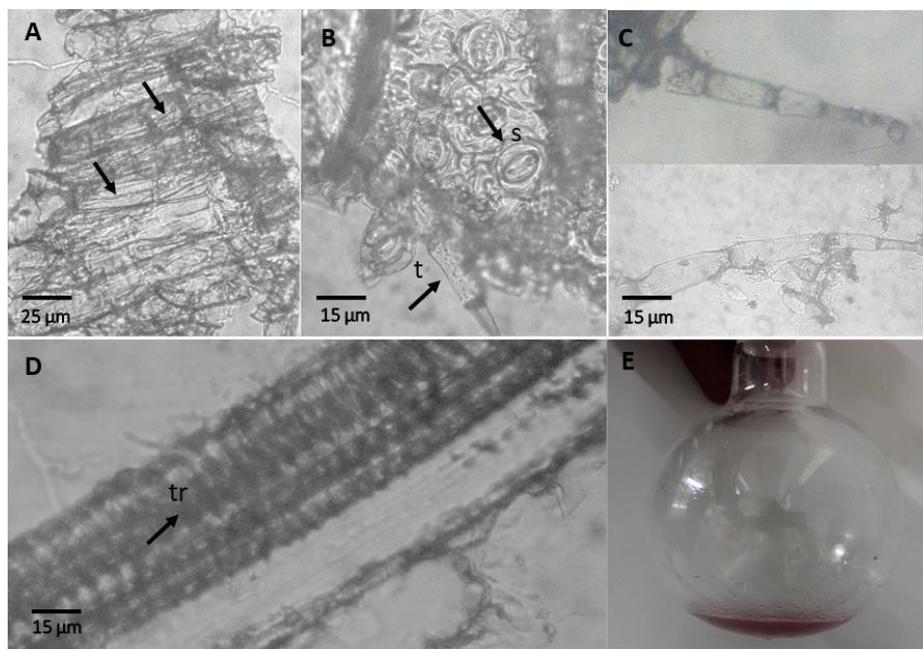


Fig. 2. Examinación microscópica del polvo de hojas de *D. purpurea*. A) epidermis, B) estomas (s) y tricomas (t), C) tricomas glandulares multicelulares (4 a 5 células), con tallo único y cabeza unicelular, D) vasos y traqueidas (tr). E) *Test* de Kedde, análisis químico cualitativo. Fuente: Pérez-Alonso N *et al.* ⁽²⁰⁾

Luego se evaluó el efecto del tipo de sustrato en la supervivencia de las plantas propagadas *in vitro* en condiciones de aclimatación *ex vitro*. Las condiciones de cultivo garantizan una alta supervivencia de las plantas propagadas *in vitro*, entre un 80 % a un 90 %, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Es posible emplear todas las combinaciones valoradas en este trabajo, durante la fase de aclimatación *ex vitro*. Con estos resultados se confeccionó un protocolo de propagación *in vitro* para la especie en la figura 3.

Comparación de plantas de *S. rebaudiana* obtenidas por organogénesis y propagadas mediante corte de esquejes, empleando variables morfométricas y patrones de amplificación aleatoria de ácido desoxirribonucleico polimórfico

La altura (46,94 cm) y el número de hojas de las plantas (317,3) de *S. rebaudiana* propagadas *in vitro* fueron significativamente superiores a los determinados en las plantas propagadas por esquejes (33,68 cm y 259,9 respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre ambos para el número de tallos (5,30 y 4,54, respectivamente). Las plantas propagadas *in vitro* mantuvieron un crecimiento homogéneo y fueron morfológicamente similares a las plantas propagadas por esquejes.

El empleo del protocolo propuesto por Khayat y colaboradores no fue efectivo en *S. rebaudiana*.⁽²³⁾ Mientras que, si fue posible aislar ADN genómico de esta planta, empleando el protocolo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con

modificaciones.^(22,24) De los 6 cebadores empleados en las reacciones de amplificación, solo en 1 fue posible observar la presencia de bandas. En el patrón de amplificación RAPD obtenido utilizando el cebador R1: 5'-CGACCGCAGT-3', se produjeron 63 bandas totales para las 10 muestras analizadas. Estas se encontraron distribuidas en 12 líneas de bandas, de las cuales solo 2 fueron comunes para todas las muestras (monomórficas). La similitud y la distancia genética entre las muestras, se calculó utilizando el método UPGMA con el coeficiente de Dice. Los valores de similitud se encontraron entre 0,33 y 1,00.

Estrategias de propagación *in vitro* y mejora biotecnológica de plantas con actividades edulcorante de alta intensidad y antidiabética

Se realizó una revisión sistemática de la literatura para explorar el estado del conocimiento de 4 especies de plantas que combinan 2 propiedades, a) producen metabolitos secundarios que son edulcorantes de alta intensidad y b) poseen actividad antidiabética confirmada científicamente. Esto permitió elaborar un manuscrito donde se abordaron numerosos aspectos que podrían ser empleados para el diseño de nuevas investigaciones. En primer lugar, se resumieron los compuestos bioactivos de cada especie y las vías involucradas en su biosíntesis. Posteriormente, se describió la acción antidiabética y otros efectos medicinales de estas especies. Además, se analizaron los principales estudios de propagación *in vitro* y las estrategias biotecnológicas utilizadas hasta el momen-



Fig. 3. Protocolo de propagación *in vitro* de ápices de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de ápices cultivados *ex vitro*

to en estas especies. Finalmente, se discuten los enfoques biotecnológicos más prometedores y las perspectivas futuras para la explotación industrial de las 4 plantas medicinales descritas en este estudio.

DISCUSIÓN

A pesar de ser ampliamente conocida como una planta ornamental y medicinal, queda mucho por investigar sobre *D. purpurea* y otras especies del género *Digitalis*. En este trabajo se comprobó la eficiencia del sistema de selección empleando higromicina B y se introdujo, por vez primera en una especie de *Digitalis*, un gen que puede influir en la ruta de síntesis de los cardenólidos. Además, se brindaron herramientas para la estimación del número de copias de los transgenes empleando técnicas basadas en PCR alternativas a la hibridación de Southern, las cuales no habían sido aplicadas con anterioridad en este género.

La obtención de plantas transgénicas que producen cantidades superiores de cardenólidos abren la posibilidad de desarrollar un proceso alternativo económicamente viable, mediante el uso de la biotecnología y podría reducir los costos de producción de digoxina y otras drogas que incluyan cardenólidos. La optimización de las condiciones de cultivo para una óptima producción de cardenólidos y la combinación con otras estrategias biotecnológicas son algunos de los retos para estudios futuros.

El protocolo descrito en este trabajo puede ser aplicado exitosamente para la propagación masiva de *D. purpurea* evitando las variaciones del contenido de cardenólidos logrado en condiciones naturales.⁽²⁰⁾ Esta técnica podría ser una vía eficiente para la producción del material vegetal necesario con el objetivo de obtener cardenólidos a escala industrial. Además, este protocolo puede ser asociado a otras estrategias como el cultivo en sistemas de inmersión temporal para el escalado de la producción. Por otro lado, el protocolo de organogénesis presentado podría ser empleado en nuevos estudios de transformación genética e ingeniería metabólica, con el objetivo de potenciar el contenido de cardenólidos. El cultivo *in vitro* de esta especie gana importancia en países como Cuba, que tiene un sistema de salud gratuito y la digoxina debe ser importada de países como India y Turquía. La aplicación de las metodologías propuestas en este trabajo permitiría reducir las importaciones y potenciar la producción nacional de los medicamentos que emplean cardenólidos.

Para el desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* de *S. rebaudiana* se estudiaron diversos factores que pueden influir en la obtención de plantas. Primero se analizaron las condiciones de desinfección con hipoclorito de sodio. En la literatura científica, se ha descrito el uso de NaClO al 1 % como

agente de desinfección y diferentes tiempos de exposición en varios trabajos. Sin embargo, los resultados del presente trabajo son superiores (supervivencia: 90 %-96,67 % y desinfección: 74,07 %-79,31%). Lo cual implica que el proceso de desinfección propuesto es más ventajoso.

Estudios posteriores son necesarios para optimizar las condiciones de cultivo en busca de aumentar el coeficiente de multiplicación. Mas no se debe desestimar que la utilización de un medio de cultivo de multiplicación libre de reguladores de crecimiento puede llegar a representar una situación ventajosa. Pues, además de hacer más barato el proceso de propagación *in vitro*, permite obtener coeficientes de multiplicación relativamente cercanos a los alcanzados mediante la utilización de medios de cultivo con reguladores, pero sin el peligro de inducir deformaciones morfológicas, o incluso genéticas.

En *Stevia* se ha estudiado poco el efecto de un número máximo de subcultivos. Otros autores también han recomendado un número promedio de 5 subcultivos. La imposibilidad de mantener períodos de subcultivos superiores a 2 semanas y de prolongar el proceso de multiplicación por más de 5 subcultivos, podría estar relacionada con las condiciones de cultivo *in vitro*, la cantidad del medio de cultivo y el tipo de recipiente utilizado. Es probable que variando estas condiciones se puedan determinar los valores óptimos que permitan extender los períodos alcanzados.

Por otro lado, es una gran ventaja que la especie en cuestión cuente con tanta plasticidad de sustrato y mantenga, según los resultados alcanzados, altas tasas de supervivencia en medios tan diferentes. Esto permite transferir a las plantas hacia la fase de aclimatización exitosamente, con independencia del sustrato. Luego es posible utilizar el sustrato más económico, o de mayor disponibilidad, indistintamente sin afectar la productividad y de acuerdo con las condiciones del lugar donde se ejecute. Adicionalmente, se demostró la superioridad morfológica y la estabilidad genética de las plantas provenientes del cultivo *in vitro* frente a las reproducidas tradicionalmente mediante corte de esquejes.

De manera general el protocolo de propagación *in vitro* de *S. rebaudiana* propuesto en esta investigación es simple y de fácil implementación. Este permitiría mantener una línea de producción que posibilite la extracción de los metabolitos secundarios (esteviósidos y rebaudiósidos) de manera continua. De esa manera se podría disponer de grandes cantidades de ese edulcorante natural para ser comercializado entre la población, y dirigido más específicamente al tratamiento de los pacientes diabéticos y prediabéticos. Así como para ser utilizado en la industria nacional sustituyendo edulcorantes artificiales de obligada importación comercial.

Los edulcorantes naturales de alta intensidad derivados de plantas son una alternativa factible para reducir la ingesta de azúcar en todo el mundo sin renunciar al sabor azucarado. Los potentes compuestos de sabor dulce producidos por *S. rebaudiana*, *C. paliurus*, *G. glabra* y *S. grosvenorii* son sustitutos de sacarosa no calóricos, no cariogénicos y termoestables. Estas moléculas se obtienen comúnmente de raíces de regaliz, frutos de *Siraitia* y hojas de stevia o *C. paliurus*. Los extractos de estas secciones de plantas también son responsables de múltiples propiedades terapéuticas, incluida una marcada acción antihiper glucemiante. Además, la evidencia científica de este efecto antidiabético se ha confirmado en compuestos también responsables del sabor dulce, como los esteviósidos, la glicirricina y los mogrósidos. Por lo tanto, estas plantas son muy valiosas para la industria alimentaria y farmacéutica como nutracéuticos.

Sin embargo, la propagación de plantas a través de técnicas convencionales está limitada. Además, *S. grosvenorii* y *C. paliurus* son especies locales con severas restricciones para la multiplicación o clasificadas como plantas en peligro de extinción. Por lo tanto, las técnicas de cultivo *in vitro* se han desarrollado como una alternativa prometedora para reducir la sobreexplotación de las poblaciones naturales. Se han realizado varias investigaciones para la propagación masiva y la producción de metabolitos secundarios en estas 4 especies. La stevia y el regaliz se han estudiado más ampliamente que *C. paliurus* y *S. grosvenorii*. Además, el cultivo *in vitro* no solo es útil para la propagación de plantas; nuevas estrategias para la conservación de estas especies podrían lograrse sin limitaciones ambientales o estacionales. Asimismo, deben evaluarse los protocolos de regeneración de plantas para confirmar la estabilidad genética, las características fenotípicas y el perfil metabólico de los clones.

Los estudios de cultivo *in vitro* combinados con otros enfoques biotecnológicos, como la elicitación y la transformación genética, se han aplicado ampliamente en *S. rebaudiana*. Entre otros, esto ha dado lugar a nuevos conocimientos sobre la biosíntesis de esteviósidos y su regulación. Del mismo modo, pero en menor medida, informes sobre la aplicación de estas técnicas se han publicado para *G. glabra*. Por el contrario, queda mucho por investigar sobre la respuesta al estrés, la modificación genética y la producción de metabolitos secundarios de *C. paliurus* y *S. grosvenorii*. La combinación de estas y otras herramientas biotecnológicas permitiría desarrollar estrategias comerciales para la obtención de edulcorantes homogéneos y de alto rendimiento a partir de estas especies de manera sustentable. Estos compuestos de sabor dulce se utilizarán para tratar la *Diabetes mellitus* y revertir las complicaciones asociadas a esta enfermedad.

En resumen, en esta investigación se abordó la importancia del cultivo *in vitro* para obtener plantas medicinales de forma estable y con una productividad uniforme de metabolitos secundarios. Además, se demostró la efectividad del empleo de estrategias biotecnológicas, particularmente la ingeniería genética, para potenciar la biosíntesis de metabolitos secundarios de interés farmacológico. Para ello, se realizaron estudios en 2 especies de plantas ampliamente conocidas en la literatura científica. Además, se sentaron las bases para investigaciones posteriores en otras 3 especies de plantas medicinales promisorias que aún no se han estudiado en Cuba.

Conclusiones

El sistema de selección *hpt*/higromicina B permitió realizar la selección positiva de eventos transgénicos durante la formación y proliferación de callos con una alta eficiencia. Se potenció la producción de cardenólidos en plantas transgénicas mediante la expresión de la progesterona-5 β -reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Se desarrolló un protocolo rápido y eficiente para la propagación *in vitro* de plantas de *D. purpurea* vía organogénesis directa. Este protocolo podría ser aplicado para propagar líneas élites sin afectar su estabilidad genética y la acumulación de cardenólidos. Se propagaron *in vitro* plantas de *S. rebaudiana* a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro* en corto tiempo. Las plantas propagadas *in vitro* mostraron mayor número de hojas y altura, que las propagadas convencionalmente. No se detectaron variaciones somaclonales entre ambos grupos de plantas. Se recomienda el estudio de otras especies medicinales como *C. paliurus* y *S. grosvenorii*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guo L, Yao H, Chen W, Wang X, Ye P, Xu Z, *et al.* Natural products of medicinal plants: biosynthesis and bioengineering in post-genomic era. *Hortic Res* [Internet] 2022. Disponible en: <https://academic.oup.com/hr/article/doi/10.1093/hr/uhac223/6726628>
2. Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* [Internet] 2018;248(1):1-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
3. Kairuz E, Rivero-Aragón A, Angenon G. *In Vitro* Propagation and Biotechnological Improvement Strategies of Plants with High-Intensity Sweetener and Anti-Diabetic Activities [Internet]. In: Gantait, S., Verma, S.K., Sharangi AB, editor. *Biotechnology of Anti-diabetic Medicinal Plants*. Singapore: Springer Singapore; 2021:153-210. Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-3529-8_7
4. Rieck C, Geiger D, Munkert J, Messerschmidt K, Petersen J, Strasser J, *et al.* Biosynthetic approach to combine the first steps of cardenolide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiologyopen* [Internet] 2019;8(12):e925. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mbo3.925>

5. El-Seedi HR, Khalifa SAM, Taher EA, Farag MA, Saeed A, Gamal M, *et al.* Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility. *Pharmacol Res* [Internet] 2019;141:123-75. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104366181831185X>
6. Kairuz E, Pérez-Alonso N, Angenon G, Jiménez E, Chong-Pérez B. Shoot Organogenesis, Genetic Stability, and Secondary Metabolite Production of Micropropagated *Digitalis purpurea* [Internet]. In: Ramawat K, Ekiert H, Goyal S, editors. *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites*. Springer, Cham; 2020. 1-18. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-11253-0_16-1
7. Kreis W. The Foxgloves (*Digitalis*) Revisited. *Planta Med* 2017;83(12):962-76.
8. WHO. World Health Statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: 2018.
9. Heron M, Anderson R. Changes in the leading cause of death: Recent patterns in heart disease and cancer mortality. *NCHS data brief, no 254 Hyattsville, MD Natl Cent Heal Stat* 2016;(254):1-8.
10. Pérez-Alonso N, Chong-Pérez B, Capote A, Pérez A, Gerth A, Angenon G, *et al.* Biotechnological Approaches for Biomass and Cardenolide Production in *Digitalis purpurea* L. [Internet]. In: Jain SM, editor. *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*. New York, NY: Springer New York; 2016. 81-102. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3332-7>
11. Rady MR. *Plant Biotechnology and Foxglove* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-22929-0>
12. Sales E, Müller-Urri F, Nebauer SG, Segura J, Kreis W, Arrillaga I. *Digitalis* [Internet]. In: Kole C, editor. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. 73-112. Disponible en: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-21201-7>
13. Verma SK, Das AK, Cingoz GS, Gurel E. In vitro culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: An up-to-date review. *Ind Crops Prod* [Internet] 2016;94:20-51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.031>
14. Izquierdo Y, Pérez-Alonso N, Jiménez E. Metabolismo de cardenólidos y transformación genética de *Digitalis*. Potencialidades y retos. *Biotechnol Veg* [Internet] 2010;10(3):131-41. Disponible en: <http://biblat.unam.mx/es/revista/biotechnologia-vegetal/articulo/metabolismo-de-cardenolidos-y-transformacion-genetica-de-digitalis-potencialidades-y-retos>
15. González C, Tapia M, Pérez E, Pallet D, Dornier M. Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review. *Fruits* [Internet] 2014;69(2):127-41. Disponible en: <https://www.pubhort.org/fruits/2014/02/fruits140003.htm>
16. Gantait S, Das A, Mandal N. Stevia: A Comprehensive Review on Ethnopharmacological Properties and *In Vitro* Regeneration. *Sugar Tech* [Internet] 2015; 17(2):95–106. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12355-014-0316-3>
17. Khan SA, Verma P, Ur Rahman L, Parasharami VA. Exploration of biotechnological studies in low- calorie sweetener *Stevia rebaudiana*: present and future prospects [Internet]. In: *Medicinal and Aromatic Plants*. Elsevier; 2021. 289-324. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-819590-1/00013-6>
18. Kairuz E, Pérez-Alonso N, Capote-Pérez A, Pérez-Pérez A, Espinosa-Antón AA, Angenon G, *et al.* Enhancement of cardenolide production in transgenic *Digitalis purpurea* L. by expressing a progesterone-5 β -reductase from *Arabidopsis thaliana* L. *Ind Crops Prod* [Internet] 2020; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112166>
19. Kairuz E, Pérez-Alonso N, Capote-Pérez A, Pérez-Pérez A, Jiménez E, Chong-Pérez B. Concentración mínima letal de higromicina B en la formación de callos y multiplicación de brotes de *Digitalis purpurea* L. Minimal lethal concentration of hygromycin B in calli induction and shoot multiplication process of *Digitalis purpurea* L. *Biotechnol Veg* [Internet] 2013; 13(1):23-31. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/90/457>
20. Pérez-Alonso N, Martín R, Capote A, Pérez A, Kairuz Hernández-Díaz E, Rojas L, *et al.* Efficient direct shoot organogenesis, genetic stability and secondary metabolite production of micropropagated *Digitalis purpurea* L. *Ind Crops Prod* [Internet] 2018;116:259-66. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018301808>
21. González-Hernández D, Kairuz E, Capote A, Pérez A, Rivero L, Chong-Pérez B, *et al.* Micropropagación de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de explantes *ex vitro*. *Biotechnol Veg* 2019;19(1):53-63.
22. González-Hernández D, Kairuz E, Capote-Pérez A, Pérez-Pérez A, Rivero L, Chong-Pérez B, *et al.* Obtención de perfiles genéticos de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni propagadas mediante cultivo *in vitro* y corte de esquejes. *Biotechnol Veg* 2019;19(4):249-57.
23. Khayat E, Duvdevani A, Lahav E, Ballesteros BA. Somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). Genetic mechanism, frequency, and application as a tool for clonal selection. In: Jain SM, Swennen R, editors. *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations*. New Hampshire: Science Publishers; 2004. 97-104. Disponible en: [https://www.semanticscholar.org/paper/Somaclonal-variation-in-banana-\(Musa-acuminata-cv.-Khayat-Duvdevani/516248c6894e6b0b5e0ace3d2cd8e9b2e387101](https://www.semanticscholar.org/paper/Somaclonal-variation-in-banana-(Musa-acuminata-cv.-Khayat-Duvdevani/516248c6894e6b0b5e0ace3d2cd8e9b2e387101)
24. Doyle J. *DNA Protocols for Plants* [Internet]. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW, editors. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1991. 283-93. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
25. Kairuz E, Pérez-Alonso N, Capote-Pérez A, Pérez-Pérez A, Espinosa-Antón AA, Angenon G, *et al.* Enhancement of cardenolide production in transgenic *Digitalis purpurea* L. by expressing a progesterone-5 β -reductase from *Arabidopsis thaliana* L. *Ind Crops Prod* <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669020300820>

 Recibido: 6/10/2024

 Aprobado: 6/11/2024

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en relación con la investigación presentada.

Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Borys Chong Pérez, Geert Angenon, Naivy L. Pérez Alonso

- Curación de datos: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Borys Chong Pérez, Geert Angenon, Naivy L. Pérez Alonso, Alán Rivero Aragón
- Análisis formal: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Borys Chong Pérez, Geert Angenon, Naivy L. Pérez Alonso, Alán Rivero Aragón
- Adquisición de fondos: Borys Chong Pérez, Geert Angenon, Naivy L. Pérez Alonso
- Investigación: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Alina Capote Pérez, Anabel Pérez Pérez, Borys Chong Pérez, Naivy L. Pérez Alonso, Dionys González Hernández
- Metodología: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Borys Chong Pérez, Geert Angenon, Naivy L. Pérez Alonso
- Administración del proyecto: Geert Angenon, Naivy L. Pérez Alonso
- Supervisión: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Alina Capote Pérez, Borys Chong Pérez, Geert Angenon, Naivy L. Pérez Alonso
- Validación: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Alina Capote Pérez, Borys Chong Pérez, Geert Angenon, Naivy L. Pérez Alonso, Alán Rivero Aragón
- Visualización: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Borys Chong Pérez, Naivy L. Pérez Alonso, Alán Rivero Aragón, Dionys González Hernández
- Redacción-borrador original: Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz

- Redacción-revisión y edición: Borys Chong Pérez, Naivy L. Pérez Alonso, Dionys González Hernández, Alán Rivero Aragón

Financiamientos

Esta investigación fue financiada por el Programa Nacional de Ciencia Básica del Ministerio de Educación Superior (Proyecto P223LH001-037), la beca de Doctorado CoTutelar entre VUB y UCLV (2015), y la beca de Doctorado CoTutelar otorgada por VUB Global Minds, VLIR (2019).

Cómo citar este artículo

Kairuz Hernández-Díaz E, Capote Pérez A, Pérez Pérez A, Pérez Alonso NL, Chong Pérez B, González Hernández D et al. Estrategias biotecnológicas para la producción de plantas medicinales de interés farmacológico. An Acad Cienc Cuba [internet] 2024 [citado en día, mes y año];14(4):e1699. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1699>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).[©] Los autores, 2024.

