

Capítulo 8

Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones

L. Szabados*

L. A. Mroginski**

W. M. Roca***

-
- * Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, Szeged, Hungría.
 - ** Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.
 - *** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Introducción

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes sistemas para los cultivos de protoplastos, células, tejidos y órganos vegetales; uno de ellos es el cultivo en suspensión (suspensiones celulares), el cual constituye una forma para mantener y propagar células vegetales.

Descripción y Manipulación de las Suspensiones Celulares

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento. Estas suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrimentos.

Medios de cultivo

Para el cultivo de suspensiones celulares de una gran variedad de plantas se ha utilizado el medio MS desarrollado por Murashige y Skoog (1962) para el cultivo de tejidos de tabaco, como también el medio B-5 de Gamborg et al. (1968). También se han utilizado otros medios, pero su composición no difiere mucho de los citados.

A menudo, los medios óptimos para la inducción y crecimiento de callos a partir de explantes primarios no son los mismos que para el establecimiento de suspensiones celulares; el nivel óptimo de auxinas y citocininas, p.ej., puede ser diferente (Torrey et al., 1961). En ocasiones las células en suspensión necesitan de suplementos orgánicos, aminoácidos, CH, extracto de levadura, y AC; la auxina más utilizada es 2,4-D. Mayor información sobre los medios de cultivos se consulta en el Capítulo 3 de esta publicación.

Iniciación de las suspensiones

Las suspensiones celulares se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en medios líquidos que están en movimiento continuo.

Comúnmente se emplean frascos Erlenmeyer, en los cuales se deposita el medio líquido con los trozos de callo dispersos en él, hasta llenar aproximadamente 1/5 de la capacidad de los frascos; éstos se ponen luego a

incubar en un agitador giratorio (ver Capítulo 1) a 80-150 rpm, bajo luz continua y a 25 °C de temperatura. Mediante subcultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varios días.

Durante los primeros subcultivos es recomendable usar una tasa de dilución baja (por ej., 1:1 a 1:4) utilizando cuatro partes de medio fresco por cada parte de suspensión celular. Posteriormente se puede utilizar una tasa de dilución más alta, según el objetivo para el cual se haya establecido la suspensión.

El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es sin duda un callo friable, con un alto ritmo de división celular. Sin embargo, a veces es necesario utilizar otros tipos de callos, y en esos casos hay que realizar frecuentemente operaciones para romper los agregados grandes. Se puede apelar a medios mecánicos, como el uso de frascos con deflectores o el filtrado (King, 1984); la adición de pectinasas y celulasas al medio de cultivo también puede reducir el tamaño de los agregados celulares (King et al., 1973).

La selección de células aptas para crecer en suspensiones celulares se puede efectuar, en un medio sólido, mediante el plaqueo de una suspensión recién comenzada, para continuar únicamente con la suspensión de colonias celulares friables y de rápido crecimiento (Wilson et al., 1975).

En su iniciación, las suspensiones celulares constan de grandes agregados y de células libres, alargadas y enormes, que no se dividen; pero después de repetir los subcultivos es factible obtener una suspensión celular finamente dispersa con alto ritmo de crecimiento. Estas suspensiones poseen pequeños agregados de células pequeñas, isodiamétricas, con paredes finas y citoplasma denso.

Sistemas de cultivo

Para mantener las suspensiones celulares se pueden usar diferentes sistemas de cultivo, los cuales se pueden clasificar básicamente en tres tipos: cerrados, continuos cerrados, y continuos abiertos (Figura 8.1).

Cultivos cerrados. En este sistema, las células producidas se quedan en el medio, y de esta manera se produce un aumento en la densidad celular (Figura 8.1, A); al alcanzar la suspensión la denominada fase estacionaria, se toman fracciones de ella para subcultivarlas en un medio fresco y reiniciar de esta manera el ciclo de crecimiento. Este es el sistema más empleado en los laboratorios de investigaciones de tipo agrícola que utilizan técnicas de cultivo de células.

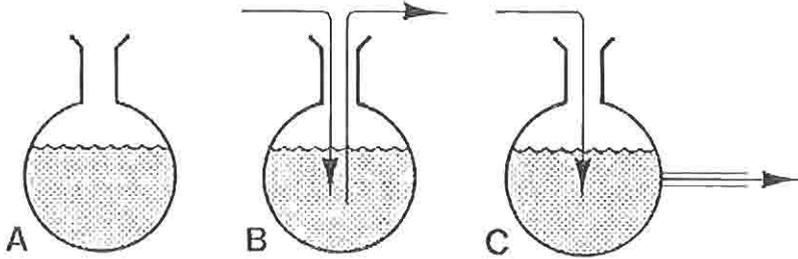


Figura 8.1 Representación esquemática de los sistemas de cultivo de suspensiones celulares vegetales. A = cultivo cerrado (no entra ni sale medio nuevo); B = continuo cerrado (entra medio nuevo y sale medio gastado pero sin células); C = continuo abierto (entra medio nuevo y sale medio gastado con algunas células).

Cultivos continuos cerrados. En este sistema se suministra a la solución medio fresco en forma continua, y simultáneamente se retira sólo el medio 'usado'; las células, separadas mecánicamente, se acumulan en el sistema (Figura 8.1, B).

Cultivos continuos abiertos. Al igual que en el sistema anterior, hay un suministro de medio fresco, pero el medio 'usado' sale junto con las células (Figura 8.1, C).

En este capítulo se tratará sólo el primer sistema. Para la manipulación de los dos últimos, como también para obtener detalles de los aparatos que se utilizan en ellos, consultar a Street (1977), Kurz (1982), Drew (1980), y Wilson et al., (1971), entre otros.

Métodos para medir el crecimiento

Hay numerosos métodos para determinar el crecimiento de las suspensiones celulares (Street, 1977). Los más utilizados son:

Número de células. Este es un parámetro de crecimiento de mucha utilidad, y para usarlo como método de medición es necesario disgregar los grupos celulares en células individuales o en agregados de no más de 10 células.

La separación de los agregados se puede hacer mediante el tratamiento con soluciones acuosas de CrO_3 al 8-12%, a 70 °C durante 2-15 min según el material vegetal; se usan cuatro volúmenes de la solución previamente

filtrada por cada volumen de cultivo (King, 1984). Para realizar el conteo de las células conviene hacerlo en un microscopio de uso rutinario, ya que el CrO_3 es corrosivo.

Los agregados celulares también se separan mediante un tratamiento con pectinasa (0.1%, durante 16 h a 25 °C).

Volumen celular. Para aplicar este método se toma un volumen conocido de la suspensión y se centrifuga durante 3 min a 200g para provocar la sedimentación de las células; luego se determina el volumen de éstas y se expresa en ml de células por ml de cultivo.

Peso fresco. Sobre un papel filtro previamente pesado se colocan las células lavadas con agua destilada y se pesan. Este método no es recomendable para cantidades pequeñas de células.

Peso seco. Se determina de manera similar a como se determina el peso fresco, pero antes de pesar las células se secan a 60 °C, durante 12 h como mínimo (preferiblemente al vacío).

Turbidez. Este método (Sung et al., 1976b) se puede aplicar a suspensiones que crecen en frascos provistos de brazo lateral; la turbidez se puede medir con un fotocolorímetro (con filtro azul, a 400-465 nm).

Índice mitótico (IM). Se recolectan las células y se fijan con una solución 1:3 de ácido acético glacial y etanol absoluto, usando 2 ml del fijador por cada 5 ml de suspensión; después de un período de 30 min a 3 horas de fijación se depositan las células sobre un portaobjetos y se colorean con carbofucsina; después de colocar y presionar el cubreobjetos, se observa en un microscopio para determinar y registrar el número de núcleos que haya en mitosis.

Se deben analizar por lo menos 1000 células, para aplicar la siguiente ecuación:

$$\text{IM} = \frac{\text{células en mitosis}}{\text{total de células}} \times 100 \quad (1)$$

Desarrollo de las Suspensiones Celulares

En los cultivos cerrados, el 'crecimiento' de las suspensiones celulares comprende varias fases representadas en la Figura 8.2.

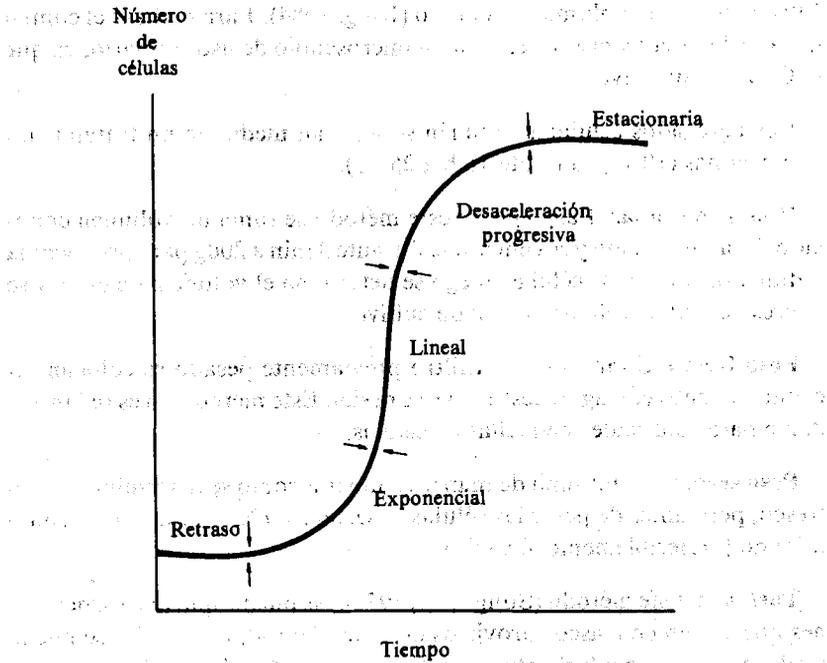


Figura 8.2. Curva de crecimiento típica, en la cual se relaciona el número de células en las diferentes fases (de retraso, exponencial, lineal, de desaceleración y estacionaria) con el tiempo de incubación, en un cultivo cerrado.

La fase de retraso se observa cuando en un medio fresco se subcultivan suspensiones celulares que están en la fase estacionaria; los cultivos crecen lentamente durante 1 a 3 días. La fase de retraso no se presenta, o es muy corta, si se subcultivan suspensiones que están en el período de crecimiento (Street, 1977; Nover et al., 1982; Meadows, 1982-1983; Gould et al., 1975); también se acorta con la adición al medio de cultivo de ciertos extractos orgánicos como la CH (Larkin, 1982).

En la fase exponencial (o fase logarítmica), la tasa específica de crecimiento (μ), o sea, el aumento de la biomasa por unidad de concentración de la misma, es constante y medible. Matemáticamente (Street, 1977) se expresaría mediante la ecuación:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{d(\log_e X)}{dt} = \frac{\log_e 2}{t_d} \quad (2)$$

en donde:

μ = tasa específica de crecimiento de la suspensión;

X = número de células por unidad de volumen, en el tiempo t ;

t_d = tiempo de duplicación de la densidad celular.

Cuando la tasa de crecimiento es igual a 1, el t_d es igual (King, 1980) al promedio del tiempo del ciclo celular (TCC). Sin embargo, la gran variación en el tiempo de los ciclos celulares y la presencia de células que no se dividen (células Q), causan diferencias de diversa magnitud entre t_d y TCC. Las células Q se han observado en numerosas suspensiones celulares (Chu et al., 1976; Vasil et al., 1982; Rembur, 1973).

Cuando la cantidad de células Q es pequeña y $t_d > TCC$, la población celular crece realmente en forma exponencial. En estos cultivos la fase exponencial de crecimiento dura de 2 a 4 veces el tiempo de la generación celular. Cuando la fracción de células Q es alta y $TCC > t_d$, la fase exponencial es más larga y el modelo de crecimiento tiende a ser lineal.

El uso de bajas densidades celulares en la iniciación del cultivo, o el empleo de elevadas concentraciones de nutrimentos en el medio, pueden prolongar la fase exponencial.

En la fase lineal, la tasa específica de crecimiento declina uniformemente con el tiempo. Esta declinación aumenta en la fase de desaceleración progresiva, para alcanzar finalmente la fase estacionaria, en la cual no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células.

Características generales de las células en suspensión

Para caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares, pueden ser útiles los siguientes parámetros: número de células, actividad mitótica, peso (fresco y seco), turbidez, y volumen.

El número de células comienza a aumentar al final de la fase de retraso, mientras que la frecuencia de la división celular, expresada por el índice mitótico (IM), es baja durante esta fase. Aunque la fase de retraso puede no existir cuando se subcultivan células en crecimiento activo, el IM decae durante varias horas, para luego aumentar rápidamente; la actividad mitótica alcanza su máximo nivel pasados de 1 a 3 días de subcultivo.

Al final de la fase lineal, el IM comienza a declinar hasta ser prácticamente nulo en la fase estacionaria (Eriksson, 1966; Evans et al., 1982; Gould et al., 1974; King, 1980; Meadows, 1982-1983; Nover et al., 1982).

La suspensión celular de remolacha azucarera (Figura 8.3) cultivada apropiadamente tiene una fase de retraso corta (Figura 8.4); la máxima actividad mitótica ($IM \approx 8\%$) se presentó al tercer día de cultivo y fue igual a cero al cabo de 9 a 10 días (Szabados et al., 1985). Gould et al. (1975) encontraron altos niveles de división celular sincronizada en la fase exponencial de suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus*, cuando el inóculo provenía de la fase estacionaria; esta sincronización fue persistente en términos de replicación de ADN y de división celular.

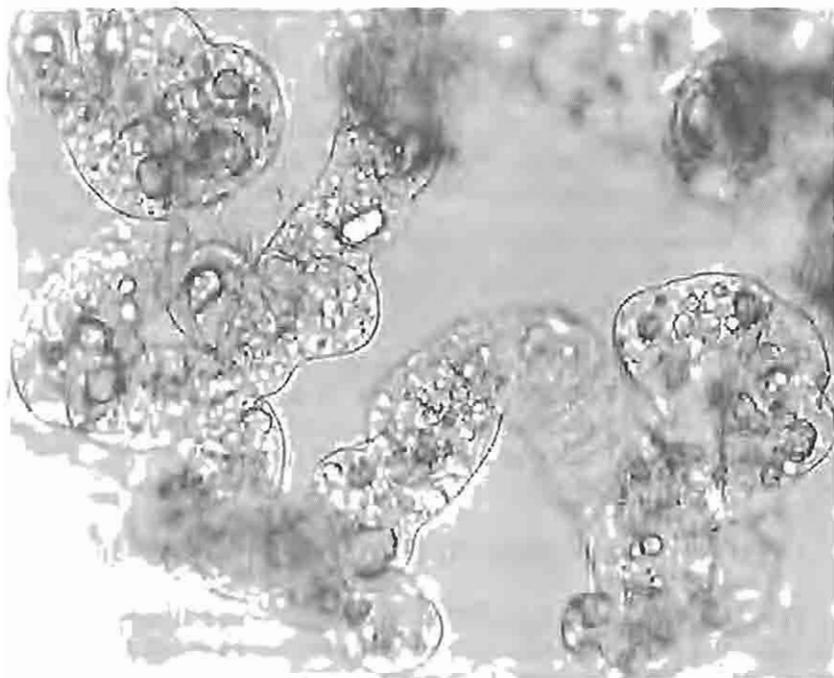


Figura 8.3 Suspensión celular de remolacha azucarera.

El crecimiento, en términos de peso fresco y seco y de volumen celular, es similar al crecimiento medido con el número de células pero no completamente paralelo a éste, ya que el incremento de los dos primeros parámetros tiende a retrasarse con respecto al número de células. En la primera parte de la fase exponencial de los cultivos, tales parámetros muestran un

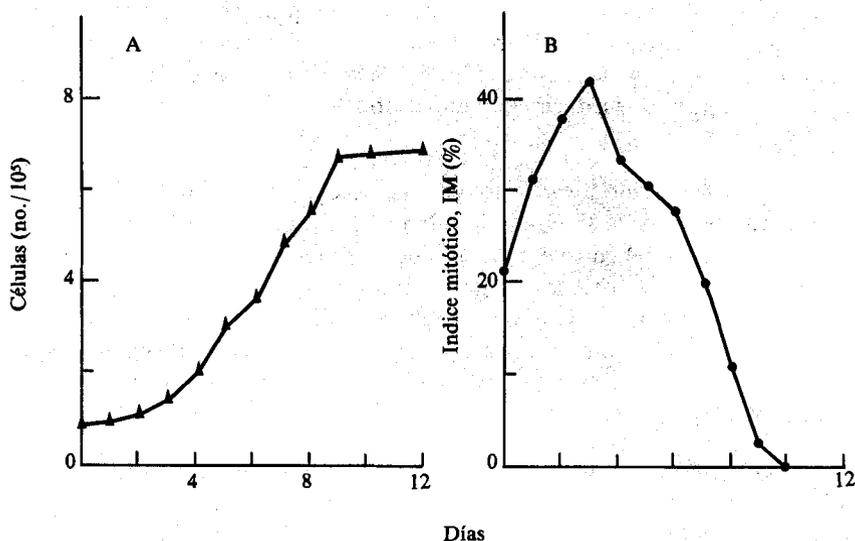


Figura 8.4. Crecimiento de suspensiones celulares de remolacha azucarera, en términos de número de células (A) e índice mitótico, IM (B).

incremento menor que el del número de células, pero en períodos posteriores ellos se pueden incrementar, incluso en la fase estacionaria, en la cual el número de células no cambia (Nover et al., 1982; Owens et al., 1979).

Esa diferencia se debe a los cambios en el tamaño de las células. El peso y el volumen de las células individuales decrece en la primera fase de los cultivos pero aumenta cuando las células están en una fase de poca actividad mitótica o estacionaria, debido a la vacuolización y a la síntesis de sustancias. En la fase estacionaria hay células pequeñas y grandes; el tamaño y la morfología de estas células se puede uniformar acortando el ciclo de cultivo.

Se ha encontrado que el volumen ocupado por el citoplasma en la célula está correlacionado con la cantidad de proteínas, pero no hay correlación exacta con el tamaño de la célula. En suspensiones celulares de frijol, el citoplasma varía desde el 25% al momento de la transferencia hasta el 45% cuando comienza la fase de división celular rápida, para luego caer al 10% en la fase estacionaria. El crecimiento del volumen citoplasmático como un todo parece ser constante durante el ciclo de cultivo, a pesar de los cambios en la división celular, en el tamaño de las células, en su vacuolización, y en los aumentos en el peso fresco y seco (Owens et al., 1979).

Durante el cultivo ocurren ciertos cambios bioquímicos en las células. El subcultivo causa cambios complejos en los modelos de actividad génica, y estimula la síntesis de proteínas y de ARN; la formación de polisomas aumenta la traducción de un pequeño grupo de mRNA (Bevan et al., 1981; Verma et al., 1974).

Una de las características de los cultivos, luego del subcultivo, es su alta actividad metabólica. El contenido de proteínas de las células decrece en las últimas fases del cultivo, y la viabilidad de las células también declina durante fases estacionarias largas, aunque hay suspensiones celulares capaces de mantenerse vivas sin grandes cambios en su viabilidad (Reider et al., 1982). Los cambios en el peso seco, en la acumulación de proteínas, y en la viabilidad dependen de las condiciones que limitan el crecimiento (Stafford et al., 1983).

La acumulación de metabolitos secundarios es un hecho muy frecuente, especialmente cuando los cultivos se hallan en la fase estacionaria y cuando muestran cierta diferenciación estructural (Lindsey et al., 1983a).

El contenido de ADN celular muestra cambios característicos durante el ciclo de cultivo. Las células en la fase estacionaria tienen generalmente núcleos en G_1 ; al subcultivarlos comienza la replicación del ADN (al final de la fase de retraso) y el contenido de éste aumenta. Durante el período de crecimiento, el contenido de ADN es el promedio del de las células en G_1 , S, G_2 y M. Al entrar en la fase estacionaria, el contenido de ADN declina hasta alcanzar los valores de las células G_1 (Bayliss et al., 1974).

Inestabilidad cromosómica

Varios trabajos indican que las suspensiones celulares pueden contener células con considerables anomalías cromosómicas (Bayliss, 1980); las principales son la poliploidía y la aneuploidía. Bayliss et al. (1974) encontraron que los cambios estructurales y la pérdida de cromosomas ocurren al azar. Un extenso análisis del cariotipo de las células de apio cultivadas en suspensión reveló diferentes alteraciones estructurales en los cromosomas; se observó una alta tasa de aneuploidía, además de traslocaciones y desapariciones ('deletions') en los cromosomas (Murata et al., 1983).

Por el contrario, Evans et al. (1982) establecieron suspensiones celulares con números cromosómicos estables a partir de cuatro genotipos de *Nicotiana*. Para ello emplearon hojas o vástagos jóvenes como explantes, 2,4-D como auxina, e intervalos de cultivo cortos. En el Capítulo 5 se puede encontrar más información respecto a este tema.

Plaqueo de suspensiones celulares en medios semisólidos

En muchas ocasiones —por ejemplo, para obtener plantas— es necesario plaquear las suspensiones en medios que contengan agar. Lo mismo sucede cuando se desea obtener clones de una célula única; para este caso hay que asegurar, en primer lugar, la presencia de células aisladas, libres de agregados celulares.

La digestión enzimática con pectinasas o macerozimas (p. ej., 4% de macerozima a 30 °C durante 5 a 7 h) provoca la liberación de células a partir de los agregados (Gresshoff, 1980). La separación también se puede conseguir mediante la filtración a través de tamices de nylon de aberturas entre 26 y 270 µm, según el propósito (Fujimura et al., 1984). También hay indicios de que es posible incrementar la eficiencia del plaqueo de las suspensiones celulares mediante la irradiación con rayos X (Werry et al., 1981).

Morris et al. (1981) describieron un método simple para producir suspensiones celulares compuestas casi exclusivamente de células aisladas; el método consiste en aplicar alginato de calcio para inmovilizar trozos de callos (de 4 a 5 mm de diámetro); las células inmovilizadas continúan dividiéndose, y forman una suspensión celular fina que se puede filtrar y cultivar subsiguientemente en un medio fresco, o usarse para el 'plaqueo'.

Para el plaqueo, las suspensiones celulares se mezclan con un medio de cultivo que contenga 0.6% de agar a 35 °C, e inmediatamente se distribuyen en cajas Petri estériles; las células y agregados (unidades plaqueadas) se pueden contar con la ayuda de un microscopio invertido (con un aumento de 40). Las placas se incuban en la oscuridad, a 25 °C durante 20 a 30 días; después de este período se determina el número de colonias por caja y se compara con el número de unidades plaqueadas. La eficiencia del plaqueo (EP) se determina con la siguiente fórmula:

$$EP = \frac{\text{número de colonias/placa}}{\text{número de unidades plaqueadas}} \times 100 \quad (3)$$

Para obtener una alta eficiencia en el plaqueo son importantes las siguientes precauciones:

- Usar medios acondicionados o sintéticos que sean adecuados para el crecimiento de las células cultivadas a bajas densidades.
- Utilizar células en una fase de división activa (fase exponencial).

- No exponer las células que se plaquean a temperaturas superiores a 35 °C.
- Incubar las placas en condiciones de oscuridad o con muy baja intensidad lumínica (Street, 1977).

Crioconservación de suspensiones celulares

Mantener las suspensiones celulares es una tarea tediosa y que consume tiempo; además, siempre existe el peligro de que se contaminen con microorganismos y que las células sufran cambios genéticos con los prolongados subcultivos. Una posibilidad interesante para obviar estos inconvenientes es la crioconservación de las suspensiones celulares a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C). Existen numerosos trabajos de crioconservación que incluyen el tema de las suspensiones celulares (Kartha, 1982; Kartha et al., 1982; Withers, 1980); también se encuentra información sobre el tema en el Capítulo 32 de esta obra.

Probablemente, el método más apropiado para la crioconservación es el del congelamiento lento; se procede así:

- 1) Concentrar la suspensión celular de 4 a 5 veces y dejarla en hielo durante 3 minutos.
- 2) Agregar gradualmente a la suspensión celular un volumen igual de una solución crioprotectora. Los crioprotectores pueden contener una o varias sustancias. Productos como el dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 5% a 10%, glicerol, prolina o glucosa (1 a 2 M), sacarosa y manitol, se han utilizado individualmente o en combinación para la crioconservación de suspensiones celulares (Kartha et al., 1982; Hauptmann et al., 1982; Kartha, 1982; Withers, 1980; Maddox et al., 1982-1983; Withers et al., 1979).
- 3) Repartir la suspensión celular con el crioprotector en ampollas de polietileno de 2 ml y congelar en una unidad apropiada. La velocidad de congelamiento generalmente es de 1-2 °C/min hasta -40 ó -70 °C.
- 4) Trasferir las suspensiones a nitrógeno líquido (-196 °C) para almacenarlas.

Antes de usar la suspensión celular, se debe descongelar agitando la ampolla en agua a 37 °C. Las células se lavan varias veces con centrifugación. Finalmente, la suspensión celular se somete a las pruebas de viabilidad y se subcultiva. La viabilidad se puede estimar mediante la coloración con diacetato de fluoresceína o por plaqueo en medios semisólidos (ver Capítulo 32).

La tasa de sobrevivencia es variable, y los factores más importantes que se deben optimizar son:

- a) el tipo de las células y su estado fisiológico antes del congelamiento; generalmente las células en la fase de retraso o en la fase exponencial brindan los mejores resultados;
- b) el tipo de crioprotector;
- c) la velocidad de congelamiento;
- d) la temperatura final de congelamiento;
- e) la temperatura de almacenamiento; generalmente se prefiere la del nitrógeno líquido;
- f) el proceso de descongelamiento.

Los resultados exitosos en la crioconservación de diferentes suspensiones celulares (Hauptmann et al., 1980; Kartha et al., 1982; Maddox et al., 1982-1983; Withers, 1980; Withers et al., 1975) sugieren que este método podría ser aplicado en forma más general.

Sincronización de las suspensiones celulares

La sincronización de los sistemas de suspensiones celulares es necesaria para adquirir mejores conocimientos acerca de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de las células, como también para regular su ciclo externo.

En los sistemas asincrónicos, las mediciones de los distintos parámetros de la actividad metabólica darán únicamente valores promedio, ya que tales parámetros serán diferentes en todas las células según el momento del ciclo en que se encuentren. En el sistema ideal de cultivo sincronizado, en cambio, la mayoría de las células se encuentran en la misma fase del ciclo celular, y en consecuencia, el comportamiento de cualquier célula individual reflejará el comportamiento de la totalidad de la población.

En las suspensiones celulares vegetales, es posible obtener únicamente una sincronización parcial mediante diversos procedimientos que primero detienen el ciclo celular en un punto específico y luego permiten su continuación. La detención del ciclo celular se puede lograr por medio de una variedad de compuestos químicos o por la privación de algún elemento o compuesto esencial.

Uso de productos químicos. Los inhibidores que frecuentemente se usan para detener el ciclo celular son drogas específicas que bloquean la síntesis del ADN y detienen dicho ciclo en el límite entre las fases G₁ y S, o en la fase S.

Eriksson (1966), trabajando con células de *Haplopappus*, utilizó 5AU (5-aminouracil), FUDR (fluorodesoxiuridina) y HU (hidroxiurea); después de 12 a 16 h de tratamiento con las drogas, encontró picos de mitosis dos a cuatro veces mayores que en el testigo. Los mejores resultados se obtuvieron cuando las células se trataron con HU (3 mM) durante 12 a 24 h. A las 12 horas del tratamiento las suspensiones celulares tenían un IM (índice mitótico) de 35%.

Los compuestos 5AU y FUDR inhiben la síntesis de ADN (Cheon et al., 1960; Grobner et al., 1982; Prensky et al., 1965; Scheuermann et al., 1973) y aunque hay diferencias entre sus efectos, ambas sustancias se pueden utilizar exitosamente en la sincronización de suspensiones celulares (Chu et al., 1976; Eriksson, 1966; Malberg et al., 1980; Scheuermann et al., 1973).

En el caso de la HU, la inhibición de la síntesis del ADN se relaciona con el bloqueo de la conversión de ribonucleótidos a desoxiribonucleótidos, mediante la inhibición de la enzima ribonucleótido-reductasa (Timson, 1975).

La colchicina se reconoce como una sustancia que inhibe la formación de microtúbulos, y frecuentemente se usa para la acumulación de células en metafase (Evans et al., 1957).

La colchicina se ha usado con la HU en la sincronización de suspensiones celulares de trigo, perejil y amapola (Hadlaczy et al., 1983; Szabados et al., 1981). En los tratamientos con HU, los picos mitóticos en suspensiones de trigo y perejil aparecen a las 12 ó 13 h después de la remoción de la droga, con índices mitóticos entre 15 y 20%. La adición de colchicina después del tratamiento con HU permite obtener índices mitóticos del orden del 25% en trigo (Figuras 8.5 y 8.6) y de 50-80% en perejil (Szabados et al., 1981). En las células de amapola, el tratamiento con HU y colchicina no provocó un aumento significativo en el índice mitótico, pero la colchicina sola produjo altos valores de IM (Hadlaczy et al., 1983).

Utilizando un tratamiento combinado con FUDR y colchicina, Malmber et al. (1980) obtuvieron índices mitóticos de 15% en suspensiones celulares de tabaco, y de 25% en tomate.

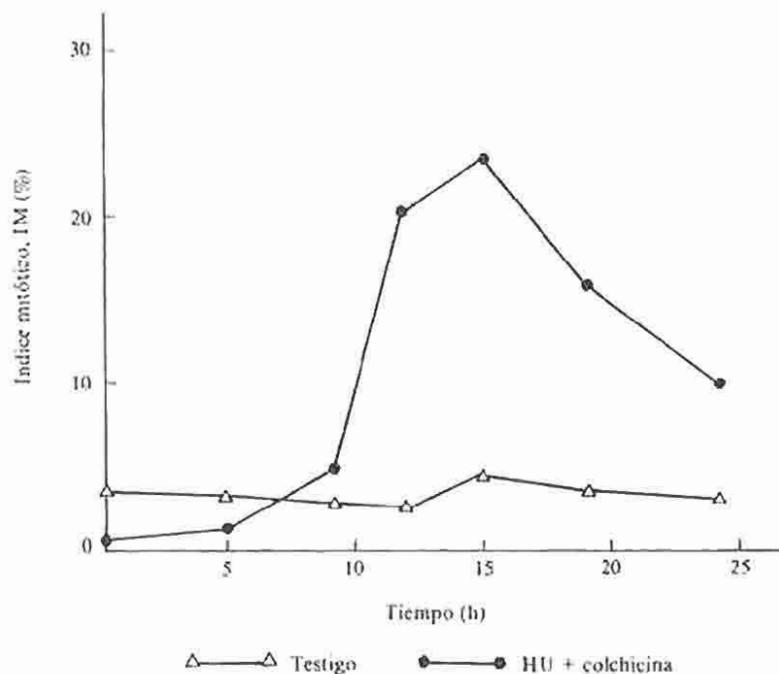


Figura 8.5. Índices mitóticos obtenidos en suspensiones celulares de trigo tratadas con hidroxiurea (5 nM) más colchicina (0.05%), y en suspensiones sin tratamiento (testigo).

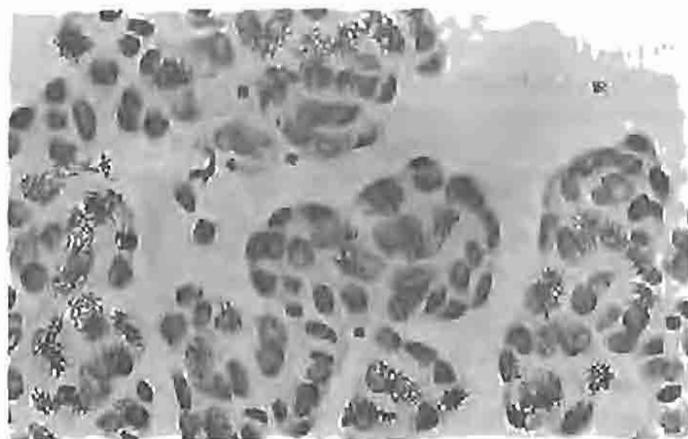


Figura 8.6. Sincronización mitótica en células de trigo después del tratamiento con hidroxiurea más colchicina. Se observa de 25% a 30% de las células en mitosis.

También existen inhibidores no específicos que inducen la sincronización celular. Constabel et al. (1977) usaron pulsos de etileno para aumentar la sincronización de la división celular en soya; se ha sugerido que el etileno no afecta directamente la mitosis pero que puede actuar influenciando el ciclo celular antes de esta fase, en los períodos G_2 o S (Constabel et al., 1977; Rost, 1982).

Mediante tratamientos con pulsos de nitrógeno gaseoso también se puede aumentar la sincronización de la mitosis, con IM superiores a 25% (Constabel et al., 1974). Los métodos basados en tratamientos gaseosos hacen posible la sincronización, durante largos períodos, de grandes poblaciones celulares en los sistemas de cultivo continuos.

La elevación de la temperatura (37-40 °C) causa una rápida disminución en el IM, pero si los cultivos se vuelven a incubar a temperaturas más bajas, se encuentran valores de IM superiores a 15%, como en las suspensiones celulares de tomate (Scharf et al., 1982).

Privación de nutrimentos. La sincronización celular se puede inducir también mediante métodos de privación de nutrimentos esenciales para el crecimiento. Las células 'hambreadas' generalmente se detienen en la fase G_1 (Gould et al., 1975; 1981; Kurz, 1982); si posteriormente se adicionan los nutrimentos al medio de cultivo, se obtiene generalmente una sincronización de las divisiones mitóticas.

Gould et al. (1975) y King et al. (1974) obtuvieron suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus* sincronizadas después de la privación de nitratos. Komamine et al. (1978) describieron divisiones sincronizadas en suspensiones celulares de *Vinca rosea* luego de la privación de fósforo.

Los cultivos que requieren reguladores de crecimiento se pueden sincronizar mediante la privación de los mismos. Nishi et al. (1977) informaron que es posible sincronizar suspensiones celulares de zanahoria por medio de la privación de 2,4-D; la posterior adición de esta hormona induce un incremento en el número de células y en el contenido de ADN. Jounneau (1971) informó que las suspensiones celulares de tabaco se pueden sincronizar parcialmente por la privación y posterior adición de citocininas, pero no por la privación de auxinas.

La aplicabilidad general de la privación de los reguladores de crecimiento para la sincronización celular ha sido cuestionada por Everett et al. (1981) quienes, usando suspensiones celulares de soya, observaron únicamente oscilaciones en los valores de IM luego de la privación de BAP.

En la mayoría de las suspensiones celulares sincronizadas, el alto grado inicial de sincronización decae rápidamente (Chu et al., 1976; Eriksson,

1966; Hadlaczky et al., 1983; King, 1980; Nishi et al., 1977; Szabados et al., 1981); esto puede deberse a la variabilidad de la fase G₁ y a la existencia de una fase poco conocida en el ciclo celular (Smith et al., 1973).

Una excepción al hecho anterior es el caso de suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus* las cuales, después de ser privadas de iones nitrato durante la fase estacionaria, muestran un alto grado de sincronización durante 4 a 5 generaciones celulares; se ha sugerido la presencia de algunos factores acondicionantes como responsables de este fenómeno (Gould et al., 1975; King et al., 1974). También se pueden inducir cultivos sincronizados mediante tratamientos con repetidos pulsos de nitrógeno gaseoso o etileno (Constabel et al., 1974; 1977).

Aplicaciones de las Suspensiones Celulares

En la investigación con vegetales, las suspensiones celulares constituyen una técnica muy valiosa, particularmente en: a) estudios sobre el ciclo celular; b) estudios fisiológicos y bioquímicos; c) formación de metabolitos secundarios y aislamientos de mutantes; y d) embriogénesis somática.

Estudios sobre el ciclo celular

El desarrollo y la regulación del ciclo celular se han estudiado intensivamente en diferentes organismos y células (Hochhauser et al., 1981).

En las plantas superiores, las investigaciones se han llevado a cabo tradicionalmente en meristemas de raíces (Giménez-Martín et al., 1977; Van't Hof et al., 1972); sin embargo, la organización de los meristemas y la traslocación de sustancias dificultan ese tipo de estudios, mientras que las suspensiones celulares constituyen un material más conveniente para el examen de muchas características del ciclo celular de tales plantas. En este caso, los problemas que presenta el crecimiento no balanceado de las suspensiones celulares, en el sistema de cultivo cerrado, se pueden obviar mediante la utilización de sistemas continuos abiertos (Street, 1977).

En una suspensión en crecimiento activo, el ciclo celular es más largo que en las células de meristemas de raíces, pero es más corto que el de las células de callos que crecen en medios semisólidos (Eriksson, 1966; Gould et al., 1974; Chu et al., 1976; González-Fernández et al., 1966). Existen diferentes métodos para determinar el ciclo celular y la distribución de las diferentes fases.

Indices de actividad celular. En una suspensión celular asincrónica, las células se encuentran en diferentes fases; la cantidad de células que hay en una determinada fase en un momento dado es proporcional al tiempo que esa fase dura con respecto al ciclo total.

El principio anterior se aplica para determinar diferentes índices en una población de células. El índice mitótico muestra la duración relativa de la mitosis, y el índice de marcación con ^3H -timidina ($^3\text{HTdR}$) muestra la duración de la replicación del ADN en la fase S (Gould et al., 1974, 1975; Chu et al., 1976). Si la población de células es homogénea (células con el mismo número de cromosomas), es posible distinguir las fases G_1 y G_2 , y calcular su duración relativa, empleando una coloración cuantitativa con Feulgen del ADN y de los núcleos individuales. Combinando la coloración con Feulgen y la marcación con $^3\text{HTdR}$ se pueden medir las fases G_1 , G_2 y S en la misma preparación y se pueden determinar diferentes etapas de la fase S (Gould et al., 1974; Mak, 1965; Navarrette et al., 1978).

Mediante la utilización de esta técnica, Gould et al. (1975) encontraron que en diferentes líneas asincrónicas de *Acer pseudoplatanus* el tiempo de duplicación celular es de 22 a 63 horas, y que las fases tenían las siguientes duraciones:

$$\begin{aligned} S &= 7.0 \pm 0.2 \text{ h} \\ G_2 &= 8.7 \pm 0.6 \text{ h} \\ \text{Mitosis} &= 2.9 \pm 0.3 \text{ h} \end{aligned}$$

G_1 varió entre 4 y 40 h, de acuerdo con el tiempo de duplicación celular.

En una suspensión celular no sincrónica, el análisis cinético se puede llevar a cabo mediante la marcación de una fracción de la población celular, y el ulterior seguimiento de las células marcadas.

Marcación con $^3\text{HTdR}$ (^3H -timidina). Luego de un breve pulso de $^3\text{HTdR}$ y de determinar la proporción de las figuras mitóticas marcadas, se pueden determinar las fases G_2 , M y S, como también la duración del ciclo celular (Chu et al., 1976; Gould et al., 1974).

El ciclo total también se puede medir mediante la marcación continua; las células se exponen a $^3\text{HTdR}$ por períodos prolongados y, a partir de la acumulación de mitosis marcadas, se calcula la duración del ciclo. Gould et al. (1974) encontraron que este procedimiento permite medir la duración del ciclo celular en suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus*, siendo más eficiente que el método de marcación mediante pulsos.

Marcación con cafeína. La cafeína inhibe la citocinesis y produce células binucleadas (Giménez-Martín et al., 1965). La cinética de la aparición de bi-metafases en poblaciones celulares tratadas con cafeína se puede usar para determinar la duración del ciclo celular (Eriksson, 1966; Giménez-Martín et al., 1965; González-Fernández et al., 1966).

Teoría del punto principal de control. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el ciclo celular de diferentes suspensiones celulares, es posible aplicar a estos sistemas el modelo propuesto por Smith et al. (1973), modelo que divide el período intermitótico en dos partes o etapas.

La etapa B se encuentra bajo control y consta de las fases S, G₂, M y una porción de G₁; una vez iniciada esta etapa, una secuencia regular de eventos lleva la célula a la división. Después de la mitosis, la célula entra en la etapa A, que no está programada. Los datos que muestran la naturaleza variable de la fase G₁ y la duración relativamente constante de S, G₂ y M apoyan este modelo (Gould et al., 1974; 1975).

Los experimentos que utilizan la limitación o la privación de nutrientes ayudan a la determinación de las fases del ciclo celular sensibles a ella. Así, la privación de nitratos en suspensiones de *Acer pseudoplatanus* hace que las células se concentren casi exclusivamente en la fase G₁, mientras que la privación de sacarosa y fosfato conduce a una concentración en G₁ (80%) y en G₂ (20%). Las células son más sensibles a la privación de sacarosa que de nitrato o fosfato (Gould et al., 1975; 1981); Komamine et al. (1978) encontraron que la privación de fósforo hace que las células de *Vinca rosea* se acumulen preferiblemente en G₂.

Las observaciones anteriores sobre las suspensiones celulares apoyan la hipótesis de Van't Hof et al. (1972) acerca del punto principal de control (PPC). Estos investigadores describieron en los meristemas de puntas de raíz dos PPC, uno en G₁ y otro en G₂, sugiriendo que estos puntos determinan la detención o 'puesta en marcha' del ciclo celular. Además de ser sensibles a la privación de carbohidratos, estos puntos de control son sensibles a las radiaciones ionizantes, a la anaerobiosis, a la inhibición de la síntesis de proteínas, y al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Van't Hof et al., 1972).

Se ha sugerido que el estado de fosforilación de los ribosomas puede tener un papel central en el mecanismo de control de la actividad del ciclo celular. La fosforilación de ciertas proteínas ribosómicas es baja o nula en las células 'en descanso', pero es alta antes del aumento de la síntesis de proteínas y de la 'reentrada' de las células en el ciclo celular activo (Scharf et al., 1982).

En suspensiones celulares con muy baja densidad, como también en el plaqueo en medios semisólidos y en cultivos de protoplastos, se ha probado la existencia de factores que promueven la división celular (Street et al., 1977; Szabados et al., 1980; 1981).

Fitohormonas en la regulación del ciclo celular. Las fitohormonas son necesarias para la inducción de divisiones celulares y para mantener una adecuada actividad metabólica de las células. Las suspensiones celulares generalmente requieren del suministro exógeno de auxinas para su crecimiento; los reguladores más usados son 2,4-D, ANA y AIA.

La absorción y el metabolismo de 2,4-D y AIA en suspensiones celulares se ha estudiado detalladamente. En algunos casos, la división celular está controlada por una fuente intracelular de auxinas (que incluye AIA) y por auxinas sintéticas exógenas como el 2,4-D (Nishi et al., 1977; Leguay et al., 1975, 1977; Moloney et al., 1983). Nishi et al. (1977) sugirieron que en las suspensiones que requieren auxinas exógenas, éstas se necesitan para la transición entre las fases G_1 y S. En contraste con estos resultados, se ha propuesto que las auxinas no regulan la división celular en las suspensiones, debido a su interacción con puntos específicos de control del ciclo nuclear (Everett et al., 1981; Jouanneau, 1971).

Las citocininas (p. ej., KIN o BAP) se requieren ocasionalmente para promover divisiones en células cultivadas en suspensión. Se ha sugerido que las citocininas regulan la síntesis de proteínas en la fase G_0 o en la transición de las fases G_2 y M (Everett et al., 1978; Fosket, 1977); sin embargo, Wang et al. (1981) encontraron rápidas oscilaciones en los índices mitóticos después de la adición de tales sustancias a suspensiones celulares privadas de ellas, y supusieron que esto era causado por pequeñas subpoblaciones de la suspensión celular, bloqueadas previamente en numerosos puntos del ciclo celular. En general, no ha sido posible probar claramente la acción de las citocininas en algún punto principal de control de la regulación del ciclo celular (Van't Hof et al., 1972; Wang et al., 1981; Jouanneau, 1971).

Estudios fisiológicos y bioquímicos

Las suspensiones celulares, cultivadas en medios sintéticos completamente definidos y bajo condiciones ambientales controladas, representan un interesante sistema para las investigaciones fisiológicas y bioquímicas. Otras ventajas son su bajo grado de diferenciación celular y la falta de las estructuras altamente organizadas que se presentan en los tejidos y órganos.

Absorción de nutrimentos. Las plantas son organismos autótrofos, con un sistema radical altamente especializado para la absorción de nutrimentos; las suspensiones celulares, en cambio, son generalmente sistemas heterótrofos, donde el crecimiento y el metabolismo dependen de la disponibilidad de nutrimentos y reguladores en el medio de cultivo. Puesto que la disponibilidad de nutrimentos en el cultivo puede modificar la fisiología de las células, es importante conocer los mecanismos que regulan la absorción de los mismos. De otro lado, los intercambios de nutrimentos entre los compartimentos de la célula son alterados durante el ciclo de cultivo (Thom et al., 1981).

Las suspensiones celulares se han empleado extensivamente durante la última década para estudiar el transporte de moléculas orgánicas e inorgánicas. Especialmente se ha estudiado el transporte de iones (Halbrock, 1974; Thom et al., 1981; Furner et al., 1982), azúcares (de Klerk-Kiebert et al., 1983; Komor et al., 1981; Maretzky et al., 1972), y aminoácidos (Harrington et al., 1981a, 1981b; Berry et al., 1981; McDaniel et al., 1982). Maretzky et al. (1978) han revisado el transporte en células cultivadas y han discutido las ventajas del uso de suspensiones celulares en los estudios de absorción.

Eventos metabólicos en las suspensiones celulares. Las suspensiones celulares son excelentes sistemas experimentales para estudiar el metabolismo de las plantas *in vitro*. Por ello se han utilizado en diversas investigaciones de eventos metabólicos asociados con el crecimiento y la división celular (Nash et al., 1972).

Zeleneva et al (1980) estudiaron las readaptaciones de los patrones enzimáticos en callos y en suspensiones celulares de maíz. En la mayoría de los casos, durante el establecimiento y el crecimiento de los callos los patrones enzimáticos fueron similares a los de la planta intacta, mientras que los de las suspensiones celulares diferían marcadamente. El medio líquido introduce un gran cambio ambiental, el cual se traduce muchas veces en una modificación de la actividad enzimática y de los patrones cuantitativos de la expresión de los genes.

En numerosos experimentos se han utilizado suspensiones celulares para estudios relacionados con las fosfatasa (Zink et al., 1982), las nucleasas (Schaefer et al., 1981) y las enzimas involucradas en la oxidación de carbohidratos (Stafford et al., 1983; Zeleneva et al., 1980). También se han usado para estudios relacionados con la asimilación de nitratos (Stafford et al., 1983; Jones et al., 1976), la reducción de sulfatos (Urlaub et al., 1982) y el metabolismo de los lípidos (Gaver et al., 1983), los aminoácidos (Fletcher et al., 1971; Moloney et al., 1982) y las sustancias reguladoras del

crecimiento (Moloney et al., 1982, 1983); igualmente se han utilizado para trabajos con las poliaminas (Smith et al., 1978), los nucleótidos (Slabas et al., 1980) y la respiración (Horn et al., 1982).

Se han efectuado estudios relacionados con la replicación del ADN y con la expresión de los genes en sistemas que hacen uso de bacterias o virus, debido a la flexibilidad genética y fisiológica de estos sistemas y a la estructura simple de su material genético. Muchos de estos estudios en eucariontes se han llevado a cabo con levaduras; sin embargo, las suspensiones celulares de plantas superiores son potencialmente adecuadas para este tipo de experimentación, dado que pueden crecer a diferentes temperaturas y en medios simples bien definidos, y pueden ser fácilmente trasladadas de una condición a otra (King, 1980; Street, 1977; Chu et al., 1976).

En los últimos años ha aumentado la utilización de las suspensiones celulares en los estudios sobre la replicación de ADN (Slabas et al., 1980; Cress et al., 1978), la síntesis de ARN (Jackson et al., 1982) y la síntesis de proteínas (Bevan et al., 1981). Scharf et al. (1982) informaron que en suspensiones celulares de tomate, los tratamientos de calor inducen alteraciones en la expresión de los genes y en la fosforilación de las proteínas.

Diversos autores han hecho énfasis en la importancia de los sistemas sincronizados para los estudios relacionados con el crecimiento y diferenciación en células y tejidos de plantas. Así, Komamine et al. (1978) examinaron, en el ciclo celular de células sincronizadas de *Vinca rosea* cultivadas en suspensión, los cambios que se presentaban en el ritmo de respiración, la síntesis de ADN, ARN y proteínas, y la actividad de las enzimas del metabolismo de las pentosas-fosfato y de las purinas. Por otra parte, King et al. (1974) estudiaron la síntesis de ADN, la respiración y la actividad de diferentes enzimas de células de *Acer pseudoplatanus* sincronizadas y cultivadas en suspensión. Cress et al. (1978) utilizaron suspensiones celulares en la fase exponencial y suspensiones sincronizadas con FUDR para estudiar el mecanismo de replicación del ADN en soya.

Formación de metabolitos secundarios

Si bien la mayoría de las plantas superiores sintetizan diferentes metabolitos secundarios, sus células cultivadas en suspensión suelen comportarse de manera diferente y frecuentemente no producen estos metabolitos secundarios; esto podría deberse a cambios en la expresión de los genes (Bohm, 1982). Sin embargo, debido al interés económico en explotar las técnicas del cultivo de tejidos para la producción y bioconservación de

sustancias (véase Capítulo 9), en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones que se traducen en un aumento sustancial de la capacidad biosintética de las suspensiones celulares.

Los resultados experimentales muestran que la máxima acumulación de productos secundarios ocurre cuando el ritmo de crecimiento de los cultivos celulares decrece y cuando éstos exhiben alguna diferenciación estructural (Yeoman et al., 1982; Hagimori et al., 1982a; Franke et al., 1982).

Lindsey et al. (1983a) investigaron detalladamente las relaciones entre el contenido de alcaloides, el ritmo de crecimiento y el grado de diferenciación de suspensiones celulares de varias especies de solanáceas. Sus estudios mostraron que la máxima acumulación de compuestos secundarios tenía lugar en la fase estacionaria de los cultivos, en la que éstos mostraban agregación y eran de color verde; por el contrario, los cultivos en la fase exponencial del crecimiento, con poca agregación celular, eran los más improductivos. El verdeamiento de los cultivos se ha asociado muchas veces con una producción de alcaloides, pero no es aquél un requerimiento absoluto.

Hagimori et al. (1982a, 1983) obtuvieron resultados similares; usando suspensiones celulares de *Digitalis purpurea* encontraron que la máxima acumulación de digitoxina se producía en los cultivos iluminados, verdes, con principios de regeneración de vástagos. Asimismo, Franke et al. (1982) informaron acerca de la diferenciación de células especializadas en la acumulación de alcaloides, que se hallaban en los agregados celulares más grandes de suspensiones celulares de *Macleaya*.

El ritmo de crecimiento de los cultivos parece ser un importante factor en la formación de productos secundarios. El metabolismo primario está asociado con el crecimiento rápido, mientras que el secundario está ligado con el crecimiento lento y con cierta organización de los cultivos (Lindsey et al., 1983a; Davies, 1972).

Hasta la mitad de la década del 70 había relativamente pocos estudios sobre la capacidad biosintética de las suspensiones celulares; posteriormente, se han obtenido varias líneas altamente productoras de metabolitos secundarios, por medio de la repetida selección y clonación celular a partir de tales suspensiones. La producción de 10% a 15% de alcaloides en varias líneas indica la enorme capacidad biosintética de los cultivos in vitro de células vegetales (Bohm, 1980; Constabel et al., 1982; Kutney et al., 1980; Ogino et al., 1978; Watanabe et al., 1983).