

EFFECTO DE LOS CRIOPROTECTORES ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION SOBRE LA VITALIDAD DE LAS CELULAS DE CATHARANTHUS ROSEUS

M.T. González Arnao, C. Urra Villavicencio y J. Rodríguez Soria

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 23 de noviembre de 1987

Recibido: 11 de julio de 1988

ABSTRACT. The combined effect of two types of cryoprotectants (sorbitol 1 mol/L and dimethylsulfoxide 5 %) was studied on the vitality of *Catharanthus roseus* cells by respirometry before and after freezing. It was shown that a variation of the time of preculture with the first cryoprotectant from 1 to 48 h reduced significantly the vitality so as the cell washing did. It was observed that the best results were obtained with: preculture 1 h in sorbitol 1 mol/L + preculture 1 h in DMSO 5 % by freezing 1 °C/min to -40 °C follow of immersion in liquid nitrogen and fast thaw without any further cell washing to remove the cryoprotectants.

RESUMEN. Se estudió el efecto combinado de dos crioprotectores (sorbitol 1 mol/L y dimetilsulfóxido 5 %) sobre la vitalidad de las células de *Catharanthus roseus* por respirometría antes y después de la congelación, determinando los μ L de oxígeno/hora consumidos por las células tratadas. Se constató, que al variar de 1 a 48 h el tiempo de precultivo con el primer crioprotector la vitalidad se reducía considerablemente, así como, que fue significativo el deterioro celular con el lavado de los crioprotectores después de la congelación. Se observó que la variante que garantiza una mayor vitalidad de las células es la correspondiente a: precultivo de 1 h en sorbitol 1 mol/L + precultivo de 1 h en dimetilsulfóxido 5 % con un régimen de congelación de 1 °C/min hasta -40 °C e inmersión en nitrógeno líquido y descongelación rápida sin el lavado ulterior de las células para eliminar los crioprotectores.

INTRODUCCION

Las líneas celulares derivadas del *Catharanthus roseus* constituyen una fuente de producción de alcaloides con actividad antitumoral, siendo por tanto, su conservación estable con fines farmacéuticos de gran interés.

La forma más eficaz de lograr la preservación a largo plazo consiste en la inactivación temporal de las funciones metabólicas por el efecto de las ultra bajas temperaturas, en el orden de los -196 °C (temperatura del nitrógeno líquido), lo que comúnmente se denomina: criopreservación.

Sin embargo, pocos o sólo algunos cultivos tienen una resistencia natural al frío, por lo que necesitan la aplicación de sustancias crioprotectoras adecuadas, antes de ser sometidas al proceso de congelación.

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio del efecto de los crioprotectores antes y después de la congelación sobre la vitalidad de las células de *Catharanthus roseus*.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* de la línea clasificada E₅, obtenidas a partir de callos cultivados durante 3 ó 4 semanas en medio Murashige-Skoog, suplementado con 2 mg/L de 2,4 ácido diclorofenoxiacético, 0,1 mg/L de kinetina y solidificado con 0,6 % de agar.

Los callos se pasaron al mismo medio de cultivo pero en forma líquida en erlenmeyers de 250 mL los que se colocaron en una zaranda orbital a 150 r/min durante 7 d.

Tratamiento con crioprotectores

Las soluciones crioprotectoras: (sorbitol 1 mol/L y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 %), fueron preparadas previamente en el medio de cultivo mencionado anteriormente.^{1,2}

La aplicación se realizó de la forma siguiente:

Tratamiento I: precultivo en sorbitol 1 mol/L en 3 variantes que difieren entre sí de acuerdo al tiempo que dura el tratamiento. (1, 24 y 48 h).

Tratamiento II: precultivo en DMSO 5 % durante 1 h, después de concluir el tratamiento I.

Los crioprotectores se añadieron a temperatura ambiente y a 0 °C, respectivamente equilibrando la temperatura en un baño de hielo.

Congelación

Las muestras se congelaron en crioviales de poliestireno de 1 mL a un régimen de 1 °C/min, desde 0 hasta -40 °C con la posterior inmersión en nitrógeno líquido, donde permanecieron durante 24 h.

La velocidad de enfriamiento se garantizó mediante un sistema sencillo utilizando un frasco de 1 000 mL que contenía alcohol, siendo colocado en un termo con nitrógeno líquido hasta un nivel prefijado.³

Descongelación y tratamiento post-descongelación

La descongelación se efectuó en un baño de María a 40 °C, equilibrando las muestras descongeladas posteriormente a 0 °C durante 15 min en un baño de hielo.

A todas las muestras una vez descongeladas se les aplicaron dos tipos de tratamiento: lavado de los crioprotectores con medio fresco (3 veces) y sin lavado.

Prueba de vitalidad

La vitalidad de las células tratadas antes y después de la congelación se determinó por respirometría, expresando los resultados en μ L de oxígeno consumidos por hora.

Las mediciones se realizaron manométricamente. Se midieron los cambios de volumen del gas confinado en un sistema cerrado, a una temperatura de 30 °C y se llevaron a cabo a intervalos de 20 min cada una con tres réplicas para cada determinación.

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de covarianza.

Las variantes experimentales desarrolladas se muestran en la Tabla I.

TABLA I

Representación esquemática de los diferentes tratamientos aplicados

| Variante | Tratamientos | | | | | | | |
|----------|-----------------|----|----|---|---------------------------|----|----|--|
| | Pre-congelación | | | | Post-congelación | | | |
| | Precultivos | | II | | Lavado de crioprotectores | | | |
| | I | 24 | 48 | I | | Si | No | |
| | (h) | | | | | | | |
| 1 | X | - | - | X | | X | - | |
| 2 | X | - | - | X | | - | X | |
| 3 | - | X | - | X | | X | - | |
| 4 | - | X | - | X | | - | X | |
| 5 | - | - | X | X | | X | - | |
| 6 | - | - | X | X | | - | X | |

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados correspondientes a las mediciones de la respiración se reflejan en la Tabla II.

TABLA II

Mediciones de la respiración de la células tratadas antes y después de la congelación

| Variantes | Precultivos | | Tratamiento Post-descongelación |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------------------|
| | I | II | |
| | µL oxígeno/h | | |
| 1 | 133,76 (3;4;5;6) | 105,52 (3;4;5;6) | 3,10 (2;6) |
| 2 | 133,52 | 105,52 | 40,22(1;3;4;5) |
| 3 | 100,95 (1;2;5;6) | 85,50 (1;2;5;6) | 0,60 (2;6) |
| 4 | 110,95 | 85,50 | 12,31(2) |
| 5 | 85,22 (1;2;3;4) | 55,94 (1;2;3;4) | 3,93(2;6) |
| 6 | 85,22 | 55,94 | 26,28(1;3;5) |

Los números entre paréntesis expresan las variantes con las que existen diferencias significativas, (p < 0,05)

Se puede apreciar que para las variantes del precultivo I los mejores resultados se obtuvieron para el tratamiento de menor tiempo (1 h), pues en la medida en que aumentó el tiempo de exposición de las células al crioprotector disminuyó la vitalidad de ellas.

Este fenómeno está estrechamente relacionado con el aumento de la concentración de soluto en medio extracelular por la presencia del crioprotector, lo que provoca la deshidratación parcial de las células con la inherente contracción del protoplasma completo y sus compartimientos individuales y aunque las membranas toleran considerables desviaciones de la ordenación espacial de las macromoléculas que la componen la reducción del volumen celular en ocasiones es letal.⁴

Igualmente ocurrió para el precultivo II, donde además se adiciona el efecto del otro componente de la mezcla crioprotectora (DMSO). Este crioprotector sin embargo facilitó la tolerancia de las células a la congelación lo que no ocurrió con precultivos sólo en sorbitol 1 mol/l, según las experiencias preliminares realizadas.

En cuanto al tratamiento de lavado de las muestras se puede apreciar que en el caso en que las células no se lavaron, los resultados fueron mejores. Esto puede ser debido a que con el lavado se disminuye bruscamente la concentración del medio de suspensión de las células por lo que ocurre un estrés osmótico, además de que puede ocurrir la pérdida de solutos vitales por la extracción del propio medio con los crioprotectores.

El mejor tratamiento que garantizó una mayor vitalidad de la suspensión celular de *Cathartinus roseus* antes y después de la congelación fue la correspondiente a la variante 2, lo que fue corroborado con el análisis estadístico aplicado.

CONCLUSIONES

El presente trabajo mostró que de las variantes de precultivo con crioprotectores estudiadas, aquella que garantiza la mayor vitalidad de las células conservadas es II que corresponde al precultivo de 1 h en sorbitol 1 mol/l + precultivo de 1 h en DMSO 5 % con un régimen de congelación de 1 °C/min hasta -40 °C e inmersión en nitrógeno líquido.

Se comprobó que las células se mantuvieron en el medio con los crioprotectores después de la congelación tenía mayor vitalidad que aquellas que se lavaron, lo que demuestra que son muy susceptibles a los cambios de tonicidad del medio de suspensión.

Se recomienda seguir estudiando tiempos de precultivos inferiores y formas más leves de extracción de los crioprotectores.

BIBLIOGRAFIA

1. Kartha K.K. *Plant Physiology*, 75, 720, 1984.
2. Kartha K.K. *Plant Cell Report*, 1, 135, 1982.
3. Liman J.H. and Marchin G.L. *Cryobiology*, 21, 170, 1984.
4. Withers L.A. *Cryopreservation and storage of Germoplasm*. Chapter 8, *Plant Cell Culture*, 169-191, R.A. Dixon ed., IRL Press, Washington D.C., 1985.

El Sistema Internacional de Unidades y su aplicación en las Ciencias Exactas

Rafael León Rodríguez y Rafael León Avendaño

Contiene las definiciones y conceptos de las diferentes magnitudes. El Sistema Internacional de Unidades (SI), Unidades Básicas, Unidades Suplementarias, magnitudes y unidades derivadas, tablas de unidades derivadas, unidades no pertenecientes al SI cuyo uso se permite por tiempo indefinido. Relación de constantes que se emplean en Química. Dimensiones de las unidades. Ecuaciones Dimensionales. Reglas generales para el uso de las unidades SI. Reglas para el uso de las unidades derivadas. Indicaciones sobre el empleo de prefijos. Normas para la señalización de los ejes en los gráficos y encabezamiento de columnas en tablas cuantitativas. Ejemplos del empleo del SI y Bibliografía.