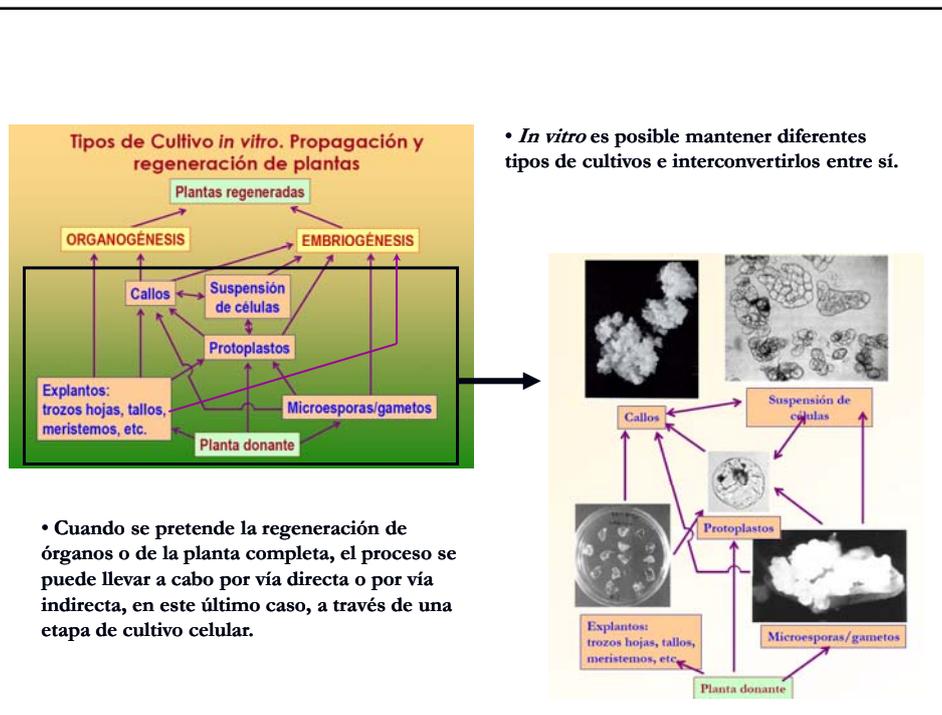
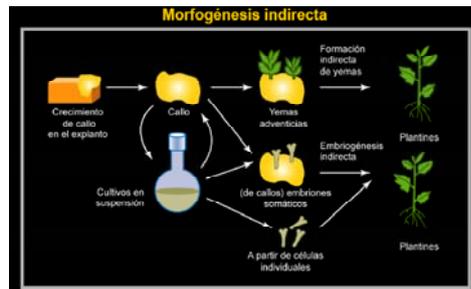
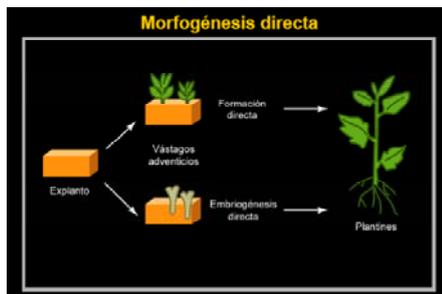
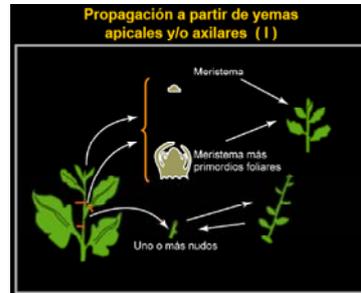


## CULTIVOS CELULARES: TIPOS Y APLICACIONES

Biotecnología Vegetal. Curso 2013-2014  
 Biotecnología Vegetal. Curso 2013-2014



- Procesos morfogénéticos que conducen a la regeneración in vitro



Figuras tomadas de Rudoy, 2008 (curso Agrobiotecnología, Univ. Buenos Aires)

### Totipotencia, competencia y determinación:

**Totipotencia** - potencial genético de las células para llevar a cabo un proceso de embriogénesis u organogénesis. Haberlandt propuso que todas las células son totipotentes.

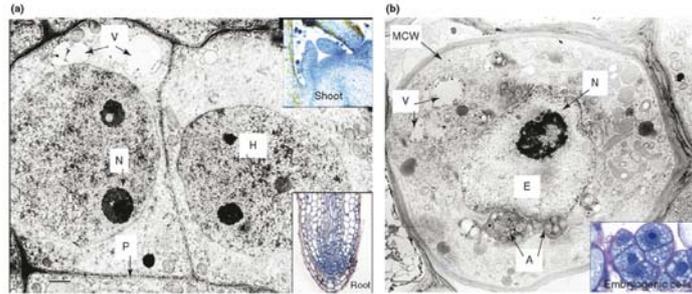
**Estado basal** – estado celular “normal”, células pueden ser competentes (meristemáticas o de tipo meristemático) o incompetentes, que deben readquirir la competencia (desdiferenciarse) antes de que se pueda producir un proceso morfogénético.

**Competencia** – competencia morfogénética; las células competentes son células indiferenciadas que retienen la capacidad para diferenciarse y dar una respuesta morfogénética.

**Determinación** – Las células competentes están destinadas (programadas) para seguir un programa genético que lleva a la morfogénesis; inducida - en respuesta a un estímulo o permisiva – se desencadena la respuesta predeterminada.

**Desarrollo** – manifestación del proceso.

- **Células unipotentes:** Células madre capaces de generar sólo un tipo de celular o tisular.
- **Células multipotentes:** Células madre capaces de dar lugar a más de un tipo celular.
  - **Células pluripotentes:** Células madre capaces de originar la mayoría, pero no la totalidad, de los tipos celulares presentes en la planta.
  - **Células totipotentes:** Células madre que pueden originar todos los tipos celulares presentes en la planta, permitiendo, por tanto, la regeneración completa de la misma.



Arquitectura celular y ultraestructura de células madre meristemáticas pluripotentes (barra, 1  $\mu\text{m}$ ) (a) y de células madre embriogénicas totipotentes (barra, 3  $\mu\text{m}$ ) (b). A, amiloplastos; E, eucromatina; H, heterocromatina; MCW, paredes celulares modificadas; N, nucleolos; P, plasmodesmos; V, vacuoma. Adaptado de Verdeil et al., 2007 (Trends Plant Sci. 12: 245).

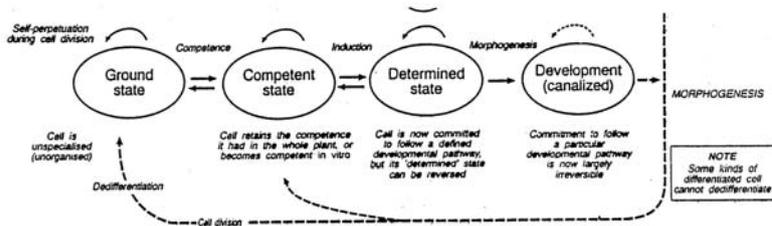
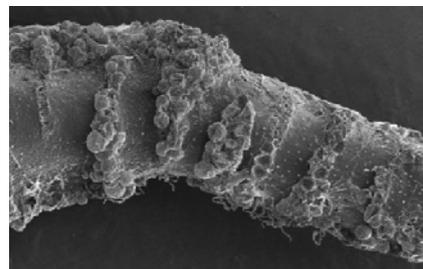


Fig. 12. Progressive steps in the capacity of a cell to become differentiated and/or morphogenic. Competence can be one step on the pathway to determination; but it is not clear whether cells in the ground state always have to pass through this stage as they are committed to development.

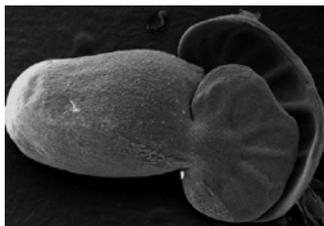
• Cualquiera que sea la respuesta morfológica debe producirse proliferación celular que dará lugar a un cultivo organizado (organogénesis y embriogénesis), o a un cultivo desorganizado (cultivo celular).



Estaminodio de cacao.



Estaminodio de cacao tras 5 días de cultivo.



Embrión somático.

Tomado de <http://cacaoprieto.com/>

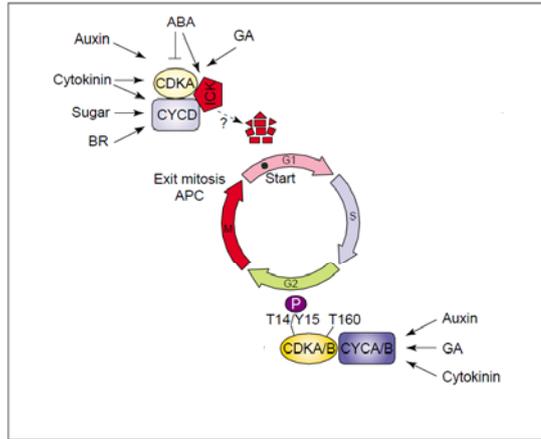
- Los fitoreguladores endógenos y/o aplicados en el medio de cultivo regulan la actividad del ciclo celular (proliferación). Los puntos de control principales sobre los que actúan son las transiciones entre las fases G0/G1 y G2/M.

- Las auxinas inducen la síntesis de ciclinas (CYC) y de quinasas dependientes de ciclina (CDK).

- Las citoquininas activan a CYCs y CDKs vía fosforilación.

- Otros reguladores como giberelinas (GA), brasinosteroides (BR) y ácido abscísico (ABA) también intervienen en la regulación del ciclo. En el caso del ABA, deteniéndolo a través de inhibidores de CDKs (ICK).

- Otros compuestos, como el azúcar, o factores ambientales ejercen una acción directa o indirecta sobre el ciclo.



Adaptado de Stals e Inzé, 2001 (Trends Plant Sci. 6:359)

Auxina

**BALANCE HORMONAL**

Citoquinina

Alta

Baja

- Formación de raíces en esquejes
- Embriogénesis
- Formación de raíces en callos
- Iniciación de cultivos celulares
- Formación de vástagos adventicios
- Crecimiento de vástagos axilares

Baja

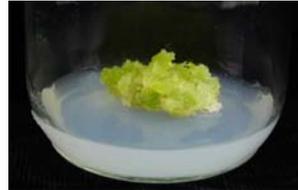
Alta



A/C: 0/0 10:1 1/10 1/1

• **Cultivo celular:** Conjunto de células diferenciadas y meristemáticas que crecen en un medio nutritivo de forma desorganizada, sin formar estructuras anatómicas reconocibles.

• **En medio sólido:** Callo.



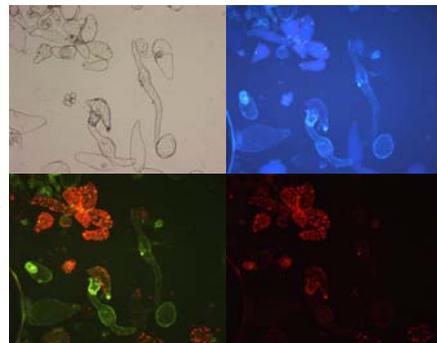
• **En medio líquido:** Suspensión celular.



Los cultivos celulares son cultivos desorganizados, pero no desdiferenciados. Se podría hablar de desdiferenciación anatómica, pero se produce citodiferenciación que conduce a poblaciones más o menos heterogéneas de tipos celulares.



Callos de *Beta vulgaris* con diferente pigmentación.  
Tomado de Buchanan, 2000 (Biochemistry and Molecular Biology of Plants).



Citodiferenciación en una suspensión celular de *Zygophyllum fabago* observada bajo el microscopio de fluorescencia con diferentes filtros.

**Formación de callos:**

- *In vivo*: Heridas, ataque de microorganismos e insectos.



Tumor provocado por *Agrobacterium tumefaciens*.

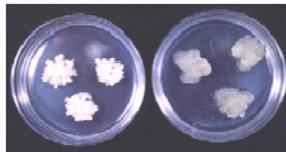
- *In vitro*: Fitohormonas (sólo auxinas, sólo citoquininas, ambas, ninguna (habituaación)).



Callo derivado de inflorescencias de lavandín.

**Factores que afectan a la inducción y al tipo de callo obtenido**

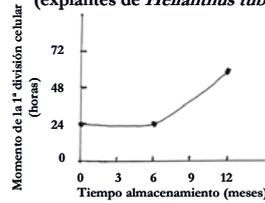
**Genotipo**  
3 mg/L 2,4-D



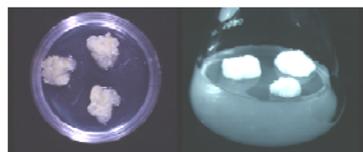
Arabidopsis  
(compacto)

Tabaco  
(friable)

**Estado fisiológico**  
(explantes de *Helianthus tuberosus*)



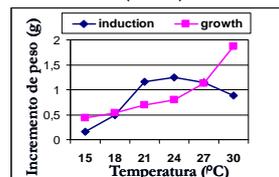
**Balance hormonal**  
(tabaco)



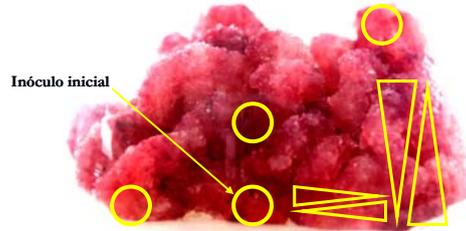
3,0 mg/L 2,4-D  
0,1 mg/L kinetina  
(friable)

2,0 mg/L AIA  
3,0 mg/L 2-IP  
(compacto)

**Temperatura**  
(*Citrus*)



Los callos constituyen un sistema muy heterogéneo. Las condiciones de entorno de las células son diferentes en función de la posición en la que se encuentren.



Callo derivado de frutos de *Vitis vinifera* cv. Gamay.

- Gradientes de nutrientes.
- Gradientes de reguladores.
- Gradientes de productos del metabolismo, etc.

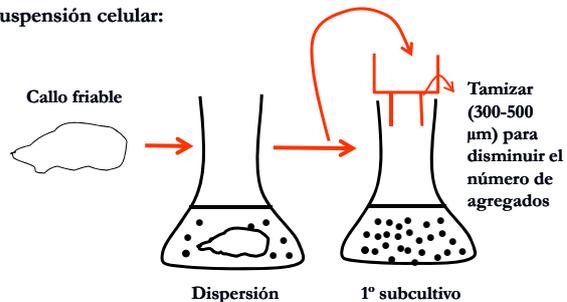
La respuesta de las células de un callo puede variar de acuerdo con esta heterogeneidad.

Las suspensiones celulares presentan como ventajas mayor homogeneidad en el entorno celular y, por lo tanto, mayor reproducibilidad en las respuestas celulares, mayor facilidad de manipulación y escalado de los cultivos, mayor velocidad de crecimiento, etc.

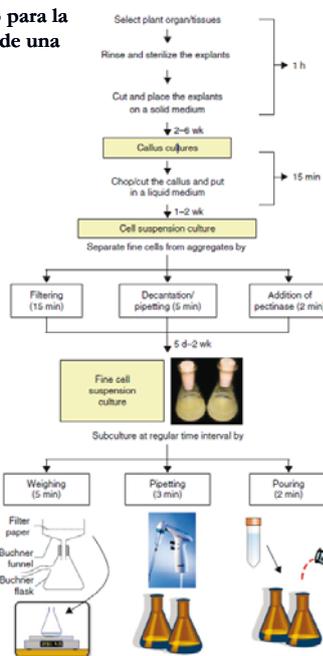
**Suspensiones celulares:** Cultivos de agregados celulares (mayoritariamente) o de células individuales que proliferan y completan un ciclo de crecimiento en medio líquido.



**Iniciación de una suspensión celular:**



Esquema del procedimiento para la iniciación y mantenimiento de una suspensión celular.

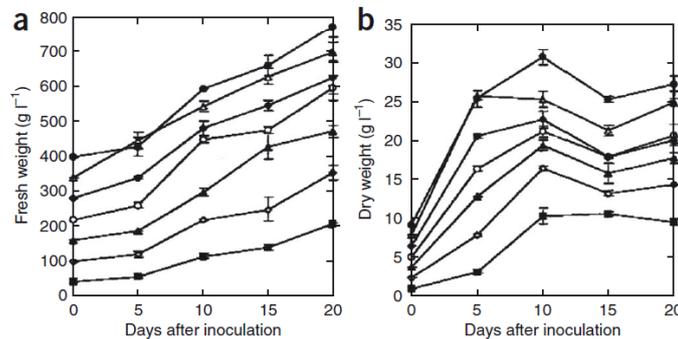


• En una suspensión, las células, o agregados celulares, se mantienen en suspensión mediante agitación (en muchos casos, orbital) o aireación, lo que contribuye a homogeneizar el medio y minimizar el riesgo de que se produzcan condiciones de hipoxia.



Tomado de Mustafa et al., 2011 (Nature Protocols 6:715).

Uno de los aspectos críticos en la iniciación y mantenimiento de una suspensión celular es la densidad de inóculo inicial. Se define la “densidad celular inicial crítica”, o “densidad efectiva mínima”, como la menor cantidad de células por volumen de medio a la cual un cultivo crecerá.



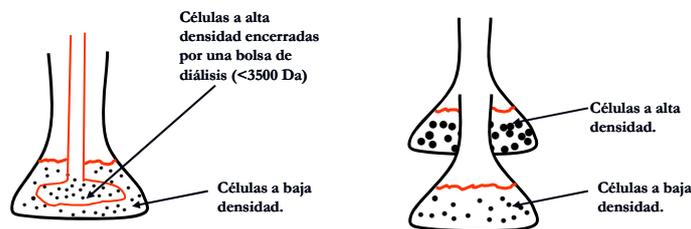
Efecto de la densidad inicial de inóculo sobre el crecimiento de suspensiones celulares de *Catharanthus roseus*, determinada como peso fresco (a) y como peso seco (b). Las densidades de inóculo son ( $g\ l^{-1}$ ): 40 (■), 100 (◇), 160 (▲), 220 (○), 280 (◆), 340 (△), y 400 (●). Adaptado de Mustafa et al., 2011 (Nature Protocols 6:715)

Se puede reducir la densidad de inóculo inicial mediante el uso de medios condicionados.

Las células liberan al medio metabolitos que cuando se acumulan a concentraciones suficientes pueden iniciar los procesos de proliferación celular.

Se pueden crear medios condicionados "artificiales" que permiten reducir un orden de magnitud la densidad inicial de inóculo (de  $10^4$  a menos de  $10^3$  células  $\text{ml}^{-1}$ ).

Los factores condicionantes son, normalmente, compuestos de bajo peso molecular (ej. fitosulfuquina- $\alpha$ ). El condicionamiento se puede hacer utilizando una parte del medio en el que ha crecido previamente un cultivo de la misma u otra especie, conectando las cámaras aéreas de dos cultivos (factores volátiles), o por adición de fitorreguladores o suplementos orgánicos (giberelinas, citoquininas, aminoácidos).

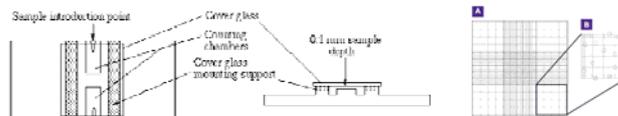


### Caracterización del crecimiento de una suspensión celular

No hay una definición precisa del crecimiento de un cultivo de células vegetales, ya que éste puede ser relacionado con el número de células, masa de células, volumen celular, etc.

Entre los métodos utilizados figuran los siguientes:

- Determinación de los pesos fresco y seco de las células – Son los métodos más comúnmente utilizados. Requieren la toma de células para determinar el peso fresco (diferencia entre el peso fresco de las células en el filtro menos el peso del filtro humedecido) y/o el peso seco (Diferencia entre el peso de las células con el filtro, secados en estufa a  $60-70 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta peso constante, menos el peso del filtro seco prepesado) por volumen de suspensión celular.
- Número de células – Determinación del número de células por volumen de suspensión con ayuda de una cámara de conteo (hemocitómetro). Las suspensiones con grandes agregados celulares requieren un tratamiento ( $\text{CrO}_3$ , 8% (p/v); pectinasa 0.25%) para romper los agregados.



### Caracterización del crecimiento de una suspensión celular

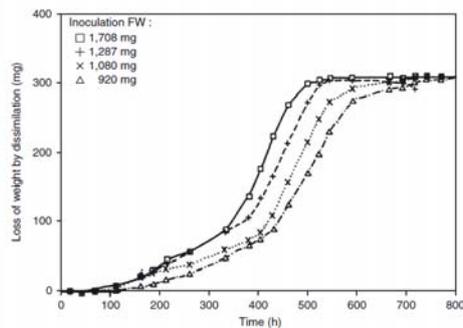
- **Determinación del volumen de empaquetamiento celular (VEC o PCV)** – Al aumentar el número de células y su volumen aumenta la proporción de volumen de suspensión ocupado por las células. Para determinar el volumen de células empaquetadas, un volumen de suspensión se somete a centrifugación a baja velocidad ( $200\text{-}250 \times g_{\text{max}}$ ). El VEC se expresa como el porcentaje del volumen de células con respecto al volumen de suspensión.
- **Determinación del volumen de sedimentación celular (VSC o CVS)** – Se determina igual que el VEC, pero las células se dejan sedimentar sin centrifugación. Se pueden diseñar dispositivos sencillos para medir este parámetro *in situ*, de forma no invasiva. Tanto este método como el anterior no diferencian entre células vivas y muertas.



Dispositivo para medir el VSC. El ángulo de  $60^\circ$  maximiza la altura de las células sedimentadas (para erlenmeyer de 250 ml). Tomado de Mustafa et al., 2011 (Nature Protocols 6:715).

### Caracterización del crecimiento de una suspensión celular

- **Determinación de la pérdida de peso por la actividad catabólica de los cultivos (curvas de desasimilación)** – Consiste en pesar a intervalos regulares el frasco conteniendo el cultivo. Se trata, pues, de un método no invasivo. Se requiere contar con un frasco de control, conteniendo medio de cultivo, para compensar las pérdidas de peso debidas a la evaporación.

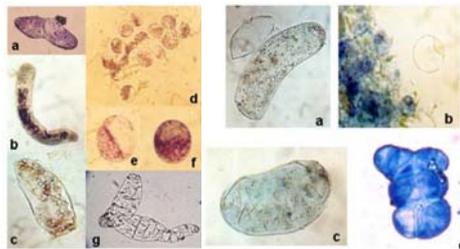


Curvas de desasimilación para suspensiones celulares de *Tabernaemontana divaricata* iniciadas con densidades iniciales de inóculo crecientes. Tomado de Mustafa et al., 2011 (Nature Protocols 6:715).

### Caracterización del crecimiento de una suspensión celular

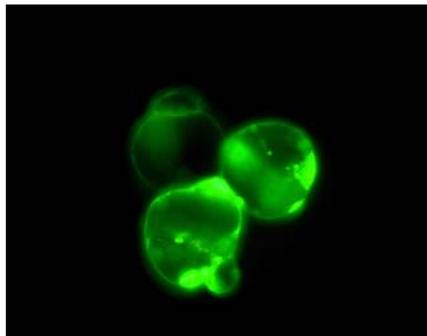
• **Determinación de la conductividad** – Las células, al crecer, van tomando nutrientes minerales del medio, lo que hace disminuir la conductividad de éste. La variación de la conductividad de un medio de cultivo con el tiempo es inversamente proporcional a la variación del peso fresco. El método puede hacerse no invasivo mediante la utilización de sondas.

• **Viabilidad celular** – Determina el número de células vivas por volumen de suspensión celular. La viabilidad puede medirse utilizando colorantes vitales (diacetato de fluoresceína, DAF, sales de tetrazolio, rojo neutro, etc.) o colorantes de exclusión (azul de Evans, azul tripán, etc.). La determinación de la viabilidad puede hacerse mediante técnicas microscópicas, espectrofotométricas, o mediante citometría de flujo.



Tinción con MTT (izqda.) y con azul de Evans (dcha.) de células y protoplastos de café. Tomado de Fernández-Da Silva y Menéndez-Yuffá, 2006 (EJB 9:593).

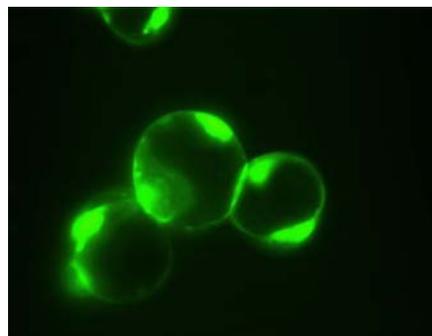
### Caracterización del crecimiento de una suspensión celular



Gamay en G20

Tinción con diacetato de fluoresceína

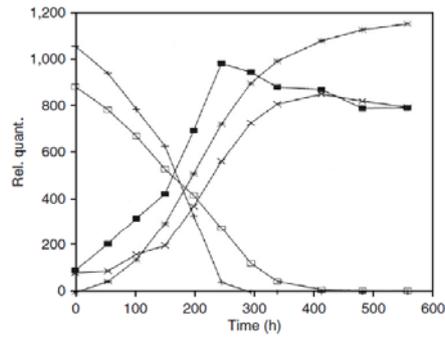
Gamay en G15



Imágenes cedidas por la Dra. Pedreño

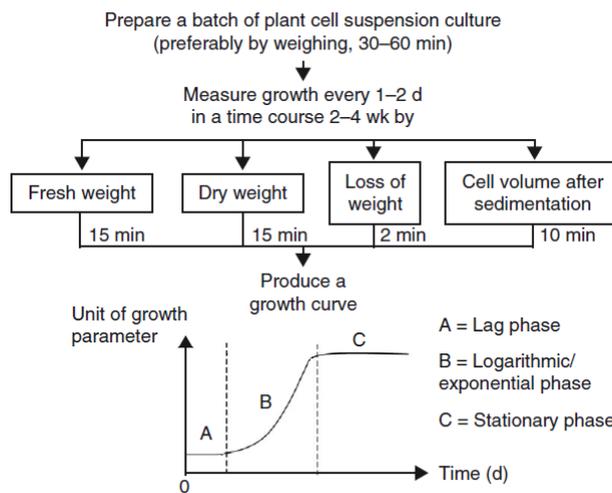
**Caracterización del crecimiento de una suspensión celular**

• Otras determinaciones – Cambios en el volumen celular, agregación celular, niveles y patrones proteicos, ADN, nutrientes y metabolitos, etc. Estas determinaciones complementan a las anteriormente descritas.



Comparación de varios métodos para la caracterización del crecimiento de una suspensión celular de *Catharanthus roseus*. Peso seco (■, 1000=1 g por frasco), carbohidratos en el medio (+, 1000=8 mmol eq. monómero por frasco), nitrato en el medio (□, 1000= 3 g l<sup>-1</sup>), pérdida de peso por desasimilación (\*, 1000=500 mg), peso fresco (x, 1000=20 g por frasco). Tomado de Mustafa et al., 2011 (Nature Protocols 6:715).

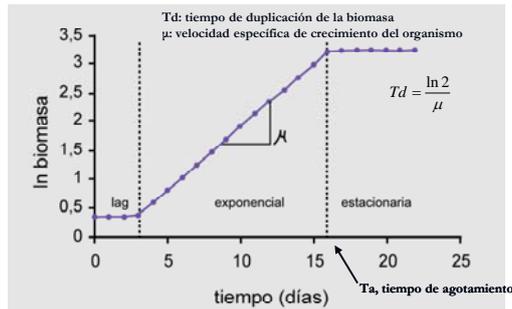
**Caracterización del crecimiento de una suspensión celular**



Esquema con el procedimiento a seguir para caracterizar el crecimiento de una suspensión celular. Adaptado de Mustafa et al., 2011 (Nature Protocols 6:715).

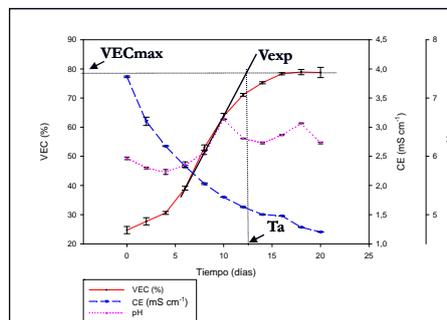
### Caracterización del crecimiento de una suspensión celular

- Fase de latencia (lag): Las células activan el metabolismo para la proliferación celular. Se produce un aumento de ATP y poder reductor, así como de la síntesis de ADN y proteínas.
- Fase exponencial: Priman los procesos de división celular, por lo que baja el volumen celular y aumenta el número de células. Al final de esta fase cesa la división, normalmente, por agotamiento de algún nutriente.
- Fase estacionaria: Cesa la proliferación y disminuyen la síntesis de proteínas y la respiración celular. Aumenta el grado de vacuolización y los procesos de diferenciación llevan a la síntesis de metabolitos secundarios, entre otros cambios.



Curva de crecimiento característica de una suspensión celular con indicación de algunos parámetros que pueden calcularse a partir de la misma. Adaptado de Mentaberry, 2010 (Conceptos y Técnicas de Biotecnología)

### Curva de crecimiento de una suspensión celular derivada de frutos de tomate Microtom



### Guía de problemas durante la inducción y el mantenimiento de un cultivo celular

Problema	Posible causa	Solución
Contaminación en callos	Fallo en la técnica aséptica durante el establecimiento y mantenimiento	Revisar procedimiento y estado de los agentes antisépticos
Contaminación en suspensiones celulares	Fallo en las condiciones de asepsia durante la iniciación y mantenimiento	Revisar procedimiento y estado de los agentes antisépticos
Crecimiento nulo o bajo de cultivos celulares	Medio inadecuado para ese material	Iniciar cultivos con diferentes medios
	Concentración de fitoreguladores inapropiada	Probar diferentes compuestos a diferentes relaciones de concentración
	Condiciones de cultivo no adecuadas	Cambiar condiciones de incubación (luz, fotoperiodo, velocidad de agitación, etc.)
	Densidad de inóculo muy baja	Aumentar la cantidad de inóculo, especialmente en la iniciación
	Medio nutritivo pobre	Añadir suplemento orgánico (ej. fuente de nitrógeno reducido)
	Cierre de frascos no permite ventilación	Utilizar cierres de algodón o silicona que tengan tasas de intercambio gaseoso reproducibles

### Guía de problemas durante la inducción y el mantenimiento de un cultivo celular

Problema	Posible causa	Solución
Pardeamiento	Fenoles	Añadir PVPP o carbón activo
	Tiempo entre subcultivos muy largo	Hacer subcultivos en medio líquido más frecuentes o plaqueros
	Medio inadecuado	Cambiar el medio, probar diferentes reguladores
Grandes agregados	Tiempo entre subcultivos muy largo	Quitar agregados por tamizado o decantación. Añadir pectinasa
	Aireación deficiente. Volumen de suspensión en el frasco muy alto	Reducir el volumen de suspensión
Curva de crecimiento no reproducible	Tras la filtración de células, cantidad de agua variable	Utilizar la misma fuerza de succión, durante el mismo tiempo y, si es posible, el mismo operador
	Al secar la muestra queda agua	Secar muestras en condiciones idénticas
	Diferentes frascos de cultivo utilizados	Usar los mismos frascos. Hay métodos muy sensibles a este factor
Inconsistencia de resultados analíticos	Uso de células de diferentes lotes para iniciar experimento	Mezclar bien todas las células en un frasco antes de iniciar las inoculaciones

### APLICACIONES DE LAS LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS

- Organogénesis *in vitro* → Medio sólido/líquido variando la concentración hormonal
- Embriogénesis somática → Medio sólido/líquido con hormonas
- Obtención, fusión e hibridación somática de protoplastos (mejora)
- Producción de metabolitos y proteínas → en sistemas en discontinuo (matraces agitados) o continuos (biorreactores)

