

# Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato)

## Callus formation of cell suspensions in *Uncaria tomentosa* (cat's claw)

Laura Sánchez-Calvo<sup>1</sup>, Silvana Alvarenga-Venutolo<sup>2</sup>

---

*Fecha de recepción: 21 de enero del 2014*

*Fecha de aprobación: 3 de mayo del 2014*

Sánchez-Calvo, L; Alvarenga-Venutolo, S. Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*. Vol. 28, N° 1, Enero-Marzo. Pág 105-120.

<sup>1</sup> Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot). CENAT. Costa Rica. Correo electrónico: lasanchez@cenat.ac.cr

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: savenutolo2208@gmail.com

## Palabras clave

*Uncaria tomentosa*; callogénesis; suspensiones celulares; cinética de crecimiento.

## Resumen

*Uncaria tomentosa*, conocida como uña de gato, es una planta medicinal originaria de Perú que se emplea en medicina natural, principalmente como antiinflamatoria, inmunoestimulante, antioxidante y citotóxica en varias líneas celulares cancerígenas (HL-60, A549 y HEp-3).

Es necesario crear estrategias biotecnológicas para el estudio y extracción de los compuestos activos de esta planta, tales como el cultivo de células en biorreactores, lo que permitiría la producción de los metabolitos secundarios a gran escala, bajo condiciones controladas.

Previamente al escalamiento del cultivo, es necesario estandarizar los protocolos de callogénesis y de establecimiento de suspensiones celulares.

En el presente trabajo se probaron dos protocolos de inducción de callo a partir de segmentos foliares de plantas *in vitro* de *Uncaria tomentosa*. Posteriormente se estableció el cultivo de células en suspensión. Se elaboraron las cinéticas de crecimiento del proceso de callogénesis y del cultivo en suspensión.

Se determinó que la composición del medio de cultivo más efectivo para la inducción de callo es el Murashige y Skoog (MS) (1962) complementado con 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mg/L de ácido 3-indolbutírico (AIB). Además de que produjo la mayor biomasa, el callo fue friable, adecuado para el establecimiento de suspensiones celulares.

En el cultivo de células en suspensión se utilizó el medio de cultivo más efectivo en el proceso de callogénesis, anteriormente citado. Además, se evidenció la predominancia de dos morfotipos de células, tanto en callo como en suspensiones celulares, con características propias, según la etapa de cultivo.

## Keywords

*Uncaria tomentosa*; cat's claw; callus formation; cell suspensions; growth kinetics.

## Abstract

*Uncaria tomentosa*, known as cat's claw, is a medicinal plant native to Peru, used in herbal medicine, mainly as anti-inflammatory, immune stimulant, antioxidant and cyto toxic in several cancer cell lines (HL-60, A549 and HEp-3).

It's necessary to generate biotechnological strategies for studying and extraction of active compounds from the plant, such as cell cultures in bioreactors. Allowing the production of secondary metabolites scale under controlled conditions.

Prior to the escalation of the crop, it is necessary to standardize protocols callus induction and cell suspension setting.

In the present work we tested two protocols callus induction from leaf segments vitroplants *Uncaria tomentosa*. Subsequently established in cell culture suspension. Were prepared growth kinetics of the process of callus formation and suspension culture.

It was determined that the composition of the most effective medium for callus induction was Murashige and Skoog (MS) (1962) supplemented with 2 mg/L 2,4-Dichlorophenoxyacetic

acid (2,4-D) and 1 mg/L 3-Indole butyric acid (IBA). Besides that produced the highest biomass, the callus was friable, suitable for establishment of cell suspensions. The cell culture suspension was used in the culture medium more effective in the process of callus formation, cited above. Furthermore, it showed the predominance of two morphological types of cells, in both, callus and cell suspensions with characteristics depending on the cultivation stage.

## Introducción

Las plantas tienen la capacidad de producir gran cantidad de compuestos bioactivos como parte de su metabolismo secundario, algunos de uso medicinal. En la mayoría de los casos, estos compuestos no participan en procesos bioquímicos vitales pero desempeñan un importante rol en la interacción planta-ambiente, como defensa contra depredadores (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003), funciones alelopáticas y atracción de polinizadores, entre otras (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007; Rodríguez et al., 2007).

Entre las especies de plantas con propiedades medicinales destaca *Uncaria tomentosa*, denominada comúnmente uña de gato o bejuco de agua, que es una liana originaria de América del Sur, específicamente de Colombia y Perú. Se distribuye por la Amazonia brasileña, Ecuador, Bolivia y la región atlántica de los países centroamericanos (Zevallos y Tomazello, 2006; Alvarenga et al., 2008).

Se ha demostrado la efectividad de *U. tomentosa* en el tratamiento de enfermedades como la gastritis, úlceras gástricas, diferentes tipos de cáncer, artritis y asma; al mismo tiempo, existe evidencia de su actividad inmunoestimulante, citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante (Gonçalves et al., 2005; Carvalho et al., 2006).

Las propiedades medicinales de la uña de gato se atribuyen a la síntesis de gran cantidad de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, glicósidos triterpenoides, esteroides y flavonoides, flavonas y fenoles (Alvarenga, 2010; Heitzmam et al., 2005; Laus, 2004). Los alcaloides pentacíclicos tienen gran relevancia farmacológica, ya que se consideran responsables de la actividad inmunoestimulante y citotóxica en varias líneas de cáncer (Trejo-Tapia et al., 2005).

Actualmente existe una gran demanda comercial de los extractos de *U. tomentosa*, a raíz del descubrimiento de la actividad biológica de la planta desde hace más de tres décadas, incrementada por las manifestaciones de su poder curativo basado en su acción inmunoestimulante, documentada en enfermos de cáncer y sida y la factibilidad de su uso combinado con antivirales y otros productos relacionados (Obregón, 1997).

Dada la importancia medicinal de esta planta, en los últimos años se han hecho esfuerzos por generar sistemas de cultivo utilizando herramientas biotecnológicas para la producción a gran escala de oxindol-alcaloides, por medio del cultivo de células de esta especie y su escalamiento en biorreactores (Trejo-Tapia et al., 2005).

El cultivo de células vegetales en suspensión es una herramienta que permite conocer diversos aspectos del cultivo, como su comportamiento metabólico, fisiológico y bioquímico, así como controlar y optimizar las condiciones de cultivo para la producción de biomasa, o bien la producción de metabolitos secundarios empleando diferentes elicitores (Moscatiello et al., 2013).

Esta estrategia requiere un proceso inicial que incluye la formación de callo friable y posteriormente el establecimiento de suspensiones celulares. Para ello, es necesario conocer la cinética de crecimiento de las células y su comportamiento en estos sistemas, para así estimar

el tiempo requerido de subcultivo y los días en que se produce el crecimiento activo del cultivo celular (Trejo-Tapia et al., 2005; George, 2008).

En la presente investigación se describe el crecimiento de células de *U. tomentosa* en las etapas de callogénesis y el establecimiento de células en suspensión para ser cultivadas en biorreactor.

## Metodología

### Inducción de callogénesis

El estudio se realizó en el Centro de investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en Cartago, durante el año 2010.

En los ensayos de inducción de callo de *U. tomentosa* se empleó tejido foliar de plantas germinadas in vitro a partir de semillas recolectadas en la zona atlántica de Costa Rica, específicamente en la provincia de Limón, en el cantón de Pococí. Las semillas fueron desinfectadas y sembradas en un medio de cultivo semisólido M&S (1962), con 3% de sacarosa, y cuando tenían una semana de haber germinado se subcultivaron en un medio basal, suplementado con 1 mg/L de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) durante 22 días.

Se probaron dos tratamientos en medios de cultivo semisólidos para la inducción de callo a partir de segmentos foliares de *U. tomentosa* in vitro. El tratamiento 1 consistió en un medio basal con sales y vitaminas Murashige y Skoog (M&S, 1962) con 3% (m/v) de sacarosa y suplementado con 1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mg/L de ácido 3-indolbutírico (AIB), mientras que el tratamiento 2 fue suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de AIB. Ambos medios de cultivo fueron gelificados con 8g/L de agar y se ajustó el pH a 5,7. Además se sembró un tratamiento control, con sales M&S (1962), fuente de carbono y sin reguladores de crecimiento.

Los segmentos de hoja incluían vena media y tenían un área superficial de 1 cm<sup>2</sup>, en la cual se realizaron pequeñas cortaduras con el bisturí. Se inocularon dos explantes por frasco de cultivo, ambos con la superficie abaxial en contacto con el medio, y se mantuvieron en condiciones de oscuridad a una temperatura aproximada de 27 °C ± 2 °C durante 30 días. Se trabajó con un total de 96 repeticiones por tratamiento.

Con el fin de determinar la producción de callo, a los 37 días de cultivo se calculó el peso fresco y el peso seco (g) de los callos inducidos en los tratamientos empleados. Se tomó una muestra al azar de 26 callos por tratamiento, se pesaron en fresco, empleando una balanza analítica, inmediatamente después de ser retirados del frasco de cultivo. Para la obtención del peso seco, los callos se sometieron a un proceso de secado en una estufa a 70 °C durante 24 horas. Posteriormente, con los datos obtenidos, se realizó el análisis ANOVA con un 95% de confianza, con el programa estadístico Minitab 15.1.0.0. Se hicieron observaciones sobre la friabilidad y color del callo.

### Curvas de crecimiento de callo

A los 27 días del cultivo inicial ya se mostraba callo debidamente formado, por lo cual se subcultivó 1,00 g de callo procedente del tratamiento 2 en un medio de cultivo con la misma composición, para trazar la cinética de crecimiento. Se tomaron tres muestras cada dos días hasta que los callos presentaron síntomas de muerte celular. Se determinó el peso fresco y seco (mg) de los callos, siguiendo el protocolo de Trejo y colaboradores (2007).

### Estudio de la morfología celular en las diferentes etapas de callo

Para el análisis histológico del callo se realizaron observaciones de células en las diferentes etapas (fase *lag*, exponencial y de muerte), proveniente del tratamiento 2, es decir, el medio de cultivo M&S (1962) suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de AIB, subcultivado en el mismo medio. Se tomó una muestra de callo y se colocó en un portaobjetos con una gota de agua destilada. Además, se realizaron observaciones de las células teñidas con Azul de Evans a una concentración de 0,05 M, para determinar su viabilidad.

### Establecimiento y cinética de crecimiento de suspensiones celulares

De acuerdo con la curva de crecimiento obtenida, se utilizaron callos provenientes del tratamiento 2, subcultivados en el mismo medio de inducción y en etapa exponencial, para establecer los tratamientos de suspensiones celulares, según el protocolo de Rodríguez-Monroy (2009, com. pers.). El medio de cultivo líquido empleado en esta etapa consistió en sales M&S (1962), suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de AIB, con 30g/L de sacarosa (el mismo medio de inducción de callo). Se inocularon en total 30 Erlenmeyer, manteniendo una relación de medio de 1/5 del volumen del Erlenmeyer, es decir, 25 ml de medio de cultivo en Erlenmeyer de 150 ml y se colocaron en agitación orbital de 100rpm.

A los 10 días de transferencia de los callos al medio líquido, las células se dejaron asentar, manteniéndolas sin agitación por 20 minutos, y se descartó el sobrenadante (medio de cultivo con restos de células muertas), procurando que las células y los agregados se mantuvieran en el matraz, al que se agregó medio de cultivo fresco, hasta completar nuevamente el volumen establecido inicialmente.

Diez días después (día 20 desde la inoculación inicial), se repitió el procedimiento anteriormente descrito, con la diferencia de que, una vez colocado el medio fresco, se pusieron en agitación nuevamente los Erlenmeyer a 100rpm durante 5 minutos. Una vez transcurrido ese lapso, se traspasó el contenido de dos Erlenmeyer de 125ml a uno de 250 ml, procurando que los grumos y agregados visiblemente más grandes no fueran transferidos, con el fin de ir estableciendo suspensiones celulares finas y eliminando dichos agregados.

Una vez que se obtuvo una suspensión celular fina y transcurridos 10 días después del último cambio de medio, se filtraron las suspensiones haciendo uso de un tamiz de 80 mesh, con el fin de recuperar células.

Se establecieron suspensiones en 32 Erlenmeyer de 125 ml que contenían 1 g de las células retenidas en el tamiz, en 25 ml de medio de cultivo.

Para trazar la curva se tomó una muestra de 10 ml de suspensión celular de tres Erlenmeyer diferentes, agitándolos manualmente en el momento del muestreo para lograr homogeneidad. Cada muestra se procesó por separado y los muestreos se realizaron cada tres días durante 33 días.

Cada muestra fue colocada en un tubo graduado y se dejó sedimentar durante una hora, con el fin de determinar el volumen celular empacado, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ PCV} = (\text{vol. celular sedimentado} / \text{volumen total}) \times 100$$

Las muestras se filtraron al vacío con un papel filtro Albet 502, con un poro de 7 µm a 11 µm de diámetro. Los papeles filtro fueron pesados previamente, tanto en fresco como en seco, empleando una balanza analítica.

Una vez filtradas las muestras, se pesaron en fresco (mg) y se colocaron en una estufa a 70 °C durante 24 horas. Posteriormente, se determinó el peso seco (mg) de las muestras empleando una balanza analítica.

## Estudio de la morfología de las células en suspensión

La morfología celular de las suspensiones celulares se describió mediante la visualización de las células y agregados celulares en el microscopio de luz.

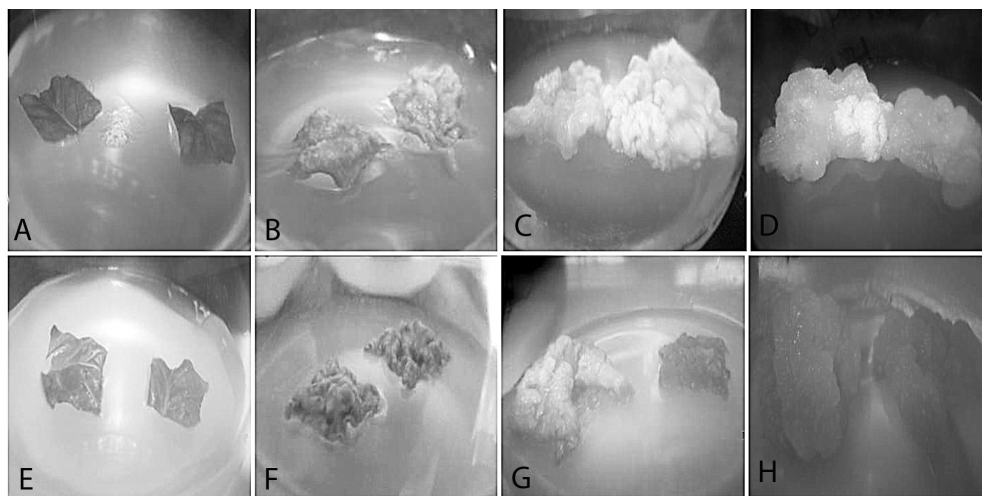
Se realizaron tinciones con Azul de Evans. Para ello se tomaron 0,5 ml de suspensiones celulares y se incubaron en un tubo Eppendorf®, durante 5 minutos con la misma cantidad de Azul de Evans a una concentración de 0,05M a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron las observaciones en el microscopio de luz.

Además, se realizaron tinciones con diacetato de fluoresceína (DFA). Se preparó una solución madre con concentración de 1000µg/ml. Se elaboró una solución de trabajo, diluyendo 10µl de la solución madre en 990µl de agua destilada. Finalmente, se tomó una muestra de 500µl de la suspensión celular y se colocó en un tubo Eppendorf® con la misma cantidad de solución de trabajo. Se colocaron 100µl de la muestra en un portaobjetos y las células se visualizaron en el microscopio de fluorescencia.

## Resultados y discusión

### Inducción de callogénesis

Se obtuvo la inducción de callo friable en ambos tratamientos evaluados, con una respuesta muy similar entre sí. Los segmentos de hoja se mantuvieron verdes desde el momento de la inoculación hasta el día 10, a partir del cual se observó un cambio en la coloración de las hojas, que empezaron a mostrarse amarillentas y engrosadas por sectores, principalmente cerca de las regiones de corte, mientras que al día 15 se pudo observar la formación de callo como tal (figura 1).



**Figura 1.** Inducción de callo a partir de segmentos de hoja de *Uncaria tomentosa*. Tratamiento 1 (suplementado con 1 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de AIB): A) Día 5 de cultivo. B) Día 10. C) Día 18. D) Día 27. Tratamiento 2 (suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de AIB): E) Día 5 de cultivo. F) Día 10. G) Día 18. H) Día 27.

En el tratamiento control (desprovisto de reguladores de crecimiento) no se produjo callo, las hojas se mantuvieron verdes durante los primeros 15 días y posteriormente empezaron a necrosarse por sectores, hasta que las células murieron.

Esta respuesta evidencia que la composición básica del medio de cultivo suplementado con los reguladores de crecimiento (2,4-D y AIB) favorecieron la proliferación celular en segmentos de hoja de *U. tomentosa*. Probablemente, esta respuesta se presentó por el efecto sinérgico de la presencia de reguladores endógenos en las condiciones físicas de cultivo, que promovieron modificaciones del metabolismo celular y por consiguiente se indujo la respuesta morfogénica de división en las células (Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2007; George, 2008).

La formación de callo, empleando como regulador de crecimiento el 2,4-D, coincide con investigaciones realizadas, en las que se informa que la presencia de esta auxina induce la callogénesis utilizando como explante inicial segmentos de hoja de *U. tomentosa* (Alvarenga et al., 2002).

La influencia de auxinas en la formación de callo podría estar relacionada con la capacidad que tienen estos compuestos de estimular la división de las células e influir indirectamente en la regulación del ciclo celular, estimulando notablemente la expresión de ciclinas a nivel transcripcional, por ejemplo, las de tipo D, desencadenando la activación de las quinasas necesarias para la etapa G1 del ciclo celular (Arellano et al., 2008).

En la etapa G1, período en el que las células crecen y acumulan nutrientes, se reporta que las auxinas y las citocininas inducen la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular (Smith y Atkins 2002; Jurado, 2010).

La inducción del callo se evidenció inicialmente en las zonas de corte (bordes) y en las regiones de incisión de las hojas, posiblemente debido a la tendencia de los tejidos vegetales a formar callo a partir de las heridas como una reacción defensiva natural (George, 2008). En condiciones in vitro, las auxinas promueven mayor división celular en las zonas de corte del explante, donde se observó una capa fina de células que, días después, inician la etapa de proliferación masiva y, por consiguiente, la formación del callo (Gallardo et al.; 2004; Krikorian, 1995).

Al colocar los callos en medio líquido se observó una disgregación aproximadamente de un 75% a un 85% después de siete días en agitación de 100rpm, por lo cual los callos se consideran friables, con textura suave, aparentemente apta para el establecimiento de suspensiones celulares. Cabe destacar que este dato se determinó de manera cualitativa, mediante la observación del comportamiento de los callos y las suspensiones celulares.

En ensayos realizados en géneros pertenecientes a la familia de las rubiáceas, específicamente en *Borojoa patinoi* y *Coffea arabica*, se ha obtenido buena friabilidad en los callos formados, empleando el regulador de crecimiento 2,4-D como inductor principal, solo o en combinaciones con otras auxinas o citocininas (González, 2003; Martínez et al., 2007).

Los callos se agruparon por color en tres tipos: blanco, amarillo y amarillo pálido translúcido. Los tres tipos de callo fueron friables y se disgregaron fácilmente, sin embargo, el callo translúcido mostró una mayor friabilidad. Algunos callos mostraron los tres fenotipos, mientras que otros presentaron una combinación de los tipos mencionados anteriormente, distribuidos por regiones. Estas diferencias pueden deberse a la variabilidad de los genotipos de las plantas con las que se trabajó en esta fase, debido a que explantes provenían de plántulas germinadas in vitro. Además, en la misma hoja existen diferentes tipos de tejidos que, al proliferar, podrían dar como resultado callo con diferentes tipos celulares, lo cual podría evidenciarse con diferentes coloraciones en el callo (Martínez et al., 2007).

A pesar de que los dos tratamientos indujeron la formación de callo friable cualitativamente similar, el análisis ANOVA de una vía mostró la existencia de diferencias significativas entre ambos, tanto para la variable peso fresco ( $P= 0,000$ ), como peso seco ( $P= 0,000$ ) (Cuadro 1). En este análisis se aplicó la prueba de Tukey con un 95% de confianza (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Biomasa fresca y seca de los callos de *U. tomentosa* inducidos en tratamiento 1 y tratamiento 2 a los 37 días de cultivo.

Tratamiento	Peso fresco promedio (g)	Peso seco promedio (g)
1 M&S (1962) + 1 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de AIB	1,6998 <sup>a</sup>	0,0961 <sup>a</sup>
2 M&S (1962) + 2 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de AIB	2,1554 <sup>b</sup>	0,1301 <sup>b</sup>
Control M&S (1962) sin reguladores de crecimiento	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>

Nota: Datos para la misma variable, con letras diferentes, poseen diferencias estadísticamente significativas, según la Prueba Tukey  $P \leq 0,05$

El tratamiento 2 (2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de AIB) presentó la mayor producción de biomasa seca (0,1301 g) y el mayor peso fresco (2,1554 mg) en las muestras analizadas, mientras que la formación de callo en el tratamiento control fue nula, como se observa en el Cuadro 1. Tomando en cuenta que la única diferencia entre ambos tratamientos fue la concentración del 2,4-D (relación 2:1), puede afirmarse que probablemente la presencia de esta auxina en mayor concentración fue la que indujo una mayor tasa de división celular, evidenciada en las variables de peso fresco y seco.

Se reporta que el 2,4-D es la auxina de mayor empleo y, por ende, más efectiva para la inducción de callo, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (George, 2008). En estas últimas, las concentraciones de mayor uso de este compuesto para la inducción de callo se encuentran generalmente en el rango de 1,1 mg/L a los 3,31 mg/L (Machakova et al., 2008).

Estos resultados coinciden con investigaciones realizadas sobre inducción de callo en *Borojoa patinoi* (Rubiaceae) a partir de tejido foliar, empleando diferentes concentraciones de 2,4-D en condiciones de oscuridad. Se obtuvo que el tratamiento con 2 mg/L de este compuesto presentó valores más altos de peso fresco, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este ensayo (Martínez et al., 2007).

Debido a que el tratamiento 2, con mayor concentración de 2,4-D, mostró rendimientos superiores, se estableció el cultivo de células en suspensión a partir de este tratamiento y se elaboró la curva de crecimiento respectiva.

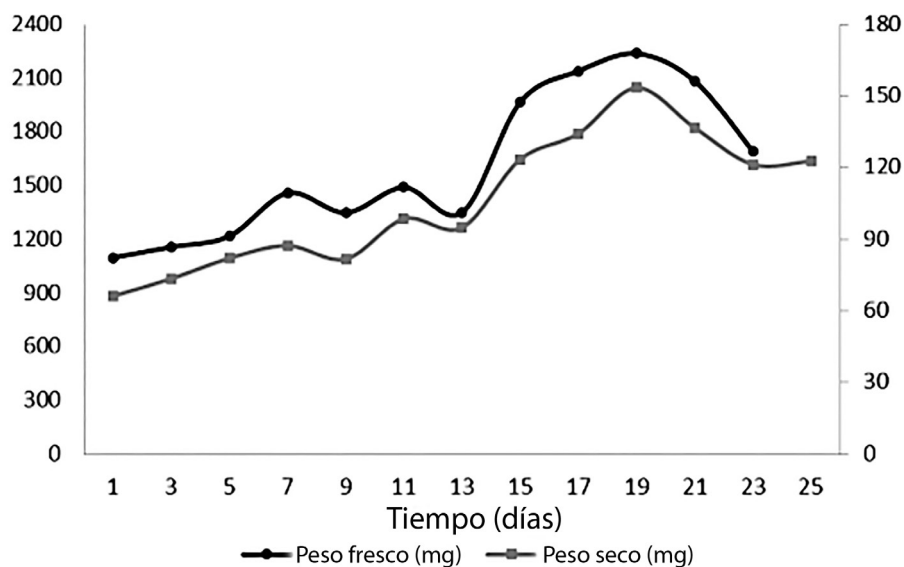
#### Curvas de crecimiento de callo

En la figura 2 se muestra la curva de crecimiento elaborada a partir de callo inducido en el medio 2. Se observa que la mayor producción de biomasa (peso fresco y seco) se registra al día 19 de cultivo, a partir del cual el peso empieza a disminuir.

En la cinética de crecimiento se observa una etapa *lag* de 13 días, en seguida se inicia la etapa de crecimiento exponencial, en la que, como es de esperar, se observan los valores de peso



fresco y seco crecientes, hasta el día 19, en el que se obtuvo el máximo valor tanto de peso fresco como seco (2236,60 mg y 152,37 mg, respectivamente), lo cual indica que el día 19 el callo mostró el máximo incremento con los componentes nutricionales y las condiciones físicas proporcionados (oscuridad y temperatura de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); ese mismo día se inicia la etapa de desaceleración del crecimiento de callo y su muerte.



**Figura 2.** Cinética de crecimiento del callo de *U. tomentosa* subcultivado en el tratamiento 2(M&S (1962), con 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de AIB).

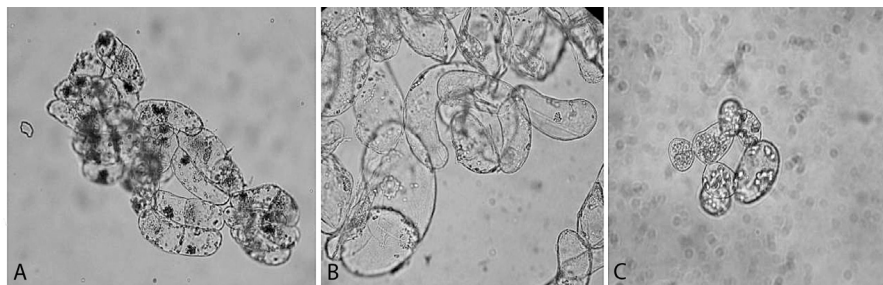
### Estudio de la morfología celular en las diferentes etapas de callo

Al visualizar en el microscopio de luz muestras de callo de *U. tomentosa*, se distinguen células de morfología diversa, con un predominio en número de las células redondeadas y las células alargadas, con presencia de pared celular delgada y con inclusiones citoplasmáticas, principalmente cloroplastos.

Las células alargadas, de forma tubular, probablemente se derivan del mesófilo de empalizada de las hojas y se encuentran diferenciadas. Además, se presentan células redondas, isodiamétricas con menor grado de diferenciación, lo que se evidencia en la escasez de cloroplastos en su interior (González et al., 2010). Estas últimas mostraron inclusiones protoplasmáticas, brillantes en el microscopio de luz, principalmente gránulos de almidón.

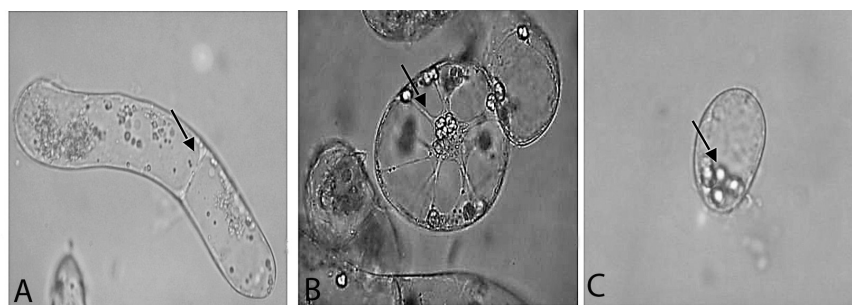
Alvarenga y colaboradores (2002) reportan la existencia de estos dos tipos de células en callo de *U. tomentosa* inducido, de igual manera, con 2 mg/L de 2,4-D, lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

En la etapa inicial (fase *lag*) se observaron claramente los dos tipos de células mencionadas e inclusiones celulares brillantes en el interior de las células, más notorias en las células redondas (figura 3).



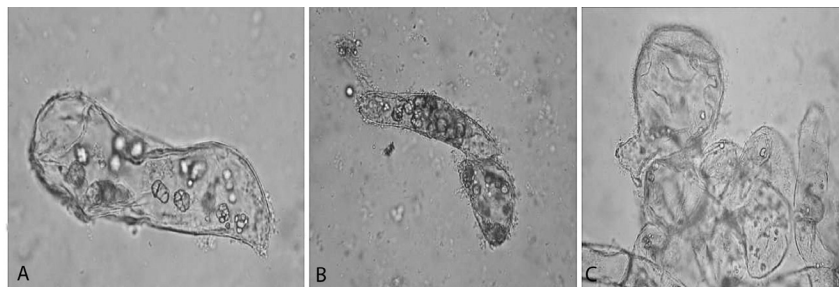
**Figura 3.** Visualización de células de *U. tomentosa* en la fase *lag* de la curva de crecimiento. Aumento 40X. A) Agregado celular. B) Células alargadas. C) Células redondas formando agregados celulares.

En la fase exponencial, se observaron células en etapa de división celular. Como muestra la figura 4, es posible identificar algunas, recientemente divididas, con la placa celular en formación, así como células con fibras visibles del citoesqueleto, propio de la etapa de mitosis (George, 2008). Además, se observaron células redondas con inclusiones citoplasmáticas y células alargadas, procedentes del tejido parenquimático de empalizada de hoja.



**Figura 4.** Visualización de células de *U. tomentosa* en fase exponencial. Aumento 40X. A) Célula en división celular. B) Célula con citoesqueleto visible. C) Célula redonda con inclusiones brillantes en el microscopio de luz.

En la etapa de muerte, que se inició a partir del día 19 de cultivo, las células presentaron necrosis y pérdida de la integridad de la membrana celular, así como falta de turgencia, por lo que se muestran más pequeñas y deformes (figura 5) (Sánchez, 2001).



**Figura 5.** Visualización en el microscopio de luz de células de *U. tomentosa* en fase de muerte. Aumento: 40X. A) Célula con ruptura en la membrana celular. B) Célula alargada y redonda en etapa de muerte. C) Agregado celular plasmolizado.

Con la muerte celular se detienen los procesos biológicos de las células, provocando cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles que les impiden realizar sus funciones vitales. Por esta razón, las células dejan de dividirse y al morir liberan su contenido citoplasmático, lo que coincide con una disminución en el peso fresco y seco del cultivo (Sánchez, 2001).

### Establecimiento y cinética de crecimiento de suspensiones celulares

En el establecimiento de las suspensiones celulares, el callo fue disgregado efectivamente en el medio de cultivo líquido, con agitación orbital, y se obtuvo una suspensión celular fina.

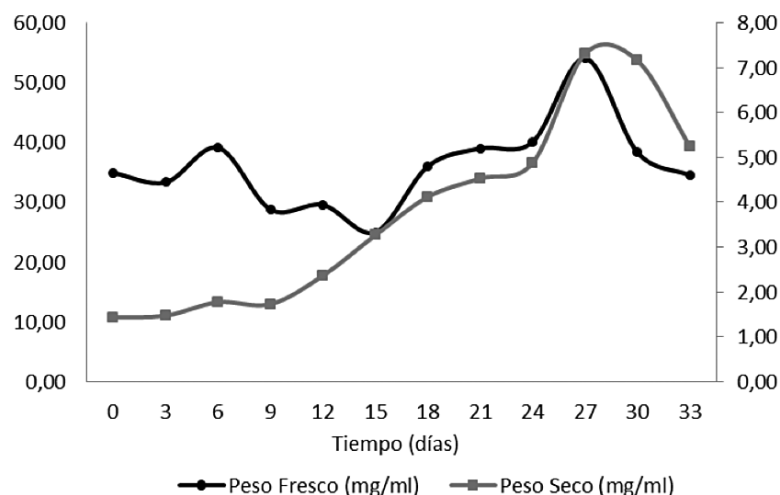
En la figura 6 se ilustran las cinéticas de crecimiento de las células de *U. tomentosa* en suspensión, a partir del peso fresco y la biomasa seca.

En la curva elaborada a partir de la determinación del peso seco se observó una etapa inicial de nueve días, en la que el crecimiento del cultivo fue bajo y lento. Este comportamiento coincide con lo reportado en la literatura durante la fase lag, ya que las células se encuentran en un proceso de adaptación a las nuevas condiciones nutricionales del medio, para luego incrementar la velocidad de división celular durante la fase exponencial (Shigeta et al., 1996).

A partir de la determinación del peso seco, la etapa de crecimiento exponencial comenzó a partir del día 9, mientras que el peso fresco y el volumen celular empacado señalan el día 15 como inicio de la fase exponencial. Estas variantes pueden deberse a diferencias entre los métodos empleados para medir el crecimiento, o bien a una imprecisión en la medición del peso fresco y volumen celular empacado del día 15, ya que no se espera una disminución en la concentración celular una vez iniciado el crecimiento, cuando las condiciones se mantienen constantes.

La etapa exponencial se caracterizó por un incremento de biomasa, como indicador de una mayor concentración celular a consecuencia de la división activa de las células (figura 6).

En las curvas trazadas con base en la biomasa se presentó un valor máximo al día 27 de cultivo, en el que concluye la fase exponencial, con pesos de 54,07 mg de peso fresco por mililitro y 7,32 mg de peso seco por mililitro de suspensión celular. Esto se debe a que en la fase exponencial las células jóvenes y activas biológicamente alcanzan su máxima tasa de división (Freire, 2003).



**Figura 6.** Cinética de crecimiento de suspensiones celulares de *U. tomentosa*, considerando peso fresco y peso seco.

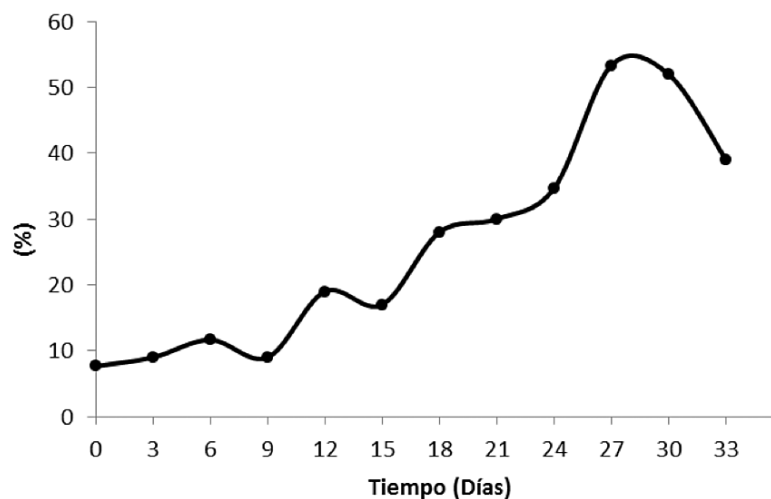
Según lo reportado por Caballero y Cardona (2007), bajas densidades de inóculo o grandes cantidades de nutrientes pueden prolongar la fase *lag* y exponencial, y se espera que estas etapas sean más cortas al emplear un inóculo inicial mayor.

La fase estacionaria del cultivo fue muy corta o casi inexistente, ya que a partir del día 27 de cultivo se inició la etapa de muerte, probablemente debido a que, al alcanzar el número máximo de células, se produce una rápida lisis y muerte de las células a consecuencia del consumo de nutrientes en el medio de cultivo (Caballero y Cardona, 2007). En esta etapa se observó una coloración más oscura en las suspensiones celulares y microscópicamente las células mostraron daños a nivel de membrana.

Alvarenga y colaboradores (2008) elaboraron curvas de crecimiento en esta especie, empleando una cantidad tres veces mayor de células iniciales. Se obtuvo el valor máximo en el día 12 de cultivo, lo que demuestra que una mayor biomasa de células iniciales provoca una cinética de crecimiento corta, mientras que una cantidad baja de células iniciales genera una curva de crecimiento más extensa, a consecuencia de una mayor disponibilidad de nutrientes, lo que provoca menor estrés por compuestos limitantes en el medio de cultivo (Bedoya y Hoyos, 2010).

Con base en la cinética de crecimiento, es necesario realizar los subcultivos a la mitad de la fase exponencial, es decir, cerca del día 21, para garantizar que las células se encuentran en crecimiento activo.

La curva de crecimiento elaborada con base en el volumen celular empacado (VCE) mostró correspondencia con las etapas de las cinéticas de crecimiento realizadas con base en el peso seco de las suspensiones y resultó muy cercana a las elaboradas con base al peso fresco (figura 7).



**Figura 7.** Cinética de crecimiento para suspensiones celulares de *U. tomentosa* a partir de la determinación del volumen celular empacado.

### Estudio de la morfología de las células en suspensión

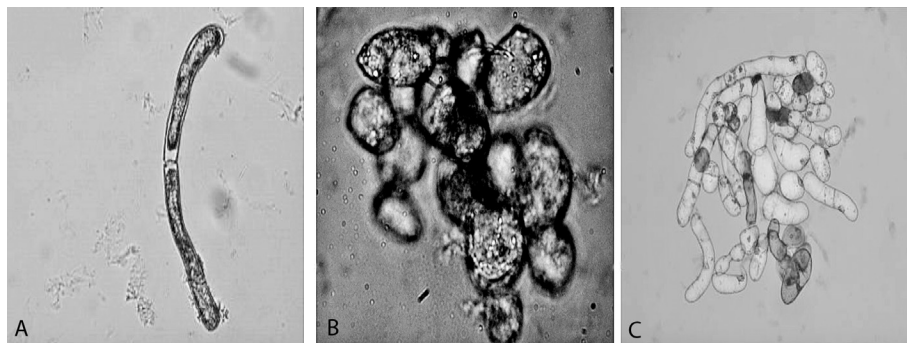
En cuanto al análisis microscópico del cultivo en suspensión, se observaron dos tipos de células, unas alargadas y otras redondas, con pared celular gruesa, en su mayoría viables, con inclusiones amarillentas y brillantes en el microscopio de luz (figura 8).

Se determinó que las células en suspensión forman agregados pequeños, de 10 a 20 células aproximadamente, aunque también fue posible visualizar células individuales en suspensión. La formación de agregados celulares pequeños es muy característica de las células vegetales en suspensión, lo que probablemente se debe a que las células, al dividirse, no se separan adecuadamente o bien se asocian posteriormente (Arias et al., 2009; Mustafa et al., 2011).

En la etapa de crecimiento exponencial se visualizaron células que se encontraban en división celular, mostrando el tabique en la región ecuatorial de éstas, mientras que en otras se dio evidencia de formación del huso mitótico (figura 8A).

En las fases *lag* y exponencial de la curva de crecimiento de las suspensiones celulares, tratadas con DFA y observadas en el microscopio de fluorescencia, se pudo observar la presencia de células fluorescentes, por lo que se deduce que las células estaban vivas, debido a que, por su actividad enzimática interna (acción de las esterasas citoplasmáticas), son capaces de hidrolizar el DFA para originar fluoresceína, compuesto que al exponerse a una fuente de luz de alta intensidad (en este caso una lámpara de mercurio) es excitado y libera energía en una longitud de onda tal que se puede observar de coloración verde fluorescente (figura 8B) (Brigham et al., 1995; Maestú et al., 2008).

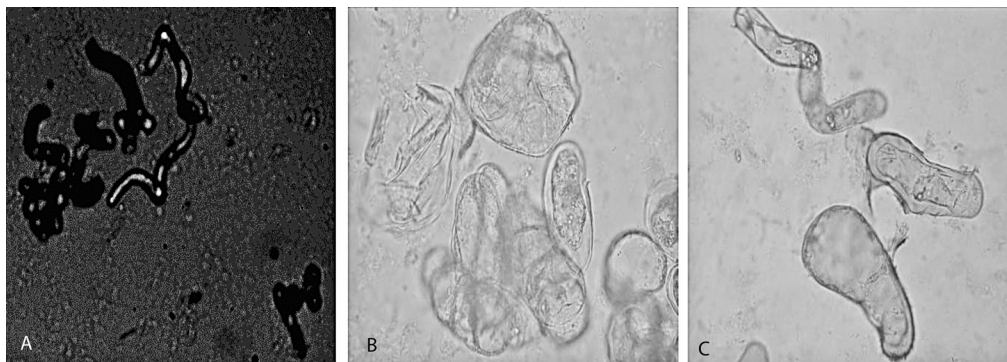
Al teñir las células con Azul de Evans, se observó la integridad de la membrana en la fase *lag* y exponencial, es decir, que no permiten la entrada del colorante, y, por consiguiente, se observan sin teñir, por lo que son células viables (figura 8C) (Herrera y Rodríguez, 2008).



**Figura 8.** Visualización en el microscopio de células de *U. tomentosa* en fase exponencial con aumento de 40X. A) Microscopía de luz. B) Microscopía de fluorescencia. C) Tinción con Azul de Evans.

En la etapa de muerte de las células en suspensión se pudo evidenciar que el cultivo empezó a perder viabilidad, ya que de manera cualitativa se determinó la disminución de células fluorescentes. Por otra parte, las células mostraron coloración azul al aplicar el Azul de Evans, tal como se muestra en la figura 9.

En esta misma fase, las células presentaron daños en la membrana celular que provocaron plasmólisis, es decir, una pérdida en la turgencia, mostrándose irregulares y con apariencia "arrugada". Este comportamiento es propio de esta fase de la cinética de las células, evidenciándose en la disminución del peso fresco y seco del cultivo. La etapa de muerte en las suspensiones celulares se presenta a menudo por la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), como consecuencia del metabolismo celular (Trejo-Tapia et al., 2007). Los ROS provocan estrés oxidativo en las células y activan las enzimas oxidasas. En algunos casos, las células liberan fenoles al medio de cultivo y estos provocan un efecto tóxico, que evita la proliferación y si no son retirados del medio causan la muerte celular (Ogita, 2005; Azofeifa, 2009).



**Figura 9.** Visualización en el microscopio de células en suspensión de *U. tomentosa* en fase de muerte. A) Microscopía de fluorescencia (10X). B) Microscopio de luz (40X). C) Tinción con azul de Evans (40X).

Para concluir, se debe resaltar que el medio de cultivo M&S (1962) con 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de AIB y 3% de sacarosa fue efectivo en la inducción de callo friable, y produjo la mayor cantidad de biomasa fresca y seca en el cultivo de células en suspensión.

## Agradecimientos

Las autoras agradecen al Dr. Mario Rodríguez-Monroy, del Centro de Productos Bióticos (CEPROBI), y al Instituto Politécnico Nacional de México (IPN), por el conocimiento, información y capacitación brindados. También al Ing. Carlos Alvarado, del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por los aportes y seguimiento a la investigación, así como la revisión del documento.

## Bibliografía

- Alvarenga, S., Alán, E. & Peraza, J. (2002). *Informe Final. Estudio de la biología, la propagación vegetativa y el cultivo in vitro de Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). Cartago, C.R.: Fundación Neotrópica-ITCR.
- Alvarenga, S., Arnáez, E., Moreira, I., Alán, E., Peraza, J., Romero, E., Vargas, W., Loaiza, J. & Barrios, M. (2008). Domesticación de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) en Costa Rica. En R. Oliver, Tabeada, M. y Granjeno, A. (Comp.). *Manejo integrado de Recursos Bióticos*. AGT Editor S.A.
- Alvarenga, S. (2010). Establecimiento in vitro y cultivo de células de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) (Willd.) D.C. *Tecnología en marcha*, 23(5), 24-33.
- Arellano, Y., García, E. & Vázquez, J. (2008). Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia*, 42(6), 637-644.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C. & Restrepo, J. (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *DYNA*, 76(157), 109-121.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Bedoya, J. C. & Hoyos R. A. (2010). Efecto de la relación agitación-aireación sobre el crecimiento celular y la producción de azadiractina en cultivos celulares de *Azadirachta indica* A. Juss. *Rev. Fac. Nal. Agr.*, 63(1), 5293-5305.
- Brigham, L. A., Woo, H. H. & Hawes, M. C. (1995). Root border cells as tools in plant cell studies. *Methods Cell Biol.* 49, 377-387.
- Caballero, C. & Cardona, N. (2007). *Evaluación del crecimiento celular y consumo de sustrato a partir del establecimiento de suspensiones celulares de Borojoa patinoi* Cuatrec. Obtenido de <http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.6CDC112/marcoTeorico.pdf>
- Carvalho, M. V., Penido, C., Siani, A. C., Valente, L. M. M. & Henriques, M. G. O. (2006). *Inflammopharmacology*, 14(48).

- Estrada, M., Vernon, E. & Cruz, F. (Eds.). (2007). *Inducción de callo en la planta medicinal Buddleja cordata Kunth (tepozán)*. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (12, Morelia, Michoacán). México, DF.
- Gallardo, J., Gómez, R., Tejeda, M., Posada, L., Herrera, I., Reyes, M., García, L. & Freire, M. (2004). Empleo de secciones de tallo de plantas *in vitro* de papaya (híbrido IBP 42-99) para obtener callos con estructuras embrionarias. *Biotecnología Vegetal*, 4(4), 213-216.
- George, E. F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. En E. F. George, M. A. Hall y G. De Klerk (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. The Netherlands: Springer.
- Gonçalves, C., Dinis, T. & Batista, M. T. (2005). Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66, 89-98.
- González, V. (2003). Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios de cafeto (*Coffea canerophora* P). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), 16-22.
- González, O. S., Sam, O., Hernández, M., Coronado, M. J. & Silva, J. J. (2010). Estudios histológicos de la embriogénesis somática: una necesidad para el conocimiento de los procesos biotecnológicos y la biodiversidad en el cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) LAM. *Cuadernos de Biodiversidad* 23-28.
- Heitzmam, M., Neto, C. C., Winiarz, E., Vaisberg, A. J. & Hammond, G. B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 66, 5-29.
- Herrera, M. & Rodríguez, A. (2008). Evaluación del crecimiento, actividad de hemoperoxidasas y remoción de fenantreno de los cultivos celulares de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*. *Polibotánica*, 25, 101-119.
- Jurado, S. (2010). *Estudio de la proteína F-box SKP2A de Arabidopsis thaliana en la división celular y en la respuesta a auxina*. Tesis Dr. Biol. Universidad Complutense de Madrid.
- Krikorian, A. D. (1995). Hormones in tissue culture and micropropagation. En P. J. Davies (Ed.). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. The Netherlands: Kluwer Acad. Publ.
- Laus, G. (2004). Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. *Phytother. Res.* 18, 259-274.
- Machakova, I., Zazimalova, E. & George, E. F. (2008). En E. F. George, M. A. Hall y G. De Klerk (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. The Netherlands: Springer.
- Maestú, F., Ríos, M. & Cabestrero, R. (2008). *Neuroimagen: Técnicas y procesos cognitivos*. Barcelona: Ed. Masson.
- Martínez, M., Hernández, C. A. & Restrepo, L. F. (2007). Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borjón (*Borojoa patinoi* CUATR.) Fase I. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 45-55.
- Moscatiello, R., Baldan, B. & Navazio, L. (2013). Plant Cell Suspension Cultures. En Maathuis, F. J. M. (Ed.). *Plant Mineral Nutrients: Methods in Molecular Biology*. Vol. 953. Springer.
- Murashige, T. & Skoog, G. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- Mustafa, N., De Winter, W., Van Iren, F. & Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6(6), 715-742.
- Obregón, V. L. (1997). Uña de gato (Cat's claw). Género *Uncaria*. Estudios botánicos químicos y farmacocinéticos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. 3 ed. Perú.
- Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*, 22, 119-125.
- Rodríguez-Monroy, M. (2009). *Protocolos de inducción de callo y establecimiento in vitro de células en suspensión de U. tomentosa*. Morelos, México: CEPROBI (Centro de Desarrollo de Productos Bióticos), IPN (Instituto Politécnico Nacional).
- Rodríguez, J., Sanabria, M., Rodríguez D. & Rangel, M. (2007). *Determinación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de Lippia organoides*. XVII Con. Ven. Bot. 705-708.
- Sánchez, V. (2001). Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Rev. Cubana Invest. Biomed*, 20(4), 266-74.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. & Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-362.
- Shigeta, J., Sato, K. & Mii, M. (1996). Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science*, 115, 109-114.

- Smith, P. M., Atkins & C. A. (2002). Purine biosynthesis: Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology*, 128, 793-802.
- Trejo, G., Cerda, C., Rodríguez, M. & Ramos, A. (2005). Monoterpenoid Oxindole Alkaloid Production by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. Cell Suspension Cultures in a Stirred Tank Bioreactor. *Biotechnology Progress*, 21(3), 786-792.
- Trejo, G., Sepúlveda, G., Trejo, J., Cerda, C., De la Torre, M., Rodríguez, M. & Ramos, A. (2007). Hydrodynamic Stress Induces Monoterpenoid Oxindole Alkaloid Accumulation by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. Cell Suspension Cultures via Oxidative Burst. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 230-238.
- Trejo-Tapia, G. & Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro* *Interciencia*, 32(10), 669-674.
- Zevallos, P. & Tomazello, M. (2006). Anatomia do lenho de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* (Rubiaceae) do Estado do Acre, Brasil. *Acta Amazônica*, 36(2), 169-176.