

“Determinación de las condiciones óptimas para la obtención de protoplastos de *Solanum torvum* y *Solanum hispidum*, *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris* para obtener híbridos somáticos por medio de electrofusión.”

Jiménez Ramírez M*. , González Rojas J. A^{1*}. , Ostria Ostria P*. , Pérez Medina M. A*.

*Alumnos del tercer semestre de la carrera de Biología Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM México.

¹⁺ biologos99@gmail.com

Resumen

Una alternativa para disminuir los efectos secundarios de los tratamientos de cáncer es el uso de remedios naturales, entre los que se destacan el uso de plantas medicinales, como lo son las plantas *Solanum hispidum* y *Solanum torvum*, las cuales se cree, poseen propiedades anticancerígenas debido a sus saponinas, pero como son consideradas mala hierba se les elimina del medio, por lo que se dificulta su estudio, una solución propuesta en este trabajo a tal problema es la electrofusión de los protoplastos de estas especies con especies de rápido crecimiento como lo son *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*, esperando que adquieran las características de rápido crecimiento de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* conservando las propiedades anticancerígenas de *S. hispidum* y *S. torvum*. Utilizando el mesófilo se extrajeron los protoplastos por método mecánico con vórtex a 7s., observándose que los parámetros utilizados para estas 4 especies son similares, la viabilidad de los protoplastos supera el 70%, los parámetros para la electrofusión como los campos de RF para la agregación se lograron con un generador con salida sinusoidal variable 0-20 V RMS y frecuencia de 0-12 MHz aplicando 10 V de salida y 0.5 MHz de frecuencia durante 15 seg para cada mezcla (1:1), observándose el tiempo manejado de dielectroforesis permite mayor número de células dicariontes que policariontes. Así también encuentra mayor rendimiento de células híbridas en las fusiones de *S. hispidum* y *S. torvum* X *Ph. Vulgaris*.

Abstract

An alternative to lessen the side effects of cancer treatments is the use of natural remedies, among which we can mention the use of medicinal plants, as are the plants *S. hispidum* and *S. torvum*, which it is believed, possess anti-cancer properties due to its saponins, but as are considered weeds are deleted from the environment, it is difficult to study, a proposed solution in this work to this problem is the electrofusion of protoplasts of these species with fast-growing species such

as *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max*, hoping that they may acquire the characteristics of rapid growth of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* retains the anti-cancer properties of *S. hispidum* And *S. torvum*. Using the mesophyll is extracted protoplasts by mechanical method with vortex to 7s., while noting that the parameters used for these 4 species are similar, the viability of the protoplast fusion exceeds 70 %, the parameters for the electrofusion as RF fields for the aggregation were achieved at a generator with sinusoidal output variable 0-20 V RMS and frequency of 0-12 MHz by applying 10 V output and 0.5 MHz of frequency during 15 sec for each mixture (1:1), observing the time handled dielectrophoretic allows a greater number of cells that dicariontes policariontes. So also is greater performance of hybrid cells in the mergers of *S. hispidum* and *S. torvum* X *Ph. Vulgaris*.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que produce una división anormal y acelerada de células, este puede ser tratado y llegar a ser curado cuando es detectado en sus etapas tempranas.

Los tratamientos más utilizados son la radioterapia, que ayuda en la reducción o erradicación de tumores; la quimioterapia que demora la proliferación de las células cancerosas y la cirugía que es la extirpación del tejido afectado. Un efecto colateral de los dos primeros tratamientos mencionados es que dañan las células normales y muchas de estas no recuperan su funcionamiento adecuado Phillip (2003), el tercer tratamiento consiste en la mutilación parcial o total del área del cuerpo donde se encuentre el tumor, siendo riesgoso si el tejido canceroso no se retira completamente, estos tratamientos presentan efectos secundarios como la disminución de células en el conteo sanguíneo, caída del cabello, disfunción eréctil, dolores intensos, etc., University (2010).

Debido a los inconvenientes causados por estos tratamientos convencionales se han buscado alternativas dentro de los productos naturales que no presenten o disminuyan los efectos secundarios. En Estados Unidos de América, aproximadamente el 67% de los tratamientos que existen para tratar esta enfermedad son de origen natural. Además de que posiblemente no presenten los efectos secundarios que si se tienen en los tratamientos convencionales, Newman y cols.; citado en Vega y cols. (2006).

Algunas plantas son una fuente importante de sustancias anticancerosas. Un ejemplo es *Solanum hispidum*, que se ha demostrado que tiene efectos sobre células cancerígenas de próstata, además de que es utilizada para tratar la tos,

gastritis, úlceras crónicas, tumores y anemia, Velasco (2009). Dentro del género *Solanum* algunas especies se caracterizan por contener saponinas, compuestos tensoactivos, los cuales actúan sobre la membrana celular, Melzing y cols. (2001), resaltando su efecto citotóxico in vitro para células de diversos tipos de carcinomas humanos, Velasco y cols. (2009). En extractos clorofórmico y metanólico se encontró que *Solanum hispidum* presenta un índice de citotoxicidad del 50% en células cultivadas de carcinoma de próstata, Ortiz y cols. (2003).

Las especies *S. hispidum* y *S. torvum* son considerada como mala hierba y por lo tanto no son cultivadas de manera tradicional además de ser eliminadas del medio donde se desarrollan; esto crea un gran inconveniente ya que no se dispone de la cantidad suficiente para llevar a cabo estudios a cerca de sus propiedades citotóxicas.

La mejora genética de las plantas cultivadas en cuanto al incremento de la producción es practicada por el ser humano desde hace miles de años. Para ello, el hombre ha empleado los cruzamientos con el fin de incrementar la variabilidad genética.

La hibridación en células vegetales por medio de fusión, surgió a principio de los años 70's como una herramienta para sortear problemas de incompatibilidad precigótica y se llevan acabo utilizando los protoplastos de las plantas a fusionar, Polci (2004), esta técnica también permite la transmisión de características específicas de una planta a otra, Barrera y cols.(1995a).

Los protoplastos son células vegetales sin pared; estos tienen gran importancia en el cultivo de tejidos vegetales, ya que por medio de la fusión de estos, se tiene la capacidad de captar para sí organelos, información genética ajena y ADN, Castillo y cols. (1998). En la mayoría de los casos se aíslan los protoplastos de mesófilo de hojas en suspensiones celulares. La hibridación en plantas en sus orígenes se efectuaba con métodos químicos, posteriormente se emplearon métodos eléctricos que consisten en provocar pulsos eléctricos en un rango muy estrecho de duración que producen una ruptura reversible de la membrana celular lo cual le permite comunicarse con la membrana de una célula vecina, y así poder llevar a cabo una recombinación de material intermembranal, Polci (2004).

Phaseolus vulgaris y *Glycine max* son plantas de gran propagación que además no demandan tanto cuidado e inversión, la electrofusión entre las especies *Solanum hispidum*, y *Solanum torvum* X *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* plantea solucionar el problema de la propagación de *Solanum hispidum* y *Solanum torvum* ya que se espera que las células híbridas obtenidas adquieran las facilidades de cultivo de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* conservando las propiedades anticancerígenas que presentan las especies de *Solanum hispidum* y *Solanum*

torvum. Además de que en estudios anteriores la electrofusión de protoplastos de *Glycine max* y *Phaseolus Vulgaris* se encontró que estos parámetros usados presentaron bajo índice de daño a las células, y en cuanto a su rendimiento es cerca del 20% con una viabilidad del 90%, Barrera y cols. (1995a).

Los productos obtenidos de la fusión pueden ser células de 3 tipos; células no fusionadas que son aquellas células en las cuales no presentan ningún cambio después de esta; dicariontes que se presentan cuando la célula presenta dos núcleos los cuales pueden ser de especies diferentes o de la misma especie; y policariontes que son aquellas células que presentan más de dos núcleos de un mismo o de diferentes tipos parentales, Polci (2004).

El rendimiento de híbridos dicariontes parece depender del periodo inicial de agregación que en la electrofusión se obtiene por medio de dielectroforesis (acercamiento) con 15 volts a 20 s. de Radio Frecuencia de 10 Volts RMS de intensidad y frecuencia de 0.5 MHz, más que, del pulso que se realiza con CD de decaimiento exponencial de 300V durante 1 mseg, Barrera y cols. (1995a).

OBJETIVO GENERAL.

Determinar las condiciones óptimas para la obtención de protoplastos entre *Solanum torvum* , *Solanum hispidum*, *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris* para obtener híbridos somáticos por medio de electrofusión.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Establecer las condiciones para la obtención de protoplastos de *Solanum torvum*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Solanum hispidum* así como evaluar su viabilidad y su rendimiento.

Determinar el rendimiento y viabilidad de los productos (dicariontes) de la electrofusión de *Solanum hispidum* X *Glycine max*.

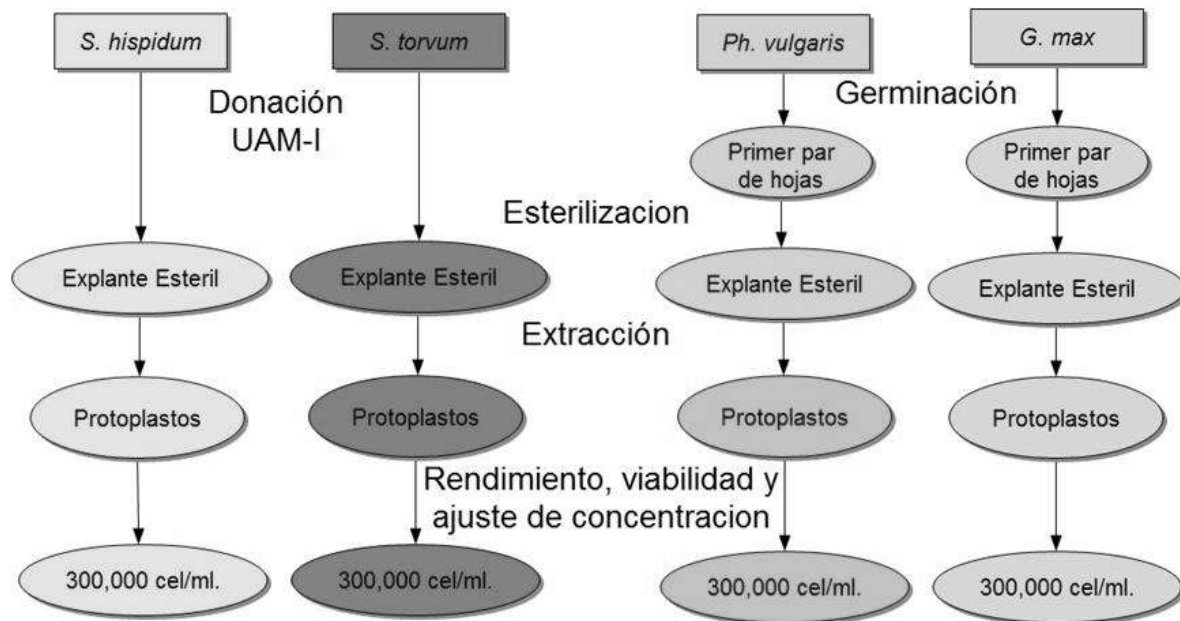
Determinar el rendimiento y viabilidad de los productos (dicariontes) de la electrofusión de *Solanum hispidum* X *Phaseolus vulgaris*.

Determinar el rendimiento y viabilidad de los productos (dicariontes) de la electrofusión de *Solanum torvum* X *Glycine max*.

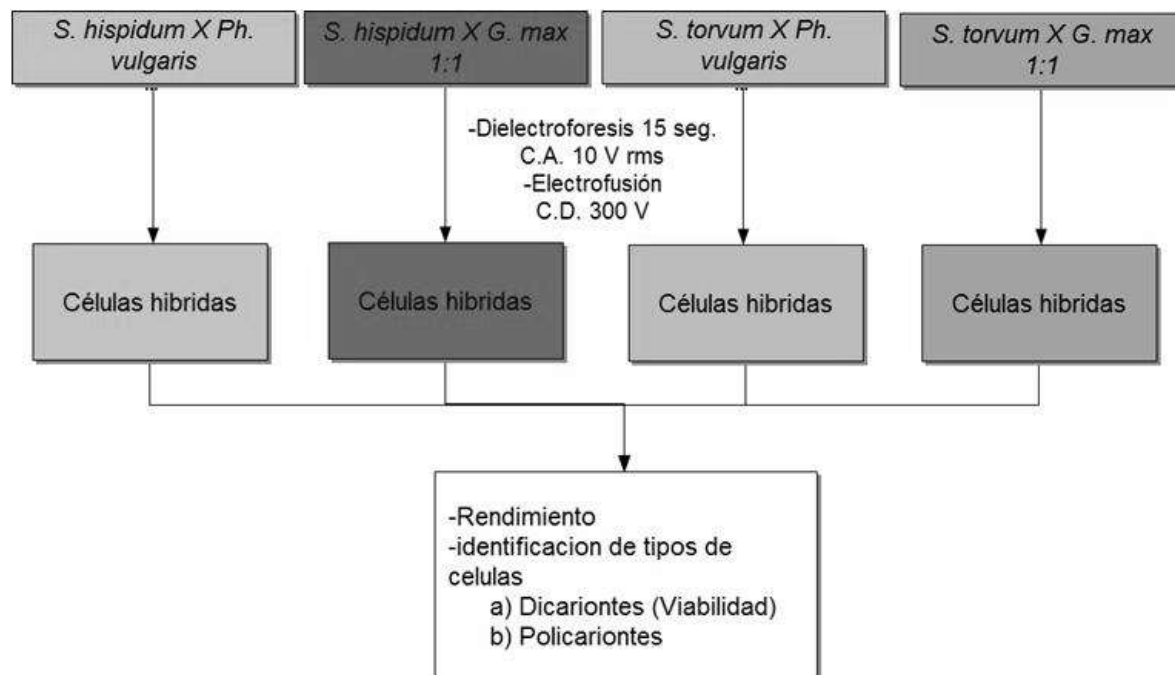
Determinar el rendimiento y viabilidad de los productos (dicariontes) de la electrofusión de *Solanum torvum* X *Phaseolus vulgaris*

DISEÑO EXPERIMENTAL.

OBTENCIÓN



ELECTROFUSIÓN



MATERIAL Y METODO.

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* fueron germinadas de manera convencional a temperatura ambiente y humedad constante; *Solanum torvum* y *Solanum hispidum* fueron donadas por la UAM plantel Iztapalapa.

La obtención de protoplastos se llevó a cabo a partir del mesófilo foliar del primer par de hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*, y para *Solanum torvum* y *Solanum hispidum* se tomaron hojas que visiblemente no estuvieran dañadas. Se trabajó con un gramo de tejido de cada especie, las cuales se lavaron con jabón quirúrgico y agua para posteriormente ser esterilizadas con alcohol al 70%, solución de hipoclorito de calcio y tween 20. Cada tejido por separado se picó en fragmentos de 1-2 mm y se colocaron en tubos de centrifuga con 3mL de agua destilada, cada tubo se sometió a agitación en Vórtex, Barrera y cols.(1995a) durante 7s (tiempo determinado por datos no reportados). posteriormente se filtraron con malla de organza, los filtrados se colocaron en otros tubos de centrifuga y se centrifugaron a 3000 rpm/5 min, se desecharon los sobrenadantes y las pastillas se re suspendieron en 3mL de manitol al 13% y CaCl₂ a 4 mM; se les hizo un lavado a 3000rpm/5 min desechando sobrenadantes y re suspendiendo en 3mL de la solución manitol al 13% y CaCl₂ a 4 mM a continuación fueron cuantificados por cámara de Neubauer determinando la viabilidad por exclusión de azul tripano. Las muestras se ajustaron a 3X10⁵ cél. /mL.

En la cámara de fusión se depositó 0.25 mL por cada vez de una muestra mezclada (1:1) de las combinaciones especificadas. Los campos de RF para la agregación se lograron con un generador con salida sinusoidal variable 0-20 V RMS y frecuencia de 0-12 MHz aplicando 10 V de salida y 0.5 MHz de frecuencia durante 15 seg para inducir dielectroforesis en los protoplastos. La fusión se realizó con un pulso de CD generado por una descarga de un capacitador de 8uF a través de una resistencia de 180 Ohms cargado por una fuente de poder con una intensidad de 300 V durante 1 mseg (Barrera et al, 1995) se retiró la muestra de la cámara y se colocó en un tubo eppendorf. Se realizó conteo por cámara de Neubauer determinando viabilidad por exclusión de azul tripano.

RESULTADOS

Las especies *S. hispidum*, *S. torvum*, *G. max* y *Ph. vulgaris* presentan similitudes en cuanto al rendimiento de protoplastos obtenidos con P> 0.05. Con respecto a la viabilidad de los protoplastos, las cuatro especies presentaron una viabilidad mayor al 70%, observándose que la especie *G. max* presentó una viabilidad mayor al 90% (Figura 1 y 2).

En los productos de la electrofusión todas las combinaciones presentan un mayor número de dicariontes en comparación con la cantidad de policariontes existentes,

encontrándose mayor cantidad de dicariontes en las combinaciones en donde la especie *Ph. vulgaris* se encontraba presente $P < 0.05$ (Figura 3)

En la electrofusión encontramos que las cuatro combinaciones presentaron una viabilidad de híbridos mayor al 70%, notándose la combinación *S. hispidum* X *Ph. vulgaris* de la cual se obtuvo una viabilidad del 80.72% (Figura 4).

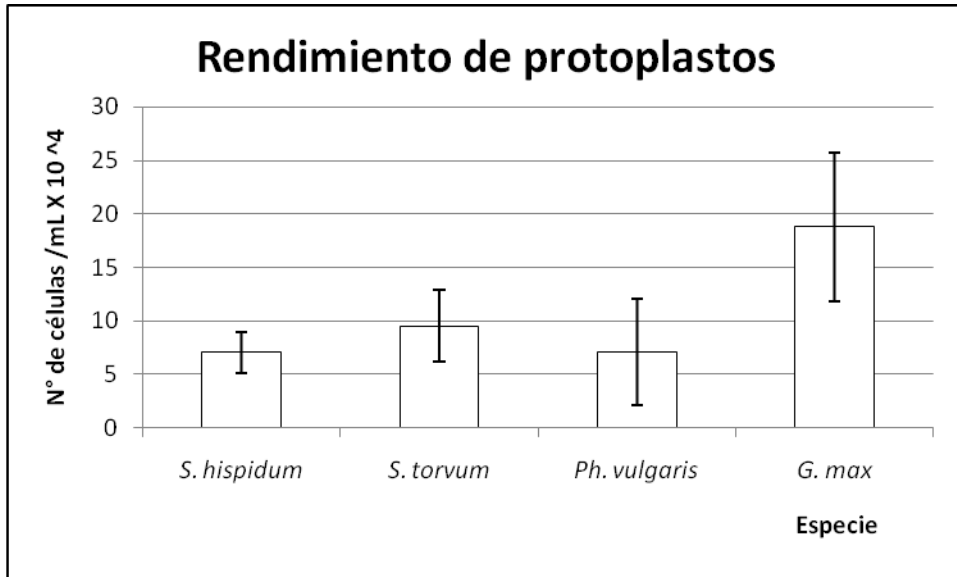


Fig. 1 Promedio de protoplastos obtenidos de 1 g de tejido de cada especie por método mecánico (7 s. de agitación a Vórtex). *S. hispidum*, *S. torvum* y *P. vulgaris* (n=4), *G. max* (n=3).

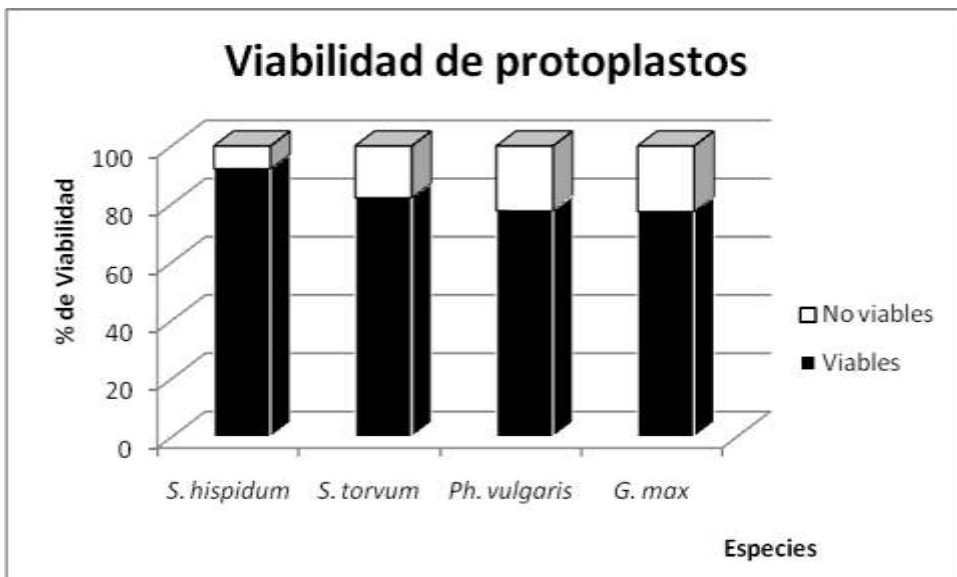


Fig. 2 Porcentaje de viabilidad de protoplastos de 1g de tejido de cada especie obtenidos por extracción mecánica (7 s. de agitación a Vórtex) *S. hispidum*, *S. torvum* y *P. vulgaris* n=4, *G. max* n=3

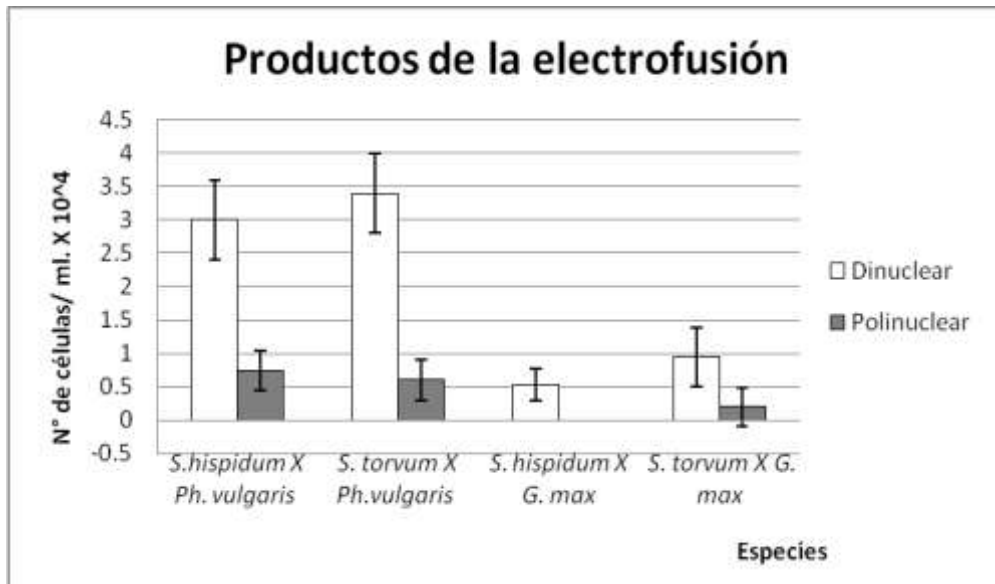


Fig. 3 Promedio de células fusionadas obtenidas por electrofusión (n=4).

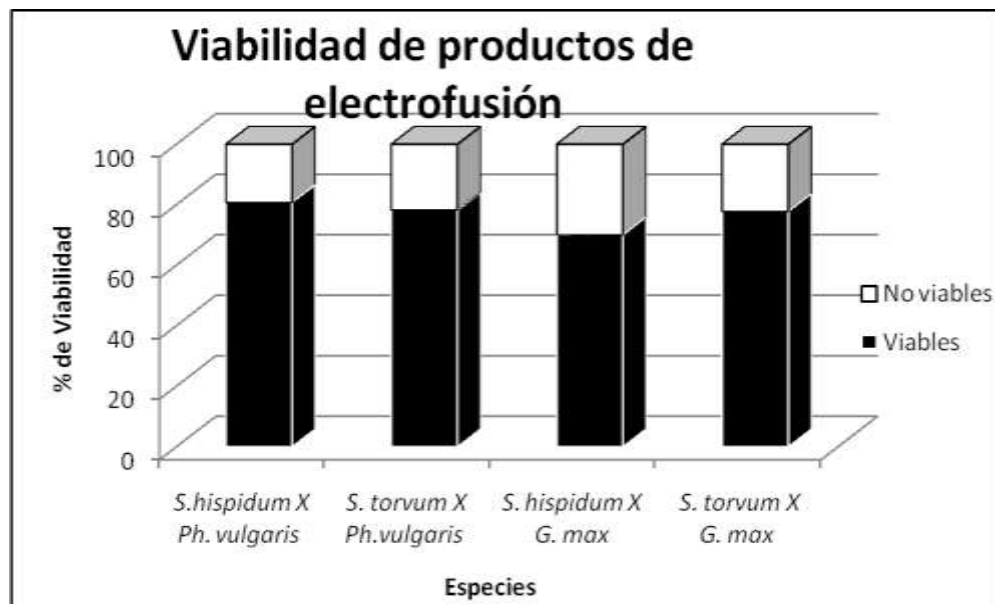


Fig. 4 Porcentajes de viabilidad de los productos de la electrofusión de protoplastos (n=4).

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En la obtención de protoplastos todas las especies obtuvieron un rendimiento similar a lo que podemos decir que las condiciones de extracción de los protoplastos empleadas son aptas para el mesófilo de todas las especies trabajadas, en contraste con los datos reportados por Barrera y cols. (1999b) que presentan resultados del promedio de la obtención de protoplastos cuatro veces mayor a los obtenidos en el presente trabajo, un factor probable de las diferencias en cuanto al rendimiento de protoplastos puede ser el tipo de tejido que se utilizó para la extracción ya que en el trabajo reportado por Barrera y cols. (1999b), fue utilizado un callo cultivado en medio MS, así como el tiempo de agitación al cual fueron sometidas las muestras (un minuto con barra magnética).

La viabilidad de los protoplastos pudiera ser el reflejo del estrés al cual está sometido el tejido en el proceso de agitación en Vórtex para la extracción de los protoplastos, presentando una mayor resistencia a estos procesos la especie *S. hispidum* la cual tiene una viabilidad mayor al resto de las especies, ya que durante la estandarización se observó que el tiempo de agitación influía en la viabilidad de protoplastos, por que se encontró que entre los 5 y los 10 segundos de agitación en Vórtex no se observaban grandes cantidades de protoplastos libres, (los cuales son indicadores de células rotas (datos no reportados)), por lo cual se promedió a un tiempo de 7 segundos de agitación en donde la viabilidad se mantuvo por arriba del 70% siendo menor que la reportada en Barrera y cols. (1999b). ya que la viabilidad que presentaron los protoplastos fue del 80% siendo factor la barra magnética utilizada en la metodología del trabajo citado.

En los productos de electrofusión de las cuatro especies (Figura 3) se obtuvo un número mayor de células dicariontes comparadas con las policariontes esto puede ser debido a que el tiempo en dielectroforesis (15 s.) es óptimo, esto refleja similitudes con los datos obtenidos por Barrera y cols. (1995a) que utilizaron el mismo tiempo en dielectroforesis y una concentración de protoplastos de 4×10^4 donde obtuvieron una frecuencia mayor de dicariontes que de policariontes. La mayor frecuencia de dicariontes se presentó en las combinaciones de las especies *S. torvum* y *S. hispidum* X *Ph. vulgaris* comparada con las combinaciones de *S. torvum* y *S. hispidum* X *G. max*, pudiendo deberse a la mayor afinidad (forma, tamaño, etc...) que tienen los protoplastos de *S. hispidum* y *S. torvum* con los de *Ph. vulgaris*.

En la electrofusión de los protoplastos, la viabilidad que se encontró para todas las combinaciones (Figura 4) fue mayor al 70% variando los valores para cada electrofusión a pesar de que se sometieron bajo las mismas condiciones. La mayor viabilidad con un valor de 80.72% se encontró en *S. hispidum* X *Ph. vulgaris* por lo

que se puede asumir que el mesófilo de estas especies son más resistente al proceso de electrofusión debido a las propiedades inherentes de sus membrana.

CONCLUSIÓN.

Los parámetros utilizados para la obtención de protoplastos son validos para el mesófilo de las 4 especies trabajadas en el presente proyecto.

El tiempo manejado de dielectroforesis permite mayor número de células dicariontes que policariontes.

Se encuentra mayor rendimiento de células híbridas en las fusiones de *S. hispidum* y *S. torvum* X *Ph. Vulgaris*.

BIBLIOGRAFÍA

Barrera Escorcia, E., Martínez Aguilar, J., Fregoso Padilla, M., Castillo Padilla, I., & Vargas Vera, A. (1995). Fusión Química y Eléctrica de Protoplastos. *Naturales* , 203-210.

Castillo Padilla, I., Fregoso Padilla, E., Barrera Escorcia, E., Martínez Aguilar, J., Ortiz Monroy, V., Vargas Vera, A., y otros. (1999). Comparacion del rendimiento y viabilidad de protoplastos aislados por un metodo mecanico y enzimatico en *Phaseolus Vulgaris* y *Glycine Max*. *Productos Naturales* , 33-39.

Melzing MF, B. G. (2001). Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Medica* , 48-53.

Newman, D., Cragg, G., & Snader, K. (2003). Natural products as source of new drug over the period 1981-2002. *Journal Natural Products* , 1022-1037.

Ortíz, M. M., Tapia, A. R., Espejo, S. A., & Velasco, L. R. (2003). Actividad citotóxica in vitro de *Solanum torvum* y *Solanum hispidum* sobre células de carcinoma de próstata.

Phillip, R. (2003). *Oncología Clínica*. España: Elsevier .

Polci, P., & Friedrich, P. (2004). Hibridación somática. En Echenique, Rubinstein, & Mroginski, *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal* (págs. 97-108). Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

University, C. I. (20 de 12 de 2010). *Cancerquest*. Recuperado el 17 de 02 de 2011, de <http://www.cancerquest.org/radiation-therapy-introduction>

Velasco Lezama, R. (2009). Efecto De *Solanum hispidum* Sobre La Proliferación De Células Hematopoyéticas In Vitro E In Vivo. *Artemisa* , 77.

Instituciones y Agradecimientos:

Este trabajo se realizo en los laboratorio de Biorregulación de la FES Iztacala UNAM, se le agradece al Mto. Eduardo Barrera Escorcia su apoyo y dirección para la elaboración de esta investigación. Así como al departamento de Ciencias de la Salud, especialmente al laboratorio de Hematología de la UAM U. Iztapalapa por la donación del material biológico utilizado en este experimento (Plantas *Solanum torvum* y *Solanum hispidum*).