

# Efectos del medio condicionado para reducción de estrés por cizalla y por dilución en cultivos de células vegetales

## Conditioned medium effects on reducing shear and dilution stress in plant cell cultures

F. Verdú-Navarro<sup>1,2\*</sup>, R. Burke<sup>3</sup>, J.A. Moreno-Cid<sup>1</sup>, M. Egea-Cortines<sup>2</sup>, P. McCabe<sup>3</sup>, J. Kacprzyk<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Technological Development Department, Bionet, Fuente Álamo, Murcia, España

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, Murcia, España

<sup>3</sup>School of Biology and Environmental Science, University College Dublin, Dublin, Irlanda

\*fuensanta.verdun@edu.upct.es

### Resumen

A pesar de las ventajas que presentan los cultivos de células vegetales para expresión y producción de proteínas y otros metabolitos de interés en biorreactores frente a los cultivos microbianos, tienen algunas limitaciones. Dos de las más importantes son el alto porcentaje de inóculo que se necesita para que los cultivos sean viables y el estrés por cizalla que sufren por la agitación mecánica. El estrés por dilución, o bajo porcentaje de inóculo, y el estrés por cizalla dan lugar al proceso de muerte celular programada (MCP). En estudios previos se ha visto que un medio de cultivo condicionado puede proteger a las células de la MCP. En este trabajo se ha estudiado este efecto frente al estrés por cizalla y por dilución que sufren los cultivos celulares vegetales a escala de matraz, para poder aplicarlo a cultivos en biorreactores.

**Palabras clave:** Biorreactor; producción proteínas; metabolitos; muerte celular programada.

### Abstract

Although there are advantages about using plant cell cultures as expression system to produce proteins and metabolites of interest in bioreactors comparing to microbial cultures, they also have some limitations. Two of the most important ones are the high inoculum percentage is needed to have viable cultures and the shear stress they suffer from mechanic agitation. Both stresses lead to programming cell death (PCD). In previous studies, it has been demonstrated that a cell-conditioned growth medium has a protective effect against PCD. In this work, we have studied this effect against both stresses in flask cultures, to apply it in the future to bioreactor cultures.

**Keywords:** Bioreactor; protein production; metabolites; programmed cell death.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de células vegetales y su uso como sistema de expresión para producción de proteínas y metabolitos de interés ha incrementado a partir del siglo 21. Debido a ello, se ha intentado obtener el mayor rendimiento posible con estos cultivos, para sacar el máximo provecho. Este tipo de cultivos presenta ventajas frente a los cultivos que se emplean normalmente en la industria farmacéutica para la producción de proteínas recombinantes. Por ejemplo, la seguridad del producto o la capacidad de producir proteínas que requieran modificaciones post-traduccionales; con microorganismos pueden aparecer problemas de pérdida de funcionalidad en proteínas debido a que no realizan estas modificaciones, y en células de mamífero sí se podrían hacer, pero los medios de cultivo tienen un precio muy elevado. Sin

embargo, las células vegetales presentan también problemas relacionados con su cultivo en biorreactores.

Dos de los problemas más importantes son el estrés por cizalla que se genera por la agitación mecánica en biorreactores de agitación continua y el alto porcentaje de inóculo que se necesita para que el cultivo sea viable. Ambos suponen un reto a la hora del escalado de los procesos de producción, afectando a los costes y a los rendimientos.

En estudios previos se ha demostrado que en cultivos celulares vegetales muy diluidos se induce la muerte celular programada(1). Por otro lado, el estrés por cizalla causa daño celular que puede provocar la apoptosis. Pero este proceso de MCP puede inhibirse añadiendo medio condicionado(2). Este medio consiste en un medio libre de células, en el cual han crecido previamente células sanas.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del medio condicionado en la inhibición de la MCP en células sujetas a estrés por dilución y estrés por cizalla debido a la agitación mecánica. Los ensayos primero se realizarán a escala de matraz y posteriormente, en futuros trabajos, se harán a escala de biorreactor si la hipótesis es correcta.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cultivos vegetales

Para estos ensayos se emplearon cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* de las variedades Columbia (Col0) y Landsberg erecta (Ler).

### 2.2 Medio condicionado

El medio condicionado se preparó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Filtrar un cultivo sano de *Arabidopsis thaliana* de siete días de edad crecido en oscuridad a través de una malla con un tamaño de poro de 71µm.
2. Filtrar de nuevo el cultivo a través de un filtro Whatman Grado 1 (11µm).
3. Ajustar el pH del medio a 5.8 y añadir las fitohormonas.
4. Autoclavar el medio a 121°C durante 30 minutos.

### 2.3 Condiciones de estrés

Las condiciones para inducir la muerte celular programada fueron:

- Estrés por dilución: Los cultivos de Col0 y Ler se subcultivaron a una tasa de dilución de 1:10 como control positivo, y a una tasa de 1:50 como control negativo. En ambos casos se añadió el medio condicionado al 20% para ver su efecto. Se realizaron recuentos cada 24 horas durante siete días.
- Estrés por cizalla: Los cultivos de Col0 con siete días de edad se sometieron a agitación con un agitador magnético durante 48 horas. Los recuentos se realizaron a las 6, 24 y 48 horas del inicio de la agitación.

### 2.4 Determinación viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular y el recuento de células viables, en proceso de muerte celular programada o necróticas, se recurrió al método de tinción mediante diacetato de fluoresceína. El recuento se hizo con la ayuda de un microscopio con fluorescencia. Para cada muestra se hacía un recuento de al menos 200 células.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comenzando por los ensayos de estrés por dilución, se pudo observar que tras siete días de cultivo el medio condicionado tuvo un efecto protector en ambas líneas de *Arabidopsis thaliana*, aunque se vieron resultados con mayor contraste en los cultivos de Ler. En la Fig. 1 se puede

observar la viabilidad celular de cada muestra a las 24 horas posteriores al inicio del tratamiento. Mientras que en la Fig. 2 se presentan los porcentajes de viabilidad de las muestras a las 168 horas.

Por otro lado, en cuanto al tratamiento con estrés por cizalla, también se observaron diferencias en los cultivos con medio acondicionado y aquellos con solamente medio fresco. En la Fig. 3 se muestra la viabilidad celular de cada muestra en cada tiempo de recuento. Se observó mayor diferencia a las 24 horas.

#### 4. CONCLUSIONES

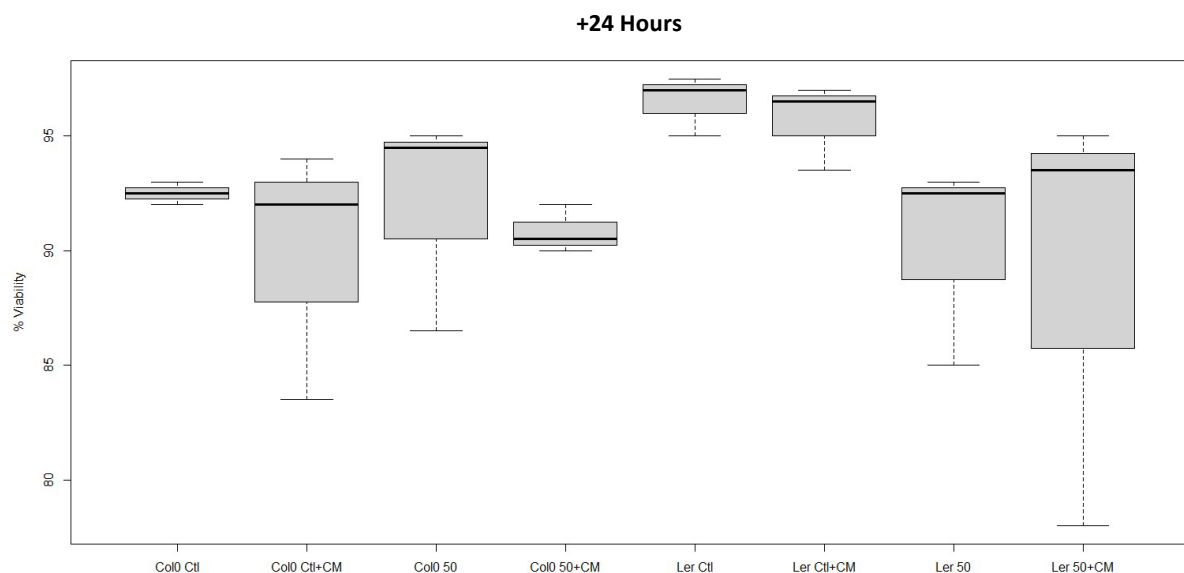
Como se ha podido comprobar con los resultados obtenidos, el medio condicionado aporta un efecto protector que inhibe la muerte celular programada inducida tanto por el estrés por cizalla por agitación mecánica, como por el estrés debido a elevadas tasas de dilución en los cultivos. Sin embargo, estos ensayos se deben de repetir e implementar en la escala de biorreactor para poder confirmar definitivamente la hipótesis y poder darle una aplicación industrial al medio condicionado.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

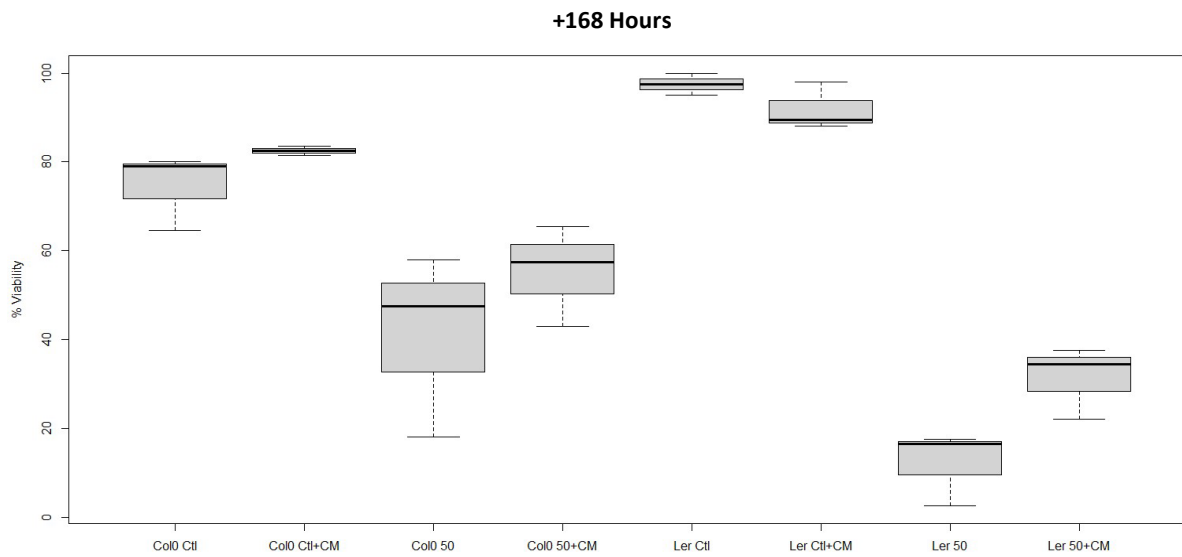
Este trabajo está subvencionado por el Proyecto PID2021-1279330B-C21 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y FEDER a MEC y JW, Catedra BIONET en Biotecnología y el proyecto AGROALNEXT del Plan de Recuperación y Resiliencia. Ayuda DIN2020-011559 financiada por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y según proceda, por “FSE Invierte en tu futuro” o por la “Unión Europea NextGenerationEU/PRTR”.

#### 6. REFERENCIAS

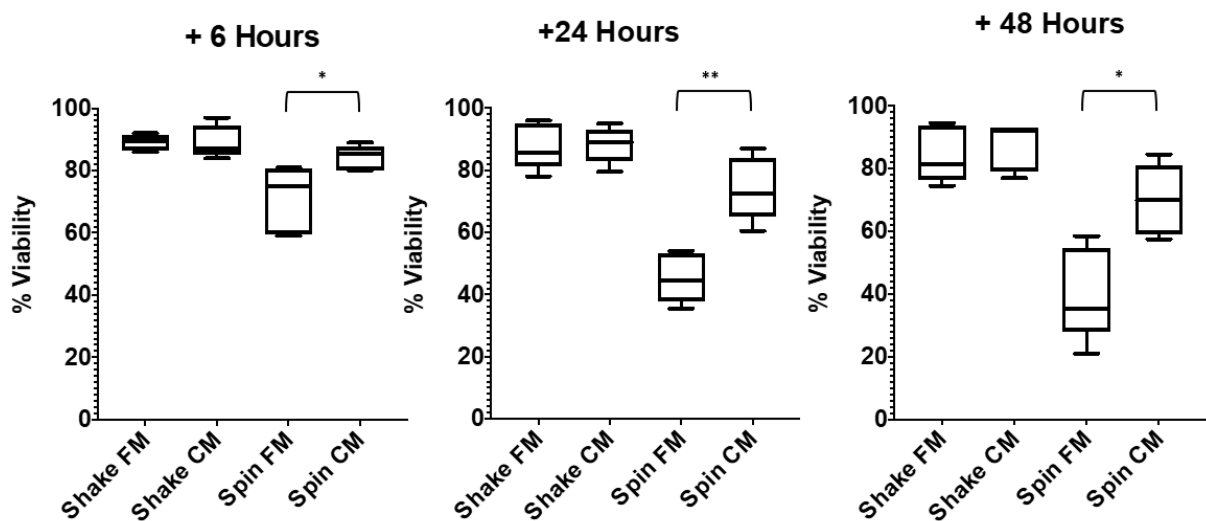
1. McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, Pennell RI. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J.* 1997;12(2):267-80.
2. McCabe PF, Leaver CJ. Programmed cell death in cell cultures. En: Lam E, Fukuda H, Greenberg J, editores. *Programmed Cell Death in Higher Plants* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2000 [citado 22 de febrero de 2023]. p. 115-24. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-010-0934-8\\_9](http://link.springer.com/10.1007/978-94-010-0934-8_9)



**Figura 1.** Diagrama de cajas donde se representa la viabilidad celular de las muestras del ensayo de estrés por dilución tras 24 horas.



**Figura 2.** Diagrama de cajas donde se representa la viabilidad celular de las muestras del ensayo de estrés por dilución tras 168 horas.



**Figura 3.** Diagramas de caja representando la viabilidad de cada muestra tras 6, 24 y 48 horas del inicio del ensayo de estrés por cizalla. Las muestras son: agitación orbital con medio fresco (Shake FM) o medio condicionado (Shake CM); agitación mecánica con medio fresco (Spin FM) o medio condicionado (Spin CM).