

**CULTIVO *in vitro* DE CÉLULAS
EMBRIONARIAS DE COCHINILLA
(*Dactylopius coccus* Costa)
A DIFERENTES pH**

***In vitro* CULTURE OF COCHINEAL EMBRYO
CELLS (*Dactylopius coccus* Costa)
AT SEVERAL pH**

**Miguel González González^{1*}, Nina Malena Bárcenas Ortega¹, Gildardo Aquino Pérez¹,
Jorge Manuel Valdez Carrasco², María Luisa Ortega Delgado³ e Iván Ramírez Ramírez¹**

¹ Colegio de Postgraduados, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Especialidad de Genética, ²Especialidad de Entomología y Acarología. ³Especialidad de Bioquímica, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230, Montecillo, Estado de México. Tel. 01(595) 952-0200, Ext. 1588. Correo electrónico: gmiguel@colpos.colpos.mx

*Autor responsable

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el pH óptimo al que cultivos celulares de cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) registran la máxima producción de ácido carmínico *in vitro*, se evaluaron varios niveles de pH (4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5) y de fracciones de centrifugado (0, 2, 5 y 10 min) de células maceradas de embriones de cochinilla establecidos en medio nutritivo de Schneider. El contenido de ácido carmínico presente en cada muestra fue determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución. La extracción del pigmento de las muestras se realizó con una solución de HCl 2M. Los límites de detección del pigmento fueron de 1.0 mg L⁻¹ a 120.0 mg L⁻¹. No se observó un efecto significativo del pH en el contenido de ácido carmínico ni en el número de líneas celulares, aunque el pH intermedio (5.5) tendió a dar mejores resultados.

Palabras clave: *Dactylopius coccus* Costa, ácido carmínico, colorantes, homópteros.

SUMMARY

In order to determine the optimal pH level at which cochineal insect (*Dactylopius coccus* Costa) cell cultures produce carminic acid *in vitro* at peak levels, several pH (4.5, 5.0, 5.5, 6.0 and 6.5) and centrifuge fractions (0, 2, 5 and 10 min) combinations were tested on cochineal insect embryos growing in a Schneider's nutritive medium. Carminic acid content was determined by high precision liquid chromatography. Dye extraction was achieved using a HCl 2M solution. Detection levels were between 1.0 and 120.0 mg L⁻¹. The effect of pH was not significantly different among pH treatments, but the intermediate pH (5.5) showed more carminic acid and higher number of cell lines.

Index words: *Dactylopius coccus* Costa, carminic acid, dyes, homopterous.

INTRODUCCIÓN

Las familias de insectos Dactylopiidae, Lacciferidae y Kermesidae, contienen géneros de escamas productoras de pigmentos. Dentro de éstas se encuentra la grana o cochinilla (*Dactylopius* spp), homópteros, parásitos específicos del género *Opuntia*, productoras de ácido carmínico, un colorante rojo natural empleado actualmente en las industrias de alimentos, farmacéutica, textil y cosmética (De Lotto, 1974; Tekelemburg, 1993).

Con el descubrimiento de los colorantes sintéticos como la eritrosina y ponceas, la mayoría de los pigmentos naturales dejaron de usarse a gran escala. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el uso de estos colorantes sintéticos son cancerígenos potenciales (Saltzman, 1992). Ante esta situación, la producción de pigmentos naturales ha resurgido y el ácido carmínico ha adquirido mayor importancia, por lo que se buscan nuevas alternativas, como la biotecnológica, para generar cultivos celulares de la cochinilla fina del nopal (*Dactylopius coccus* Costa) capaces de producir ácido carmínico *in vitro*.

El control del ambiente físico del cultivo *in vitro* es esencial y debe ser bien definido, ya que numerosos factores influyen su establecimiento, entre ellos temperatura, pH, osmolaridad y humedad. La presión osmótica y el pH son los factores de mayor cuidado en la formulación de medio. La presión que se utiliza generalmente es de 360 ± 10 mOsm kg⁻¹; el pH de 6.2 a 7.0 para lepidópteros y dípteros, pero en líneas de cucarachas el valor es más alto (7.4). Los valores de estos factores pueden ser establecidos con base en los obtenidos de la hemolinfa del insecto (McAteer *et al.*, 1979; Lynn *et al.*, 1988; Schlaeger, 1996). No existen datos para células de homópteros.

El poder colorante de un carmín se mide por la concentración de ácido carmínico y el precio del producto es directamente proporcional al porcentaje de este compuesto. La determinación de la concentración de ácido carmínico presente en una muestra o en el insecto mismo, se puede realizar por espectrofotometría (método alcalino), y mediante cromatografía. Los tipos de cromatógrafos más comúnmente usados en la detección de ácido carmínico, han sido la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este último se ha utilizado para determinar la concentración de diversos pigmentos en *Dactylopius* spp., *Kermes vermilo* y *Laccifer lacca* (Wouters, 1990; Merino y Edberg, 1996; Sugimoto *et al.*, 1998).

Dada la importancia económica del ácido carmínico y la de los cultivos *in vitro* como una opción para producirlo en gran escala, en la presente investigación se evaluó la respuesta de cultivos celulares de embriones de cochinilla establecidos en medio de cultivo para determinar el pH óptimo en el que éstos expresan su máxima producción de carmín y el mayor número de cultivos transformados en líneas celulares, considerando a un cultivo transformado como aquél con células de forma y tamaño uniforme, con capacidad de división celular que se mantiene a través de numerosos subcultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La cría de la cochinilla se llevó a cabo sobre cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica* en una cámara de cría a temperatura ambiente. Cada cladodio se infestó con ocho hembras ovíparas y conforme los machos aparecieron se fueron eliminando con el objeto de mantener a las hembras vírgenes. A los cien días de la infestación, cuando las hembras alcanzaron la madurez sexual, se introdujeron machos a la cámara para sincronizar el apareamiento y obtener embriones con la mayor uniformidad posible. Mediante ensayos previos, se determinó que 10 días posteriores al apareamiento ya existían embriones capaces de producir el pigmento en sus células y que éstas ya podían ser cultivadas.

Obtención de células embrionarias de *D. coccus*

Se recolectaron 40 hembras grávidas de cochinilla a las que se les removió la cera del cuerpo con alcohol etílico 70 %, y luego se lavaron perfectamente con agua destilada para eliminar los residuos de alcohol. Las hembras fueron disecadas dentro de una campana de flujo laminar, haciendo un corte en la parte anterior del insecto, con tijeras de disección. Los embriones se extrajeron y se depositaron en una caja de Petri de vidrio de 5 cm de diámetro conteniendo 4 mL de agua destilada estéril. Se agregaron 2 mL de cloro 7 % y se agitó con una pipeta de transferencia con la finalidad de eliminar residuos de ovariolos y restos de contaminantes (bacterias del tracto digestivo). A los 30 s se eliminó el agua con cloro y se lavó de tres a cuatro veces con agua destilada estéril.

Establecimiento del cultivo de embriones

Todos los embriones extraídos fueron transferidos a un tubo de centrifuga estéril de 12 mL de capacidad procurando eliminar toda el agua posible. Se agregaron 2 mL de medio nutritivo de Schneider con la ayuda de una pipeta estéril. Los embriones se recolectaron con una pipeta de

transferencia cuya punta fue sellada posteriormente con la llama de un mechero. Los embriones se maceraron presionándolos con los dedos hasta que éstos ya no fueran visibles en el medio. Con la ayuda de una gasa estéril se filtró la solución que contenía el macerado para eliminar grandes porciones de tejido o embriones completos. Este filtrado se colocó en un tubo de centrifuga estéril y se le adicionaron 5 mL de medio nutritivo. Se dejó en reposo durante 30 min para que sedimentaran los agregados celulares de mayor tamaño. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y al sedimento se le adicionó 1 mL de medio nutritivo mezclándolo perfectamente, lo que constituyó el nivel 0 min de centrifugado. En cada uno de cinco pozos de una placa multicelda de 24 pozos se colocó 0.2 mL del macerado y se adicionó 1 mL del medio nutritivo correspondiente (pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5, respectivamente). El sobrenadante fue centrifugado durante 2 min a 1600 rpm, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga y agregando 1 mL de medio nutritivo al sedimento. De manera similar, este último se distribuyó en cinco pozos de la placa multicelda con su respectivo medio nutritivo. Para los tiempos de centrifugado de 5 y 10 min se siguió un procedimiento similar que con el de 2 min.

Medio de cultivo

El medio de cultivo usado para el establecimiento de líneas celulares de *Dactylopius coccus* fue el de Schneider, preparado de acuerdo a las especificaciones del distribuidor (SIGMA, S-9895) y suplementado con 10 % de suero de feto de bovino inactivado por calor.

El medio fue esterilizado mediante filtración con membranas con porosidad de 0.22 μm (Millipore GSWP04700). La presión osmótica del medio para cada uno de los pH's fue establecida a 360 mOsm kg^{-1} .

Determinación del contenido de ácido carmínico

La cantidad de ácido carmínico fue determinada en un cromatógrafo de líquidos HP 1100, con base en la metodología propuesta por Merino y Edberg (1997), con modificaciones en la proporción de los solventes para adaptarlo al tipo de columna utilizado (Hypersil ODS de 225 mm de longitud x 4 mm de diámetro x 5 μm de tamaño de partícula). Para la fase móvil se utilizó metanol: buffer de fosfatos (25:85, v/v) pH 6.0, a 280 nm y con un flujo de 0.8 mg L^{-1} . Los solventes (metanol y la solución de fosfatos) fueron filtrados por separado con membrana de 0.2 μm de tamaño de poro. Se elaboró una curva patrón para determinar el flujo, la longitud de onda, el tiempo de retención y la proporción de cada una de las soluciones empleadas.

Elaboración del buffer de fosfatos. Para el buffer de fosfatos se mezclaron 890 mL 0.067 M de la solución de fosfato de potasio y 110 mL de fosfato de sodio 0.067 M. Se ajustó el pH a 6.0 ± 0.05 con fosfato de potasio si el pH fue mayor de 6.0, o con fosfato de sodio si fue menor. Cabe hacer notar que la solución fue estable únicamente por dos días.

Elaboración de la curva patrón. Para la preparación de los estándares se adicionaron 100 mg de ácido carmínico (Merck; 98 % de pureza) en 50 mL de HCl 2M. Se hirvió la solución durante 2 min, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó a 100 mL con HCl 2M. Se transfirieron 50, 100, 200, 500 y 1000 μL de esta solución a un tubo de ensaye, se aforó a 5 mL con solución HCl 2M y se filtró cada una de las soluciones con filtro de jeringa de $0.22 \mu\text{m}$. Se inyectó cada uno de los estándares al HPLC, de menor a mayor concentración. La cantidad del pigmento en cada uno de los estándares fue de 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 y 100.0 mg L^{-1} , respectivamente. Posteriormente se integraron los cromatogramas y mediante regresión lineal se realizó la curva de calibración (curva patrón).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo *in vitro* de embriones

La coloración del medio en cada nivel de pH varió en tonalidades desde un rojo intenso en pH de 4.5 a violáceo en 6.5. Esta variación se debe a que el carmín cambia su configuración de acuerdo al pH en que se establezca, por lo que se le considera un indicador de pH. La coloración de los cultivos disminuyó gradualmente conforme se agregó medio nutritivo adicional debido a que la mayoría de las células se lisan y son pocas las que continúan la producción del colorante. Las células que no fueron centrifugadas no mostraron uniformidad celular. En contraste, las fracciones de centrifugados de 2 y 5 min dieron lugar a líneas celulares heterogéneas en la forma y tamaño de las células (Figura 1). La densidad de células en las líneas celulares fue de alrededor de 0.8×10^6 células mL^{-1} .

El mayor número de líneas celulares se presentó en el pH 5.5 (Figura 2), con un total de 12 líneas; le siguió el pH 6.0 con nueve líneas y los pH 4.5 y 5.0 con ocho líneas. El pH 6.5 únicamente mostró seis líneas transformadas con gran cantidad de residuos celulares. En los demás pH probados, la apariencia de las células transformadas fue muy similar, donde sobresalieron las fracciones de 2 y 5 min.

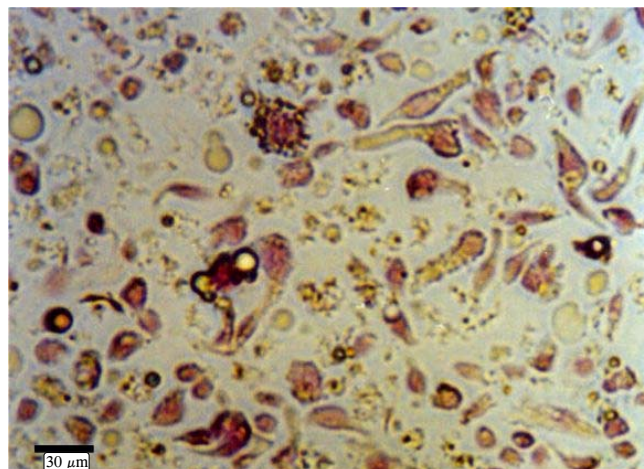


Figura 1. Línea celular obtenida de cultivos de embriones de cochinilla.

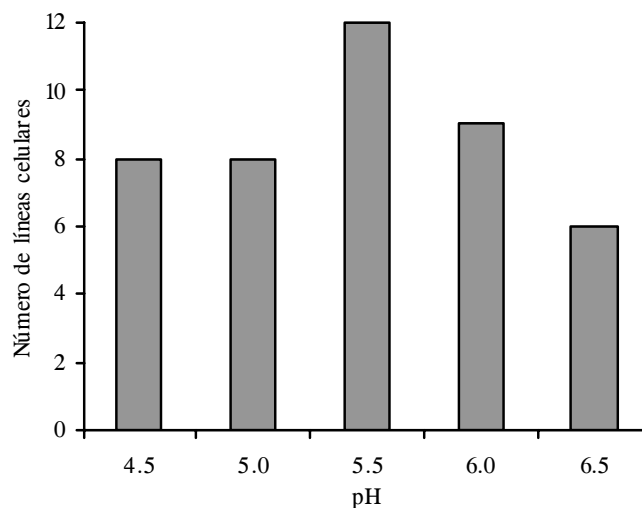


Figura 2. Líneas celulares obtenidas en cultivos de embriones de cochinilla.

Cuantificación de ácido carmínico en cultivos de embriones de *D. coccus*

Las concentraciones de ácido carmínico variaron entre 1.05 y 9.9 mg L^{-1} , según el pH. El análisis de los datos no detectó diferencias estadísticas entre los tratamientos de pH, lo cual muestra que todos los niveles evaluados tuvieron el mismo efecto y fueron apropiados para el cultivo de *D. coccus* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de contenido de carmín en cultivos celulares de embriones a diferentes pH.

pH	Media
5.5	6.32 n.s.
5.0	5.89 n.s.
6.5	5.83 n.s.
6.0	5.70 n.s.
4.5	4.48 n.s.

n.s. = Las medias no son significativamente diferentes (Tukey 0.05)

Aunque las diferencias no fueron significativas, el pH intermedio (5.5) tendió a mostrar los mejores resultados, tal y como ocurre en el número de líneas celulares; no obstante, en este pH la contaminación por hongos y bacterias patógenas también tiende a ser más frecuente.

Debido a que el producto de interés es un ácido, los valores de pH son inferiores a los óptimos obtenidos en otros cultivos celulares de insectos. Así, en *Heliothis zea* se lograron rendimientos celulares máximos entre pH 6.0 a 7.0, mientras que con valores menores de pH, el rendimiento disminuye (Vaughn, 1985; Hink, 1979). Para el caso de células de *Tricoplusia ni*, las mejores condiciones morfológicas son expresadas a pH de 6.0 a 6.24 (Hink, 1979). Sin embargo, Vaughn (1985) menciona que para algunos cultivos celulares no existen diferencias marcadamente significativas en el pH, como ocurre en células de *Culex tritaeniorhynchus*, que crecen bien desde 6.3 a 7.6; en cambio *C. quinquefasciatus* se desarrolla solamente entre 6.5 y 6.9. Al igual que en cultivos de *Culex*, en las de *D. coccus* el pH tiene un rango amplio (4.5 a 6.5) por lo que se puede usar cualquiera de estos valores para iniciar cultivos celulares, pero se da preferencia al pH intermedio (5.5).

Los cromatogramas obtenidos mediante HPLC, tanto de un estándar como el de la muestra de cultivo, se muestran en la Figura 3.

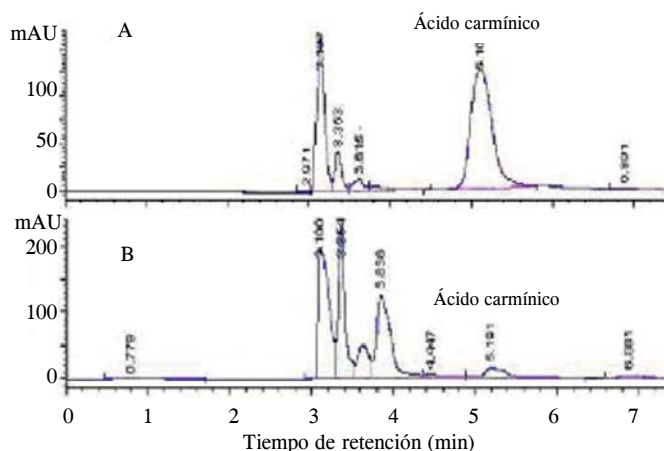


Figura 3. Cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de 280 nm: A) estándar de ácido carmínico; B) muestra de cultivo de embriones.

CONCLUSIONES

Los medios de cultivo con 4.5 a 6.5 son adecuados para el cultivo *in vitro* de células de la cochinilla, aunque tendieron a ser mejores los pH intermedios en el contenido de carmín y el número de líneas celulares. Los tiempos de centrifugado de 2 y 5 min fueron los más adecuados para establecer líneas celulares de embriones de *D. coccus*. La producción de carmín en cultivos secundarios fue baja, por lo que se sugiere evaluar otras variables del medio de cultivo, como presión osmótica y constituyentes del medio nutritivo, principalmente. Se sugiere hacer estudios citológicos y fisiológicos de los factores involucrados en la producción de carmín, para detectar los mecanismos que controlan la producción del pigmento *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- De Lotto G (1974) On the status and identity of the cochineal insects (Homoptera: Coccoidea: Dactylopidae). *J. Entomology Soc. South Africa*: 37(1): 167-193.
- Hink W F (1979) Cell lines from invertebrates. *In*: W B Jakoby, I H Pastan (eds). *Methods in Enzymology*. Vol. LVIII Cell Culture. Academic Press, Inc. London. pp: 450-466.
- Lynn D E, E M Dougherty, J T McClintock, M Loeb (1988) Development of cell lines from various tissues of Lepidoptera. *In*: H. Kuroda, E Kurstak, K Maramorosch (eds). *Invertebrate and Fish Tissue Culture*. Tokyo, Japan. Sc. Soc. Press. Tokyo, Japan. pp: 239 - 242.
- McAteer A J, J W H Douglas (1979) Monolayer culture techniques. *In*: W B Jakoby, I H Pastan (eds). *Methods in Enzymology*. Vol. LVIII Cell Culture. Academic Press, Inc. London. pp: 132-140.
- Merino L, U Edberg (1996) Development and validation of a quantitative method for determination of carmine (E120) in foodstuffs by Liquid Chromatography: NMKL Collaboratory Study. *J. AOAC International* 80(5):1044-1051.
- Saltzman M (1992) Economía y vida de los españoles en la Mixteca Alta. 1519-1720. Colección Regiones de México. Instituto Nacional de Antropología e Historia y Gobierno del Estado de Oaxaca. 36 p.
- Schlaeger E (1996) Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology* 20:57-70.
- Sugimoto N, Y Goda, J Susuki, M Kuroyanagi, T Yamada, K Yoshihira, T Maitani (1998) Structures of minor pigments in cochineal dye. *Natural Medicines* 52 (2): 135-138.
- Tekeleburg T (1993) Comercialización y mercadeo de la cochinilla. *In*: Memoria del II Seminario Regional de Tuna y Cochinilla. Tarija, Bolivia. pp: 74-81.
- Vaughn J L (1985) Insects tissue culture: techniques and development. techniques in setting up and maintenance of tissue and cell cultures. *In*: E Kurstak (ed). *Techniques in the Life Science. Cell Biology Section*. Vol. C1. Elsevier Scientific Publ. LTD Ireland. pp: C108/1-C108/35.
- Wouters J (1990) Dyestuff analysis of scale insects by High Performance Liquid Chromatography (Homoptera: Coccoidea). *In*: The VI International Symposium of Scale Insect Studies. ISSIS-VI Krakow, Part II. Agricultural University Press. pp: 61-70.