

## Desarrollo de la crioconservación de germoplasma vegetal en Cuba

María T González-Arno,<sup>1,2</sup> Caridad Urro,<sup>2</sup> Marcos Martínez,<sup>3</sup> María de los Ángeles Torres,<sup>4</sup> Manuel Martínez,<sup>5</sup> Tomás Moreira,<sup>2</sup> Rodobaldo Ortiz<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Calle 25 No. 455, entre I y J, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 32 1321; E-mail: arno@fbio.oc.uh.cu

<sup>2</sup>Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Ciego de Ávila, Cuba.

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical. La Habana, Cuba.

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.

### Introducción

Este trabajo resume el aporte científico de Cuba al desarrollo de tecnologías para la preservación segura y a largo plazo de germoplasma vegetal de origen tropical. La crioconservación consiste en el almacenamiento a temperaturas ultrabajas, preferiblemente la del nitrógeno líquido (-196 °C). Actualmente, este método es el único factible para la preservación de material biológico de interés durante períodos teóricamente ilimitados. Las muestras crioconservadas se mantienen en el reducido espacio de termos y están exentas de los inconvenientes climáticos, biológicos y geográficos del hábitat natural.

Se definen metodologías para crioconservar varias formas cultivables *in vitro* (ápices, callos embriogénicos y brotes meristemáticos) de cinco cultivos de importancia económica, alimentaria y biotecnológica como la caña de azúcar, el plátano, el café, la piña y los cítricos. Los métodos desarrollados para los ápices de caña, piña y cítricos, constituyen los primeros reportes en el ámbito internacional.

### Descripción del resultado

Con el programa de investigaciones sobre la caña de azúcar, se logró establecer metodologías de crioconservación para ápices [1-4] y callos embriogénicos [5], que permiten preservar los recursos genéticos de este cultivo y las líneas celulares empleadas en los programas de mejoramiento y semilla artificial, respectivamente. Los estudios abarcaron la extensión exitosa de dichas tecnologías a un gran número de variedades de diferente complejidad, adaptación *in vitro* y diversidad geográfica. Se evaluó la estabilidad genética en condiciones de campo mediante métodos bioquímicos, histológicos y a través de la revisión de numerosas características morfológicas, lo que permitió comprobar que el almacenamiento prolongado (hasta catorce meses) en nitrógeno líquido, no indujo modificaciones genéticas ni afectó los niveles de viabilidad y la obtención de nuevas plantas [4]. En el cultivo plátano, el comienzo de las investigaciones requirió la obtención, por cultivo *in vitro*, de una estructura nueva (brotes meristemáticos) más resistente al frío y a los tratamientos crioprotectores [6]. Se logró la crioconservación exitosa de tres genotipos en peligro de extinción pertenecientes al banco de germoplasma, y se realizaron los estudios de estabilidad genética en condiciones de campo. En el caso del café, las metodologías desarrolladas para callos embriogénicos [7] permitieron conservar el material de partida de los trabajos de mejoramiento. Para los cítricos, se definió un protocolo de crioconservación para callos embriogénicos mediante el empleo de un cultivar comercial de naranja dulce [8]. También se

estableció una metodología para conservar los ápices de diferentes especies patrones [9, 10] y actualmente se investiga con material de plantas adultas. En el caso de la piña, el método de crioconservación establecido se extendió con éxito a diferentes variedades [11] y se aplica a mayor escala en la actualidad.

### Importancia del trabajo

Los aportes tecnológicos realizados para el desarrollo de la crioconservación de germoplasma vegetal tiene un gran impacto científico nacional e internacional. Por otra parte, el trabajo tiene un alto valor estratégico y social, ya que la implantación de estos métodos permite conservar especies que se encuentren en peligro de extinción, contribuye a eliminar las pérdidas por condiciones climáticas adversas u otras causas, y asegura la preservación de la biodiversidad. Desde el punto de vista económico, es posible reducir el número de réplicas en el banco de germoplasma in campo, con el consiguiente ahorro de superficies cultivables, mano de obra, etc. A escala de laboratorio, influye en la disminución de los gastos por concepto de compra de reactivos, consumo de electricidad y dedicación de personal especializado.

### Bibliografía

González-Arno MT. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique. Technical Bulletin IPGRI: Low temperature technologies; 1997.

González-Arno MT, Donest N, Popov A, Butenko R, inventores. Metodología para el cultivo de meristemos apicales de caña de azúcar. Patente No. 160118. Moscú, Rusia. 1990.

González-Arno MT, Donest N, Popov A, Butenko R. Metodología para el cultivo de meristemos apicales de caña de azúcar. Patente No. 22193. La Habana, Cuba. 1993 Nov.

González-Arno MT, Engelmann F, Urro C, Lynch PT. Cryoconservation of sugarcane apical meristems using encapsulation-dehydration technique. Proceedings of the 2nd Sugarcane Cellular and Molecular Biology Workshop of ISSCT; 1993 Abril 19-23; Brasil.

González-Arno MT, Engelmann F, Huet C, Urro C. Large-Scale application of cryopreservation for sugarcane apices. Effect of freezing procedure and histology. Proceedings of the Breeding Workshop of ISSCT "Germplasm conservation and prospects"; 1994 Marzo; Montpellier, Francia.

Engelmann F, Benson E, Chabrilange N, González-Arno MT, Mari S, Michaux-Ferriere N, et al. Cryo-

1. González-Arno MT, Engelmann F, Urro C, Lynch PT. Crioconservación de meristemos apicales de plantas *in vitro* de caña de azúcar mediante el método de encapsulación-deshidratación. Biotecnología Aplicada 1993;10:225.

2. González-Arno MT, Engelmann F, Huet C, Urro C. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: Effect of freezing procedure and histology. Cryo-Letters 1993;14:303-8.

3. González Arno MT, Moreira T, Urro C. Importance of pregrowth with sucrose and vitrification for the cryopreservation of sugarcane apices using encapsulation-dehydration, Cryo-Letters 1996;17:141-8.

4. Engelmann F, González Arno MT, Paulet F, Glaszmann JC. Present development and use of *in vitro* techniques for the conservation of sugarcane germplasm. En: Arencibia A, Cornide MT, editores. Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar. Ciudad de La Habana: Elfos Scientia; 1999 (de próxima aparición).

5. Martínez ME, González Arno MT, Borroto C, Puentes C, Engelmann F. Cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) embryogenic callus using a simplified freezing process. Cryo-Letters 1998;19:171-6.

6. Torres MA, González Arno MT, Alonso J, Alonso C, Moreira T. Experiencias sobre la crioconservación de plátano (*Musa ABB*) en Cuba. Corbana (Costa Rica). Aceptada para su publicación; 1996.

7. Martínez M, González Arno MT, Urro C, Rojas R. Estudios preliminares sobre la crioconservación de callos y semilla botánica de *Coffea arabica* variedad 9722. Cultivos Tropicales 1995;16:74-8.

8. González Arno MT, Cárdenas MA, Urro C. Crioconservación de callos embriogénicos de *Citrus sinensis* variedad Pineapple. Biotam 1997;7:3.

preservation of several tropical plant species using encapsulation/dehydration of apices. Proceedings of the 7th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture; 1994 Junio; Florencia, Italia.

González-Arno MT, Urrea C, Engelmann F, Ortiz R, de la Fe C, Lukse E, *et al.* Evaluación de la técnica de criopreservación para preservar a largo plazo los recursos genéticos de la caña de azúcar. En: Estrada MP, Riego E, Limonta J, Téllez P, de la Fuente J, editores. Avances en Biotecnología Moderna. Vol 3; 1995 Nov 13-18; La Habana, Cuba. La Habana: Elfos Scientiae; 1995. p.II.11.

Torres MA, González-Arno MT, Urrea C, Moreira T, Engelmann F. Criopreservación de germoplasma de plátano (*Musa spp.*). En: Estrada MP, Riego E, Limonta

J, Téllez P, de la Fuente J, editores. Avances en Biotecnología Moderna. Vol 3; 1995 Nov 13-18; La Habana, Cuba. La Habana: Elfos Scientiae; 1995. p.II.22.

Martínez ME, González-Arno MT, Nieves N, Blanco MA, González J, Borroto C, *et al.* Plant regeneration from cryopreserved calli of sugarcane (*Saccharum sp.*) variedad CP 5243 by a simplified method. En: Estrada MP, Riego E, Limonta J, Téllez P, de la Fuente J, editores. Avances en Biotecnología Moderna. Vol 3; 1995 Nov 13-18; La Habana, Cuba. La Habana: Elfos Scientiae; 1995. p.II.12.

González-Arno MT. Desarrollo de una técnica para la criopreservación de meristemas apicales de caña de azúcar. Tesis de Doctorado en Ciencias Técnicas. La Habana: ISPJAE; 1996.

9. González Arno MT, Engelmann F, Urrea C, M Morenza, Rios A. Cryopreservation of Citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. Cryo-Letters 1998;19:177-82.

10. Durán-Vila N, González Arno MT, Engelmann F. Cryopreservation and *in vitro* culture. Technical Bulletin Newsletter: Conservation of plant germplasm. IPGRI; 1997.

11. González-Arno MT, Márquez M, Urrea C, Martínez M, Engelmann F. Cryopreservation of pineapple apices by vitrification. Cryo-Letters; 1999 (de próxima aparición).

## Humanización de epitopos T en las regiones variables murinas de un anticuerpo que reconoce al receptor del factor de crecimiento epidérmico: obtención de inmunoglobulinas de menor inmunogenicidad

✉ Cristina M Mateo de Acosta del Río, Josefa Lombardero Valladares, Ernesto Moreno, Rolando Pérez Rodríguez

Centro de Inmunología Molecular. Calle 206 No. 1926, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana. Fax: (53-7) 33 5049; E-mail: cristina@ict.cim.sld.cu

### Introducción

Existen numerosas evidencias experimentales que apuntan a la relación existente entre el sistema EGF/EGF-R (factor de crecimiento epidérmico/receptor del factor de crecimiento epidérmico) y el cáncer, por lo que no es sorprendente que este sistema se haya convertido en un blanco atractivo para el diseño de nuevos medicamentos antitumorales. Diferentes grupos de trabajo, incluido el del colectivo de autores, han obtenido anticuerpos monoclonales bloqueadores de la señalización del receptor. Estos anticuerpos inhiben el crecimiento de tumores humanos en ratones atímicos. Sin embargo, los anticuerpos murinos han resultado demasiado inmunogénicos en humanos, lo que dificulta sus aplicaciones terapéuticas.

### Materiales y Métodos

Se rediseñó el Anticuerpo Monoclonal R3 (AcM R3) como una inmunoglobulina humana IgG1, mediante la transplatación de los CDR (regiones determinantes de la complementariedad) del anticuerpo murino, en los marcos (FR) de las regiones variables humanas de las cadenas pesadas y ligeras Eu y Rei, respectivamente.

Mediante la utilización de este sistema como modelo, se evaluó un nuevo método de humanización mucho más simple que el método tradicional, basado en el carácter de antígeno T-dependiente de las inmunoglobulinas y en la alta homología existente entre las inmunoglobulinas murinas y humanas. El método consiste en sustituir aquellos residuos murinos incluidos en los posibles epitopos T de los marcos de las regiones variables, por los que se encuentran en la misma posición de las inmunoglobulinas humanas de mayor homología, excepto aquellos residuos críticos en la conformación de los CDR. Los posibles epitopos T en las regiones V<sub>H</sub> (región variable de cadena pesada) y

V<sub>K</sub> (región variable de cadena ligera) del R3, fueron predichos por el programa AMPHI.

### Resultados y Discusión

Se obtuvo un anticuerpo monoclonal reformado h-R3 neutralizante del EGF-R, con una K<sub>i</sub> de 10<sup>-8</sup> M, el cual ha sido objeto de seis solicitudes de patente.

Para obtener este anticuerpo fue necesario clonar y secuenciar la región variable del AcM R3 murino, clonar las cadenas ligera y pesada murinas del mismo en vectores de expresión de células superiores, que tienen incluidas las regiones constantes humanas C<sub>K</sub> (para la cadena ligera) y gamma 1 en el vector de expresión de la cadena pesada, con lo que se obtuvieron las construcciones genéticas quiméricas de las cadenas pesada y ligera del R3, es decir, las regiones variables murinas y regiones constantes humanas. Estas construcciones genéticas se introdujeron por transfección en células de mieloma NSO (mieloma no productor de inmunoglobulinas) y se expresó el anticuerpo quimérico R3, que fue capaz de reconocer el EGF-R.

El anticuerpo humanizado se obtuvo mediante trasplante de los CDR del anticuerpo murino, en los marcos de las regiones variables humanas de las cadenas pesada y ligera Eu y Rei, respectivamente. Este anticuerpo perdió la capacidad de unión al EGF-R. A partir del mismo, se construyó un anticuerpo reformado al que se le reintrodujeron residuos murinos en algunas posiciones de los marcos humanos. Para la construcción de este anticuerpo reformado, se hizo un análisis de los residuos de las regiones marcos que pudieran influir en la conformación que adoptan los CDR para el adecuado reconocimiento del antígeno y para tratar de mantener los mis-

✉ Autor de correspondencia