

EMPLEO DEL AGUA DE COCO (*Cocos nucifera* L.) EN EL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS PARA PREPARACIONES CROMOSOMICAS

José Humberto Jiménez M.
Departamento de Biología
Universidad del Valle

Resumen

Se presentan los resultados conseguidos con la sustitución parcial y total del suero fetal bovino (SFB) por agua de coco viche y agua de coco maduro en el cultivo de linfocitos de sangre periférica humana para la obtención de preparaciones cromosómicas. Se cultivó sangre total de tres pacientes de buena salud, dos de sexo femenino y uno de sexo masculino con edades de 20, 21 y 25 años respectivamente. Los cultivos se efectuaron según la técnica de (Moorhead y Col.)²³ y de cada uno de ellos se hicieron 3 repeticiones, lo cual implicó un total de 27 ensayos, siendo además el suero fetal bovino gradativamente sustituido por agua de coco viche y agua de coco maduro. Se efectuaron 5 experimentos complementarios para agua de coco viche y agua de coco maduro y experimentos controles para cada caso. Los resultados obtenidos con la sustitución parcial del suero fetal bovino a concentraciones de 0.50 cc.; 1.00 cc.; 1.50 cc., y aún la sustitución total del mismo, aunque con índice mitótico más bajo, pueden ser recomendadas como alternativas experimentales para la obtención de preparaciones cromosómicas de linfocitos de sangre periférica humana.

Abstract

Results are presented for partial and total substitution of bovine fetal serum (BFS) by liquid from immature and mature coconuts in the culture of human peripheral blood lymphocytes for obtaining chromosomal preparations. Total

blood from three patients in good health (two females and one male, 20, 21 and 25 years of age respectively) was cultured. Cultures were carried out using the technique of (Moorhead et al.)²³; three repetitions were made of each culture (a total of 27 trials), substituting liquid from immature and mature coconuts for bovine fetal serum in different proportions. Five complementary experiments were carried out, with control experiments, for liquid from immature and mature coconuts. Results obtained by partial substitution of fetal calf serum by liquid from immature coconuts at concentrations of 0.50 cc., 1.00 cc., 1.50 cc., and by total substitution (although with a lower mitotic index), can be recommended as experimental options for obtaining chromosomal preparations from lymphocytes of human peripheral blood.

Introducción

Desde finales del siglo XIX el agua de coco, fluido nutriente que baña a un embrión inmaduro¹, ha sido empleado como un excelente medio de cultivo para bacterias²; para hongos fitopatógenos, micodermas y bacteroides^{3,4}; como líquido monofásico en el cultivo de tripanosomas⁵; en cultivos de embriones y tejidos vegetales^{6,7,8,9,10,11,12,13,14,15}; en la preparación de un sustituto de la leche de vaca¹⁶; para estudiar su efecto en el desarrollo de células sarcomatosas en el ratón¹⁷; para analizar los cambios electrolíticos en sangre y orina de perros durante su administración en forma de infusión¹⁸; su empleo en medicina en el tratamiento del cólera pediátrico¹⁹; en la rehidratación oral de niños con diarrea²⁰ y como una solución electrolítica oral²¹. En el campo del cultivo de células animales su empleo únicamente se ha dado como una tentativa de usar este fluido como suplemento de dichos medios para mantener viva pero no en crecimiento una línea celular de riñón humano²².

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al sustituir gradativamente hasta su reemplazo total el *SFB* por agua de coco viche y agua de coco maduro en el cultivo de linfocitos humanos para preparaciones cromosómicas, como una búsqueda de alternativas tendientes a reducir o suprimir la dependencia del empleo del *SFB* exógeno, que con resultados prometedores no sólo introduce cambios sustanciales en la metodología tradicional, sino que disminuye ostensiblemente los costos de la misma.

Materiales y Métodos

Agua de coco viche: Con la ayuda de una jeringa estéril se obtuvieron

120 cc. de un fruto con epicarpio de color verde claro, los cuales fueron filtrados por millipore de 0.22μ , a una temperatura de 28°C .

Agua de coco maduro: De la misma manera fueron obtenidos 70 cc. de un fruto con epicarpio pardo oscuro, los cuales se pasaron primero por tela de gasa y después esterilizados por filtro millipore de 0.22μ , a una temperatura de 28°C .

Para ser utilizados en los cultivos, ambos fluidos se llevaron a un *pH* entre 7.2–7.4 con bicarbonato de sodio estéril y se mantuvieron congelados.

Cultivo de linfocitos: Se cultivó sangre total de tres personas de buena salud, dos de sexo femenino de 20 y 21 años respectivamente y una de sexo masculino de 25 años según el método de (Moorhead y Col.)²³ con las siguientes modificaciones. *TC* 199–1X Difco, *pH* 7.2–7.4, 8 cc.; fitohemaglutinina (*PHA*) *P* Difco 0.3 cc. de una solución 1.2 con agua destilada estéril; *SFB* Difco 2 cc. y 0.4 cc. de sangre total heparinizada para los controles (Tabla 1:1).

En cada paciente el *SFB* fue gradativamente sustituido por agua de coco viche y agua de coco maduro (Tabla 1:2–9). De cada uno de estos tratamientos se hicieron repeticiones, lo cual implicó un total de 27 ensayos. Se efectuaron además 5 experimentos complementarios para agua de coco viche y agua de coco maduro (Tabla 2:10–14).

Los cultivos fueron mantenidos 72 horas a 37°C y tratados con 0.15 μ grs. de colchicina por 10 cms. de medio durante la última hora. El índice mitótico (*IM*) se determinó identificando interfases, profases y metafases en una población de 1.000 células para cada caso $IM = \frac{\text{profase} + \text{metafase}}{100}$.

El diseño estadístico empleado en el estudio de los experimentos, corresponde al Análisis de Varianza^{24,25,26}.

Resultados

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se presentan en la Tabla 3, relievándose el hecho de que con el uso del agua de coco viche se consiguió un aumento de los *IM*, respecto a los *IM* alcanzados con el empleo del agua de coco maduro.

También se puede ver, que la respuesta mitogénica en términos de *IM*, es la misma cuando solamente se emplea *SFB*, que cuando se usa 0.50 cc. de *SFB* adicionado con 1.50 cc. de agua de coco viche (Tabla 3) y que en los experimentos de la Tabla 2:10, 11, 12, 13 y 14, no se obtuvieron células

en crecimiento, ni en división ($IM = 0$).

Realizado el análisis de varianza^{24,25,26}, de los datos de los experimentos de la Tabla 3, se encontró un valor (F) altamente significativo ($= 39.92$ con 8 y 18 grados de libertad), que indica que si existen diferencias significativas en los efectos de los tratamientos, es decir, el IM cambia de acuerdo con la combinación de SFB , el tipo y la proporción de agua de coco utilizado (viche o maduro).

Con el propósito de verificar si existen diferencias entre los resultados de los IM para los 2 tipos de agua de coco empleados, Tabla 3, se usó la técnica de contrastes ortogonales²⁴, encontrándose un valor (F) altamente significativo ($F = 157.79$ con 1 y 18 grados de libertad), lo cual claramente muestra que cuando se utiliza agua de coco viche, el incremento en el IM , es superior al que se obtiene cuando se lo hace con agua de coco maduro.

Los hallazgos hasta aquí descritos, nos indujeron a restringir nuestro análisis únicamente a aquellos ensayos en los cuales se empleó agua de coco viche, ya que fue precisamente con ella que se obtuvieron los mejores IM , Tabla 3, (2.55; 3.85; 6.25; 6.77).

Dado que el SFB se mantuvo permanentemente congelado, salvo en aquellas oportunidades en que se realizaron los ensayos en donde cada vez éste se descongeló, se pensó que tal hecho pudiera haber influido en los resultados conseguidos. Verificando si la variación dentro de los ensayos es la misma para todos los tratamientos y con el objeto de tener en cuenta si se puede o no considerar que el SFB empleado en estas pruebas, es homogéneo, se encontró que el análisis de varianza correspondiente^{24,25,26}, arrojó un valor (F) altamente significativo ($F = 12.1$ con 4 y 10 grados de libertad), indicativo que el suero utilizado en los ensayos, cumplió con los requisitos de homogeneidad.

En esta etapa del estudio se plantearon 2 pruebas de particular importancia, así:

1. Verificar si el aumento del IM es superior cuando se usa únicamente SFB , respecto a la sustitución total o parcial del SFB por agua de coco viche.
2. Encontrar si existe por lo menos una determinada combinación de SFB con agua de coco viche, cuyo IM sea similar al que se obtiene cuando sólo se utiliza SFB .

Empleando de nuevo la prueba de los contrastes ortogonales²⁴ se halló

un (F) altamente significativo ($F = 10.74$ con 1 y 10 grados de libertad). Este resultado permite concluir que la respuesta en términos de IM es la misma, cuando se emplea solamente SFB (tratamiento No.1), que cuando se usa 0.50 cc. de SFB adicionado con 1.50 cc. de agua de coco viche (tratamiento No.6). (Ver Tabla 3).

Discusión

Las células *in vitro* requieren para su proliferación de una mezcla de nutrientes básicos de aminoácidos, azúcares, vitaminas y sales, lo mismo que un suplemento de otros extractos o fluidos que incluyen linfa, leche o calostro, fluido espinal o amniótico, extracto de embrión y suero de diferentes orígenes²⁷. Estudios bioquímicos del agua de coco viche y agua de coco maduro¹² indican que estos líquidos poseen los aminoácidos esenciales (leucina, lisina, metionina, treonina, valina) y otros aminoácidos que no son sintetizados “*in vitro*” en cantidades suficientes (glutamina, arginina, histidina, ácido glutámico, tirosina). Los azúcares (glucosa, sucrosa fructosa); vitaminas (B_1 , B_2 , biotina, ácidos fólico, nicotínico, pantoténico); minerales (potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro, cobre, fósforo, azufre) y los factores de crecimiento 1 – 3–difencil urea¹⁰, el ácido 3–indol acético¹⁵ y la 9 – β – *D*–ribofuranosilzeatina²⁸.

Entre los componentes críticos del suero están las hormonas presentes en pequeñas cantidades, también se encuentran proteínas de ligamiento y factores de adherencia²⁹.

Así, si bien es cierto que el agua de coco viche no tiene los aminoácidos esenciales triptofano, isoleucina y fenilalanina¹², también lo es que tales elementos serían aportados a través del medio de cultivo utilizado, *TC 199*³⁰, lo cual podría sugerir que el crecimiento observado en el experimento 8 de la Tabla 1 en el cual SFB fue totalmente reemplazado, los elementos necesarios para tal proliferación fueron aportados por el agua de coco viche. Es importante entonces mencionar que en el agua de coco se ha detectado la presencia de la 1 – 3–difencil urea y de la arabinosa indolacética, reconocidos factores de crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales³¹, de la 9 – β – *D*–ribofuranosilzeatina²⁸ y una citoquinina que exhibe las propiedades cromatográficas de la zeatina³².

Todo lo hasta aquí planteado se complementa con el hecho de que la isopentenil adenina así como su análogo 4–hidroxilado, la zeatina, pueden muy bien mediar el control de la fase *S* de la síntesis del *ADN* en células

BHK (riñón de Hamster) sincronizadas, indicando que cualquiera de estas dos citoquininas pueden causar activación de la *ADN* girasa nuclear no identificada, responsable de la replicación del *ADN*³³. Conviene además anotar que la glutamina juega un papel fundamental en el metabolismo de las células en cultivo³⁴ y que el contenido de este aminoácido es ocho veces mayor en el agua de coco viche que en el agua de coco maduro¹². Esta enorme diferencia podría explicar el hecho de no haberse obtenido células en división en cultivos en los cuales el *SFB* se reemplazó totalmente por agua de coco maduro, experimento 9 de la Tabla 3.

Finalmente, debemos mencionar que los resultados conseguidos en cada uno de los experimentos de la Tabla 2, en los cuales no se obtuvieron células en división, se podrían explicar mencionando que la *PHA* actúa como factor de iniciación de la actividad mitótica en el cultivo de linfocitos humanos³⁵, de la importancia del *SFB* para el cultivo de cierto tipo de células animales²⁷ y de los requerimientos mínimos de los diferentes elementos y su concentración en el medio *TC* 199, empleado en el cultivo de linfocitos³⁰.

La sustitución parcial de suero total bovino a concentraciones de 0.50 cc.; 1.00 cc.; 1.50 cc. y aún la sustitución total del mismo, aunque con índice mitótico más bajo, pueden ser recomendadas como alternativas experimentales para la obtención de preparaciones cromosómicas de linfocitos de sangre periférica humana.

Agradecimientos

A los Doctores Felipe García y Mario Ríos, por la revisión del manuscrito y sus importantes sugerencias al respecto.

A los profesores Huber Ramos y Javier Olaya, por el diseño y análisis estadístico.

A la señorita Janneth Caicedo por su importante colaboración en la labor de mecanografía.

	SUERO FETAL BOVINO (SFB)	AGUA DE COCO VICHE	AGUA DE COCO MADURO
1	2.00 cc	—	—
2	1.50 cc	0.50 cc	—
3	1.50	—	0.50 cc
4	1.00 cc	1.00 cc	—
5	1.00	—	1.00 cc
6	0.50 cc	1.50 cc	—
7	0.50 cc	—	1.50 cc
8	—	2.00 cc	—
9	—	—	2.00 cc

Tabla 1. Tratamientos realizados en el control empleando exclusivamente SFB (1), para los casos con agua de coco viche (2, 4, 6, 8) y agua de coco maduro (3, 5, 7, 9). En todos los experimentos se usó TC199, IX(8.00cc); fitohemaglutinina P(0.3cc) y sangre periférica humana heparinizada (0.4cc).

	SUERO FETAL BOVINO (SFB)	AGUA DE COCO VICHE	AGUA DE COCO MADURO
10	—	—	—
11	—	2.00 cc	—
12	—	10.00 cc	—
13	—	—	2.00 cc
14	—	—	10.00 cc

Tabla 2. Tratamientos complementarios a los diseñados en la Tabla 1, para cada uno de los casos. En todos los experimentos se usó TC199, IX(8.00cc); fitohemaglutinina P(0.3cc) y sangre periférica humana heparinizada (0.4cc).

TRATAMIENTO No.	OBSERVACIONES (INDICES MITOTICOS)			MEDIDAS POR TRATAMIENTO
1	5.30	8.37	7.10	6.92
2	4.02	3.91	3.61	3.85
3	2.98	2.84	1.90	2.57
4	6.35	6.01	6.38	6.25
5	1.39	1.16	1.46	1.37
6	6.28	8.35	5.69	6.77
7	0.00	0.00	0.00	0.00
8	2.41	3.21	2.04	2.55
9	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 3. Resultados obtenidos (INDICES MITOTICOS) en los diferentes tratamientos indicados en la Tabla 1.

Bibliografía

1. Kirwood, J.K., Gies, W.J. *Chemical studies of the coconut with some*

- notes on the changes during germination.* Bull. Torrey Bot. Club XXIX, 325-359 (1902)
2. Van Slyke, L.I. *Analysis of milk of ripe and unripe coconuts.* J. Am. Chem. Soc. 13, 130-131 (1891)
 3. Picado, C. *El agua de coco como medio de cultivo.* Bol. of Sanit. Panam. 21, 960-965, (1942)
 4. Blanwelt, L., Asheville, N.C. *The use of noncooked, nonsterilized coconut milk as an additional nutrient substance in culture media.* J. Lab. Clin. Med. 29, 420-423, (1939)
 5. Márquez, J.C., Scorza, J.V., Anez, N. *Coconut water as a monophasic liquid medium for cultivating trypanosomatids.* Trans. R. Soc. Med. Hyg. 81 (4), 615-617, (1989)
 6. Van Overbeek, J., Conklin, M.E., Blakealce, A.F. *Factors in coconut milk essential for growth and development of very young Datura embryos.* Science 94, 350-351, (1941)
 7. Tukey, H.B. *Plant breeding by incubator methods.* Science Monthly. LVIII, 321-322, (1944)
 8. Caplin, S.M., Steward, F.C. *Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot Root.* Science, VIII, 655-657, (1948)
 9. Steward, F.C., Caplin, S.M. *Investigation on growth and metabolism of plant cell, IV evidence on the role of the coconut milk factor in development.* Ann. Bot. (N.S.) XVI (64), 491-504, (1952)
 10. Shantz, K.M., Steward, F.C. *Coconut milk factor. The growth promoting substances in coconut milk.* J. Amer. Chem. Soc. 74, 6133-6135, (1952)
 11. Stewards, F.C., Shantz, K.M. *The chemical regulation of grow (some substances and extracts which induce growth and morphogenesis)* Ann. Rev. Plant Physiol. 10, 379-404, (1959)
 12. Tulecke, W., Weinstein, L.H., Rutner, A., Laurencot, H.J. Jr. *The biochemical composition of coconut water (coconut milk) as related to its use in plant tissue culture cont.* Boyce Thompson Inst. Plan Research Inc. 21 (2), Part I, 115-128, (1961)

13. Halperin, W. *Single cells, coconut milk, and embryogenesis in vitro*. Science 153 (741), 1288, (1966)
14. Steward, F.C. *From cultured cells to whole plants: The induction and control of their growth and morphogenesis*. Proc. R. Soc. London (Biol.) 175 (38), 1-30, (1970)
15. Fisher, J.B., Isai, J.H. *vitro growth of embryos and callus of coconut palm*. In vitro 14 (3), 307-311, (1978)
16. Chitarra, M.I.F., Campos, M.A.P. *Coconuts (cocos nucifera) in preparation of milk substitutes*. Rev. Farm. Bioquim. S. Paulo (Brazil) 13 (2), 351-374, (1975)
17. Crispens, C.G. Jr., Jones, D.D. *Effect of coconut milk on the development of reticulum cell sarcoma in mice*. Anat. Rec. (USA). 763, 187-194, (1977)
18. Senesh, T.P., Sharma, K.N. *Electrolyte changes in plasma and urine tender coconut water infusion in dogs*. Indian J. Physiol. Pharmacol. (India) 23 (1), 44-48, (1979)
19. Nurasid, H., Antoseno, T., Purwodibroto, S. *The use of young coconut water in pediatric cholera*. Indones (Indonesia) 19 (9-10), 219-2255, (1979)
20. Kuberski, T. *Coconut water for the oral rehydration of childhood diarrhoeas*. N.Z. Med. J. (New Zealand) 91 (60), 390-392, (1980)
21. Munir, M., Mustadjab, I. *Coconut water as one of the optional oral electrolyte solutions*. Pediatr. Indone. (Indonesia) 20 (1-2), 38-46, (1980)
22. Shatzmayr, H.G., Homma, A., Loureiro, M.L.P.O. *Uso da agua de coco verde para o cultivo de celulas animais*. Rev. Brasil Biol. 30 (1), 97-100, (1970)
23. Moorhead, P.S., Nowell, R.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., Hugerford, D.A. *Chromosome preparations of leucocytless cultured from human peripheral blood*. Exp. Cell Res. 20, 613-616, (1960)
24. Walpole, R.K. y Myers, R.H. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. 3a. Ed., México: Interamericana, 462-484, (1987)

25. Graybill, F. *Theory and applications of the lineal model*. N. Scituate, Mass: Duxbury Press, 514-526, (1976)
26. Searle, S.R. *Linear Models*. New York: Wiley, 229-245, (1971)
27. Barnes, D., Sato, G. *Methods for growth of cultured calls in serum free medium*. Anal. Biochem. 102, 255-270, (1980)
28. Letham, D.S. *Regulators of cell division in plant tissues, XX. The cytokinins of coconut mil*. Physiol. Plant 32, 66-70, (1974)
29. Barnes, D., Sato, G. *Serum free cell cultured: A Unifying Approach Cell*. 22, 649-655, (1980)
30. Morgan, J.I., Morton, A.J., Parker, R.C. *Nutrition of animal cell in tissue culture. In initial studies on a synthetic medium*. Proc. Soc. Expt.1 Biol. Med. 71, 1, (1950)
31. Shantz, K.M., Steward, F.C. *The identification of compound a from coconut milk as 1, 3-Diphenylurea*. J. Amer. Chem. Soc. 77, 6351-6353, (1955)
32. Zwar, J.A., Bruce, M.I. *Cytokinin from apple exctract and coconut milk*. Aust, J. Biol. Sci. 23, 289-297, (1970)
33. Huneeus, V.Q., Wiley, M.H., Siperstein, M.D. *Isopentenyladenine as a mediator of mevalonate regulated DNA replication*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (10), 5842-5846, (1980)
34. Meister, A. *On the synthesis and utilization of glutamine*. Harvey Lect. Serie 63. Academy Press, N.Y. London, 139-178, (1968)
35. Nowell, P.C. *Phytohemagglutinin: An iniciator of mitosis in culture of normal human leukocytes*. Cancer Research. 20, 462-466, (1960)