

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Establecimiento de cultivos en suspensión de *Daucus carota* para el  
desarrollo de vacunas contra poliovirus”**

**T E S I S   P R O F E S I O N A L**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

**Biól. Mónica Morales Aguilar**

**DIRIGIDO POR:**

Tutor: **Dra. Anabel Ortiz Caltempa**

Cotutor: **Dr. Sergio Rosales Mendoza**

Cuernavaca, Morelos

Agosto, 2021



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología en colaboración con el Laboratorio Biofármacos Recombinantes del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí; bajo la dirección de la Dra. Anabel Ortiz Caltempa y el Dr. Sergio Rosales-Mendoza.

## ***AGRADECIMIENTOS***

A la Dra. Anabel Ortiz Caltempa por permitirme formar parte del grupo de trabajo y fungir como mi tutora durante la realización del proyecto, por su confianza, enseñanzas, dedicación y por sus valiosas aportaciones.

Al Dr. Sergio Rosales Mendoza por darme la oportunidad de formar parte del proyecto, por brindarme su apoyo, disposición y por sus recomendaciones para enriquecer el proyecto.

A la Dra. María Luisa Villareal Ortega por permitirme nuevamente ser parte de su grupo de trabajo y por sus valiosas aportaciones que me han ayudado fortalecer mi formación como profesional.

A la Dra. Elba Villegas por aceptar formar parte de del comité evaluador, por su disposición, dedicación y recomendaciones tanto en el proyecto como en mi formación académica

A la Dra. Edda Sciutto por aceptar formar parte del comité evaluador, por su apoyo, sus enseñanzas y recomendaciones durante el proyecto.

A la Dra. Omayra Bolaños Martínez por la disposición, dedicación y el apoyo en los ensayos realizados en el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la UASLP.

A la M.I Ariadna Zenil Rodríguez por su asesoría en el manejo del equipo de HPLC.

Al Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa por formar parte de mi formación académica, por sus recomendaciones en los seminarios de grupo.

A T. Lucero Valladares por el apoyo brindado para la liofilización de las muestras.

A mis compañeros de laboratorio Miguel, Efraín, Christian, Paloma, Eli, Cynthia, Nancy, Itzel, por sus consejos y apoyo en el laboratorio.

A mis amigas Clau, Isa y María por la complicidad, por la sincera amistad y los momentos compartidos.

Al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de este proyecto No. 966345.

***DEDICATORIA***

**A MIS PADRES:**

Martha Aguilar Hopper y José Pedro Morales Rangel

Por el don de la vida, por la educación, por su apoyo y amor incondicional, por enseñarme con el ejemplo a trabajar por mis objetivos

**A MI HERMANA SUSU:**

Por tu complicidad y motivación para hacer mis sueños realidad, por tu apoyo incondicional

A mí, por no rendirme a pesar de las complicaciones durante el proyecto, por creer en mis sueños y trabajar duro para obtenerlos

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	II
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT .....	VII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Poliomielitis .....	2
2.1.1 Poliovirus.....	4
2.1.2 Epidemiología .....	7
2.1.3 Tipos de vacunas antipoliomielíticas.....	10
2.2 Vacunas .....	11
2.2.1 Vacunas de subunidades .....	12
2.2.2 Sistemas vegetales para la expresión de antígenos.....	13
2.3 Generalidades <i>Daucus carota</i> .....	15
2.3.1 Clasificación Taxonómica .....	17
2.3.2 Expresión genética en <i>Daucus carota</i> .....	17
2.3.3 Transformación de <i>Daucus carota</i> para la expresión de proteínas recombinantes .....	18
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	19
2.4.1 Medios de cultivo .....	19
2.4.2 Fitorreguladores .....	20
2.4.3 Cultivo de callo .....	21
2.4.4 Cultivos de células en suspensión .....	22
3. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	23
3.1 Expresión de proteínas estructurales de poliovirus de tejidos vegetales .....	23
3.2 Importancia de la estructura de poliovirus.....	25
4. JUSTIFICACIÓN .....	27
5. HIPÓTESIS .....	28
6. OBJETIVOS .....	28
6.1 Objetivo General: .....	28
6.2 Objetivos particulares.....	28

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	29
8. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
8.1 Obtención de las líneas celulares de <i>Daucus carota</i> .....	30
8.2 Cultivo de callos y células en suspensión de <i>Daucus carota</i> .....	30
8.2.1 Medio de cultivo .....	30
8.2.2 Cultivo de callos líneas WT y C-1 de <i>Daucus carota</i> .....	32
8.2.3 Establecimiento de cultivos en suspensión de las líneas SMC-1 y SM-WT de <i>Daucus carota</i> .....	33
8.3 Cinética de crecimiento de células en suspensión de <i>Daucus carota</i> en matraz.....	33
8.3.1 Viabilidad celular .....	34
8.3.2 Medición del pH.....	34
8.3.3 Análisis de biomasa en peso fresco .....	34
8.3.4 Análisis de biomasa en peso seco .....	35
8.3.5 Análisis estadístico .....	35
8.3.6 Cuantificación de azúcares totales .....	35
8. 4 Extracción de proteína VP2 de cultivos de <i>Daucus carota</i> .....	36
8.5 Inmuno-detección de VP2 por Dot blot.....	36
8. 6 Cuantificación de la proteína VP2 por ELISA.....	36
9. RESULTADOS .....	38
9.1 Establecimiento de callos de las líneas C-1 y C-WT de <i>Daucus carota</i> .....	38
9.1.1 Análisis estadístico.....	40
9.2 Cuantificación de la proteína VP2 en callo por medio de ELISA.....	42
9. 3 Establecimiento de células en suspensión de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> en matraz.....	44
9.4 Cinética de crecimiento celular de <i>Daucus carota</i> de la línea SMC-1 y SM-WT .....	45
9.4.1 Parámetros cinéticos de las células en suspensión de <i>Daucus carota</i> .....	46
9.4.2 pH del medio de cultivo en los estudios cinéticos de <i>Daucus carota</i> (SMC-1).....	48
9.4.3 Consumo de azúcares de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> .....	49
9.4.4 Viabilidad celular de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> .....	51
9.4.5 Detección de proteína VP2 .....	53
9.4.6 Expresión de proteína VP2 producida por la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> .....	54
9.5 Análisis de costos de los medios de cultivo.....	55
10. DISCUSIÓN .....	57
10.1 Establecimiento de cultivo de callos de la línea C-WT y C-1 de <i>Daucus carota</i> .....	57

10.2 Establecimiento de células en suspensión de la línea CMC-1 en matraz agitado de <i>Daucus carota</i> .....	58
10.3 Cinética de crecimiento de células en suspensión de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> .....	58
10.4 Consumo de azúcares de células en suspensión de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> en matraz .....	59
10.5 Comportamiento del pH .....	59
10.6 Viabilidad y agregados celulares .....	60
10.7 Producción de proteína VP2 .....	61
11. CONCLUSIONES .....	63
12. PERSPECTIVAS .....	63
13. REFERENCIAS .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico y replicativo del poliovirus	<b>3</b>
<b>Figura 2</b>	Organización y morfogénesis del genoma del poliovirus.	<b>6</b>
<b>Figura 3</b>	Distribución geográfica de infecciones por poliovirus	<b>8</b>
<b>Figura 4</b>	Características morfológicas de <i>Daucus carota</i>	<b>16</b>
<b>Figura 5</b>	Descripción del vector de expresión pBI-VPs	<b>26</b>
<b>Figura 6</b>	Secuencia de nucleótidos optimizada que codifica para la proteína VP2.	<b>26</b>
<b>Figura 7</b>	Modelo cinético del crecimiento de células en suspensión de <i>Daucus carota</i> en matraz de 250ml	<b>34</b>
<b>Figura 8</b>	Establecimiento de células en suspensión de la línea CMC-1 de <i>Daucus carota</i> .	<b>44</b>
<b>Figura 9</b>	Cultivo de células en suspensión de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> en matraz de 250 ml	<b>45</b>
<b>Figura 10</b>	Viabilidad celular de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i>	<b>52</b>
<b>Figura 11</b>	Inmunodetección de proteína VP2 por Dot blot	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Casos de poliomielitis	<b>8</b>
<b>Tabla 2</b>	Producción de vacunas en plantas	<b>14</b>
<b>Tabla 3</b>	Aportaciones científicas sobre transformación de <i>Daucus carota</i>	<b>18</b>
<b>Tabla 4</b>	Stock de medios de cultivo	<b>31</b>
<b>Tabla 5</b>	Modelo experimental para el establecimiento de cultivo en callos	<b>32</b>
<b>Tabla 6</b>	Crecimiento celular de <i>Daucus carota</i> (CMC-1 y CM-WT) en medio sólido	<b>39</b>
<b>Tabla 7</b>	Concentración de proteína VP2 por ELISA	<b>42</b>
<b>Tabla 8</b>	Parámetros de crecimiento y producción de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i>	<b>55</b>
<b>Tabla 9</b>	Comparación de costos de los medios de cultivo	<b>56</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1</b>	Biomasa de callos (gPF) de la línea CMC-1 de <i>Daucus carota</i>	<b>40</b>
<b>Gráfica 2</b>	Biomasa de callos (gPF) de la línea CM-WT de <i>Daucus carota</i>	<b>41</b>
<b>Gráfica 3</b>	Cuantificación de la proteína VP2 mediante ELISA indirecta	<b>43</b>
<b>Gráfica 4</b>	Curva de crecimiento celular de la línea SCM-1 a nivel matraz de <i>Daucus carota</i>	<b>46</b>
<b>Gráfica 5</b>	ln [biomasa en peso seco] contra tiempo de la fase exponencial del cultivo SMC-1 de <i>Daucus carota</i> , $\mu$ y Td	<b>47</b>
<b>Gráfica 6</b>	Curva de crecimiento celular y comportamiento de pH de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> en matraz agitado de 250 ml	<b>48</b>
<b>Gráfica 7</b>	Curvas de calibración para cuantificación de azúcares	<b>49</b>
<b>Gráfica 8</b>	Curva de crecimiento celular de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> en matraz agitado de 250 ml y consumo de carbohidratos (sacarosa, glucosa, fructosa)	<b>50</b>
<b>Gráfica 9</b>	Curva de crecimiento celular de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> y porcentaje de viabilidad.	<b>51</b>
<b>Gráfica 10</b>	Curva de crecimiento celular de la línea SMC-1 de <i>Daucus carota</i> y expresión de proteína VP2.	<b>54</b>

## ABREVIATURAS

<b>C1</b>	Callos de la línea transformada de <i>Daucus carota</i>
<b>SMC-1</b>	Células en suspensión de la línea transformada de <i>Daucus carota</i>
<b>WT</b>	Línea sin transformar (silvestre) de <i>Daucus carota</i>
<b>CIN</b>	Cinetina
<b>D.O</b>	Densidad Óptica
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>MS</b>	Murashine y Skoog
<b>B5</b>	Gamborg
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>g</b>	Gramos
<b>mg</b>	Miligramos
<b>µg</b>	Microgramos
<b>h</b>	Horas
<b>min</b>	Minutos
<b>s</b>	Segundos
<b>L</b>	Litros
<b>ml</b>	Mililitros
<b>µl</b>	Microlitros
<b>cm</b>	Centímetros
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>MSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PS</b>	Peso seco
<b>PF</b>	Peso fresco
<b>PVP</b>	Polivinil pirrolidona
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>td</b>	Tiempo de duplicación celular
<b>µ</b>	Velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ )
<b>XPS</b>	Concentración de biomasa en peso seco ( $g L^{-1} PS$ )
<b>XPF</b>	Concentración de biomasa en peso fresco ( $g L^{-1} PF$ )
<b>Y</b>	Rendimiento del producto

## RESUMEN

El poliovirus es uno de los agentes infecciosos en vías de erradicación a nivel global, actualmente Afganistán y Pakistán son los únicos países en donde el virus se mantiene endémico (serotipo 1); sin embargo, se han reportado rebrotes de poliomielitis ocasionados por poliovirus derivado de vacuna circulante (cVDPV) en países donde el virus no es considerado endémico. La Organización Mundial de la Salud recomienda mantener elevados los niveles de cobertura de vacunación sistemática, así como buscar nuevas alternativas de vacunación efectiva y accesible para combatir infecciones provocadas por poliovirus.

En los últimos años se han desarrollado técnicas para el aprovechamiento de cultivos vegetales con capacidad de producir vacunas a través de proteínas recombinantes. Una de las ventajas de los productos biofarmacéuticos a partir de plantas es que, al ser administradas de forma oral, ayudan a la producción de una respuesta inmunitaria en la mucosa. *Daucus carota* es una de las especies con gran oportunidad en este campo biotecnológico, dado que produce tejido que es de uso comestible en todo el mundo por lo cual se considera como un recurso de importancia para la producción de vacunas comestibles.

Rosales-Mendoza en el año 2018 realizó la transformación y obtención de células de zanahoria que expresan la proteína VP2 que junto con VP1, VP3 y VP4 conforman la cápside del poliovirus, de gran importancia para el desarrollo de una vacuna. En el presente trabajo se estableció la producción de cultivos celulares de *Daucus carota in vitro* de callos y células en suspensión, con la capacidad de producir proteína VP2, con relevancia en la inducción de respuesta inmune contra poliovirus.

A partir de los subcultivos de callos de la línea transformada (C-1) y de la línea silvestre (C-WT) se obtuvieron callos friables bajo tres condiciones de crecimiento (luz constante, fotoperiodo y oscuridad) y seis tratamientos de medio de cultivo.

Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación permitieron el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Daucus carota* de la línea SMC-1 lo que representa el primer reporte de células en suspensión establecidas en matraz para la producción de una vacuna contra poliovirus. Así mismo, se muestran los resultados obtenidos en una cinética de crecimiento celular de la línea SMC-1, se registró un máximo de biomasa es  $16.07 \text{ g L}^{-1} \text{ PS}$  a los 12 días con una velocidad de crecimiento de  $0.2938 \text{ d}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 2.35 días lo

que permiten generar un cultivo celular interesante para la realización de nuevos proyectos con otras estrategias de cultivo que permitan mejorar el rendimiento de una biomasa con la capacidad de producir la proteína VP2

## ABSTRACT

Currently, Afghanistan and Pakistan are the only countries where poliovirus remains endemic (serotype 1); however, polio outbreaks caused by circulating vaccine-derived poliovirus (cVDPV) have been reported in countries where the virus is not considered endemic. The World Health Organization recommends maintaining high levels of routine vaccination coverage, as well as seeking new effective and accessible vaccination alternatives to combat poliovirus infections.

In recent years, techniques have been developed for the use of plant crops with the capacity to produce vaccines through recombinant proteins. One of the advantages of plant-based biopharmaceuticals is that, when administered orally, they help to produce an immune response in the mucosa. *Daucus carota* is one of the species with great opportunity in this biotechnological field, since it produces tissue that is of edible use all over the world or for which it is considered as an important resource to produce edible vaccines.

In 2018, Rosales-Mendoza carried out the transformation and obtention of carrot cells that express the protein (VP2); that together with VP1, VP3 and VP4 make up the capsid of the poliovirus, of great importance for the development of a vaccine. In the present work, the production of *in vitro* *Daucus carota* cell cultures of callus and suspension cells, with the ability to produce VP2 protein, with relevance in the induction of immune response against poliovirus, was established.

From callus subcultures of the transformed line (C-1) and the wild-type line (WT), friable callus was obtained under three growth conditions (constant light, photoperiod and darkness) and six culture medium treatments.

The results obtained in this research project allowed the establishment of the *in vitro* culture of *Daucus carota* of the SMC-1 line, which represents the first report of cells in suspension established in a flask for the production of a vaccine against poliovirus. The results obtained in the cell growth kinetics of the SMC-1 line are shown; a maximum biomass of 16.07 g L<sup>-1</sup> PS at 12 days a growth rate of 0.2938 d<sup>-1</sup> and a doubling time of 2.35 days were recorded, which allow generating an interesting cell culture for the realization of new projects with other culture strategies that allow improving the biomass yield and the production of the VP2 protein.

## 1. INTRODUCCIÓN

La poliomielitis es una enfermedad infecciosa originada por poliovirus, un enterovirus de ácido ribonucleico (ARN) perteneciente a la familia *Picornaviridae*, que tiene la capacidad de invadir sistema nervioso central (SNC) y generar parálisis flácida aguda de forma irreversible en una de cada 200 personas infectadas, siendo los niños menores de 5 años los que resultan más afectados (WHO, 2020). La vía de transmisión es fecal-oral y oral-oral, la mayoría de los casos son asintomáticos, no obstante, la infección puede diseminarse al sistema nervioso central en donde afecta a las neuronas motoras de la medula espinal, lo cual puede ocasionar parálisis flácida muscular y en algunos casos la muerte (Nathanson, 2008).

A pesar de que del porcentaje de casos con poliovirus ha disminuido notoriamente, aún hay registros de poliomielitis causada por serotipo 1 en países donde el virus se mantiene endémico, además de reinfección por poliovirus derivado de vacuna circulante (WHO, 2019), la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda mantener elevados los niveles de cobertura de vacunación sistémica, así como buscar nuevas alternativas de vacunación efectivas y accesibles para poder combatir infecciones provocadas por poliovirus.

En la actualidad se han desarrollado técnicas para el aprovechamiento de cultivos vegetales con capacidad de producir vacunas a través de proteínas recombinantes. Dentro de las ventajas de los productos biofarmacéuticos a partir de plantas incluyen: bajo costo con potencial en la administración oral.

El objetivo del presente trabajo es establecer la producción de cultivos celulares de *Daucus carota in vitro*, con la capacidad de producir proteína VP2, con relevancia en la inducción de respuesta inmune contra poliovirus.

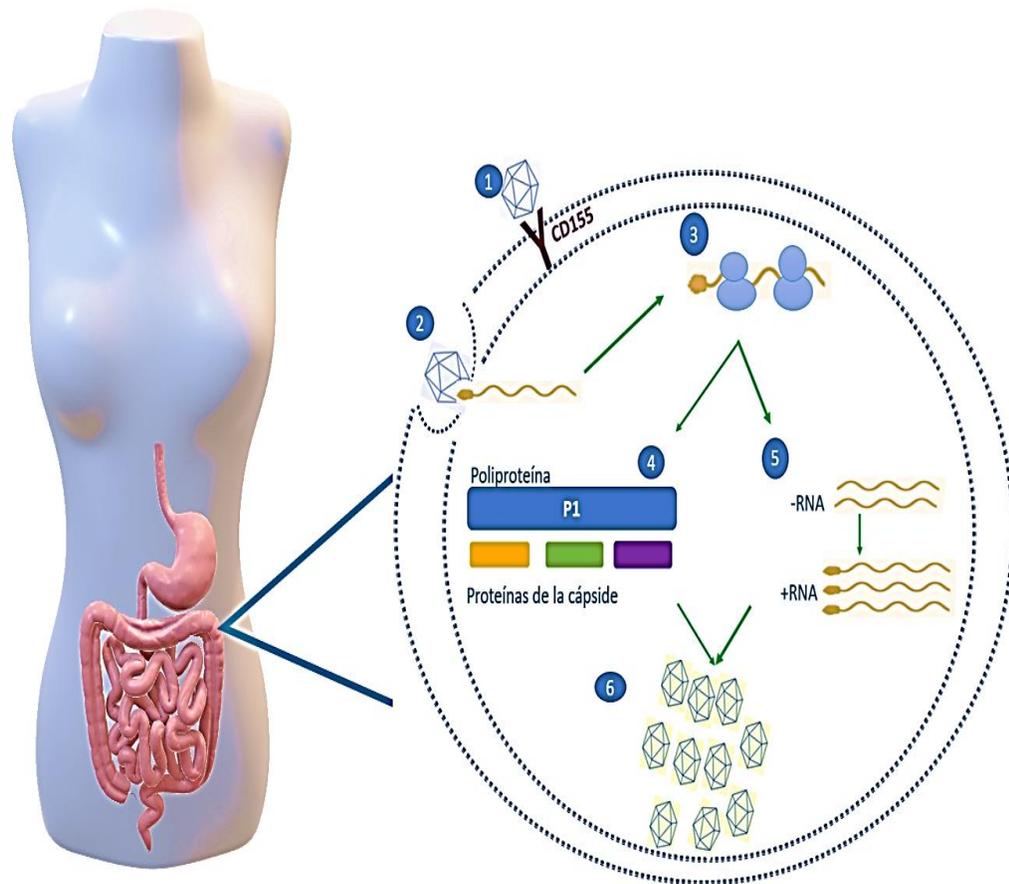
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Poliomielitis

La poliomielitis es una enfermedad viral infecciosa, ocasionada por un enterovirus de ácido ribonucleico (ARN) que puede invadir el sistema nervioso central. La vía de transmisión es oral-oral o fecal-oral; la mayoría de los casos son asintomáticos; sin embargo, la infección puede diseminarse al sistema nervioso central en donde afecta a las neuronas motoras de la médula espinal, lo cual puede ocasionar parálisis flácida muscular y en algunos casos la muerte. En menos del 1% de los infectados, el virus se multiplica en las células de la asta anterior de la médula espinal, produciendo parálisis flácida aguda, a menudo con secuelas persistentes. Las tasas de letalidad entre los casos de parálisis varían entre el 5 y 10% en los niños, entre el 15 - 30% en los adolescentes y adultos, se asocian principalmente a la afectación bulbar (Mueller *et al.*, 2005).

El virus ingresa al huésped a través de la mucosa oral, en donde se une a través del receptor CD155, presente en las células del epitelio de la orofaringe y las placas de Peyer, sitio donde inicia el ciclo de replicación, en el interior de la célula infectada el RNA del virus se traduce para dar lugar a una poliproteína, cuyo procesamiento conduce a las diferentes proteínas codificadas por virus. Posteriormente es transportado por células dendríticas y macrófagos infectados en dirección a los ganglios linfáticos cervicales profundos y ganglios linfáticos mesentéricos, en donde se replica eficientemente (**Figura 1**) (Fernández-Cruz Pérez & Rodríguez-Sainz, 2013). Los virus son liberados hasta la linfa y transportados a través de los vasos linfáticos eferentes hacia el torrente sanguíneo provocando viremia primaria; generando la propagación viral a otros tejidos. Aproximadamente solo en el 1% de las infecciones por poliovirus circulante, invade el SNC.

Se han sugerido tres hipótesis sobre el ingreso de poliovirus al sistema nervioso central (SNC). En todos los casos se requiere viremia primaria, es decir, el ingreso del virus por mucosa orofaringe/intestinal. La primera hipótesis predice que los viriones pasan directamente de la sangre al SNC a través de la barrera hematoencefálica (Yang *et al.*, 1997), la segunda hipótesis sugiere que los viriones son transportados mediante la vía neuronal o transporte axonal retrogrado y la tercera hipótesis es que el virus es transportado hasta SNC a través de los monocitos o macrófagos infectados (Blondel *et al.*, 2005; Ohka *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Ciclo biológico y replicativo del poliovirus. 1) Unión al receptor (PVR), la molécula CD155; 2) Ingreso de RNA viral a la célula; 3) Traducción del RNA viral para sintetizar la poliproteína; 4) Procesamiento proteolítico de la poliproteína; 5) Replicación del material genético para síntesis de proteínas o encapsulación, 6) Ensamblaje y liberación de progenie viral.

### 2.1.1 Poliovirus

Los virus son entidades biológicas microscópicas con capacidad para infectar células, cuando un virus infecta a un ser vivo se multiplica millones de veces, causando una enfermedad vírica. A una partícula de virus individual con capacidad infecciosa se le llama virión, y está compuesto por: cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), que codifica los genes del virus, las proteínas enzimáticas que permiten al virus la replicación, la envoltura externa o "cápside" conformada de proteínas estructurales que envuelve o se asocia al ARN o ADN y otra envoltura exterior de tipo lipídico con glucoproteínas. Los virus más simples no tienen esta capa externa, como los virus más complejos que sí la presentan.

Los enterovirus son un grupo de agentes virales que habitan en el intestino y que son los responsables de importantes y frecuentes enfermedades humanas con manifestaciones clínicas muy variadas. Pertenecen a la familia *Picornaviridae*, llamada así por tratarse de pequeños (pico) virus RNA c45 (pico) virus RNA con una cápside no encapsulada.

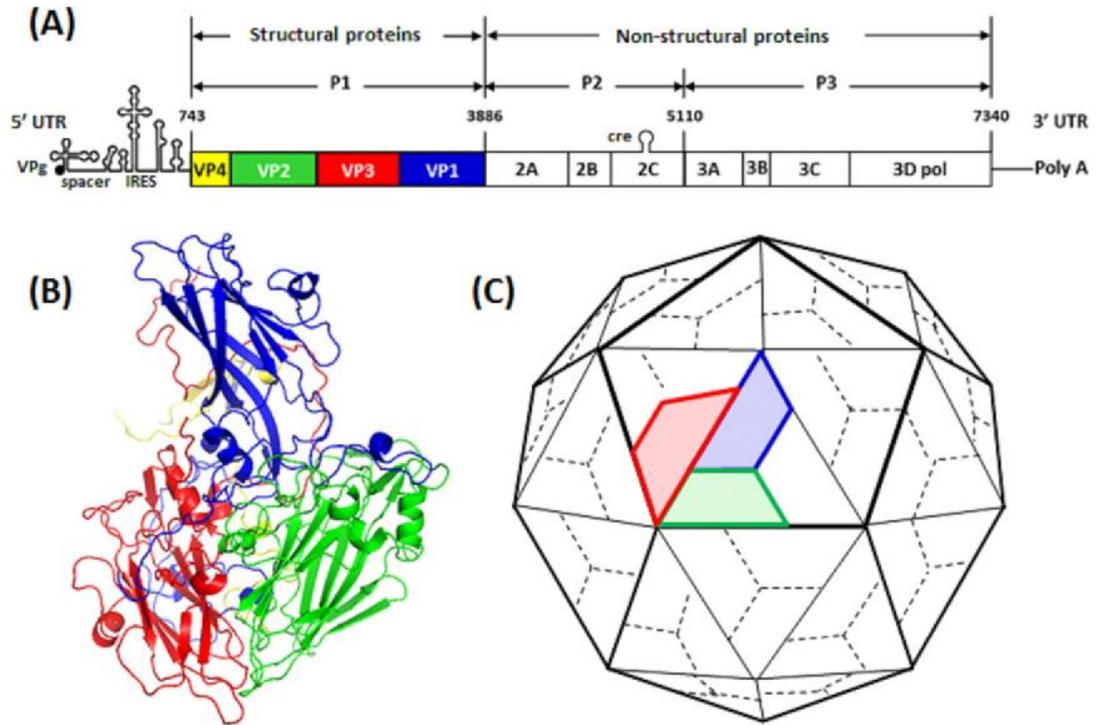
El poliovirus es un enterovirus de la familia *Picornaviridae*, la estructura genómica del virión de poliovirus se constituye de una cadena simple de RNA (+) y está recubierta por una nucleocápside (Cápside Virión Protein, VP) con cuatro subunidades VP1, VP2, VP3 y VP4 (Jiang *et al.*, 2014). En el extremo 5' contiene la proteína viral VPg unida por enlace fosfodiéster al ARN (+); a continuación, encuentra la región 5' UTR (untranslated región) que alberga estructuras secundarias en forma de tallo-asa que son indispensables para la replicación y traducción del genoma viral. Posteriormente posee un único fragmento de lectura abierta (ORF) que codifica a una poliproteína que contiene proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4) en la región P1, en las regiones P2 y P3 se encuentran las proteínas no estructurales 2A-2C Y 3A-3D respectivamente, una estructura de sesenta nucleótidos necesaria para la replicación del material genético se encuentra en la región 2C, conocida como cis- replication element (*cre*). Posteriormente en la región 3' UTR contiene una cola de cola de adeninas (poli-A) (Wimmer *et al.*, 1993)

La formación de viriones infecciosos surge a partir de la poliproteína P1 modificada por miristoilación, es decir, la modificación lipídica que permite la asociación de las proteínas con las membranas celulares y liberada proteolíticamente por la enzima 2Apro.

Después del corte proteolítico, la chaperona se disocia de las proteínas de la cápside que se ensamblan en el protomero 5S; que se consensan entre si formando pentámeros 14S (base estructural para la formación de procápside el cual junto con el ARN viral integran el virión inmaduro). Posteriormente la maduración del provirion se realiza mediante la autocatálisis de la proteína VP0 para formar las proteínas VP2 y VP4 (**Figura 2**) (Van Der Linder *et al.*, 2015).

Las proteínas VP1, VP2, VP3 se encuentran en el exterior de la de la estructura y contienen los principales sitios antigénicos de neutralización, los cuales han sido definidos como estructuras lineares y no lineare en donde se pueden unir los anticuerpos para neutralizar el virus (N-Ag I, N-Ag II, N-AG IIIA y N-AG IIIB); la proteína VP4 reside en el interior de la partícula (Fry & Stuart, 2010; Oluwapelumi *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2014).

Los poliovirus expresan tres sitios antigénicos de neutralización (N-ag) que han sido clasificadas en tres serotipos virales: serotipo 1 (Mahoney), serotipo 2 (Lansing) y serotipo 3 (León), de los cuales el más común es el N-ag I, debido a que esta frente a la dirección de la mayoría de los anticuerpos neutralizantes tipo 2 y tipo 3. La proteólisis con proteasas de N-ag I, provoca que el virus de la polio pierda las cualidades antigénicas, promoviendo así el desarrollo de los anticuerpos neutralizantes existentes en la mucosa intestinal (Bodián *et al.*, 1949; Salk, 1951).



**Figura 2.** Organización y morfogénesis del genoma del poliovirus. (A) Estructura genómica de PV-1 que muestra genes de proteínas estructurales en azul (VP1), verde (VP2), rojo (VP3) y amarillo (VP4). (B) Modelo de cinta de un PV protómero que muestra las posiciones relativas de las proteínas de la cápside. (C) Modelo de caricatura de la cápside PV, con un pentámero esbozado. Tomado de Oluwapelumi *et al.*, 2017.

### 2.1.2 Epidemiología

Durante el siglo XX, la poliomielitis fue una de las enfermedades con más de 350000 casos registrados en 125 países. En 1988, se fundó la Iniciativa Global para la Erradicación de la Polio (GPEI), confirmado el avance en la erradicación total de la enfermedad disminuyendo casi en un 99% los casos de polio y la contención de los casos generados por las cepas silvestres en solo dos países (Afganistán y Pakistán).

La organización mundial de la salud ha certificado la inexistencia de casos de polio en cuatro regiones. En la region de las Américas el último caso registrado fue en 1994 en un niño de Perú-, en 2000 y 2004 se certificó a las regiones del Pacifico Occidental y Europa libres de poliomielitis, posteriormente en el año 2014 se declaró a la region de Asia Sudoriental libre de polio.

En México, el último caso de poliomielitis originado por la cepa silvestre fue reportado en 1990. Sin embargo, entre los años 2000 y 2010 se notificaron 5099 casos de Parálisis Flácida Aguda, la confirmación de dos casos presentados en los años 2004 y 2006 asociados a Poliomielitis Paralítica Asociada a la Vacuna Oral (PPVA), ambos casos con antecedentes de haber recibido dosis de OPV dentro de los treinta días previos a los síntomas de parálisis flácida aguda (Esteves-Jaramillo, 2012)

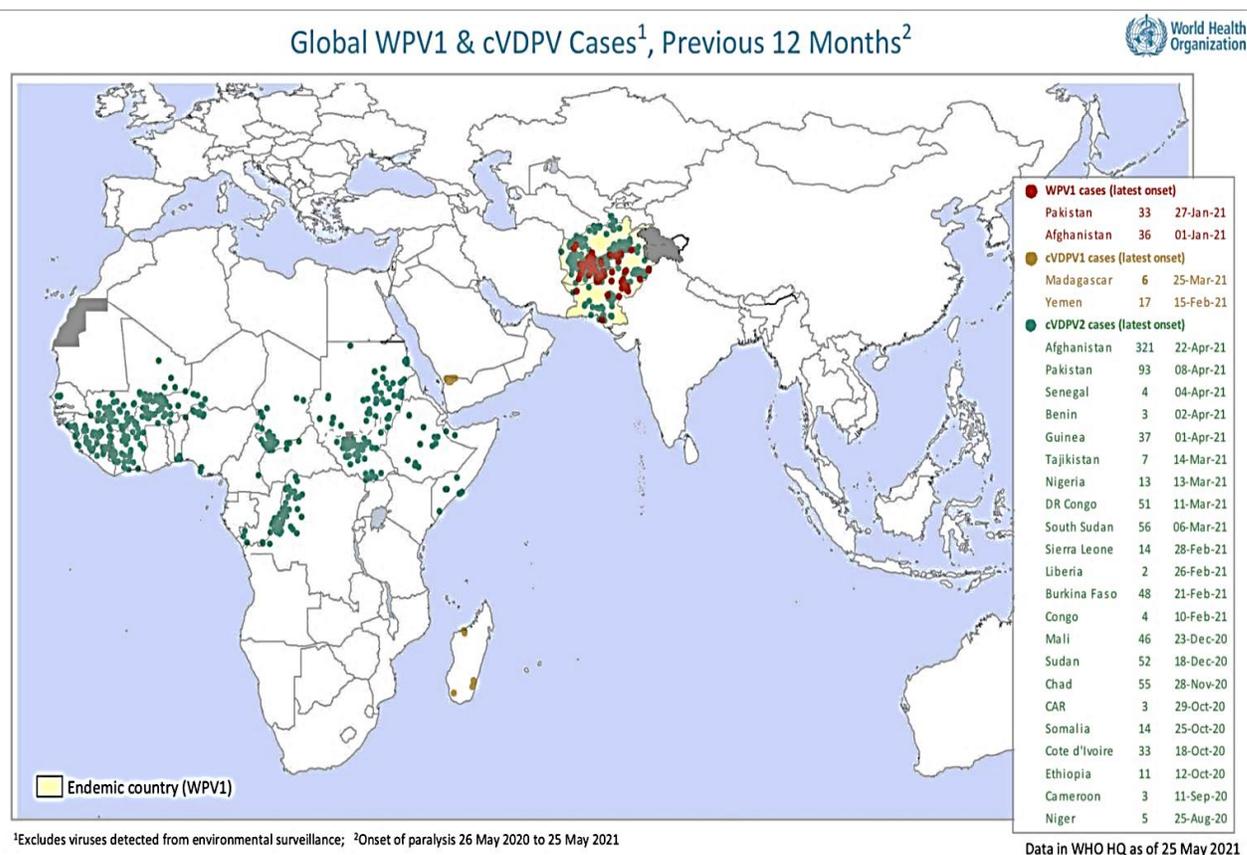
Con el fin de eliminar los efectos del uso de OPV, se han sugerido cambios en el calendario de vacunación en sitios donde ya ha sido eliminada la poliomielitis. Es decir, se decidió introducir la Vacuna Inactivada de la Polio (IPV) administrada en cuatro dosis a los dos, cuatro, seis y dieciocho meses, esto se conoce como vacuna pentavalente. Desde el inicio del esquema secuencial de IPV/OPV en el 2007, no se han reportado casos de Poliomielitis Paralítica Asociada a la Vacuna Oral (PPVA).

En la actualidad podemos encontrar presencia de virus de la polio en Afganistán y Pakistán en donde se mantiene endémica. Además, en 5 países más en los que se había interrumpido la circulación de los virus de la polio (Siria, República Democrática del Congo, Somalia, Kenia y, recientemente, Papúa-Nueva Guinea) están sufriendo brotes debido a la circulación de virus derivados de la vacuna (OMS, 2020; GPEI, 2020) tal como se muestra en la **Tabla 1 y Figura 3**.

**Tabla 1.** Casos de poliomielitis

Casos totales	2020		2021	
	WPV	cVDPV	WPV	cVDPV
	(25 de mayo)			
Globalmente	61	222	69	898
Países endémicos	61	103	69	414
Países no endémicos	0	119	0	484

OMS, GPEI, 2021



**Figura 3.** Distribución geográfica de infecciones por poliovirus. Marcado en color rojo se observan los países en donde se registran casos de infección por WPV, Pakistán y Afganistán; en color verde y amarillo se observan los casos de infección por cVDPV 1 y 2, respectivamente. Tomado de Our World in Data.2021

El 29 de mayo del 2019, los líderes de salud en la Asamblea Mundial de la Salud en Ginebra, Suiza, dieron la bienvenida a la nueva Estrategia para el Juego Final de Polio 2019-2023 , y reconocieron que, aunque se había logrado mucho, se necesitaban más esfuerzos para lograr un mundo duradero libre de polio para el 2023. La OMS recomienda buscar alternativas para sustituir a las inyecciones, debido a que ha encontrado que en algunos países hasta 30% de éstas se realizan con jeringas no estériles, debido a los problemas económicos de esos lugares. En este contexto, la aplicación oral sería buena alternativa para las vacunas que actualmente se administran vía parenteral. Con las vacunas orales se incrementa la probabilidad de adquirir inmunidad en mucosas contra agentes infecciosos que entran al cuerpo a través esta ruta.

Una vez erradicada la poliomielitis, el mundo podrá celebrar la consecución de un progreso crucial para la salud pública mundial que beneficiará equitativamente a todas las personas, independientemente de donde vivan. La modelización económica ha revelado que la erradicación de la poliomielitis permitirá ahorrar al menos entre 40,000 y 50,000 millones de dólares, principalmente en los países de bajos ingresos. Más importante aún, el éxito significará que ningún niño volverá a sufrir nunca más los efectos de la parálisis permanente provocada por la poliomielitis (OMS, 2019).

### **2.1.3 Tipos de vacunas antipoliomielíticas**

Existen dos tipos de vacunas antipoliomielíticas la IPV con virus inactivados, introducida en 1955 y vacuna oral con virus atenuados (OPV) introducida a principios de los años 60. La OPV se incorporó al Programa Ampliado de Inmunización en 1974. En 1988 la Asamblea Mundial de la Salud resolvió erradicar la poliomielitis en el mundo, para lo que se estableció la Iniciativa de Erradicación Mundial de la Poliomielitis (GPEI). La vacuna de poliovirus inactivados trivalente (IPV) diseñada por Jonas Salk fue la primera que consiguió una licencia en 1955. La formulación de la vacuna deriva de cepas seleccionadas de virus salvaje (wild type poliovirus, WTP) inactivadas con formalina, cuya potencia inmunogénica fue aumentada en 1970. La IPV ha demostrado ser extremadamente eficaz para estimular la producción de anticuerpos antipoliovíricos a nivel sistémico, ya que los virus son neutralizados antes de ingresar a Sistema Nervioso Central (SNC). Sin embargo, induce baja inmunidad en mucosa intestinal, por lo que los virus tienen la capacidad de replicarse y diseminarse a través de las heces. Otra de las desventajas de IPV es su elevado costo en comparación con el de OPV, por lo tanto, es administrada en países desarrollados (Hawken & Troy, 2012).

En el caso de la vacuna OPV, puede contener hasta las tres cepas Sabin en forma atenuada, se administra por vía oral. No obstante, las limitaciones de esta vacuna son los casos de poliomielitis parálisis asociada a vacuna (VAPP), producidas por la reversión de la atenuación viral en el hospedero, además de la generación de nuevas cepas patogénicas descritas como poliovirus derivado de vacuna (cVDPV) generando casos de poliomielitis de origen vacunal (Minor, 2009). En los últimos años se ha reportado que los casos de polio ocasionados por cVDPV son más que los registrados para las cepas silvestres de poliovirus.

## 2.2 Vacunas

Una vacuna se define como una suspensión de microorganismos vivos atenuados, inactivados o sus fracciones, administradas para inducir inmunidad y prevenir enfermedades infecciosas o sus secuelas (Moreno *et al.*, 2005)

Las vacunas se caracterizan por su naturaleza biológica, pues han sido creadas para prevenir enfermedades y se aplican por lo general a personas sanas como método de inmunización, proceso en el cual se induce artificialmente la inmunidad o proporciona protección frente a una determinada enfermedad. La inmunización activa consiste en estimular al organismo para que produzca anticuerpos y otras respuestas inmunitarias con el objetivo de que produzca una respuesta similar a la infección natural, mientras que la inmunización pasiva se refiere a la administración de anticuerpos específicos generados *in vitro* para un objetivo determinado (Escobar *et al.*, 1992).

Existen diferentes tipos de vacunas, fabricadas para preparar al sistema inmunitario y así este pueda combatir enfermedades. Según su fabricación las vacunas se clasifican en:

Vacunas atenuadas (vivas): Reduce la virulencia del agente infeccioso conservando su capacidad inmunógena, vacunas inactivas (muertas): el virus o bacteria son inactivados por métodos físicos o químicos, la respuesta inmune menos potente que las atenuadas, por lo que se requieren varias dosis para lograr una respuesta inmune adecuada. Vacunas recombinantes: se elaboran a partir de la clonación de genes de diferentes patógenos que codifican proteínas antigénicas específicas y por tanto generan respuesta inmune en una célula huésped. Vacunas sintéticas: se producen a partir de polipéptidos que copian la secuencia primaria de aminoácidos de los determinantes antigénicos del agente infeccioso.

La forma de administración del preparado vacunal en el organismo puede ser oral (rotavirus, fiebre tifoidea atenuada, cólera), intranasal (gripe atenuada), subcutánea (varicela y triple vírica) o intramuscular profunda, en el caso de las restantes, ya que, al incluir adyuvantes, pueden producir importantes reacciones inflamatorias locales si se administran de forma superficial. Se están explorando nuevas vías de administración que sean menos dolorosas. Es el caso de algunas vacunas de la gripe en investigación que se administran mediante parches cutáneos.

### **2.2.1 Vacunas de subunidades**

En los últimos años la tecnología del ADN recombinante ha permitido una nueva generación de soluciones terapéuticas de gran interés entre las que destacan las vacunas. El descubrimiento y decodificación del genoma de bacterias y virus, ha abierto la puerta al desarrollo de este tipo de vacunas de forma generalizada.

Las vacunas de nueva generación se desarrollan a partir de la ingeniería genética, técnica que permite, entre otras cosas, eliminar los genes virulentos de un agente infeccioso sin alterar la capacidad de estimular una respuesta inmune del individuo en el cual es inoculado. Tal es el caso de las vacunas de subunidades, las cuales son muy estables y seguras de administrar incluso en población vulnerable con sistema inmune comprometido. Sin embargo, se ha descrito que las vacunas de subunidades generan una baja inmunogenicidad, un tópico muy importante para el desarrollo de vacunas orales.

Las vacunas comestibles se obtienen por técnicas de Molecular Pharming, han conseguido interponerse social y científicamente entre el concepto de medicamentos biotecnológicos y el de alimentos biotecnológicos, creando un escenario controvertido en el que compiten intereses sociales contrapuestos en lo que se refiere a la aceptación o rechazo de esta tecnología (Cebadera y Cámara, 2007).

La producción de numerosos antígenos en plantas transgénicas constituye un hecho demostrado desde hace años. El interés para realizar estos experimentos surgió debido a la interrogante sobre si determinadas proteínas inmunogénicas se podrían sintetizar en plantas, y después usar el tejido vegetal como inmunógenos orales en seres humanos o en animales. Actualmente se ha evidenciado que esta idea es viable si se utilizan diversas proteínas bacterianas y virales.

La mayor ventaja que poseen estas vacunas es que se administran por vía oral y que permiten la producción a gran escala. Esto permite el acceso masivo a la vacunación, incluso en zonas poblacionales alejadas de un sistema sanitario estructurado y accesible.

### 2.2.2 Sistemas vegetales para la expresión de antígenos

Las proteínas, péptidos o polisacáridos que componen las vacunas de subunidades, pueden ser obtenidos directamente de los patógenos o bien pueden producirse en sistemas de expresión heteróloga como son las células vegetales.

El uso de plantas como centros productores de compuestos bioactivos se lleva a cabo consiguiendo que la planta modificada genéticamente exprese nuevas proteínas o bien modifique la expresión de proteínas propias. Una de las cualidades de las plantas es la capacidad de producir proteínas con un ensamble y plegamiento adecuado, además realizan las modificaciones pos- traduccionales necesarias para la actividad.

La inmunogenicidad de las proteínas expresadas en células vegetales se ha demostrado con éxito, lo cual podría atribuirse a la presencia de los metabolitos secundarios como lectinas, terpenoides, saponinas, carotenoides y motivos GpG (Wang, *et al.*, 2002; Licciardi & Underwood 2011). Por otra parte, las células vegetales poseen la cualidad de efecto de bioencapsulación; confiriendo protección al antígeno a través de su paso por el tracto gastrointestinal evitando su degradación.

En 1997 Curtis y Cardineau, lograron patentar la primera vacuna extraída a partir de plantas de tabaco transgénicas contra *Streptococcus mutans*. El antígeno obtenido de esta planta provocó una respuesta inmune cuando se administraba vía oral en humanos o animales y era capaz de inhibir la colonización *S. mutans* a través de la superficie mucosa.

La mayoría de los anticuerpos que se han expresado hasta la fecha fueron generados en tabaco, aunque también se ha utilizado papa, tomate, zanahoria, soya, lechuga, espinaca, alfalfa, arroz y trigo (Stöger *et al.*, 2000) **Tabla 2.**

**Tabla 2.** Producción de vacunas en plantas

Planta	Aplicación	Niveles de expresión	Referencia
<i>Nicotiana tabacum</i>	Vacuna contra <i>E. coli</i> Enterotoxigénico	<0.01%PTS	Haq <i>et al.</i> , (1995)
<i>Lactuca sativa</i>	Vacuna contra <i>E. coli</i> Enterotoxigénico	0,2% PST	Gómez Lim, (2001)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Vacuna contra <i>Vibrio cholerae</i>	0,0041%PST	Kim, <i>et al.</i> , (2004)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Antígeno protector contra ántrax	4.5-14.2% PTS	Koya <i>et al.</i> , (2005)
<i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Nicotiana tabacum</i>	proteína S SARS-Cov	0.1 %PTS	Pogrebnyak <i>et al.</i> , (2005)
<i>Solanum tuberosum</i>	Rotavirus (vp7)	0.3-0.4% PTS	Li <i>et al.</i> , (2006)
<i>Medicago sativa</i>	Rotavirus humanos de grupo A	0.06-0.28% PTS	Dong <i>et al.</i> , (2005)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Subunidad B de la toxina de colera (ctb)	0.081% PTS	Jiang <i>et al.</i> , (2007)
<i>Solanum lycopersicum</i>	proteína de la cápside del virus Norwalk (Nvcp)	20 µg/gPF	Zhang <i>et al.</i> , (2006)
<i>Oryza sativa</i>	Colera	2.1 % PTS	Tokuhara <i>et al.</i> ; (2010)
<i>Lactuca sativa</i>	Hepatitis B	200 µg/gPF	Czyz <i>et al.</i> , (2014)

En la transformación genética estable, el material genético (ADN o ARN) de interés se puede insertar en el genoma del núcleo o del cloroplasto, generando un rasgo hereditario; obteniendo lo que conocemos como plantas transgénicas, es decir, plantas que incorporan ciertas modificaciones en su código genético de forma estable lo cual se transfiere a su

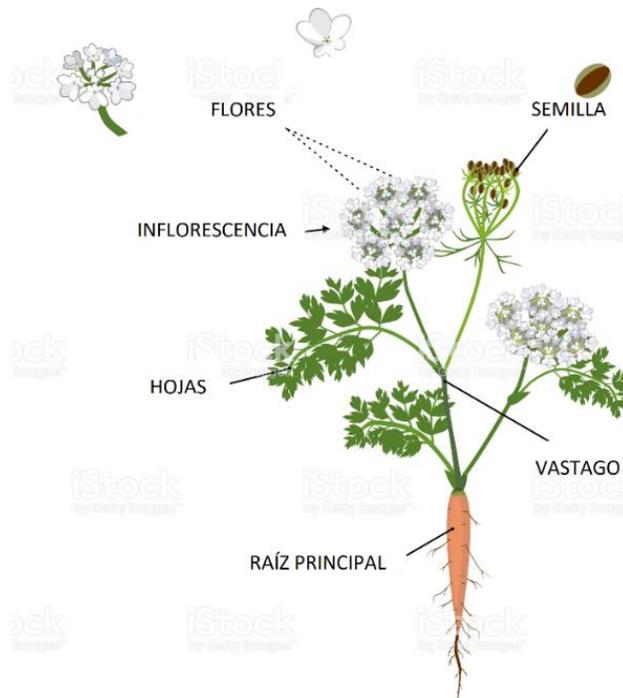
descendencia tanto por reproducción sexual (mediante semillas) como asexual (mediante esquejes, micropropagación, etc.) (Tzfira *et al.*, 2014).

### **2.3 Generalidades *Daucus carota***

Es una planta de la familia de las umbelíferas, originaria de Europa y Asia, ampliamente distribuida y cultivada por todas las regiones templadas. El nombre se aplica también a la raíz de la planta que puede ser silvestre o cultivada.

La variedad cultivada es una hortaliza muy apreciada, es bianual, durante el primer año forma una roseta de hojas finamente divididas, almacena nutriente en la raíz, que se vuelve grande, carnosa y comestible, estas zanahorias de primer año son las que se recolectan para el consumo (Maroto, 1995)

Las hojas de la zanahoria son compuestas, con foliolos marcadamente hendidos y en algunos casos poseen vellos. De acuerdo con las distintas variedades, los pecíolos pueden ser más o menos largos y el color de las hojas puede variar de verde claro a oscuro (Huerres y Caraballo, 1991). El tallo es muy rudimentario y está reducido a un pequeño disco o corona en la parte superior de la raíz, con una longitud de 1.0 a 2.5 cm (Vigliola *et al.*, 1992). La forma de la raíz en las distintas variedades puede ser diversa, las hay cilíndricas, cónicas, etc. Su superficie puede ser lisa, aunque regularmente presenta rugosidades, con pequeñas hendiduras denominadas lenticelas, a través de las cuales se puede producir un intercambio gaseoso entre la raíz y el medio que la rodea (Huerres y Caraballo, 1991). La coloración de la raíz es generalmente amarilla, anaranjada o roja. Su longitud puede variar de 15 a 18 cm., su sistema de raíces laterales, que deriva de la raíz principal, alcanza a desarrollarse entre 120 y 150 cm, extendiéndose hasta 90 cm (Valadez, 1993). La inflorescencia se compone por umbelas primarias y secundarias, las flores siempre son blancas, menos las centrales de cada umbela, que son de color rosado o púrpura, siendo a veces todas coloreadas. Cada flor está compuesta por cinco pétalos y cinco estambres; son hermafroditas, pero algunas veces puede haber flores femeninas y masculinas (Valadez, 1993). El fruto es un diaquenio y las semillas son pequeñas (3 mm), elípticas, de color café claro (Valadez, 1993) y con dos caras asimétricas, una plana y otra convexa, provista en sus extremos de unos aguijones curvados (Maroto, 1995) Figura 4.



**Figura 4.** Características morfológicas de *Daucus carota*. Tomado de Pinto y Fonseca, 2009.

Dentro de la familia de las umbelíferas, la zanahoria es la más conocida y la más importante de las hortalizas de raíz, dada la demanda de que es objeto y a la superficie sembrada que ocupa. Es una hortaliza rica en caroteno, precursor de vitamina A con cantidades de tiamina y riboflavina (Valadez, 1993). Esta raíz puede ser consumida en estado crudo, en forma de ensalada, o cocida. Su mayor importancia desde el punto de vista alimentario se debe a su contenido 3 elevado en provitamina A en la zona cortical de su raíz. Este contenido oscila entre 10.000 y 15.000 UI en cada 100 gr de raíz (Vigliola *et al.*,1992).

### 2.3.1 Clasificación Taxonómica

La taxonomía general de la zanahoria descrita por Valadez (1993):

Reino	Plantae
Filum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliosida
Familia	Umbelliferae
Orden	Apiales
Género	<i>Daucus</i>
Especie	<i>Daucus carota</i>

### 2.3.2 Expresión genética en *Daucus carota*

A finales de los 90's se presentó un protocolo para la transformación eficiente de la zanahoria (*Daucus carota* L. cv. Nantaise) por *Agrobacterium tumefaciens*. En el cual vector binario contenía el gen marcador glucuronidasa (GUS), impulsado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, demostrando que esta puede ser una herramienta útil para conducir la expresión de transgénos en el desarrollo de raíces de almacenamiento de zanahoria. Desde entonces, diversos grupos científicos se han interesado en *Daucus carota* como instrumento para la transformación de diversos genes, con la finalidad de producir compuestos de interés que pudieran actuar como vacunas (**Tabla 3**). La primera vacuna que utilizó zanahoria como sistema de expresión consistió en un modelo para la inmunización contra el sarampión (Marquet-Blouin, *et al*, 2003). A partir de esta investigación, estudios científicos han validado a *Daucus carota* como sistema de expresión para mejorar los rendimientos y desarrollar nuevos biofármacos.

### 2.3.3 Transformación de *Daucus carota* para la expresión de proteínas recombinantes

**Tabla 3.** Aportaciones científicas sobre transformación de *Daucus carota*

COMPUESTO	APLICACIÓN	REFERENCIA
Glucuronidasa (GUS)	Transformación eficiente de <i>Daucus carota</i> por <i>A. tumefaciens</i>	Heidegger & Sturm, (1997)
Hemaglutinin	Vacuna contra sarampión	Marquet-Blouin <i>et al.</i> , (2003)
[L4T4]2	Vacuna contra sarampión	Bouche <i>et al.</i> , (2005)
Glucocerebrosidasa GDC	Tratamiento enfermedad de Gaucher	Shaaltiel <i>et al.</i> , (2007)
Proteína LTB	Vacuna oral contra cólera	Rosales-Mendoza <i>et al.</i> , (2008)
Proteína viral PreS2-S	Vacuna oral contra hepatitis B	Deneiko <i>et al.</i> , (2009)
Toxina de región extracelular difteria	Vacuna contra difteria, tétanos	Brodzik <i>et al.</i> , (2009)
Proteína p24	Vacuna contra HIV- 1 subtipo C	Lindh <i>et al.</i> , (2009)
Proteína URE B	Vacuna contra <i>Helicobacter pylori</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2010)
Proteína F1-V	Vacuna contra <i>Yersinia pestis</i>	Rosales-Mendoza <i>et al.</i> , (2011)
Proteína quimérica MOMP	Vacuna contra <i>Chlamydia trachomatis</i>	Kalbina <i>et al.</i> , (2011)
Interferón alfa-2b	Enfermedades virales y cáncer	Luchakivskaya., Kishchenko <i>et al.</i> , (2012)
Proteínas esat6 y cfp10	Vacuna contra tuberculosis	Uvarova <i>et al.</i> , (2013)
CTB	Vacuna contra arteroesclerosis	Govea-Alonso, Rosales-Mendoza <i>et al.</i> , (2017)

## 2.4 Cultivo *in vitro*

### 2.4.1 Medios de cultivo

El cultivo *in vitro* de plantas puede definirse como el cultivo de células, tejidos, órganos, embriones y plantas enteras, en condiciones asépticas, dentro de recipientes adecuados conteniendo un medio nutritivo y en un ambiente controlado, cuyo objetivo es la formación y producción de células o productos deseados.

La elección del medio de cultivo por utilizar se realiza en base a los conocimientos previos de la especie, tipo de cultivo *in vitro*, condiciones químicas y ambientales requeridas. Actualmente se cuenta con una literatura detallada de técnicas de cultivos vegetales *in vitro*, con los protocolos correspondientes a muchas especies vegetales (Pollard & Walker, 1990; Roca & Mroginski, 1991), existen especies en las cuales el establecimiento, multiplicación y/o enraizamiento de los cultivos es dificultoso y se requiere una intensa tarea experimental para lograr su micropropagación o para obtener callos o suspensiones capaces de producir los metabolitos deseados.

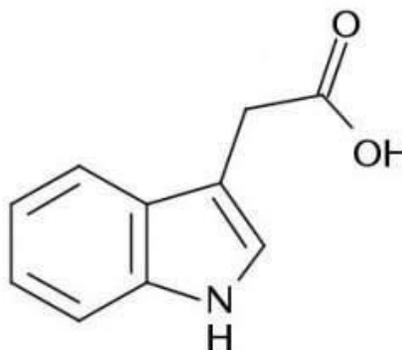
Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953, 1954; Murashige & Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk & Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular; además el medio debe ir enriquecido con aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento (Schillberg *et al.*, 2013). A diferencia de las plantas enteras, los cultivos en suspensión celular no son fototróficos, por lo que requieren una fuente de carbono. Por lo tanto, los medios de células vegetales generalmente contienen sacarosa, sales inorgánicas, vitaminas, fitorreguladores vegetales y agua, hay una amplia gama de diferentes medios disponibles comercialmente según las especies, las características de crecimiento y el propósito del cultivo (Murashige y Skoog, (MS) 1962; Gamborg (B5) *et al.*, 1968).

## 2.4.2 Fitorreguladores

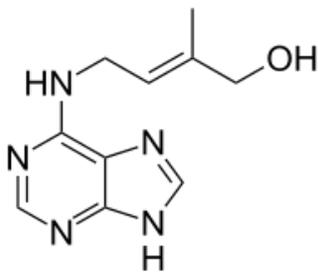
Los reguladores del crecimiento vegetal son compuestos orgánicos diferentes a los nutrientes, que en pequeñas cantidades pueden estimular, inhibir o modificar procesos fisiológicos en las plantas a nivel órgano, tejido o celular (Wareing & Philips, 1973). Los reguladores de crecimiento vegetal se agrupan en cinco categorías: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno.

Las auxinas se encuentran en todos los tejidos de la planta, una mayor concentración ocurre en las regiones que están en crecimiento activo, como meristemos activos y posteriormente llega a los demás tejidos vegetales en donde Influencian tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en muchos procesos del desarrollo, estimula la producción de raíces después del trasplante, promueve la producción de raíces adventicias en estacas, la fructificación y la dominancia apical, Acelera la maduración, la germinación de semillas, Induce a la floración, evita la caída prematura de fruto, controlan la velocidad y elongación de la células en los brotes, y provoca o retarda la abscisión de frutos jóvenes y maduros, en algunos de estos procesos interactuando con otras fitohormonas. La síntesis de auxinas deriva del aminoácido L-triptófano, durante este proceso el grupo indol se mantiene constante, pero sufre una descarboxilación y una desaminación. Las auxinas más comunes son el IAA, el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

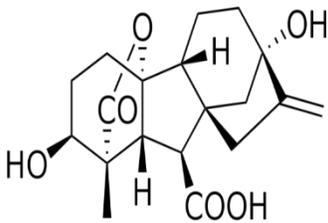


Diversos bioensayos han sido descritos para analizar respuestas a auxinas, los cuales han sido útiles en la identificación de compuestos con actividad típica de auxinas y de plantas mutantes con defectos en la síntesis, metabolismo o respuestas a auxinas. Uno de los ensayos que caracterizan el efecto de auxinas en el desarrollo es la regulación del crecimiento radicular el cual es definido desde el desarrollo embrionario (Jenik & Barton, 2005), un representante de este grupo es 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D).

Las citocininas son hormonas esenciales derivados de la adenina, estimulan la división celular o citocinesis por lo que están vinculados a procesos como: crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes; por ejemplo, Inhibe en el crecimiento de la raíz principal, estimula la división celular en tejidos vegetales y la aparición de raíces laterales, estimula la floración, induce la partenocarpía en frutos, provocan la germinación de semillas, aumenta la tasa fotosintética, impide la abscisión y senescencia de flores frutos y hojas y promueve la formación de botones florales. Se trata de derivados de la base adenina.



Las giberelinas son diterpenoides, ácidos derivados del hidrocarburo heterocíclico ent-Kaureno naturales que provienen del hongo *Giberella fujikuroi* de este hongo se ha extraído una sustancia que estimula el crecimiento de las plantas que se llamó Giberelina y cumple las siguientes actividades en los frutales: Provoca la división y elongación celular. Produce un crecimiento acelerado, estimula la floración y ayuda a la formación de amilasa en semillas.



El etileno está relacionado principalmente con actuar en órganos como flores y frutos de la planta; por ejemplo, acelera la maduración de frutos, promueve la abscisión de las hojas y frutos, estimula la inducción floral y provoca la salida de reposo de semillas.

### 2.4.3 Cultivo de callo

Un callo consiste en una masa amorfa de células de parénquima de paredes finas libremente dispuestas que provienen de células en proliferación del tejido matriz. Con frecuencia, como resultado de la herida, se forma un callo en el extremo cortado de un tallo o raíz. Aunque el principal énfasis ha estado en los tejidos de angiospermas, la formación del callo se ha observado en gimnospermas, helechos, musgos y hepáticas (Yeoman & Macleod, 1977).

Es el tipo de cultivo más ampliamente usado y se obtiene a partir de casi cualquier planta u órgano. Regularmente se utiliza un medio enriquecido con sales en alta concentración de nitrógeno como “macronutrientes” y otros en menor cantidad como los “micronutrientes”, los cuales son necesarios para una buena actividad metabólica de las

células vegetales, se adiciona sacarosa como fuente de carbono y reguladores del crecimiento como auxinas y/o citocininas.

#### **2.4.4 Cultivos de células en suspensión**

Los cultivos en suspensión frecuentemente son usados en investigaciones relacionadas con plantas como herramienta para determinar variables de interés, debido a que presenta la ventaja de permitir el control de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto; sin embargo, pueden verse modificadas algunas características de las células presentes en las plantas como su diferenciación y la comunicación intercelular (Trejo-Tapia *et al.*, 2007), estos cultivos se constituyen principalmente por células meristemáticas indiferenciadas, más débiles e inestables en comparación con su estado en el ambiente natural, sin embargo, con respecto a los cultivos de células diferenciadas (raíces y brotes), presentan las ventajas de poder ser cultivadas a mayores concentraciones celulares y a mayores velocidades de crecimiento (Schlatmann *et al.*, 1996).

En los cultivos de suspensiones, las células individuales se distribuyen en forma homogénea a través del medio de cultivo y por estar rodeadas del mismo, se facilita la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma lo que implica en muchos casos el incremento en la producción de metabolitos secundarios, sin embargo para algunas especies vegetales se ha reportado que la síntesis de ciertos metabolitos requiere la coexistencia o acercamiento de células o la compartimentalización intracelular.

Las células vegetales en suspensión tienden a formar agregados de manera natural, lo cual puede afectar la producción de metabolitos secundarios, probablemente por el estrés nutricional, especialmente el oxígeno, ya que tiende a generar limitación en la transferencia de gas hacia la masa celular, además; el aumento de las interacciones intercelulares puede facilitar el intercambio de señales y metabolitos, necesarios en la síntesis de algunos metabolitos particulares (Edahiro *et al.*, 2006). En el cultivo en suspensión el estado que más se aproxima a las condiciones naturales es la fase estacionaria, además es mayormente utilizado en escalamiento de cultivos celulares vegetales.

### 3. ANTECEDENTES DIRECTOS

#### 3.1 Expresión de proteínas estructurales de poliovirus de tejidos vegetales

Fujiyama & colaboradores en el 2006, modificaron genéticamente el virus del mosaico de tabaco (VMT) insertando fragmentos de RNA para codificar una secuencia de 15 aminoácidos derivados de VP1 y VP3 que son proteínas pertenecientes a la cápside del poliovirus tipo 1, posteriormente transformaron plantas de *N. tabacum*. Finalmente realizaron inmunización intraperitoneal de ratones C5BL con partículas recombinantes las cuales produjeron anticuerpos contra proteínas de poliovirus.

En el 2016 Chan & colaboradores realizaron la caracterización y expresión de dos proteínas VP1 (nativo y codón optimizado) procedentes de Sabin 1, en cloroplastos de tabaco y lechuga. Realizaron inmunización subcutánea con IPV seguida de boosters orales con material vegetal liofilizado emulsificado con saponina o escualeno. Los niveles de IgA e IgG aumentaron en suero de ratones alimentados con tejido vegetal liofilizado en comparación con los niveles encontrados en ratones que no recibieron boosters orales. Por lo que llegaron a la conclusión de que VP1 es muy estable en células vegetales liofilizadas cuando se almacena a temperatura ambiente durante varios meses. Posteriormente, Xiao & Daniell (2017) administraron por vía oral células vegetales liofilizadas que contenían 1 o 25 mg de proteína de poliovirus 1 (VP1) a ratones previamente inmunizados con IPV; tres dosis (una por mes) o solo un booster oral permitieron la detección de altos niveles de anticuerpos IgG1 e IgA, la respuesta inmune se mantuvo hasta 400 días protegiendo contra los tres serotipos virales, finalmente concluyen que las células vegetales liofilizadas que expresan VP1 pueden almacenarse sin perder eficacia, eliminando así la cadena de frío.

Por otro lado, Marshian *et al.* (2017) transformaron *N. benthamiana* mediante infiltración de *Agrobacterium tumefaciens* para coexpresar la poliproteína estructural P1 y la proteasa 3CD de los tres serotipos de poliovirus, dando como resultado la línea transformada SktSC8. Realizaron la inmunización de ratones por vía intraperitoneal con VLP elaborado a partir de plantas, logrando su protección contra poliovirus tipo 3.

Daniell *et al.*, (2019) proponen una nueva vacuna mejorada de bajo costo, libre de cadena de frío y poliovirus, que utiliza proteína de la cápside de polio (VP1, conservada en todos los serotipos) fusionada y expresada en cloroplastos de lechuga formulado con un

adyuvante oral derivado de plantas. En ratones inmunizados con la IPV seguida de tres boosters orales con 20 mg de material vegetal liofilizado mezclado con adyuvantes (escualeno, saponina), se observó un aumento en los niveles de anticuerpos, VP1-IgA e IgG1 título específicos.

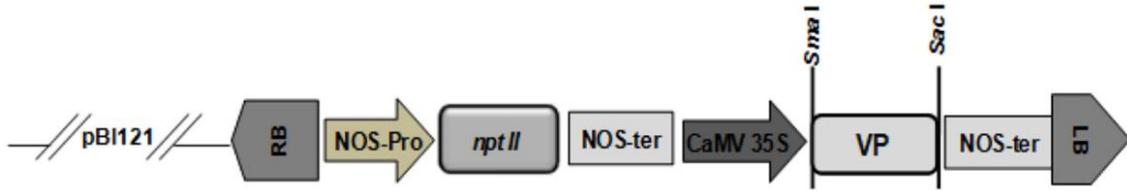
Bolaños- Martínez *et al.*, (2020) analiza la capacidad de las células del tabaco para expresar antígenos inmunogénicos de poliovirus VP1, VP2, VP3 y VP4. Señala que rendimientos de VPs en los tejidos foliares oscilaron entre 0,31 y 16,85  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco. Plantea la capacidad que poseen las VPs para inducir inmunogenicidad en ratones, posterior a la administración de cuatro dosis por vía subcutánea (SC) una vez a la semana, seguidas de cuatro refuerzos orales cada dos semanas. Así mismo reporta que en ratones inmunizados con VP1 derivada de plantas, no detectaron niveles significativos de anticuerpos IgG en el suero después de todas las inyecciones subcutáneas. Sin embargo, se observó una respuesta mediada por IgG específica después de la primera inmunización oral y la producción de anticuerpos aumentó significativamente y las tres inmunizaciones orales posteriores (día 105). Para VP2, no detectaron niveles altos de anticuerpos IgG en el suero de ratones tratados por vía subcutánea. Sin embargo, después de la administración oral de todas las dosis de proteína, el número de anticuerpos aumentó ligeramente. Finalmente, la respuesta humoral indicó la inmunogenicidad de cada proteína es diferente. Para las respuestas de IgG sistémicas, las proteínas VP3 y VP4 inducen mayores respuestas. Así mismo enfatiza que no se utilizaron adyuvantes, por lo que sugiere estas proteínas son altamente inmunogénicas.

### 3.2 Importancia de la estructura de poliovirus

En el plegamiento de la poliproteína P1, las proteínas estructurales de la cápside VP1, VP2 y VP3 están localizadas en la superficie del virión y constituyen los sitios antigénicos de neutralización, los cuales son estructuras lineares o no lineares en donde se unen los anticuerpos para neutralizar el virus (N-Ag, N-AgI, N-AgII, N-AgIIIa, N-AgIIIb); la proteína VP4 se encuentra en el interior de la partícula (Fry & Stuart, 2010; Rhoades *et al.*, 2011). Es importante mencionar que el sitio de neutralización antigénica N-AgII se extiende desde los aminoácidos 221-226 de la proteína VP1 y los aminoácidos 164 al 172 de VP2, mientras que N-AgIII presenta sitios independientes y N-AgIIIa posee los aminoácidos 58 al 60 y 71 al 73 de la proteína VP3.

Rosales-Mendoza y colaboradores en 2018 realizó a transformación genética de zanahoria la cual consistió en la construcción de vectores de expresión basados el vector binario PBI121 para expresar de forma nuclear- estable cada una de las proteínas VPs (VP1, VP2, VP3 y VP4) (**Figura 5**) del poliovirus en plantas de *Daucus carota*. En la **figura 6**, se observa la secuencia de nucleótidos optimizada para la expresión de la proteína VP2.

La transformación de zanahoria fue mediada por *A. tumefaciens* en donde los explantes se mantuvieron en medio suplementado con kanamicina, posteriormente fueron transferidos a medio MS adicionado con sacarosa 3%, 2,4-D (1ml/L), BA (300µg/L), luz continua, kanamicina (25mg/L), cefotaxima (125mg/L); condiciones que favorecieran la proliferación de los callos, con lo anterior se generaron diferentes líneas de *Daucus carota* que expresan la proteína VP2.



**Figura 5.** Descripción del vector de expresión pBI-VPs. Esta construcción se basa en el vector binario pBI121 y se usó para transformar *Daucus carota* por *A. tumefaciens*. RB borde derecho, LB borde izquierdo, nptII gen de resistencia a Kanamicina bajo el control del control de nopalina sintasa NOS-pro, NOS-ter terminador de nopalina sintasa, VP: gen VP2 expresado bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). Sitios de digestión SmaI y SacI añadidos en los extremos 5' y 3' del gen. Tomado de Bolaños-Martinez (2020).

## VP2

```

GGATCCCGGGATGTCTCCAAATATTGAAGCTTGTGGATATTCAGATAGAGTTCCTTCAATTGACACTTGGTAAC
TCTACTATCACTACACAAGAGGCTGCTAATTCAGTTGTTGCTTATGGAAGATGGCCAGAATACTTGAGGGATT
CTGAGGCTAATCCTGTTGATCAACCAACAGAACCTGATGTTGCTGCTTGCAGATTTTACACACTTGATACTGT
TTCTTGGACTAAGGAGTCAAGAGGTTGGTGGTGGAAATTGCCAGATGCTCTTAGGGATATGGGATTGTTCCGT
CAAAACATGTACTACCATTATCTTGGAAGGCTGGTTACACAGTTCATGTTCAATGTAATGCTTCAAAGTTTC
ATCAAGGAGCTTTGGGTGTTTTTGTCTGTTCCCTGAAATGTGCCTTGTCTGGAGATTCTAACACTACAACATGCA
TACTTCATAACAAAACGCTAATCCAGGAGAGAAGGGAGGAACTTTTACTGGAACTTTTACTCCTGATGATAAT
CAAACATCACCAGCTAGAAGGTTCTGTCCTGTTGATTATTTGTTTCGAAATGGTACTCTTTTGGGTAATGCTT
TCGTTTTCCACATCAAATTAATTTGAGGACAAATAACTGCGCTACTTTGGTTCCTTACGTTAACTC
TCTTTCAATCGATTCTATGGTTAAGCATAAATACTGGGGAATTGCTATTTTGCCACTTGCTCCTCTTAATTTT
GCTTCAGAATCTTCACCAGAGATTCCATTACATTGACTATTGCTCCAATGTGTTGCGAGTTTAATGGTCTTA
GAAACATCACTTTGCCTAGGCTTCAATAAGAGCTCGGCGCGCCCTGCAG

```

**Figura 6.** Secuencia de nucleótidos optimizada que codifica para la proteína VP2. Tomado de Bolaños- Martínez (2020).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los esfuerzos ejercidos por los gobiernos de los países del mundo y por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para disminuir en un 99% la infección por poliovirus salvaje, aún hay limitaciones que interfieren con la etapa final para la erradicación del poliovirus debido a la generación de nuevas cepas virulentas asociadas a la administración de la vacuna atenuada. En este sentido, se debe tomar en cuenta que mientras haya un solo niño infectado, la población infantil de todos los países corren el riesgo de contraer la poliomielitis; además, se podrían producir hasta 200 000 nuevos casos anuales en diez años en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud, recomienda mantener elevados los niveles de cobertura de vacunación sistemática, así como buscar nuevas alternativas de vacunación efectivas y accesibles para poder combatir infecciones provocadas por poliovirus. En la actualidad se han desarrollado técnicas de biología molecular y cultivo *in vitro* celular que permiten el aprovechamiento de cultivos vegetales con capacidad de producir vacunas y biofármacos a través de proteínas recombinantes a bajo costo y libre de patógenos. *Daucus carota* es una de las especies vegetales con gran oportunidad en este campo biotecnológico, dado que produce tejido que es de uso comestible en todo el mundo por lo cual se considera como un recurso de importancia para la producción de vacunas orales comestibles.

Es imprescindible establecer y optimizar cultivos de células en suspensión de *Daucus carota*, con la capacidad de expresión de proteína VP2, la cual juega un papel importante en la producción de respuesta inmune contra poliovirus, lo que representa una alternativa original para la producción de la proteína de interés con un procesamiento mínimo y con la capacidad de ser administrada por vía oral.

## **5. HIPÓTESIS**

El establecimiento y optimización del cultivo de células en suspensión de la línea C-1 de *Daucus carota*, permitirá aumentar la concentración de biomasa y el rendimiento de la proteína VP2 de gran importancia en la poliomielitis.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General:**

- Establecer cultivos celulares *in vitro* de *Daucus carota* en suspensión, para la producción de la proteína VP2.

### **6.2 Objetivos particulares**

- Determinar las condiciones y el medio de cultivo para el crecimiento de callos y células en suspensión de las líneas transformadas C-1 así como la línea silvestre de *Daucus carota*
- Desarrollar cinéticas de crecimiento de células en suspensión de la línea transformada SMC-1 de *Daucus carota*
- Determinar la presencia de la proteína VP2 por Dot-blot, a nivel callo y células en suspensión
- Evaluar la producción de la proteína VP2 por ELISA, a nivel callo y células en suspensión

## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### Condiciones:

- Medio MS o B5
- Fitorreguladores
- Sacarosa
- pH
- Temperatura
- Luz constante
- Fotoperiodo y oscuridad

### Parámetros cinéticos para evaluar

- Peso fresco
- Peso seco
- pH de medio de cultivo
- Viabilidad celular
- Consumo de azúcares

Cultivo *in vitro* de *Daucus carota*

Optimización del cultivo de callos de *Daucus carota* de la línea transformada (C-1) y línea silvestre (WT)

Establecimiento del cultivo de células en suspensión de la línea SMC-1 y SM-WT de *Daucus carota*

Cinética de crecimiento de células en suspensión de la línea SMC-1 y SM-WT de *Daucus carota*

Detección de la proteína VP2 por Dot-Blot  
Cuantificación de proteína VP2 por ELISA

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Obtención de las líneas celulares de *Daucus carota*

Los callos iniciales de *Daucus carota* fueron proporcionados por el grupo de trabajo a cargo del Dr. Sergio Rosales-Mendoza del laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). Realizaron la transformación genética nuclear-estable de *Daucus carota*, mediante co-cultivo con *A. tumefaciens* utilizando el vector de expresión binario, donde se clonó el gen VP2 bajo el control del promotor CaMV35S y un gen de resistencia a kanamicina (nptII) como marcador de selección (Bolaños-Martínez *et al.*, 2020), posteriormente las condiciones de proliferación del cultivo de *Daucus carota* fue colocado en medio rico en sales MS, adicionado con 20 aminoácidos, sacarosa 3%, 2,4-D (1ml/L), BA (300µg/L), luz continua, kanamicina (25mg/L), cefotaxima (125mg/L); obteniendo líneas independientes transgénicas, de las cuales para este proyecto solo se utilizó la línea C-1, esta línea celular presentó mejor rendimiento en la producción de proteína VP2 y como control se utilizó la línea WT.

### 8.2 Cultivo de callos y células en suspensión de *Daucus carota*

#### 8.2.1 Medio de cultivo

Los medios de cultivos que se utilizaron para subcultivar los callos y células en suspensión de *Daucus carota* línea C-1, fueron MS (Murashige y Skoog, 1962) y B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (**Tabla 4**), adicionado con 30g de sacarosa, 3g/L PVP, 2.5g KNO<sub>3</sub>, los fitoreguladores: 2,4-D (2mg/L) y cinetina (2mg/L) y urea, pH 5.7. Al medio de cultivo sólido se le adicionó 3 g/L de Phytigel y se esterilizó por 15 minutos a 121°C y 15 psi.

**Tabla 4.** Stock de medios de cultivo

<b>MS</b>	<b>B5</b>
<p>MACROELEMENTOS</p> <p>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></p> <p>KNO<sub>3</sub></p> <p>CaCl<sub>2</sub>*2H<sub>2</sub>O</p> <p>MgSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O</p> <p>KH<sub>2</sub>OPO<sub>4</sub></p>	<p>MACROELEMENTOS</p> <p>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></p> <p>MgSO<sub>4</sub></p> <p>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></p> <p>CaCl<sub>2</sub>*2H<sub>2</sub>O</p>
<p>MICROELEMENTOS</p> <p>MnSO<sub>4</sub>*H<sub>2</sub>O</p> <p>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></p> <p>ZnSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O</p> <p>KI</p> <p>NaMoO<sub>2</sub></p> <p>CuSO<sub>4</sub> * 5H<sub>2</sub>O</p> <p>CoCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O</p>	<p>MICROELEMENTOS</p> <p>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></p> <p>CoCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O</p> <p>CuSO<sub>4</sub> * H<sub>2</sub>O</p> <p>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</p> <p>KI</p> <p>ZnSO<sub>4</sub> *7H<sub>2</sub>O</p>
<p>EDTA</p> <p>FeSO<sub>4</sub>*H<sub>2</sub>O</p> <p>Na EDTA</p>	<p>EDTA</p> <p>FeSO<sub>4</sub>*H<sub>2</sub>O</p> <p>Na EDTA</p>
<p>VITAMINAS</p> <p>Ac. Nicotínico</p> <p>Pirridoxina HCL</p> <p>Tiamina HCL</p> <p>Glicina</p>	<p>VITAMINAS</p> <p>Ac. Nicotínico</p> <p>Pirridoxina HCL</p> <p>Tiamina HCL</p> <p>Myonositol</p>
<p>Sacarosa</p>	<p>Sacarosa</p>
<p>Myoinositol</p>	<p>KNO<sub>3</sub></p>
<p>PVP</p>	<p>PVP</p>
<p>Fitorreguladores</p> <p>2,4-D</p> <p>Cinetina</p>	<p>Fitorreguladores</p> <p>2,4- D</p> <p>Cinetina</p>

### 8.2.2 Cultivo de callos líneas WT y C-1 de *Daucus carota*

Para establecer las condiciones de crecimiento de callos celulares de *Daucus carota*, se diseñó y desarrolló un modelo experimental que consta de seis tratamientos en medio de cultivo sólido MS y B5 adicionado con 2 ml de fitorreguladores [2,4-D y Cinetina 2mg/l respectivamente] y urea como fuente de nitrógeno (**Tabla 5**). El cultivo de callos se realizó en una campana de flujo laminar en condiciones asépticas. Posteriormente se realizó la siembra de callos cada 15 días, en frascos de vidrio de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo sólido de acuerdo con el tratamiento correspondiente para generar suficiente biomasa. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de luz constante ( $24\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), fotoperiodo (16hrs luz/ 8hrs oscuridad) y oscuridad total a 25°C con una humedad relativa de 90% con resiembras cada 15 a 20 días.

**Tabla 5.** Modelo experimental para el establecimiento de cultivo en callos de la línea celular C-1 de *Daucus carota*.

Condiciones de los medios de cultivo	Luz constante	Fotoperiodo 16:8	Oscuridad
MS -FH	*	*	*
MS +FH	*	*	*
MS +FH+U	*	*	*
B5 -FH	*	*	*
B5 +FH	*	*	*
B5 + FH+U	*	*	*

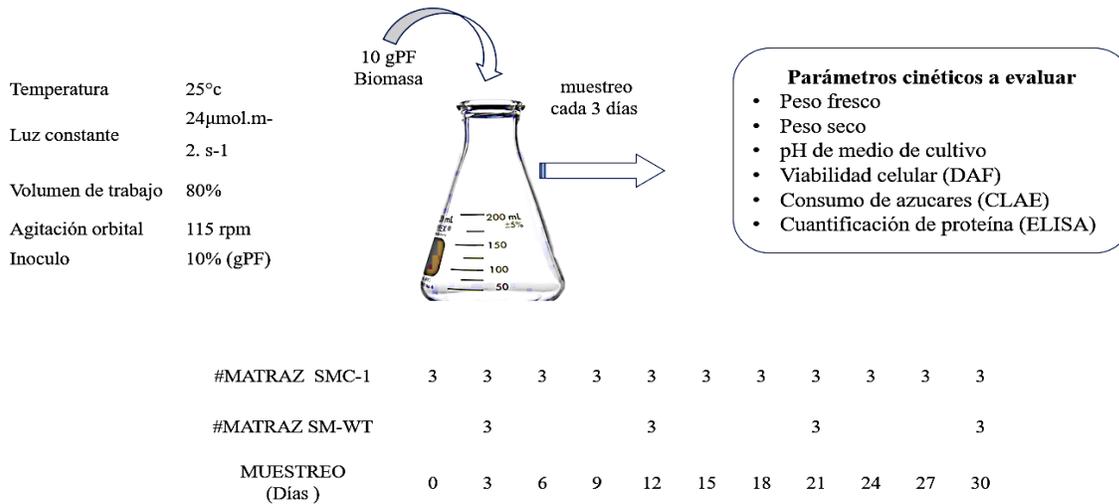
FH= fitohormona, U= urea. Cada tratamiento se realizó por triplicado y analizó mediante Tukey.

### **8.2.3 Establecimiento de cultivos en suspensión de las líneas SMC-1 y SM-WT de *Daucus carota***

Partiendo de la mejor condición de crecimiento de los callos de *Daucus carota* (línea C-1), se pesaron 10 g de callo friable y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con baffles laterales, a estos matraces se les adicionó 100 ml de medio de cultivo B5. Posteriormente, una vez establecidos los cultivos de células en suspensión de la línea transformada C-1, ahora denominada SMC-1 y línea silvestre (SM-WT); se propagaron los cultivos a matraces sin baffles, se inoculó 10% (v/v) de biomasa de la línea SMC-1 y SM-WT por separado, los matraces se mantuvieron en un agitador orbital de plataforma a una velocidad de agitación de 115rpm, luz constante ( $24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y  $25^{\circ}\text{C}$ ; se realizó resiembra de los cultivos cada 15 días

### **8.3 Cinética de crecimiento de células en suspensión de *Daucus carota* en matraz**

Una vez obtenida la biomasa suficiente de *Daucus carota* en suspensión, se inició la cinética de crecimiento con los cultivos de células en suspensión de la línea SMC-1 (**Figura 7**). Se utilizaron 36 matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml de medio B5, fueron inoculados con 10% de la biomasa. Estos nuevos cultivos se mantuvieron en agitación orbital 110 rpm, bajo condiciones de luz constante ( $24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a  $25^{\circ}\text{C}$ , durante 30 días, para evaluar los parámetros cinéticos en suspensiones celulares, como lo indica el protocolo de (Carreño-Campos, 2017).



**Figura 7.** Modelo: cinética de crecimiento de células en suspensión en matraz de 250ml

### 8.3.1 Viabilidad celular

Para preparar la solución stock de diacetato de fluoresceína (DAF), se disolvieron 5 mg de DAF en 1 ml de acetona y se almacenó a 4°C. Se colocó 0.1 ml del stock y se adicionaron 5 ml de agua destilada. Posteriormente, se tomó 500 μl de esta última dilución y se mezclaron con 500 μl de muestra, se dejó reposar por 1 min, posteriormente se tomó 50 μl de esta suspensión y se colocaron en un portaobjetos. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia 10X (Nikon Eclipse E 400) y la reacción de células viables fue confirmada por la fluorescencia emitida.

### 8.3.2 Medición del pH

La importancia del pH en el medio radica en la influencia que ejerce tanto en el crecimiento celular como en los reguladores del crecimiento en células vegetales, por tal motivo se realizó la medición de pH con un potenciómetro marca ORION modelo 410<sup>a</sup>, el medio de cultivo filtrado de los cultivos en suspensión a nivel matraz se midió directamente.

### 8.3.3 Análisis de biomasa en peso fresco

El peso fresco (PF) de los callos se determinó al separar la biomasa celular del medio de cultivo, para células en suspensión se separó la biomasa el medio de cultivo por filtración al vacío; en ambos casos la biomasa se pesó en una balanza analítica y se congeló.

#### **8.3.4 Análisis de biomasa en peso seco**

Para obtener el peso seco, la biomasa filtrada se colocó en un liofilizador (marca LABCONCO FreeZone) a  $-50^{\circ}\text{C}$  y vacío de 0.02 mbar durante 2-3 días hasta mantener un peso seco constante.

#### **8.3.5 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizó prueba T-students la cual permite analizar dos muestras que tienen medias iguales y que provienen de la misma población. Posteriormente se sometieron a una prueba de Siegel y Tukey que permite comparar la dispersión de dos conjuntos de resultados para ver las diferencias de producción entre las líneas celulares.

#### **8.3.6 Cuantificación de azúcares totales**

Para la cuantificación de azúcares en el medio nutritivo de las células en suspensión de *Daucus carota* SMC-1 y SM-WT, se realizó inicialmente una curva de calibración para sacarosa, fructosa y glucosa posteriormente se determinó el consumo de carbohidratos presentes en el medio de cultivo de las muestras. La cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con el equipo de la marca Waters 7117 plus Autosampler. Se utilizó una columna amino ( $\text{NH}_2$ ) UG80 de tamaño  $5\mu\text{m}$  ( $4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$ ) y como fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (acetonitrilo: agua) en una proporción 80:20 respectivamente y un flujo de operación de  $1.0\text{ ml min}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### **8. 4 Extracción de proteína VP2 de cultivos de *Daucus carota***

A partir de los cultivos obtenidos de callos de *Daucus carota* (CM-C1) se realizó la extracción de proteínas totales por el método de extracción reportado por Franklin Scott *et al.*, (2002). Se congeló 100 mg de tejido vegetal fresco, posteriormente se lisaron en un mortero frío con 300µl de buffer de extracción (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25Mm (pH 6.6), NaCl 100Mm, Triton X-100 v/v 5%, 100 mM β-mercaptoetanol, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)). Se sonicaron las suspensiones suavemente (5 pulsos/5 s/25% amplitud) con ultrasonificador de punta (Vibra-Cell™ Ultrasonic) a 4°C, posteriormente los extractos se clarificaron por centrifugación a 9600xg a por 10min a 8000 rpm a 4°C y se colectó el sobrenadante (200µl) en tubos Eppendorft nuevos. Finalmente, con estos extractos se llevó a cabo la cuantificación de la proteína VP2 como se describe a continuación.

#### **8.5 Inmuno-detección de VP2 por Dot blot**

Para detectar la presencia de VP2 se aplicaron 2µL del extracto total en una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Germany) y se dejaron secar, posteriormente se realizó el bloqueo con leche libre de grasa al 5% durante 2 horas. Se colocó péptido sintético de VP2 con el anticuerpo primario y se incubó durante toda la noche a 4°C. Después se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG (dilución 1:2000) por un periodo de 2 hrs a 25° C.

#### **8. 6 Cuantificación de la proteína VP2 por ELISA**

La cuantificación de proteína VP2 de los extractos solubles, se realizó ELISA indirecta que se basa en el reconocimiento específico antígeno-anticuerpo conjugado a una enzima, cuyo producto de reacción da lugar a un complejo coloreado (cromóforo) que se cuantifica en un lector de ELISA mediante espectrofotometría.

En este caso, el antígeno (VP2) es reconocido por un anticuerpo (anticuerpo primario) que carece de enzima conjugada; este complejo antígeno-anticuerpo es posteriormente reconocido por un anticuerpo secundario el cual se une a dominios constantes del anticuerpo primario. Será la unión de este segundo anticuerpo conjugado a una enzima la que desencadenará la reacción enzimática y la formación de un compuesto coloreado.

Inicialmente, se fijó el antígeno (VP2) a la base de la placa de poliestireno en un volumen de 50µl de concentración de extracto y 50µl de buffer de carbonatos durante toda la noche a 4°C, al día siguiente se lavó cuatro veces con PBST 0.5%. Posteriormente, se bloqueó con leche libre de grasa (Svelty 5%) con 50µl en cada pozo por 2hrs a 25°C, se secó y se añadió anticuerpos primarios dirigidos contra la proteína de interés (anti-VP2) en una dilución optimizada (PBST en 1:100) 50µl por pozo se incubaron toda la noche a 4° C. Posteriormente se lavó cuatro veces con PBST 1X y se agregó el anticuerpo secundario (anti-IgG) conjugado con peroxidasa de rábano por 2 horas a 25°C (dilución 1:1000), en seguida se lavó la placa con PBST 1X para eliminar el exceso de enzima no unida. Finalmente, se determinó la unión de los anticuerpos con ABTS + 1mm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se determinó la densidad óptica (D.O) a 405 nm. Las lecturas se compararon con las lecturas de la curva estándar la cual se construye usando diferentes concentraciones de péptidos sintéticos (VP2 y VP2-D).

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Establecimiento de callos de las líneas C-1 y C-WT de *Daucus carota*

A partir de los subcultivos de callos de las líneas transformadas C-1 y de la línea silvestre (WT) se obtuvieron callos friables en las condiciones de crecimiento de luz constante, fotoperiodo y oscuridad. En cada condición mostro cambios morfológicos diferentes en la coloración, friabilidad, rendimiento de biomasa y de la proteína de interés (VP2). Para los cultivos que crecieron en luz constante en ambos medios (B5 y MS ), los callos (CMC-1) presentaron una coloración verde o amarilla-verde, en condiciones de fotoperiodo se observó de igual forma una coloración amarilla-verde y en algunos casos amarillos, en oscuridad la coloración del callo fue más amarillo cremoso mostrando un cambio a partir del día 14 del cultivo, su color fue virado a naranja lo cual podría estar indicando la activación de  $\beta$ -carotenos en la célula, dato que coincide con otros autores en donde se reporta la expresión de metabolitos secundarios como carotenos hacia el medio de cultivo, este mismo efecto se ha reportado para las especies de *Cleome rosea*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon sculentum*, *Tagetes erecta* y *Daucus carota* ( Breithaupt & Bamedi,2002; Dalal *et al.*,2010; Mech-Nowak *et al.*,2012; Benítez-García, 2014). Así mismo en algunos casos se observó coloración clorótica principalmente en los callos WT.

Con respecto al efecto de los nutrientes presentes en los medios de cultivos B5 y MS los callos generados de la línea CMC-1 y CM-WT sin fitohormonas ni urea, los resultados son los siguientes. En los callos generados para línea CM-WT se observó diferenciación celular (embriogénesis) a partir del día 12 y para la línea CMC-1, los callos han crecido lentamente, pero se mantienen desdiferenciados, ambos cultivos se han mantenido por más de 12 meses. El interés de crecer la línea CMC-1 sin fitohormonas radica en mantener la línea capaz de producir la proteína de interés sería principalmente su uso para consumo humano, además del impacto biotecnológico al reducir costos de producción a gran escala.

En la **Tabla 6** se observa el crecimiento celular bajo diferentes condiciones de crecimiento para los callos transformados (CMC-1) y no transformados (CM-WT) de *Daucus carota*, como se puede observar la mejor condición de crecimiento fue en el medio de cultivo B5 suplementado con urea y las fitohormonas (2,4-D y Cinetina, 2mg/l respectivamente), los callos crecieron en luz constante, fotoperiodo y oscuridad, se observó una alta friabilidad a

los 15 días. Mientras que en los callos crecidos en medio de cultivo MS se observó agregados celulares con consistencia dura y poco friable, lo que afectaría para futuros estudios de cultivos en suspensión y su escalamiento.

**Tabla 6.** Crecimiento celular de *Daucus carota* (CMC-1 y CM-WT) en medio de cultivos solido para la generación de callo.

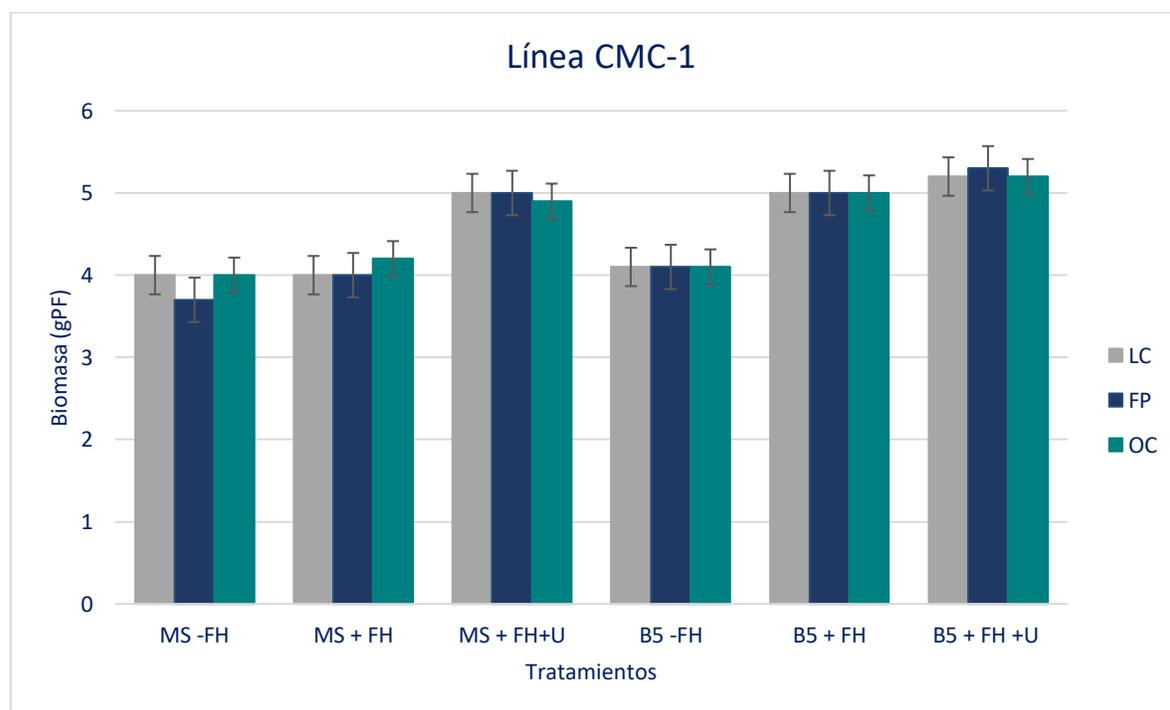
Tratamiento	Condición					
	WT Luz Constante	WT Fotoperiodo	WT Oscuridad	C1 Luz constante	C1 Fotoperiodo	C1 Oscuridad
MS Sin FH						
MS 2,4D:Cin						
MS 2,4D:Cin/U						
B5 Sin FH						
B5 2,4D:Cin						
B5 2,4D:Cin/U						

En callos de la línea CMC-1 el valor máximo de biomasa obtenido al día 15 de cultivo en medio MS adicionados con fitohormonas (2,4-D y Cinetina) y urea fue de 5 gPF, en medio B5 adicionados con fitohormonas (2,4-D y Cinetina) y urea fue 5.3 gPF, lo que representa un incremento de cinco veces del inóculo inicial (**Gráfica 1**).

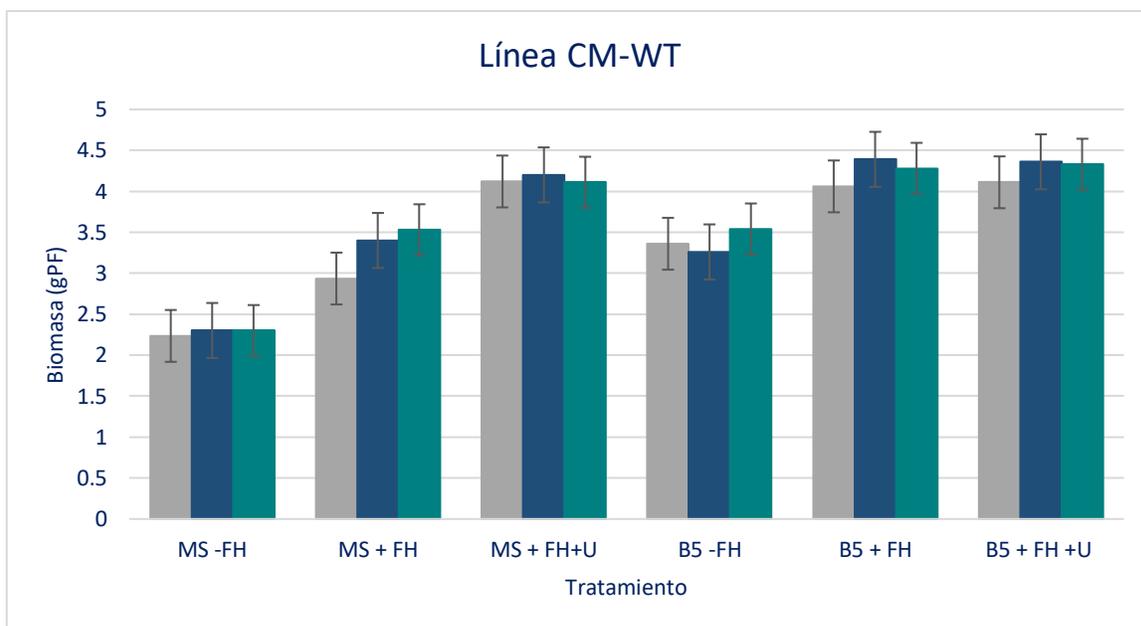
Para la línea CM-WT los valores máximos de biomasa obtenidos en callo al día 15 en los tratamientos B5 y MS adicionados con fitohormonas (2,4-D y Cinetina) y urea. Los valores máximos de biomasa fueron de 4.2 g PF y de 4.3 gPF en medio B5, lo que representa un incremento cuatro veces del inoculo inicial (**Gráfica 2**).

### 9.1.1 Análisis estadístico

De acuerdo con los análisis estadísticos basados en la Prueba de Comparación de Tukey, se estableció que hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ) tanto para la línea transformada (CMC-1) y la línea silvestre (CM-WT) de *Daucus carota*, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre las condiciones de cultivo ( $P > 0.05$ ).



**Gráfica 1.** Análisis de varianza en callo de la línea celular CMC-1 de *Daucus carota*. el valor de P obtenido para condición ( $P= 0.489$ ) y para tratamiento ( $P=0.000$ ). LC = Luz constante, FP= Fotoperiodo, OC= Oscuridad.



**Gráfica 2.** Análisis de variancia en callos de la línea celular CM-WT de *Daucus carota*. el valor de P obtenido para condición (P= 0.910) y para tratamiento (P=0.000). LC = Luz constante, FP= Fotoperiodo, OC= Oscuridad.

## 9.2 Cuantificación de la proteína VP2 en callo por medio de ELISA

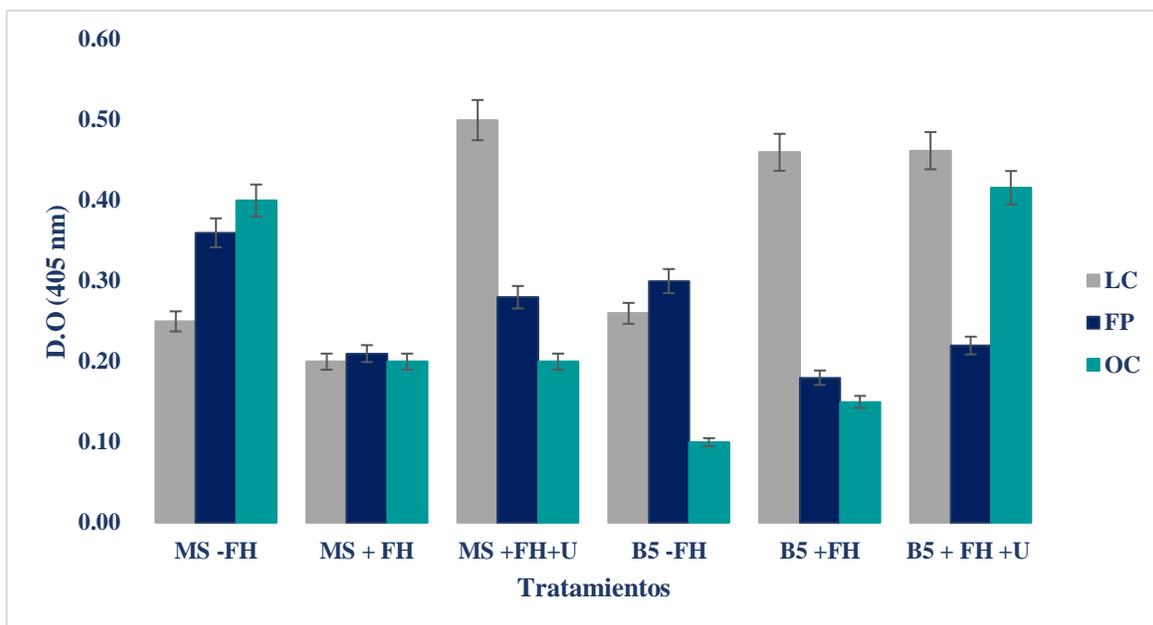
Una vez establecidos los primeros cultivos celulares de *Daucus carota* (CMC-1) se analizó la producción de la proteína VP2. Los resultados de la concentración de proteína VP2 producida en cuatro de los tratamientos a diferentes condiciones se muestra en la **Tabla 7**. La mayor producción de la proteína VP2 fue de 11.24 µg/g en peso fresco de los callos que crecen en el medio de cultivo B5 adicionado con fitohormonas (2,4-D y Cinetina) y urea en condición de oscuridad, seguidas por los callos crecidos en las mismas condiciones nutricionales, pero en luz constante con un rendimiento proteico de 5.62 µg/g en peso fresco. Sin embargo; la producción de esta proteína es menor a la reportada en los callos que crecen en el medio MYT (13.86 µg/g PF), esto podría deberse a que el medio que inicialmente se utilizó para generar las líneas transformadas era un medio enriquecido con sales y aminoácidos.

**Tabla 7.** Concentración de proteína VP2 en callos de la línea CMC-1 mediante ELISA indirecta

Condiciones de crecimiento de la línea CMC-1	Proteína VP2 (µg/g PF)
Callo SLP (C1) Medio MYT fotoperiodo	13.86
B5 + FH + U + oscuridad	11.24
B5 + FH + U + Luz Constante	5.62
B5 +FH + Luz constante	2.13
MS+ FH + U Luz constante	1.24

\*SLP= San Luis Potosí, FH= Fitohormonas, U=Urea, PF= Peso fresco

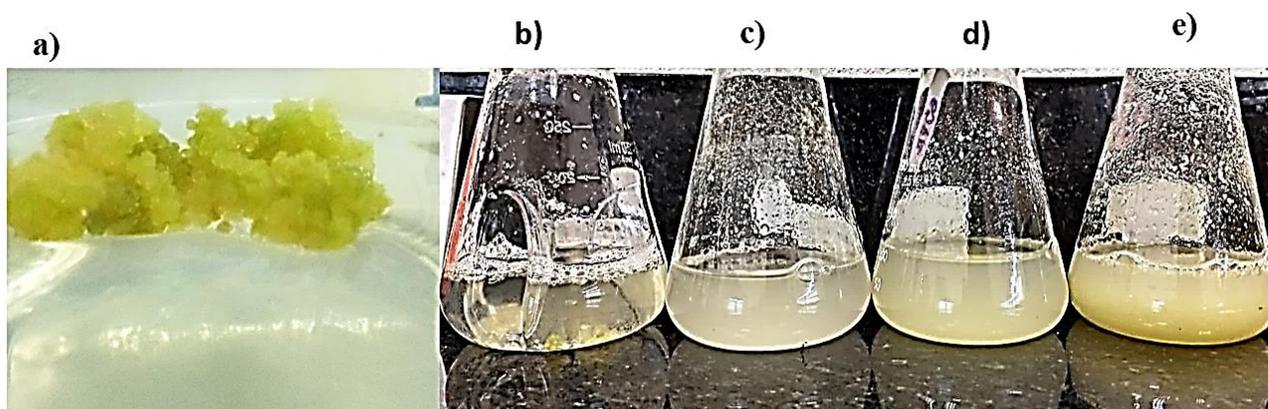
Los datos obtenidos mediante ELISA indirecta revelaron diferencias significativas entre los valores de absorbancia emitidos por los extractos de callo de la línea CMC-1 de *Daucus carota*. Se observó mayor la expresión de proteína VP2 en cuatro tratamientos: B5 adicionado con fitohormonas (2,4-D: Cinetina); MS y B5 suplementado con urea y fitohormonas (2,4-D: Cinetina) en condición de luz constante y medio MS sin fitohormonas en condición de Oscuridad (**Gráfica 3**); lo cual proporcionó datos importantes para iniciar la cinética de crecimiento de células en suspensión de la línea SMC-1.



**Gráfica 3.** Expresión de la proteína VP2 en callos de la línea CMC-1 de *Daucus carota* cuantificada mediante ELISA indirecta. LC = Luz constante, FP= Fotoperiodo, OC= Oscuridad

### 9. 3 Establecimiento de células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota* en matraz.

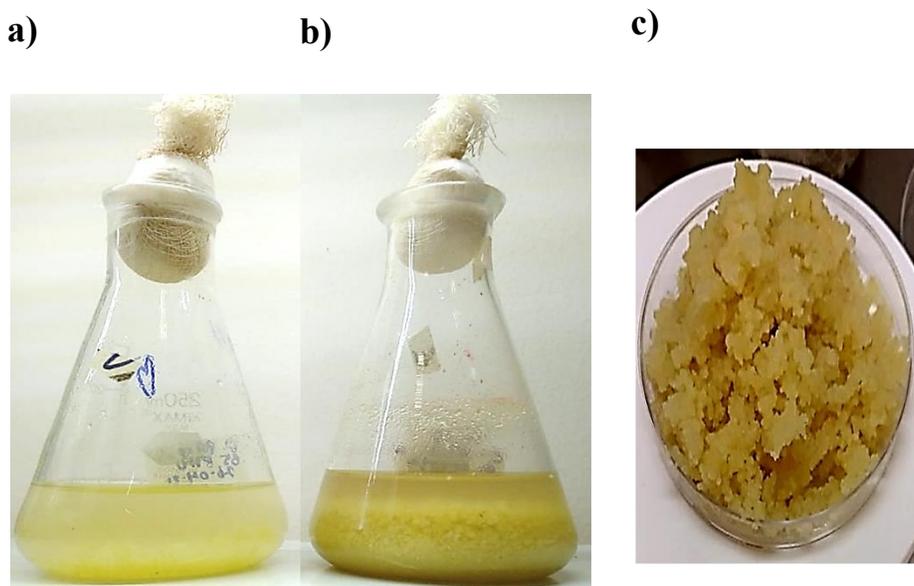
A partir de callos celular de la línea CMC-1 de *Daucus carota* (**Figura 8a**), se inició el establecimiento de cultivos en suspensión en matraces bafleados de 250 ml con 100 ml de medio B5 líquido adicionado con fitohormonas (2,4-D y cinetina, 2mg/L respectivamente) y urea, lo cual permitió la disgregación de los callos y favoreció el crecimiento individual de las células (**Figura 8b**). Posteriormente, se transfirieron los cultivos con células en suspensión disgregadas a matraces Erlenmeyer de 250 ml para obtener la biomasa necesaria e iniciar la cinética de crecimiento (**Figura 8 c, d e**).



**Figura 8.** Establecimiento del crecimiento de células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota*. **a)** Callo friable de la línea CMC-1, **b)** Establecimiento de cultivos en suspensión en matraces bafleados, **c)** crecimiento células en suspensión (5 días), **d)** Células en suspensión (10 días), **e)** Células en suspensión 15 días de crecimiento

#### 9.4 Cinética de crecimiento celular de *Daucus carota* de la línea SMC-1 y SM-WT

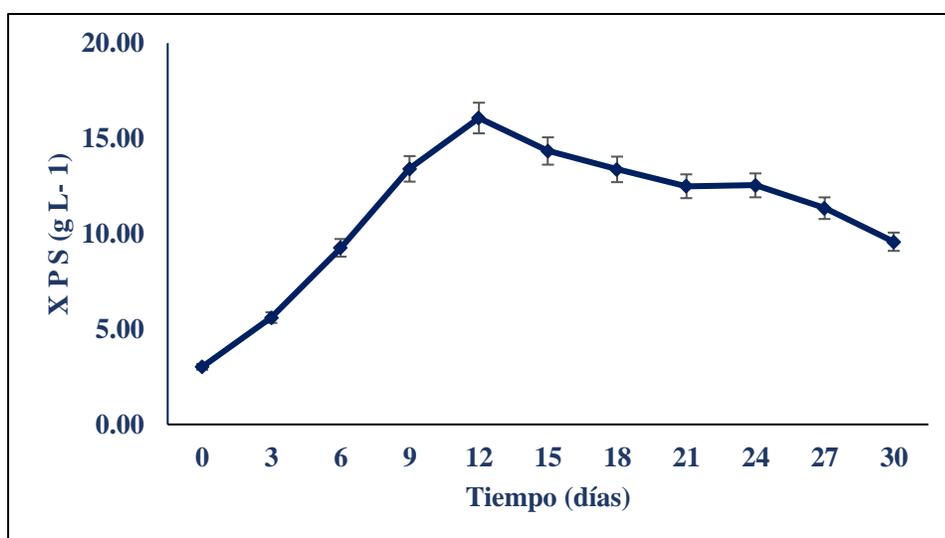
Una vez establecidos los cultivos de células en suspensión de la línea SMC-1, se realizó una cinética de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo B5 suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, fitohormonas (2,4-D y Cinetina 2mg/L respectivamente) y urea como fuente de nitrógeno. En la **figura 9** se muestra un matraz inoculado al día 3 con 10g de biomasa fresca (**Figura 9a**) y después de 30 días de cultivo (**Figura 9b**). Por el movimiento orbital de la agitadora, las células tienden a agruparse hacia el centro del matraz y forman agregados de distintos tamaños (0.5mm a >1cm) durante todos los días de cultivo (**Figura 9c**).



**Figura 9.** Cultivo de células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota* en matraz agitado de 250 ml. **a)** Matraz recién inoculado con 10g, **b)** Matraz a los 30 días de cultivo y **c)** Agregados celulares a los 30 días de cultivo.

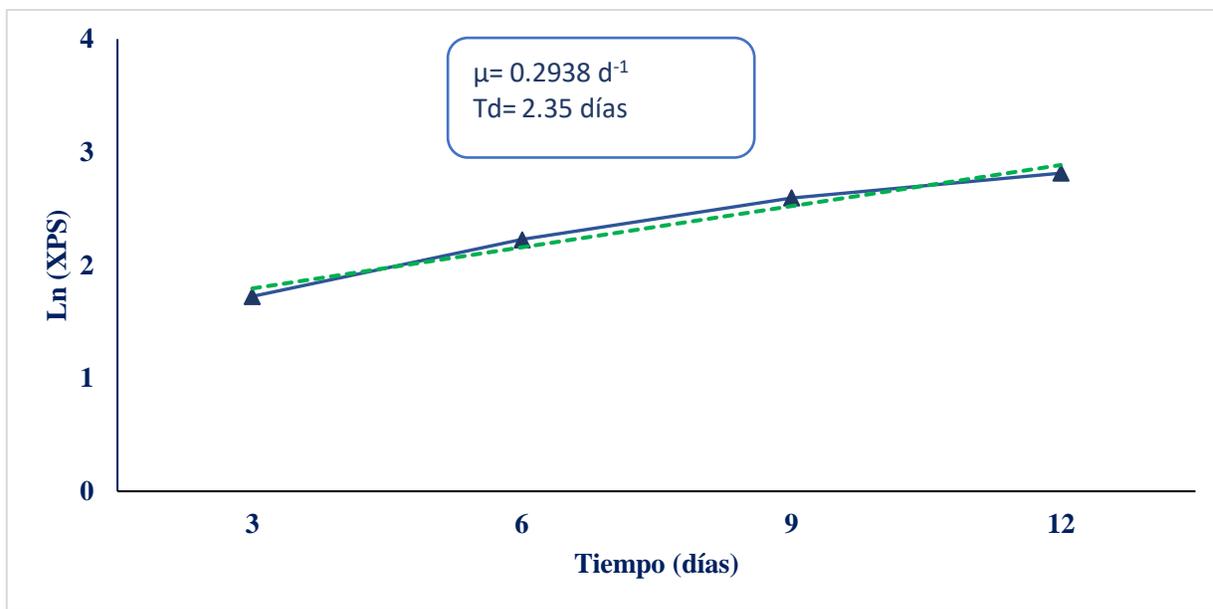
#### 9.4.1 Parámetros cinéticos de las células en suspensión de *Daucus carota*.

En la **gráfica 4** se muestra la curva de crecimiento obtenida para la cinética de células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota* en medio B5 adicionado con urea y fitorreguladores (2,4-D y Cinetina), la cual presenta una tendencia sigmoidea; además, no se observó una fase de adaptación (lag) quizá debido al origen del inóculo. La cinética mostró una fase de crecimiento exponencial, que se prolongó hasta el día 12 de cultivo, donde se observó el valor máximo de biomasa es  $16.07 \text{ g L}^{-1}$  PS, lo que representa un aumento de 5.32 veces en el tamaño del inóculo inicial.



**Gráfica 4.** Cinética de crecimiento de las células en suspensión de *Daucus carota* (línea SMC-1) en matraz agitado. Los datos son por triplicado y se expresaron como la media  $\pm$  (SD) del experimento.

Se graficaron los valores de peso seco de la fase exponencial contra el tiempo mediante análisis de regresión, se obtuvo una línea de tendencia exponencial, cuya pendiente se determinó como la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), así mismo se calculó el tiempo de duplicación ( $T_d$ ). El cultivo presentó una  $\mu = 0.2938 \text{ d}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 2.35 días, la cual duró hasta el día 12, posteriormente comenzó la fase estacionaria (días 12 al 27) y finalmente la muerte celular a partir del día 27 (**Gráfica 5**).



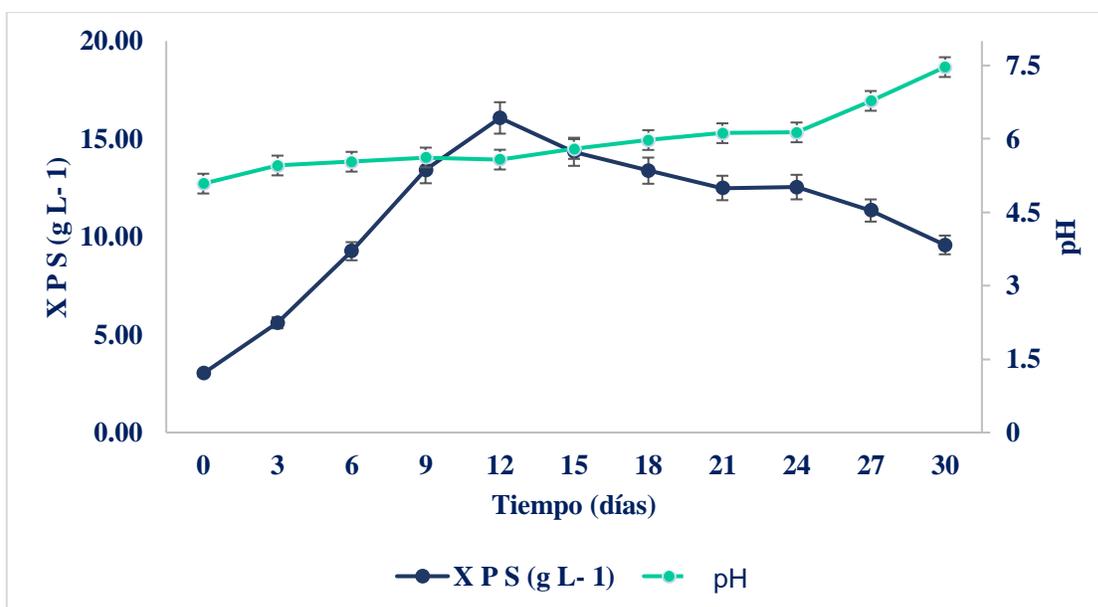
**Gráfica 5.** Ajuste de datos de la biomasa (PS) de la fase exponencial del cultivo de *Daucus carota* línea SMC-1, velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (Td).

Durante la fase exponencial (primeros 12 días), las células en suspensión flotan en el medio líquido con un movimiento uniforme de agitación. Posteriormente, entre los días 15 y 27, la biomasa se observa en el fondo del matraz y cambia de coloración hasta finalizar la cinética al día 30, lo que puede ser el resultado de la muerte celular y el consumo de nutrientes en el medio.

#### 9.4.2 pH del medio de cultivo en los estudios cinéticos de *Daucus carota* (SMC-1)

En el cultivo *in vitro* vegetal la concentración de iones de hidronio [H<sup>+</sup>] juega un papel muy importante, ya que se encarga de evitar dañar la función de la membrana celular o alterar el pH citoplasmático. El pH del medio utilizado para el cultivo de la línea SMC-1 se ajustó a 5.7 antes de esterilizarlo.

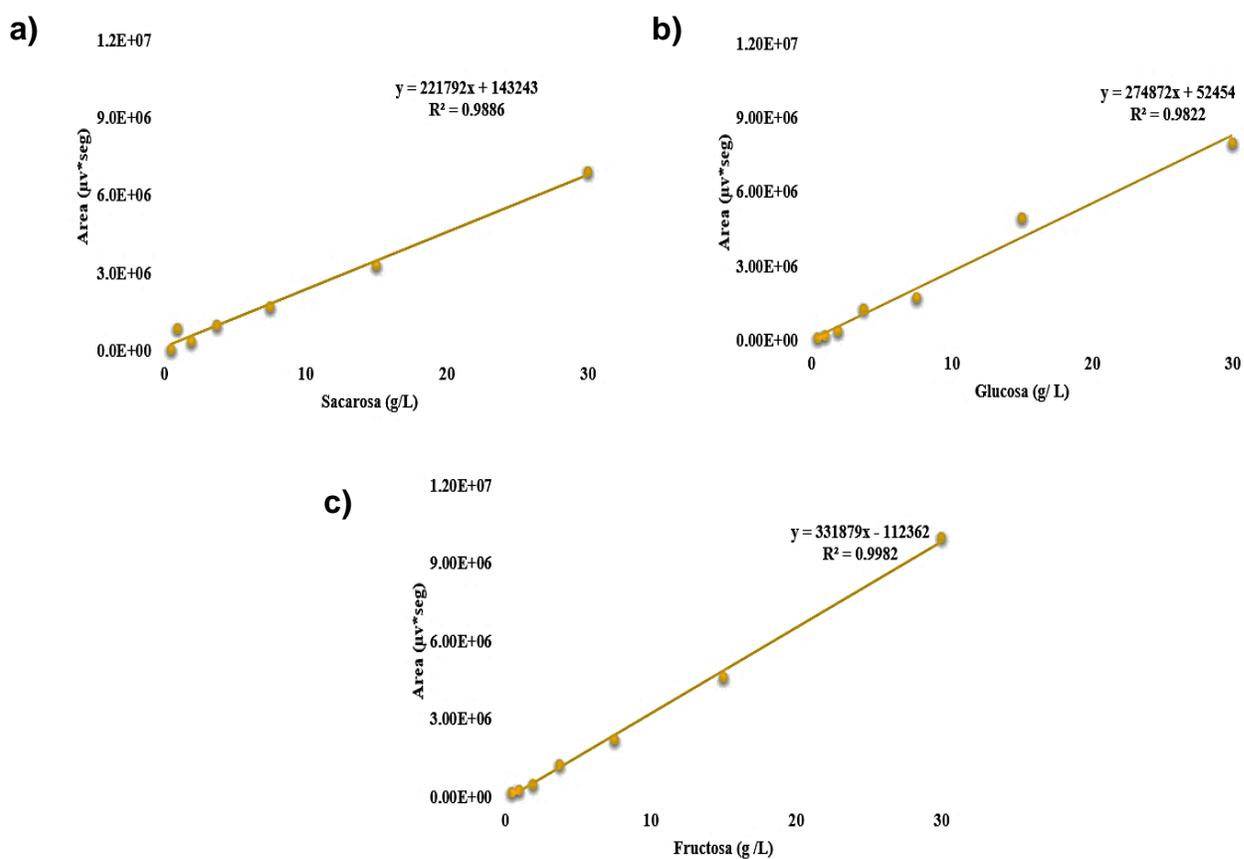
En cada punto de la cinética se midió el pH presente y se comparó con el peso seco obtenido en el medio de cultivo. En la **gráfica 6** puede observar que al día 0 este tuvo un valor de 5.08, mientras que durante la fase exponencial se registraron valores entre 5.45-5.57 al día 12 del cultivo, durante las fases estacionaria el pH aumentó para permanecer entre 5.79 -6.13 desde el día 15 al día 24; al día 27 comenzó a disminuir la biomasa y el pH aumentó a 6.7, finalmente al día 30 se registró un pH de 7.46. Este incremento podría ser debido al consumo de nitratos durante la fase inicial como fuente de nitrógeno.



**Gráfica 6.** Curva de crecimiento celular de la línea SMC-1 de *Daucus carota* y su comportamiento de pH.

### 9.4.3 Consumo de azúcares de la línea SMC-1 de *Daucus carota*

Se realizó el análisis del consumo de azúcar para determinar su comportamiento durante la cinética de crecimiento. Esta cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) de la marca Waters 7117 plus Autosampler. Como fase estacionaria se utilizó una columna amino (NH<sub>2</sub>) UG80 de tamaño 5μm (4.6 mm x 150 mm) y como fase móvil CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O (acetonitrilo: agua) en una proporción 80:20 respectivamente y un flujo de operación de 1.0 ml min<sup>-1</sup> a 25°C. Los datos obtenidos se reportan como gramos de sustrato por litro de medio S (g L<sup>-1</sup>). Se utilizaron soluciones estándar de sacarosa, glucosa y fructosa, se obtuvo curvas de calibración (**Gráfica 7**). Se determinó el tiempo de retención (TR) de cada uno de los azúcares analizados, sacarosa (TR: 10.0 min), glucosa (TR: 8.4. min) y fructosa (TR: 6.6 min). Con estos datos se determinó el patrón de consumo de azúcares mediante la cuantificación de sus concentraciones durante los 30 días de crecimiento.

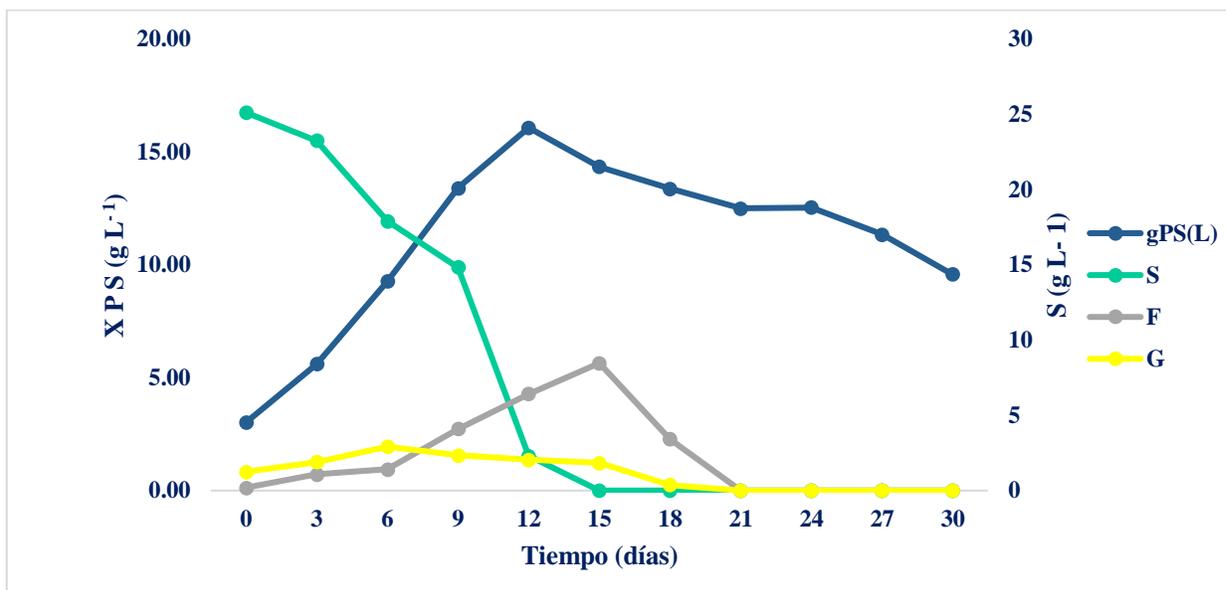


**Gráfica 7.** Curvas de calibración de azúcares. **a)** Sacarosa, **b)** Glucosa, **c)** Fructosa.

En el medio de cultivo, se utilizó sacarosa como fuente de carbono, del cual la concentración inicial fue de 30 g L<sup>-1</sup>. La hidrólisis de sacarosa se observó desde los primeros días del cultivo y se degradó completamente al día 15; sin embargo, la producción máxima de biomasa se observó al día 12, lo anterior nos muestra que el crecimiento celular durante la fase exponencial no solo estaba influenciado por la presencia de sacarosa, sino también la por el aumento de concentración de glucosa y fructosa en el medio (**Gráfica 8**).

Este patrón de comportamiento del consumo de azúcares que se presentó en el cultivo de células en suspensión dependió del consumo de la fructosa, ya que la glucosa se degradó totalmente al día 18 y la fructosa llegó su nivel más bajo (3.426 g/L), sin embargo, se observó que esta se consumió en su totalidad al día 21 (**Gráfica 8**).

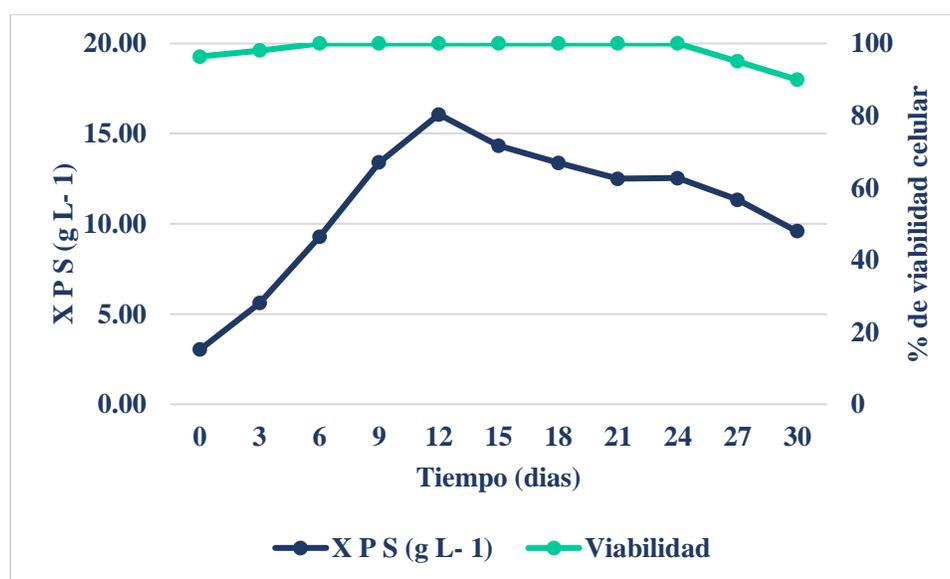
Cuando el cultivo celular de la línea SMC-1 alcanzó su fase estacionaria ya no presentó crecimiento de biomasa, ya que al agotarse la fuente de carbono el crecimiento celular cesa y posteriormente hay muerte.



**Gráfica 8.** Curva de crecimiento celular y consumo de carbohidratos de la línea SMC-1 de *Daucus carota*. (sacarosa (S), glucosa (G), fructosa (F)).

#### 9.4.4 Viabilidad celular de la línea SMC-1 de *Daucus carota*

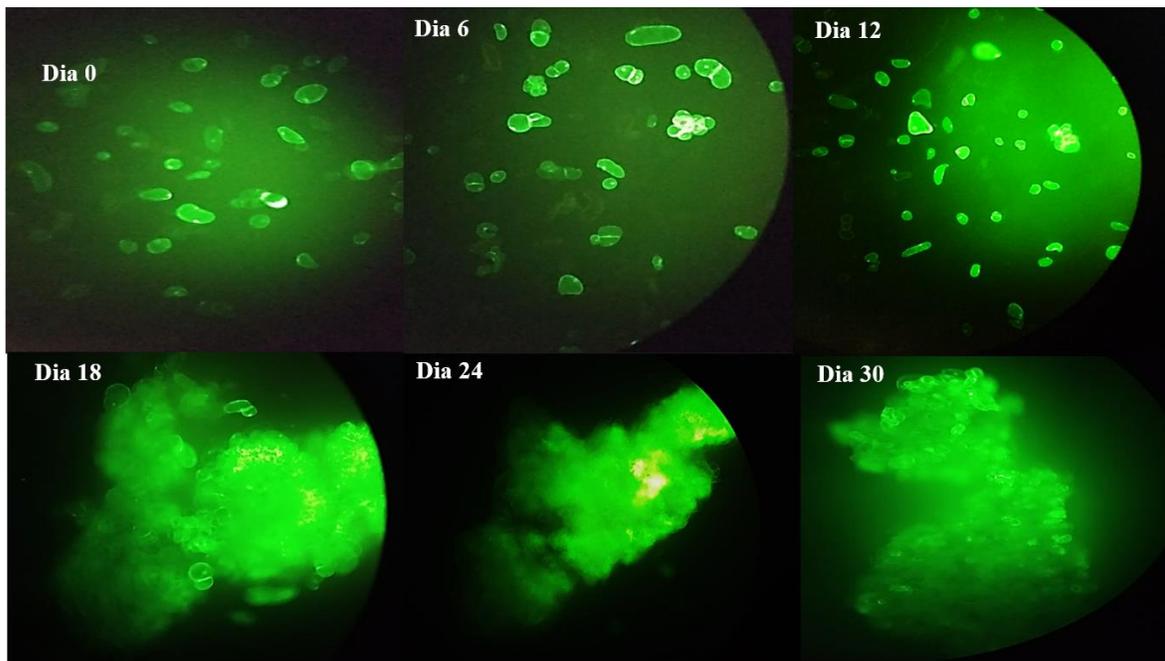
La viabilidad celular permite obtener información sobre el crecimiento del cultivo, confirma la integridad de las células y corrobora que se mantengan viables durante la cinética de crecimiento. Al visualizar en el microscopio de fluorescencia las células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota*, se observó que el cultivo inicio con un 96% de células viables, a partir del día 6 la viabilidad celular fue del 100% y se mantuvo hasta el día 24 del cultivo. Al día 27 comenzó a decaer la viabilidad hasta un 10% (Gráfica 9).



**Gráfica 9.** Curva de crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota*.

Así mismo, se observó la presencia de algunos agregados celulares pequeños, de 10 a 20 células aproximadamente en la etapa inicial (**Figura 10 al día 0**). En la fase exponencial, se observaron células redondas y alargadas formando agregados mayores (**Figura 10, día 18**). En la etapa de muerte, que se inició a partir del día 27 de cultivo, algunas de las células presentaron pérdida de la integridad de la membrana celular, por lo que comienzan a mostrarse deformes. (**Figura 10, día 30**).

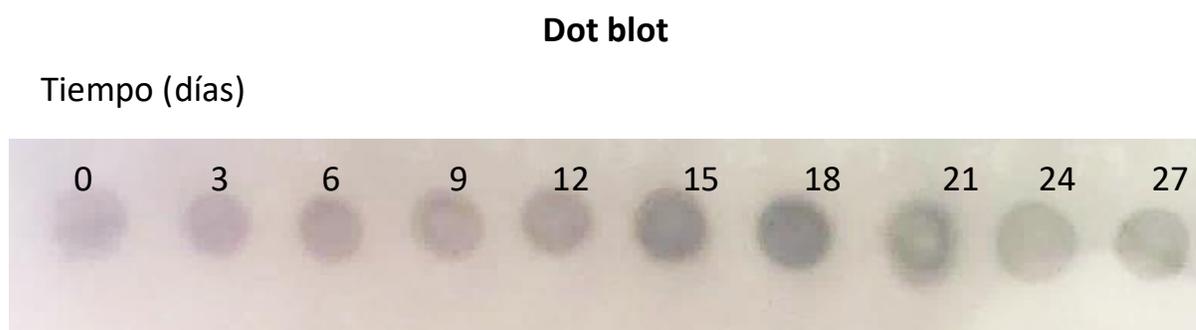
A medida que la célula muere, disminuyen los procesos biológicos provocando cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles, lo que le impedirá realizar funciones importantes. Por esta razón, las células dejan de dividirse y cuando mueren liberan su contenido citoplasmático, lo anterior coincide con la disminución del peso fresco y seco del cultivo (Sánchez, 2001).



**Figura 10.** Viabilidad celular de la línea SMC-1 de *Daucus carota* a diferentes días de la cinética de crecimiento (Objetivo 10X).

#### 9.4.5 Detección de proteína VP2

La inmunodetección de VP2 expresada de forma nuclear estable en las células en suspensión de la línea SMC-1 se realizó mediante la técnica de Dot-blot, se utilizó un antisuero Anti-poliomielitis 1 (Anti-VP2), si la proteína se producía en esta línea celular SMC-1 se generaba una señal (marca oscura), como se puede observar en la **Figura 11**. Se colocaron los extractos de las muestras obtenidas a diferentes tiempos de la cinética, en cada punto hay una señal de color gris muy marcada lo que demuestra que la expresión de la proteína VP2 en la línea SMC-1 se mantiene durante todo el tiempo de la cinética de crecimiento.

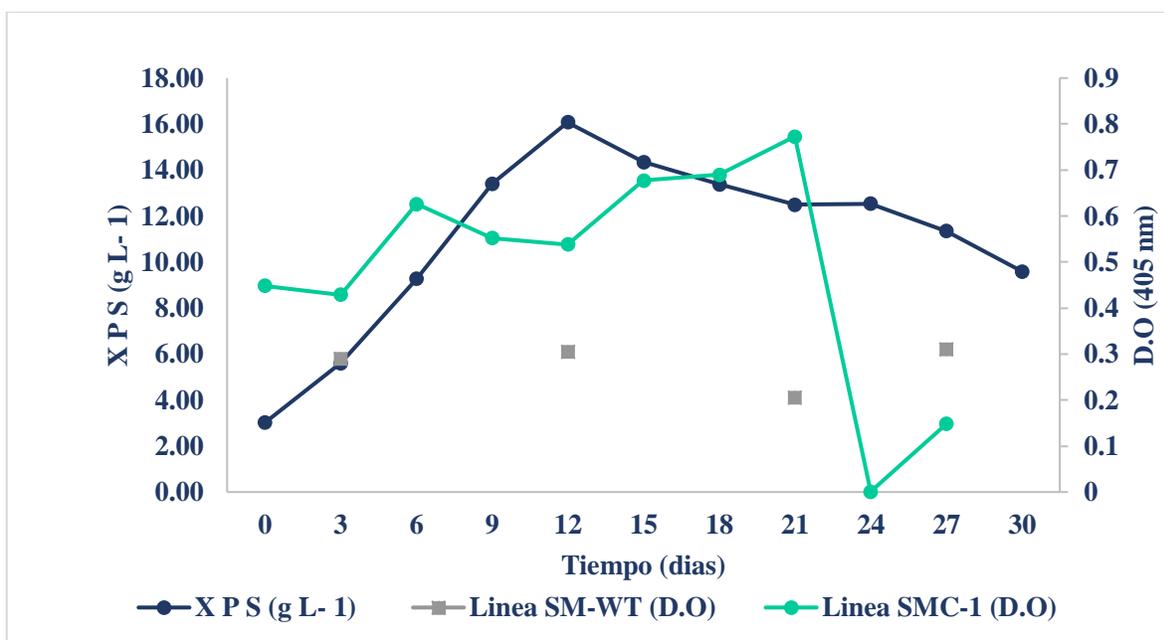


**Figura 11.** Inmunodetección por Dot-blot de la proteína VP2 en la línea SMC-1 de *Daucus carota*. Señal positiva detectada durante la cinética de crecimiento de células en suspensión.

#### 9.4.6 Expresión de proteína VP2 producida por la línea SMC-1 de *Daucus carota*

Se evaluó la expresión de la proteína VP2 en la línea SMC-1 mediante la técnica de ELISA indirecta, la cual se basa en el reconocimiento Antígeno-Anticuerpo y la reacción de anticuerpo marcado con un sustrato que genera una coloración proporcional a la cantidad de complejos formados.

Los datos obtenidos mediante ELISA indirecta revelaron diferencias significativas entre los valores de absorbancia emitidos por los extractos de la línea SM-WT y la línea SMC-1. Se observó que la expresión y producción de la proteína VP2 (línea SMC-1) está relacionada con el crecimiento celular, debido a que VP2 fue incrementado conforme la biomasa aumentó, al día 12 donde se obtuvo el valor máximo de biomasa 16.07gPS donde la densidad óptica (D.O) fue 0.538; sin embargo, se observó un aumento al día 21 de cultivo (D.O 0.773), lo cual representa un incremento de 1.72 veces respecto al día 0 (D.O 0.448) (Gráfica 10).



**Gráfica 10.** Curva de crecimiento celular y expresión de proteína VP2 presente en células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota*.

En la **Tabla 8** se muestran parámetros obtenidos en la cinética de crecimiento de la línea SMC-1 de *Daucus carota* en matraz agitado de 250 ml como índice de crecimiento (IC), rendimiento de producto, rendimiento de biomasa y productividad.

**Tabla 8.** Parámetros de crecimiento y producción de la línea SMC-1 de *Daucus carota*.

Biomasa (gPS L-1)	$\mu$ (d-1)	Td (días)	IC	YX/S (gX/gS)
Xo = 3.02 Xmax=16.07	0.3	2.3	3.1	0.45

Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), Tiempo de duplicación (Td), Índice de crecimiento (IC), Rendimiento de biomasa (YX/S).

### 9.5 Análisis de costos de los medios de cultivo

Cabe destacar que para la producción biotecnológica a escala de la línea SMC-1 debe ser considerados los costos de inversión del medio de cultivo a utilizar, se realizó un análisis del costo del medio MYT, MS y B5, que se utilizaron inicialmente para establecer el crecimiento celular y el rendimiento de proteína VP2 de la línea SMC-1. Los resultados del análisis de costos de estos medios presento diferencias muy significativas destacando que el medio MYT es el más costoso \$ 840.00 pesos mexicanos mientras que del medio B5 es de \$ 285-00 pesos mexicanos. Las diferencias de costos mostraron que el medio MYT es un medio de cultivo buenos para establecer la línea peor no para llevar a escala, mientras que biotecnológicamente el medio B5 sería el más rentable para un proceso a mayor escala de producción de la línea SMC-1 (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Costo de medios de cultivo

MS	MS + FH	MS + FH + B5 UREA	B5 + FH	B5 + FH+ UREA	MEDIO MYT	
Macroelementos	Macroelementos	Macroelementos	Macroelementos	Macroelementos	Macroelementos	
Microelementos	Microelementos	Microelementos	Microelementos	Microelementos	Microelementos	
Vitaminas	Vitaminas	Vitaminas	Vitaminas	Vitaminas	Vitaminas	
EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	CaC <sub>12</sub> 2H <sub>2</sub> O	
Myoinositol	Myoinositol	Myoinositol	KNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	EDTA
Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	Myoinositol
PVP	PVP	PVP	PVP	PVP	PVP	Sacarosa
	2,4-D	2,4-D		CIN	CIN	PVP
	CIN	CIN		2,4-D	2,4-D	2,4-D
		UREA			UREA	BA
						Coctel 20 aminoácidos
\$452	\$469	\$477.83	\$259	\$276.25	\$284.83	\$840-\$980

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1 Establecimiento de cultivo de callos de la línea C-WT y C-1 de *Daucus carota*

Para establecer los cultivos de células indiferenciadas y friables de callos de la línea transformada (CMC-1) y línea silvestre (CM-WT) se implementó el uso de seis diferentes tratamientos con los medios de cultivo MS y B5, con fitohormonas de crecimiento (2,4-D y cinetina) y urea como fuente de nitrógeno y sin fitohormonas de crecimiento. Las mejores condiciones de crecimiento para la línea CMC-1 se observaron en los tratamientos de medio B5 y MS adicionados con fitohormonas (2,4-D y Cinetina 2mg/L, respectivamente) y urea, así como en el tratamiento B5 adicionado con fitohormonas (2,4-D y cinetina 2mg/L respectivamente) sin urea. Los valores máximos de biomasa fueron obtenidos al día 15 (5 y 5.3 gPF), lo que puede deberse a la presencia de fitohormonas de crecimiento y a la urea como fuente de nitrógeno.

En el 2008 Shiram y colaboradores señalan que a concentraciones elevadas de auxinas o citoquininas se estimula la producción de células indiferenciadas generando los cultivos celulares denominado “callo”. Además, se ha reportado que la suplementación de cultivos celulares con auxinas podría estar relacionada con la capacidad de estimular la división celular e influir en la regulación del ciclo celular, induciendo la expresión de ciclinas a nivel transcripcional (Arellano *et al.*, 2008). Se ha reportado que durante la etapa G1 las células crecen y acumulan nutrientes; las auxinas y las citocininas inducen la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular (Jurado, 2010). Así mismo, se ha reportado que el 2,4-D es la auxina más efectiva para la proliferación de callos, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (George, 2008).

Por otra parte, el enriquecimiento de los cultivos con aminoácidos o urea representan para las células, una fuente efectiva e inmediata de nitrógeno, puesto que se pueden incorporar al metabolismo mucho más rápido que el nitrógeno inorgánico, (Thom *et al.*, 1981). Se ha reportado que la suplementación con compuestos nitrogenados orgánicos es necesaria para la formación de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ADN, ARN, clorofila, coenzimas y polímeros de la pared celular; sin embargo, los compuestos nitrogenados también juegan un papel importante en la formación de callo, ya que se consideran estimulantes de la proliferación celular (Gamborg & Jhyluk, 1981). La urea también puede ser usada como una

fuentes de nitrógeno, en lugar de aminoácidos; ya que se ha señalado que siempre que el medio de cultivo tenga la fuente de amonio o nitrato adecuado, los aminoácidos no son esenciales (Gamborg *et al.*, 1976). Tal es el caso de cultivos celulares de *Daucus carota* pueden sintetizar glutamina a partir del ácido aminobutírico (urea). Por tal motivo, la suplementación de los medios con fuentes adicionales de nitrógeno ha probado ser una estrategia exitosa para incrementar los rendimientos en la producción de proteínas recombinantes en células vegetales (Zabala *et al.*, 2009; Holland *et al.*, 2010)

Carreño-Campos en el 2019 reportó que en la cinética de crecimiento celular de *Daucus carota* se observa una fase lag de 15 a 20 días para ambas líneas (transformada y silvestre), debido a que los cultivos de callos son de crecimiento lento y heterogéneo. Por otro lado, el mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares son callos friables, formados por células indiferenciadas y con baja cohesividad entre ellas; se sabe que, para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos cortos (según la especie de 30-45 días) (Gómez *et al.*, 2006)

## **10.2 Establecimiento de células en suspensión de la línea CMC-1 en matraz agitado de *Daucus carota***

Una vez colocados los callos friables en medio B5 líquido se observó una desintegración de entre un 70 a un 80% después de 15 días en agitación orbital a 115rpm en matraces bafleados, permitiendo establecer adecuadamente los cultivos de células en suspensión después de varias resiembras en medio B5 adicionado con fitohormonas (2,4-D y cinetina, 2 mg/L, respectivamente) y urea, a los cultivos celulares establecidos en suspensión se le determinó línea SMC-1. Este análisis se determinó de manera cualitativa, mediante la observación de los callos y las suspensiones celulares.

## **10.3 Cinética de crecimiento de células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota***

Los resultados en la cinética de crecimiento de la línea SMC-1 obtenidos a partir del peso seco indicaron ausencia de fase lag, lo anterior podría deberse a diferentes factores como el estado fisiológico del inóculo al momento de iniciar la cinética. Se ha demostrado que esto último tiene influencia en el crecimiento celular de otras especies vegetales. Posteriormente se observó un crecimiento exponencial que persiste hasta el día 12, similar a lo reportado

anteriormente para *Daucus carota* correspondiente a 10 y 15 días; en esta fase las células presentan su máxima capacidad de crecimiento y división debido a la disponibilidad inmediata de nutrientes (Kanabus *et al.*, 1996; López *et al.*, 2017; Carreño-Campos, 2019).

La fase de muerte de las suspensiones celulares es generada por especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas por el metabolismo celular. Las ROS provocan estrés oxidativo en las células y activan las oxidasas. En algunos casos, las células liberan fenol en el medio de cultivo y provocan efectos tóxicos para prevenir la proliferación. Si el fenol no se elimina del medio de cultivo, provocará la muerte celular (Trejo-Tapia *et al.*, 2007).

La velocidad de crecimiento ( $\mu = 0.2938 \text{ d}^{-1}$ ) y el tiempo de duplicación (2.35 días) obtenidos durante la cinética coinciden con otros cultivos de células en suspensión en los cuales los valores de  $\mu$  oscila entre 0.15 y  $0.63 \text{ d}^{-1}$  (Arias, 2014). Se ha reportado que para *Daucus carota*, los valores velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) oscilan entre 0.074 - 0.259 y un tiempo de duplicación de 2.676- 9.33 (Anchinal *et al.*, 2008; Carreño-Campos, 2019) lo anterior se debe a que dichos valores dependen del tamaño del inóculo y las condiciones del medio de cultivo.

#### **10.4 Consumo de azúcares de células en suspensión de la línea SMC-1 de *Daucus carota* en matraz**

El consumo de carbohidratos en el cultivo de células en suspensión de la línea SMC-1 estuvo asociada al incremento en la biomasa celular. La sacarosa se hidrolizó completamente al día 15, esta degradación enzimática se observó de forma temprana durante el cultivo y se correlaciona con un incremento en la concentración de los monosacáridos, glucosa y fructosa. El patrón en el consumo de glucosa y fructosa fue similar, el cultivo consumió preferencialmente glucosa, este patrón se presenta generalmente en el cultivo de células en suspensión (Caspeta, 2004; Pérez -Aguilar, 2019).

#### **10.5 Comportamiento del pH**

El cambio de pH del medio de cultivo en matraz puede estar relacionado con la absorción y utilización de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo por las células. La disminución inicial puede deberse a la absorción de amoníaco (Bonga y Ardekas, 1992; Fett-Neto *et al.*, 1994), y la tendencia de alcalinización posterior puede estar relacionada con la absorción y reducción de nitrato (debido a la formación de OH equivalentes). Las células

parecen depender principalmente del nitrato (la forma más abundante de nitrógeno en el medio) como fuente de nitrógeno durante todo el proceso de crecimiento (Hahlbrock & Kuhlen, 1972). La etapa inicial de rápida absorción de nitratos es importante para apoyar la síntesis de proteínas y promover el crecimiento de células.

### **10.6 Viabilidad y agregados celulares**

Durante las fases lag y exponencial de la curva de crecimiento de las suspensiones celulares en matraz agitado, se observó la presencia de células fluorescentes vivas, debido a su actividad enzimática interna (esterasas citoplasmáticas) que puede hidrolizar el diacetato de fluoresceína (DAF) para producir fluoresceína (Maestú *et al.*, 2008). En cuanto al análisis morfológico se determinó que las células en suspensión de *Daucus carota* tienden a formar agregados pequeños de 10 a 20 células al inicio del cultivo, también fue posible visualizar células individuales en suspensión, sin embargo, conforme avanzan los días los agregados comienzan a ser más grandes.

Las características celulares presentes en el cultivo de la línea SMC-1, como la formación de microagregados y morfología esférica coinciden con lo reportado en otros cultivos de células vegetales como *Papaver somniferum* (Curtis y Emery, 1993), *Oryza sativa* y *Trichosanthes kirilowii* (McDonald *et al.*, 2001) *Uncaria tomentosa* (Trejo-Tapia *et al.*, 2005), *Solanum tuberosum* (Granger L., 2016).

La formación de agregados celulares es característica de las células vegetales en suspensión; esto es regulado por la cohesividad de la pared celular que permite la comunicación célula-célula y a su vez puede favorecer el transporte de intermediarios necesario para la biosíntesis de metabolitos secundarios y de proteínas de interés (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007 Mustafa *et al.*, 2011).

## 10.7 Producción de proteína VP2

Los niveles estimados de proteína VP2 reportados en este estudio fueron similares a los niveles alcanzados en cuanto a proteínas de poliovirus expresados en plantas de tabaco y lechuga. En células indiferenciadas (callo) de *Daucus carota* se obtuvo un rendimiento de 1.24- 11.24  $\mu\text{g vp2/g}$  peso fresco.

Durante la cinética de crecimiento de la línea SMC-1 se observó que al día 12 donde se obtuvo el valor máximo biomasa 16.07gPS la expresión de VP2 generó una absorbancia de 0.538; sin embargo, hubo un aumento densidad óptica día 21 de cultivo (D.O 0.773) valor observado aun en la fase estacionaria, lo cual representa un incremento de 1.72 veces respecto al día 0 (D.O 0.448). Otros autores han reportado que en la fase estacionaria la producción de metabolitos primarios y secundarios se mantiene constante al final de esta fase debido a que las células crecen utilizando sus propias reservas (Hussain *et al.*,2012).

En términos generales, los niveles de expresión de proteínas recombinantes dependen de diversos factores, como el tipo de promotor utilizado en el vector de transformación, el sitio y número de veces en el que se inserta la secuencia foránea en el genoma del hospedero, las condiciones de cultivo, entre otros (Huang *et al.*,2009). Los resultados del ensayo ELISA indirecta confirmaron que bajo las condiciones en las que se realizó este estudio, las células no pierden la capacidad de expresión de la proteína VP2.

Diversos estudios han demostrado la eficacia de la expresión de VPs en plantas para la producción de vacunas contra poliovirus, donde se reportó que los niveles de expresión de proteína VP1 alcanzaron hasta 2600 $\mu\text{g/g}$  de peso seco cuando se utilizó la secuencia optimizada, mientras que la proteína VP1 nativa produjo un rendimiento de hasta 54  $\mu\text{g/g}$  de peso seco. La expresión de la secuencia optimizada de VP1 en lechuga produce un rendimiento de 9 a 15 veces mayor que la expresión de la proteína nativa (Chan *et al.*, 2016; Daniell, 2019). En ambos estudios, confirmaron que el rendimiento obtenido es debido a que la expresión de VP1 se realizó en cloroplastos de tabaco y lechuga, es decir, que el alto número de copias del plasmoma y cloroplastos por célula además de la ausencia de eventos de silenciamiento de genes favorecen la producción elevada de VP1.

Bolaños-Martinez *et al.*, (2020) ha reportado que los niveles de acumulación de proteínas VPs son: 0.3  $\mu\text{g VP1/g}$ , 6.16-16.85  $\mu\text{g VP2/g}$ , 2.74-4.33  $\mu\text{g VP3/g}$  y 0.96-6  $\mu\text{g}$

VP4/g de tejido fresco de hoja de *N. tabacum*. Plantea la capacidad que poseen las VPs para inducir inmunogenicidad en ratones, posterior a la administración por vía subcutánea (SC) seguida de refuerzos orales sin la adición de adyuvantes, generando respuesta inmune humoral significativa en ratones BALB/c. Así mismo reporta que la respuesta inmune sistémica en ratones inmunizados se caracterizó por el aumento de anticuerpos IgG después de boosters orales.

## 11. CONCLUSIONES

- Se estableció y optimizó por primera vez las condiciones del medio de cultivo para el crecimiento de callos de las líneas CM-WT y CMC-1 de *Daucus carota* para la producción de la proteína VP2 del poliovirus.
- Se confirmó la producción de la proteína VP2 por técnicas de inmunodetección, de las líneas de *Daucus carota* establecidas en callos y suspensiones CMC-1 y SMC-1.
- Se caracterizó cinéticamente el crecimiento celular de cultivos en suspensión de *Daucus carota* a nivel de matraz agitado de 250 ml de la línea SMC-1.

## 12. PERSPECTIVAS

Con este trabajo se ha generado conocimiento operacional para la producción de la proteína VP2 en células de suspensión a nivel matraz, sin embargo, es necesario realizar las siguientes propuestas:

- Realizar réplicas de la cinética en matraz de 250 ml de *Daucus carota* para la producción de VP2 y para corroborar los datos obtenidos.
- Una vez optimizando las condiciones de crecimiento del cultivo se recomienda el escalamiento a biorreactor.
- Evaluar la inmunogenicidad de los cultivos de células en suspensión de la línea transformada SMC-1 de *Daucus carota*.

### 13. REFERENCIAS

1. Arellano Y, García E, y Vázquez J. (2008). Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia*, 42(6), 637-644.
2. Arias Echeverri, J. P. (2014). Optimización de parámetros de cultivo en suspensión de células de la especie vegetal *Thevetia peruviana* y su efecto en la producción de metabolitos secundarios (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Medellín).
3. Benítez-García, I, Venegas-Espinoza, P.E, Melendez-Martinez, A.J., Heredia., F. J., Paredes-Lopez O. y Del Villar-Martinez, A.A. (2014). Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Electronic Journal of Biotechnology*. DOI: 10.1016/j.ejbt.2014.01.004
4. Blondel B., Colbere-Garapin F., Couderc T., Wirotius A., Guivel-Benhassine F. (2005) Poliovirus, Pathogenesis of Poliomyelitis, and Apoptosis. In: Griffin D.E. (eds) *Role of Apoptosis in Infection*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 289.
5. Bodián, D., Morgan IM., Howe HA (1949). Differentiations of types of poliomyelitis viruses: III. The grouping of fourteen strains into three basic immunological types. *Am J Hyg.* 49(2): 234-245
6. Bolaños-Martinez O. C., Govea-Alonso D., Cervantes-Torres J. Hernández M., Fragoso G., Sciutto-Conde E., Rosales-Mendoza S.(2020). Expression of immunogenic poliovirus Sabin type 1 VP proteins in transgenic tobacco, *Journal of Biotechnology*, Volume 322,10-20, ISSN 0168-1656. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.07.007>.
7. Bonga J.M., y Ardekas V.P. (1992). *In vitro* culture of trees. *Forestry sciences*, vol. 38. Kluwer Academic, Dordrecht.
8. Bouchard, MJ., Lam DH., Racaniello VR., (1973). History of sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *Journal of Biotechnology*. 1 (2): 115-118.
9. Breithaupt D.E & Bamedi, A. (2002). Carotenoid esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) new insights into an ancient vegetable. *Journal Agric Food Chem* 50(24):7175-81

10. Brodzik, R., Spitsin, S., Pogrebnyak, N., Tzinslerling, V., & Yakovlev, A. (2009). Generation of plant-derived recombinant DTP subunit vaccine. *Vaccine*, 3730–3734.
11. Carreño - Campos C. (2019). Producción a nivel de matraz y reactor *air-lift* de células de *Daucus carota* que expresan una vacuna experimental contra la enfermedad de Parkinson (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
12. Caspeta G.L. (2004). Escalamiento de raíces transformadas de la especie *Galphimia glauca* en un biorreactor *air-lift* modificado (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
13. Chan Hui-Ting, Xiao Yuhong, Weldon William C., Oberste Steven M., Chumakov Konstantinand, Daniell Henry. (2016) Cold chain and virus-free chloroplast-made booster vaccine to confer immunity against different poliovirus serotypes *Plant Biotechnology Journal* 14, pp. 2190–2200.
14. Chow M, Newman JF, Filman D, Hogle JM, Rowlands DJ and Brown F., (1987). Myristylation of picornavirus capsid Protein VP4 and its structural significance. *Nature*. 327 (6122), 482-486
15. Deineko, E. V., Zagorskaya, A. A., Pozdnyakov, S. G., Filipenko, E. A., Permyakova, N. V., Sidorchuk, Y. V., (2009). Comparative analysis of HBV M-antigen production in leaves of individual transgenic carrot plants. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 425, 76–79.
16. Dong J. L., Liang B. G., Jin Y. S., Zhang W. J., Wang T. 2005. Oral immunization with pBsVP6- transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 339:153-163.
17. Edahiro JI, Ski M. (2006). Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*; 102(1):8-13.
18. Escobar A, Valdespino JL, Sepúlveda J. (1992). Historia de las vacunas y las vacunaciones. *Ciencia y salud*.
19. Fernández-Cruz Pérez E y Rodríguez-Sainz C. (2013). Inmunología de la poliomielitis: vacunas, problemas para la prevención/erradicación e intervenciones de futuro. *Rev Esp Salud Pública*, 87:443-454.

20. Fischer R, Twyman RM, Schillberg S. (2003). Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine*, 21:820-825.
21. Fujiyama K, Saejung W, Yanagihara I, Nakado J, Misaki R, Honda T, Watanabe Y, Seki T. (2006). In planta production of immunogenic poliovirus peptide using tobacco mosaic virus-based vector system. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 101:398-402.
22. Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 12, 473–478 <https://doi.org/10.1007/BF02796489>
23. George E.F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. En E. F. George M.A. Hall y De Klerk G. (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture.*, 3ed. *The Netherlands: Springer.*
24. Granger Serrano L. F. (2016). Evaluación del potencial del cultivo de células en suspensión de papa (*Solanum tuberosum* subsp. andígena) como plataforma de producción de proteínas recombinantes. (Tesis Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
25. Gómez Lim. M.A. (2001). Producción de vacunas y compuestos farmacéuticos en plantas transgénicas. *Avance y Perspectiva*, 20.
26. Govea-Alonso D., Tello-Olea M., Beltran-Lopez J., Monreal Escalante E., Salazar-Gonzalez, Buñuelos-Hernandez, Rosales-Mendoza S., (2017) Assessment of Carrot Callus as Biofactories of an Atherosclerosis Oral Vaccine Prototype. *Molecular of Biotechnology* 59:482–48
27. Hanchinal, V. M., Survase, S. A., Sawant, S. K., & Annapure, U. S. (2008). Response surface methodology in media optimization for production of  $\beta$ -carotene from *Daucus carota*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 123–132. doi:10.1007/s11240-008-9350-8
28. Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ., (1995). Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.
29. Hawken J., Troy S., (2012). Adjuvants and inactivated polio vaccine: A systematic review. *Vaccine*, Volume 30, Issue 49, Pages 6971-6979.
30. Holland, T., Sack, M., Rademacher, T., Schmale, K., Altmann, F., Stadlmann, J., Fischer, R. and Hellwig, S., (2010) Optimal nitrogen supply as a key to increased and

- sustained production of a monoclonal fullsize antibody in BY-2 suspension culture, *Biotechnology Bioeng.*, 107(2), pp. 278-289. DOI: 10.1002/bit.2280
31. Huang, T.-K. and McDonald, K.A. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures, *Biochem. Eng. J.*, 45(3), pp. 168-184. DOI: 10.1016/j.bej.2009.02.008.
  32. Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z. and Saeed, M., (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites, *J. Pharm. Bioallied Sci*, 4(1), pp. 10-20. DOI: 10.4103/0975-7406.92725
  33. Jiang X.L., He Z.M., Peng Z. Q., Qi Y., Chen Q., Yu S. Y.,(2007). Cholera toxin B Protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Res.* 16,169-175.
  34. Jiang, P., liu Y., Ma ch., Paul AV., Wimmer E. (2014). Morphogenesis. *microbiol mol biol rev* 78(3)
  35. Jurado, S. (2010). Estudio de la proteína F-box SKP2A de *Arabidopsis thaliana* en la división celular y en la respuesta a auxina. (Tesis Dr. Biol.). Universidad Complutense de Madrid.
  36. Kanabus J, Bressan R, Carrita N.C. (1986). Carbon assimilation in carrot cells in liquid culture. *Plant Physiol.*, 82: 362-368.
  37. Kim Tg, Mi-Young K, Bang-Geul K, Tae-Jin K, Young-Sook K, Jang Yong-Suk, Arntzen Cj; Yang Moon-Sik. (2007). Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Protein expression and purification*, 51: 22-27.
  38. Kalbina, I., Wallin, A., Lindh, I., Engström, P., Andersson, S., & Strid, K. (2011). A novel chimeric MOMP antigen expressed in *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, and *Daucus carota* as a potential *Chlamydia trachomatis* vaccine candidate. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 194–202.
  39. Kim, T-G. (2004). HIV-1 gp120 V3 cholera toxin B subunit fusion gene expression in transgenic potato. *Protein Expression and Purification*, 37, 196-202.
  40. Koya V., Moayeri M., Leppla S.H. y Daniell H. 2005. Plant- based vaccine: mice immunized with chloroplast- derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxine challenge. *Infect. Immun.*73, 8266-8274.

41. Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JM, Brooks CA, Barker DK, Turner DD. (2002). Delivery of subunit vaccine in maize seed. *Journal Control Rel*, 85:169-180.
42. Li J.T., Fei L., Mou Z., Wei J., Tang Y., He H., Wang L., Wu Y., (2006). Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology* 356, 171-178.
43. Lindh, I., Wallin, A., Kalbina, I., Sa'venstrand, H., Engstro'm, P., Andersson, S., & Strid, A. (2009). Production of the p24 capsid protein from HIV-1 subtype C in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* using an endoplasmic reticulum-directing SEKDEL sequence in protein expression constructs. 46-54.
44. Luchakivskaia, Iu. S., Olevinskaia, Z. M., Kishchenko, E. M., Spivak, N. Ia., & Kuchuk, N. V. (2012). Obtaining of hairy-root, callus and suspension carrot culture (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b. *i genetika*, 46(1), 18–26. 40
45. Maroto, J. (1995) Horticultura Herbacea Especial. 4ta Edición. Ediciones Mundi Prensa. Impreso por Grafo, S.A. Bilbao. Madrid, España. pp. 45-54
46. Marquet-Blouin, E., Bouche, F. B., Steinmetz, A., & Muller, C. P. (2003). Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Molecular Biology*, 51(4), 459–469. Food and Agriculture Organization
47. Mech-Nowak. A., Swiderski A, Krucze, M, Luczac, L &Kostecka-Gugala, A (2012). content of carotenoids in roots of seventeen cultivars of *Daucus carota* L. *Acta Biochimica Polonica* 59(1).
48. Minor P., (2009). Vaccine-derived poliovirus (VDPV): Impact on poliomyelitis eradication. *Vaccine*, Volume 27, Issue 20, 2649-2652,
49. Moreno, M., Amat, J., & Cruz, S. (2005). Reacciones adversas producidas por vacunas infantiles. *Alergol Inmunol Clin*, 20:51-63.
50. Mueller S, Wimmer E, Cello J., (2005) Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res.* 111: 175-193.
51. Nathanson, B., (2008). The pathogenesis of poliomyelitis: what we don't know. *adv Virus res.*71:1-50

52. Ohka S, Yang WX, Terada E, Iwasaki K, Nomot A. (1998). Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the first transport system. *Virology* 250 (1): 67-75.
53. Pelet, F., Hildebrandt, A., Riker, A., & Skoog, F. (1960). Growth *In vitro* of Tissues Isolated from Normal Stems and Insect Galls. *American Journal of Botany*, 47(3), 186-195. doi:10.2307/2439248
54. Pinto, B. y Fonseca, J. (2009). Guía técnica para la producción del cultivo de zanahoria. La Habana, Cuba. Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales.
55. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R. y Koprowski H., (2005). Severe acute respiratory syndrome (SARS) S Protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9062-9067
56. Rhoades RE, T.-G. J. (2011). Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*, 288-305.
57. Rosales-Mendoza, S. S.-G.-R.-F.-S. (2008). Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Reports*, 79-84.
58. Rosales-Mendoza, S., Soria-Guerra, R. E., Moreno-Fierros, L., Han, Y., Alpuche-Solís, A. G., & Korban, S. S. (2011). Transgenic carrot tap roots expressing an immunogenic F1-V fusion protein from *Yersinia pestis* are immunogenic in mice. *Journal of Plant Physiology*, 168(2), 174–180.
59. Sabin AB and Boulger, LR. (1973). History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J biol stand.*1(2): 115-118.
60. Salk, JE., Youngner JS., Lewis LJ., Bennett BL. (1951). Immunologic classification of poliomyelitis viruses. IV. Results of typing by neutralization of prototype viruses with antiserum produced by vaccinating monkeys with unknown strain and an adjuvant *Am J Hyg* 54(2): 255-267
61. Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G. (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal*, 5(5), 579–590.

62. Schlatmann J, Hoopen H, eijnen J. (1996). Plant cell culture secondary metabolism: toward industrial application. New Cork: CRS Press, 11-52.
63. Shiram V, V Kumar y M Shitole. (2008). Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora L.*, an important medicinal plant. *In vitro Cell Dev Biol-Plant.*, 44:186 DOI: 10.1007/s11627-008-9108-3.
64. Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol*, 18: 333–338.
65. Stöger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J. (2000). Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol*, 42: 583–590.
66. Thom E.R, Dorofaeff F. D. & Dyson C. B. (1981). Effect of plant population and time of harvest on yield and quality of maize (*Zea mays L.*) grown for silage, New Zealand *Journal of Agricultural Research*, 24:3-4, 285-292.
67. Trejo-Tapia, G., Cerda-García-Rojas, C. M., Rodríguez-Monroy, M., & Ramos-Valdivia, A. C. (2005). Monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* (Willd) DC cell suspension cultures in a stirred tank bioreactor. *Biotechnology progress*, 21(3), 786-792.
68. Trejo-Tapia, Rodríguez-Monroy. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in-vitro*. *Interciencia*, 32(10):669-674.
69. Uvarova, E. A., Belavin, P. A., Permyakova, N. V., Zagorskaya, A. A, Nosareva, O. V., Kakimzhanova, A. A., & Deineko, E. V. (2013). Oral immunogenicity of plant-made *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10. *Biomed Research International*, 316304.
70. Valadez, A. (1993). Producción de hortalizas. Noriega Editores. 3era reimpresión. Limusa S.A. de C.V. México. pp. 109-116.
71. Valdés R, Gómez L, Padilla S, Brito J, Reyes B, Álvarez T. (2003). Large purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 308:94-100.
72. Van der Linder, L., Wolthers KC., Van Kupperveld FJ., (2015). Replication and inhibitors of enteroviruses and parechoviruses. *Viruses*. 7(8):4529-4562

73. Vigliola, M. (1991). Manual de horticultura, Buenos Aires. Ed. hemisferio sur, Buenos Aires, Argentina
74. Wang Y, Wang W, Li N. (2002). Activation of antigen presenting cells by immunostimulatory plant DNA: a natural resource for potential adjuvant. *Vaccine* 20(21-22): 2764-2771.
75. Wimmer, E., Hellen, C.U., Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet.* 27:353-436.
76. Webster DE, Thomas MC, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL. (2002). Strugnell Appetising solutions: an edible vaccine for measles. *Med.J*, 176: 434-437.
77. World Health Organization (2019). Poliomyelitis. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>.
78. World Health Organization. (2020). Poliomyelitis.
79. Yeoman, M.M. and Macleod, A.J. (1977). Tissue (Callus) Culture Technique. In: Street, H.E., Ed., *Plant Tissue and Cell Culture*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 31-59.
80. Zabala, M.A., Angarita, M., Restrepo, J.M., Caicedo, L.A. and Perea, M. (2009). Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*, *Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 46(3), pp. 233-238. DOI: 10.1007/s11627-009-9249-z
81. Zhang, H., Liu, M., Li, Y., He, H., Yang, G., & Zheng, C. (2010). Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot derived vaccine candidate expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. *Protein Expression and Purification*, 69(2), 127–131.
82. Zhang X., Buehner N. A., Hutson A. M., Estes M. K., Mason H. S. (2006). Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid Protein. *Plant Biotechnol. J.* 4, 419-432.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 20 de mayo del 2021.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Sergio Rosales Mendoza (codirector de tesis CICSaB, UASLP)

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (CEIB, UAEM)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (CEIB, UAEM)

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde (IIBO, UNAM)

Tesis: **“Establecimiento de cultivos en suspensión de *Daucus carota* para el desarrollo de vacunas contra poliovirus”**

Alumno que lo presenta a revisión: **Mónica Morales Aguilar**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

### APROBADO

ATENTAMENTE

---

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2021-05-28 22:18:06 | Firmante**

CmQOHC05ojm9vIZAdvPcsQPQFlhk+ci8BjONnRiBHOSq3kHVshpEr8/aPeXFnxVQ6fK44qfGf3EE3ddAbpmBXkZineXJ/HPrnsM4djSdlZFM1rpUVyrTcbmMnW6FyclSbj7kaXdJkEvvuvVM+auFn++X+rag+mIfEy4gbZ7c0Wdb52/jKBEWqgA8zsHCRAKvduF27WhZAdYjC3FGjU98TiyZrSKSmX6OFMEGnyMcEpGh1sed309veZXn9kTYprbGNuujybOgLQ0dFE Sqbi4N5wDazRbOpXWpK8AGDydg6o3bZIB44a6cFq8EtyuSsZdamcp25ToHiP0XSDp3cD4vA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[tzlk12](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SEPjwL6nN7wrrjtNDThS5HbCYhoA7HXQ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 20 de mayo del 2021.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Sergio Rosales Mendoza (codirector de tesis CICSaB, UASLP)

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (CEIB, UAEM)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (CEIB, UAEM)

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde (IIBO, UNAM)

Tesis: **“Establecimiento de cultivos en suspensión de *Daucus carota* para el desarrollo de vacunas contra poliovirus”**

Alumno que lo presenta a revisión: **Mónica Morales Aguilar**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

---

DR. SERGIO ROSALES MENDOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**SERGIO ROSALES MENDOZA** | Fecha:2021-06-24 10:34:45 | Firmante

XIZ785oVM4fvioriydFAZonq85gy7O0BjnHguo+wYD5s2jxi61A/pN7vbN28v40ydzAcris9EzEC0FOw0v7SFuyJu1N93JNZ9esLqD6aTd4+PG7+9EAeakNI6aW3cAYTXX1XJ4YxUICp1mfmB3V8g032V+SvukQCfHRlrW1leoZ3GitLRrRm+KcKyLWZnC1scAR/NCggdWBqo+YiRISay6KppPbVi6EyiW53PXZHL9ISqnCHDIeduDvaeV5t5jK297Zy9mRtlanv54s1TqK4BQW30HQw+YIQkuB9ZY4FrNYipeKhqUxOyUdFk3jUthzjERUTWhs9cL2h9+dtE8Xog==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[UAakWS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HeOhoei7jYIQPkWX5eqZopFaYGPuBzkA>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 20 de mayo del 2021.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Sergio Rosales Mendoza (codirector de tesis CICSaB, UASLP)

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (CEIB, UAEM)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (CEIB, UAEM)

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde (IIBO, UNAM)

Tesis: **“Establecimiento de cultivos en suspensión de *Daucus carota* para el desarrollo de vacunas contra poliovirus”**

Alumno que lo presenta a revisión: **Mónica Morales Aguilar**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

\_\_\_\_\_  
DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2021-05-30 13:08:23 | Firmante**

SRECbOGmrfglyaMshuvsbXI9l/QFGjOgSrBF6kToGS4ruKlfCcapZtLauuoG3MDFueluc0l9P41GCMdLkMhmFYQxfe6gGJctP9AHytTvW5ImNCM4o1aDKOEztg93aLhh+d9EYa72myiDdZB5nLs3K2kIP1BWWHnS35WsfncTem1lVmYkzMLsrei+yYi3RgRD24fIPxC95fGqa6/J4hiLPEMRcs5lWkOjNKe1vj2OcTItlG3TleTIntRetwJNSAkJAryQ210y2YZ6oRIEfrCJA+eL5imB6XbhzJlsVl8ErDvEjizW2XGQ+IGbtzMxoMN4uJGblhO1Lru9AMUVPg8bQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[fDzliN](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TzcOpMJ6mzMOz2zHtRppkGvcHPya53wo>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 20 de mayo del 2021.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Sergio Rosales Mendoza (codirector de tesis CICSaB, UASLP)

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (CEIB, UAEM)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (CEIB, UAEM)

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde (IIBO, UNAM)

Tesis: **“Establecimiento de cultivos en suspensión de *Daucus carota* para el desarrollo de vacunas contra poliovirus”**

Alumno que lo presenta a revisión: **Mónica Morales Aguilar**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2021-06-23 21:05:25 | Firmante

QLOVd+2XwNjXDvBMGumlevttLBfkW4YfkVbQvaJLGQdtHC2QsH2vRfjA6IEp4kLQ5t1ZKReF2bD9gvDnCMbKy1b6l/NqcgwNar6iXk61e+kzTef4Qp1UvO5ShdUDqb2RkbVtgIY  
C9Knbm8XrUbACPzI3BDjCQpqsZZEmhzPpDDIXF8E231DgW RcrkRo6XaFMLWTd8znhM8jySQOAB8bZR0v+helIKFltqy5ga+bkybrmFamYETjsSnG3kHsp4CqG/dkokPx79oHS  
fWJdGvZn5BJ+itwQcQvpFI4KnCl/xUp6gw05myW +bfLbJ1S6UXZb4LUlotHnKkmCiVS23zvQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



GBN3M5

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zmNPNj99Z1XyBclS2LIVACwHQ3rEKOg>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 20 de mayo del 2021.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Sergio Rosales Mendoza (codirector de tesis CICSaB, UASLP)

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (CEIB, UAEM)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (CEIB, UAEM)

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde (IIBO, UNAM)

Tesis: **“Establecimiento de cultivos en suspensión de *Daucus carota* para el desarrollo de vacunas contra poliovirus”**

Alumno que lo presenta a revisión: **Mónica Morales Aguilar**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

### APROBADO

ATENTAMENTE

---

DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE** | Fecha:2021-06-24 11:52:34 | Firmante

ddxeJBIOPe0AZhI9GtukXRw2oBiJA9wLaKHBDyMxowJ9JlMr9vcaGL+74hL63j7ppO4M5KoGOYBEL56p8wKGY5I4dOEhriLRgCRO60ojQB2Jss0YUNHj1azJyqiE4UHK8W17k4tJpWwdkcoqBX83CYtVbCPW/WNUJSqzSYg6X69nxobrEK4t1zQrl+Cj1MV/xgvK1RCgpszktjPAdA8EICpRNs410mP3qMsRpS3hHc6IF0Q5dO82GmCeL72VGERVsLKA3nRbTSKbQiKFMvsxT0tD1YeVeDFBpLc0uGH+alkmmEK0D9yw+v0deFkobJjsWEZCSHNDk02bA2j5xLFI0G0Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



f4eoU7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mO3PjSGIWxnQ4hQcPEQ0THDqcQ8oqLzQ>

