
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Producción de huperzina A a partir
de cultivo en suspensión de
células de *Huperzia orizabae* y su
escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

BIOL. ROCÍO DEL CARMEN PÉREZ AGUILAR

Tutor: DR. ALEXANDRE T. CARDOSO TAKETA

Co-tutor: DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA



El presente proyecto de tesis se elaboró bajo la tutoría del Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa y co-tutoría de la Dra. Anabel Ortiz Caltempa. En el laboratorio de biotecnología de plantas medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo de beca recibido N° 822466.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Luisa Villareal Ortega:

Por aceptarme en su grupo de trabajo y por sus valiosas aportaciones en este proyecto.

Al Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa:

Por su asesoría, por confiar en mí, por su tiempo empleado en este proyecto. Pero sobre todo por los conocimientos y las enseñanzas compartidas.

A la Dra. Anabel Ortiz Caltempa:

Por su asesoría en el cultivo in vitro, por su tiempo y por sus valiosas aportaciones.

Al comité sinodal:

Dra. Gabriela Trejo Tapía

Dra. Verónica Rodríguez López

A la M. en B. Olga Lidia Cruz Miranda:

Por su guía y apoyo en la realización de este proyecto. Sobre todo, en los ensayos in vitro de inhibición de la AChE.

A la M. I. Ariadna Zenil Rodríguez:

Por guía y apoyo en el uso del HPLC

A mis compañeros de laboratorio y amigo, especialmente a:

Dr. Marco Antonio Juárez Verdayes

M. en B. Yitzel Gama Martínez

M. en B. Jose Luis Lopez Angeles

M. en B. Angelica Lucía Martínez Aguilar

M. en B. Eleazar León Álvarez

Por su apoyo, por su tiempo, por los conocimientos compartidos. Pero sobre todo creer mí, los quiero infinitamente.

DEDICATORIA

A mis padres:

María del Carmen Aguilar Cruz y José María Pérez y Pérez

Por todo su apoyo y amor, esto es por y para ustedes. Los amo

A mis hermanos y sobrinos, especialmente a:

Car y Susí

Por ser mi fuerza y mi apoyo, las amo

A mis dos ahijadas:

Nayla Victoria e Itzel Aurora

*Mis niñas aún son muy pequeñitas, pero espero que algún día
lleguen más lejos que esto, espero ser un buen ejemplo para ustedes.*

A Yitzel:

*Por tu cariño, tu tiempo, tu apoyo y compañía. Pero sobre todo
porque nadie más que tu sabe el esfuerzo que he puesto, y sobretodo
el amor y la satisfacción que me ha dejado*

*"La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que
una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se
corrige a sí misma, esta siempre evolucionando y se puede aplicar a
todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible".*

Carl Sagan

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.- Demencia	3
2.2.- Enfermedad de Alzheimer	3
2.2.1.- Características	3
2.2.2.- Patología de la EA	4
2.2.3.- Etiología - Factores de riesgo	4
2.2.4.- Tratamiento	5
2.2.5.- Fármacos y productos naturales inhibidores de la AChE utilizados para el tratamiento del Alzheimer	6
2.3.- Huperzina A	7
2.3.1.- Familia Huperziaceae	8
2.3.2.- Huperzia orizabae	9
2.4.- Aspectos biotecnológicos para la producción de metabolitos secundarios	10
2.4.1.- Cultivo <i>in vitro</i> de callos	11
2.4.3.- Escalamiento de cultivos de células en suspensión a biorreactor <i>airlift</i>	13
3.- ANTECEDENTES DIRECTOS	16
4.- JUSTIFICACIÓN	18
5.- HIPÓTESIS	19
6.- OBJETIVOS	19
6.1.- Objetivo General:	19
6.1.2 Objetivos Particulares:	19
7.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
8.- METODOLOGIA	21
8.1.- Obtención del material vegetal	21
8.2.- Preparación del medio de cultivo	21
8.3.- Cultivo de callos	22
8.4.- Establecimiento de cultivo en suspensiones celulares	22
8.5.- Cinética en matraces de 250 mL	23
8.6.- Parámetros cinéticos para la evaluación del crecimiento y cuantificación de HupA en el cultivo de células en suspensión de <i>H. orizabae</i>	23
8.6.1.- Obtención de peso fresco	23

8.6.2.- Obtención de peso seco	23
8.6.3.- Viabilidad celular	24
8.6.4.- Determinación de pH al medio	24
8.6.5.- Cuantificación del consumo de azúcares en el medio de cultivo.....	25
8.7.- Fitoquímica de los extractos alcaloideos	26
8.7.1.- Extracción de alcaloides	26
8.7.2.- Cromatografía en capa fina	27
8.7.3.- Cuantificación de Huperzina A mediante cromatografía líquida de alta eficiencia	28
8.14.- Escalamiento del cultivo de la línea de células en suspensión Hup21 a biorreactor <i>airlift</i> de 2L.....	29
8.15.- Determinación de la actividad inhibitoria de la AChE	30
XI. – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
9.1.- Curva de calibración para la cuantificación de HupA.....	31
9.2. - Determinación de la producción de HupA en callos por CLAE ¡Error! Marcador no definido.	
9.3. – Establecimiento del cultivo de células en suspensión	31
9.4.- Cinética del cultivo Hup21 en matraces de 250 mL.....	33
9.4.1.- Estudio cinético de crecimiento	33
9.4.2.- Estudio cinético de viabilidad celular.....	35
9.4.3.- Estudio cinético del pH en el medio de cultivo	37
9.4.4.- Estudio cinético del consumo de azúcares en el medio de cultivo.....	38
9.4.5.- Estudio cinético de la producción de HupA.....	40
9.5.- Escalamiento del cultivo Hup21 a biorreactor <i>airlift</i> de 2L	42
9.5.1.- Estudio cinético del crecimiento	42
9.5.2.- Estudio cinético de viabilidad celular.....	44
9.5.3.- Registro de pH en el medio de cultivo	46
9.5.4.- Estudio cinético del consumo de azúcares en el medio de cultivo.....	46
9.5.5.- Estudio cinético de la producción de HupA.....	47
9.6.- Resultados anexos.....	49
9.6.1.- Determinación de HupA por cromatografía en capa fina	50
9.6.2.- Actividad inhibitoria de la AChE <i>in vitro</i>	50
X. - CONCLUSIONES.....	54
11. PERSPECTIVAS	56

12. - BIBLIOGRAFIA 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de Huperzina A.....	8
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Huperzia orizabae</i>	9
Figura 3. Biorreactor airlift de 2L.....	15
Figura 4. Establecimiento de callos (B) a partir de frondes axénicos de <i>Huperzia orizabae</i> (A). Figura 4-A, tomada por Cruz-Miranda 2019.....	17
Figura 5. Callos de <i>Huperzia orizabae</i>	21
Figura 6. Matraces con baffles laterales para el establecimiento de células en suspensión. Matraces con medio B5.....	22
Figura 7. Perfil cromatográfico de HupA (cromatograma inferior) (inyección de 10 µL de una solución a 1 µg/mL) y del extracto alcaloideo del cultivo de callos en medio semi-sólido (cromatograma superior) (inyección de 10 µL de una solución a 4.2 µg/mL). Fase móvil H ₂ O/TFA (0.0125 %):CH ₃ CN, (85:15), C-18, flujo de 1 mL/min, a 235 y 310 nm.....	31
Figura 8. Establecimiento del cultivo células en suspensión. A) Callos de <i>H. orizabae</i> , B) Callos inoculados en matraces con tres baffles laterales, C) Cultivo de células en suspensión Hup21 (30 días).....	32
Figura 9. Perfil cromatográfico de HupA (rosa) (inyección de 10 µL de una solución a 1 µg/mL) y del extracto alcaloideo del cultivo Hup21(Azul) (inyección de 10 µL de una solución a 3.2 µg/mL). Fase móvil H ₂ O:CH ₃ CN (85:15), C-18, flujo de 1 mL/min, a 235 y 310 nm.....	32
Figura 10. Viabilidad celular del cultivo Hup21 (Día 20). Microagregados celulares, en luz transmitida A, fluorescencia B (Objetivo 10X). Morfología esférica de las células, luz transmitida C, fluorescencia D (Objetivo 40X).	36
Figura 11. Escalamiento de cultivo Hup21 a biorreactor airlift de 2L. A) día 0, B) día 10, C) día 15, D) día 20.....	42
Figura 12. Viabilidad celular del cultivo Hup21 en su escalamiento a biorreactor airlift de 2L (Día 5). Microagregados celulares, en luz transmitida A, fluorescencia B (Objetivo 10X).....	45
Figura 13. Cromatografía en capa fina de extractos alcaloideos del cultivo Hup21. Carriles laterales (HupA-Rf=0.43), carriles centrales M1(Extracto de callos), M3(Extracto del cultivo Hup21), M4 (Extracto del cultivo Hup21 crecido en biorreactor). Fase CHCl ₃ :CH ₄ OH:H ₂ O en una proporción (120:20:2). Revelado con Yodo, sistema semiautomatizado CAMAG	50

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curvas de calibración de los azúcares; sacarosa A, fructosa B y glucosa C	26
Gráfica 2. Curva de calibración de HupA, $R^2=0.998$	29
Gráfica 3. Curvas de tiempo-concentración de la biomasa del cultivo Hup21 (cinética de 60 días). PF en verde y PS en amarillo	33
Gráfica 4. Crecimiento exponencial peso seco (PS) a lo largo de los 60 días del cultivo Hup21....	34
Gráfica 5. Ajuste de datos de PS de la fase exponencial del cultivo Hup21, μ y t_d	35
Gráfica 6. Curvas de tiempo- concentración de células y % de viabilidad celular del cultivo Hup2136	
Gráfica 7. Curvas de tiempo-concentración de células y pH del cultivo Hup21	38
Gráfica 9. Curvas de tiempo-concentración de células y rendimiento de HupA del cultivo Hup21 40	
Gráfica 10. Curvas de tiempo-concentración del cultivo Hup21 en biorreactor airlift de 2L. Cinética de 20 días, PF en verde y PS en amarillo.....	43
Gráfica 11. Crecimiento exponencial del peso seco (PS), del cultivo Hup21. Cinética de 20 días .	43
Gráfica 12. Ajuste de datos de PS de la fase exponencial del cultivo Hup21, μ y t_d	44
Gráfica 13. Curvas de tiempo- concentración de células y % de viabilidad celular del cultivo Hup21	45
Gráfica 14. Curvas de tiempo-concentración de células y pH del cultivo Hup21	46
Gráfica 15. Curvas de tiempo- concentración de células y consumo de azúcares del cultivo Hup21	46
Gráfica 16. Curvas de tiempo-concentración de células y rendimiento de HupA del cultivo Hup21	48
Gráfica 17. Actividad inhibitoria de la AChE, de extracto alcaloideo del cultivo Hup21	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer	5
Tabla 2. Fármacos utilizados en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer	7
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Huperzia orizabae</i>	9
Tabla 4. Reguladores del crecimiento vegetal y sus funciones	11
Tabla 5. Clasificación y tipo de biorreactores utilizados en el cultivo de células y tejidos vegetales	14
Tabla 6. Datos comparativos de la producción de HupA	17
Tabla 7. Especificaciones de la columna cromatográfica C18	28
Tabla 8. Condiciones de escalamiento en Biorreactor airlift de 2L	30
Tabla 9.	41
Tabla 10. Datos comparativos de la producción de HupA, en callos de <i>H. orizabae</i> y el cultivo 2155	

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

A β	Péptido β -amiloide
AC	Agua de coco
AChE	Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidores de la enzima Acetilcolinesterasa
ANA	Ácido 1-naftalenacético
APOE ϵ 4	Apolipoproteína E
B5	Medio de Gamborg
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CLAE-FR	Cromatografía líquida en fase reversa
DAF	Diacetato de fluoresceína
EA	Enfermedad de Alzheimer
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
g	Gramos
HupA	Huperzina A
h	Horas
L	Litros
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MS	Murashine y Skoog
nm	Nanometros
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONF	Ovillos neurofibrilares
PF	Peso fresco
PPA	Proteína precursora de amiloide
PSN1	Presenilina 1

PSN2	Presenilina 2
PS	Peso seco
PVP	Polivinil pirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
td	Tiempo de duplicación celular
tR	Tiempo de retención
μ	Velocidad específica de crecimiento (d-1)
μL	Microlitros
VVM	Volumen de aire por Volumen de medio por Minuto
X_{PS}	Concentración de biomasa en peso fresco (g PF L-1)
X_{PF}	Concentración de biomasa en peso seco (g PS L-1)
2, 4-D	Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético

RESUMEN

Uno de los enfoques más estudiados es la investigación de fármacos que sirven para el tratamiento de los síntomas, de la Enfermedad de Alzheimer (EA) se centra en utilizar inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. Huperzina A (HupA) es un alcaloide aislado principalmente del helecho *Huperzia serrata* que ha atraído gran atención por su eficacia y seguridad en el tratamiento de la EA, razón por la que se ha perturbado el nicho ecológico de la planta. En este sentido, se hace imperativo la búsqueda de otras especies de Huperzias que produzcan HupA, tal es el caso de *Huperzia orizabae*, un helecho endémico de México. Una alternativa para la producción de HupA es el uso de estrategias biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* vegetal, para la producción de metabolitos de interés de manera estable y controlada. En el presente trabajo se buscó el crecimiento estable de un cultivo de callos que fueron obtenidos de frondes del helecho *H. orizabae* y generados previamente en el grupo de trabajo para la producción de HupA. Se optimizó el cultivo de células en suspensión de la línea celular Hup21, la cual se creció en medio B5 completo, adicionado con los fitorreguladores Ácido naftalenacético y Zeatina, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 20 mL de agua de coco/l⁻¹ y 5 g de KNO₃/L⁻¹; en condiciones de luz constante a 25 μmol s⁻¹ m⁻² y en agitación a 100 rpm. Una vez establecido el cultivo se procedió a realizar cinéticas tipo lote, con una duración de 60 días en matraz de 250 ml, donde se obtuvo un crecimiento máximo de 8.2 g de peso seco por litro de medio (g PS/L⁻¹), una velocidad de crecimiento específica de (μ) 0.045 días⁻¹ y un tiempo de duplicación (td) de 15.40 días. Posteriormente, se escaló el cultivo a biorreactor *airlift* de 2L, en el cual se realizaron cinéticas de 20 días, obteniéndose un crecimiento máximo de 16.79 g PS/L⁻¹, una μ de 0.0619 días⁻¹ y un td de 11.20 días. El crecimiento de biomasa se incrementó un 200% en biorreactor.

El análisis y la cuantificación de HupA se realizó en los extractos alcaloideos del cultivo Hup21, en las cinéticas de matraz y biorreactor *airlift* mediante la utilización de las técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). La producción máxima de HupA en matraz fue de 2.03 μg/g PS al día 45, y de 2.45 μg/g PS al día 15 en biorreactor *airlift*. Sí bien la producción de HupA fue similar en ambos, el crecimiento de la biomasa fue tres veces más rápida en biorreactor.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de inhibición de la acetilcolinesterasa del extracto alcaloideo del cultivo Hup21. Se probó el extracto a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, dando como resultado una actividad anticolinesterasa del $85.6 \pm 1.27 \%$.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son de suma importancia, ya que el cultivo Hup21 representa el segundo estudio de un cultivo *in vitro* de células en suspensión proveniente de helechos generado a nivel mundial y el primero en ser escalado a biorreactor airlift de 2L. Además, los datos obtenidos en las cinéticas dan pauta a la realización de nuevos proyectos con estrategias de elicitación del cultivo, para mejorar el rendimiento de la biomasa y la producción de HupA, así como también para la elucidación y análisis de otros posibles alcaloides bioactivos presentes en los extractos del cultivo Hup21.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, *Huperzia orizabae*, Huperzina A, cultivo *in vitro*, extracto alcaloideo.

ABSTRACT

One of the most studied approaches is the investigation of drugs that serve to treat Alzheimer Disease (AD) symptoms is the search of acetylcholinesterase enzyme inhibitors. Huperzine A (HupA) is an alkaloid isolated mainly from the fern *Huperzia serrata* that has attracted great attention for its efficacy and safety in the treatment of AD. Its overexploitation is the reason why the ecological niche of the plant has been disturbed. In this way, it is imperative to search for other species of *Huperzia* that produce HupA, such is the case of *Huperzia orizabae*, a fern endemic of Mexico. Also, the establishment of biotechnological strategies, such as *in vitro* plant culture for the production of metabolites of interest in a stable and controlled manner, is an approach to be pursued.

In the present work the stable production of calluses culture were obtained from fronds of the fern *H. orizabae*, which was generated previously in our group of work. The cell culture in suspension of the Hup21 cell line was optimized, which was grown in complete B5 medium, added with the phytohormones naphthaleneacetic acid and zeatin, 20 g L⁻¹ of sucrose, 20 mL of coconut water/L⁻¹ and 5 g of KNO₃/L⁻¹, and under conditions of constant light at 25 μmol s⁻¹ m⁻² and agitation at 100 rpm. Once the culture was established, a batch-type culture was carried out, with a duration of 60 days in 250-mL Erlenmeyer flasks, where a maximum growth of 8.2 g of dry weight per liter of medium was obtained (g PS / L⁻¹), with a specific growth rate (μ) of 0.045 days⁻¹ and a duplication time (td) of 15.40 days. Subsequently, the culture was scaled up a 2L airlift bioreactor, in which 20 days kinetics were performed, obtaining a maximum growth of 16.79 g PS / L⁻¹, a μ of 0.0619 days⁻¹ and a td of 11.20 days. The maximum growth of biomass increased by 200% in bioreactor, thus increasing the μ and decreasing the td values.

The analysis and quantification of HupA was carried out in the alkaloid extracts of the Hup21 culture, in the kinetics of flask and airlift bioreactor using the techniques of thin layer chromatography (TLC) and high efficiency liquid chromatography (CLAE). The maximum production of HupA was 2.03 μg / g PS at day 45 in flasks, and 2.45 μg / g PS at day 15 in the airlift bioreactor. Although the production of HupA was similar in both, the biomass it grew three times faster in the bioreactor.

Additionally, acetylcholinesterase inhibition assays were performed to the alkaloid extract of the Hup21 culture. The extract was tested at a concentration of 100 µg/mL, resulting in an anticholinesterase activity of $85.6 \pm 1.27\%$.

The results obtained in the present work are of great importance, because the established Hup21 cell suspension line represents the second *in vitro* culture of cells suspension cultures generated from ferns worldwide, and it is the first to be scaled up into bioreactors. In addition, the data obtained in the kinetics will allow us to start new projects, such as the elicitation of the cells to improve the yield of biomass and production of HupA, as well as to start the elucidation and analysis of other possible bioactive alkaloids present in the extracts of the Hup21 culture.

Key words: Alzheimer's disease, *Huperzia orizabae*, Huperzina A, *in vitro* culture, alkaloid extract.

1.- INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales, definidas por la Organización Mundial de la Salud como “cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos”, han sido utilizadas ampliamente en la medicina tradicional de diversos países para fines curativos. Es más empleada en países en vías de desarrollo, donde se estima que el 80% de la población las usa para el cuidado de la salud (Farnsworth *et al.*, 1985), como es el caso de México, con un alcance del 90% de la población. De hecho, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial con respecto al número de plantas medicinales, con alrededor de 4500 ejemplares. Sin embargo, a pesar de la gran riqueza de plantas medicinales que tiene México, la validación química, farmacológica y biomédica se ha llevado a cabo en un 5% de estas especies, por lo que su estudio es un campo de investigación importante (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010).

Los metabolitos secundarios les confieren sus propiedades a las plantas medicinales. Éstos son compuestos de bajo peso molecular con propiedades biológicas beneficiosas para la planta, principalmente en su interacción con el ambiente, además de conferirles sus propiedades medicinales características (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Schäfer y Wink, 2009). Se clasifican en dos grandes grupos: nitrogenados y no nitrogenados. Dentro de los primeros se encuentran los alcaloides, que han sido ampliamente estudiados con fines terapéuticos y han dado origen a diversos fármacos; y en el segundo grupo están los terpenos, derivados fenólicos y cetogeninas (Barreiro, 2001). Dentro de las enfermedades que son tratadas con alcaloides se encuentra la enfermedad de Alzheimer (EA), que es un desorden neurodegenerativo, irreversible y progresivo, caracterizado por la pérdida de la memoria y daños en las funciones cognitivas, ambos relacionados con la mente neuronal (Berg *et al.*, 1993; Barinaga, 1995). Si bien actualmente aún no hay cura de esta enfermedad, existen fármacos que actúan como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChEI) y por lo tanto ayudan a disminuir los síntomas. Dentro de éstos se encuentran disponibles en el mercado el donepezil, rivastigmina y la galantamina, siendo esta última un producto natural. Sin embargo, estos compuestos tienen efectos secundarios en los pacientes, por lo que la investigación en la búsqueda de metabolitos más seguros y eficaces para el tratamiento de

esta enfermedad ha sido tema de estudio de muchos grupos de trabajo. Interesantemente, en la medicina tradicional china las plantas Lycopodiales han sido empleadas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central, y es precisamente por estos conocimientos que se empezó a estudiar los compuestos producidos por estas plantas. Sí bien se sabe que existen un gran número de metabolitos secundarios en estas especies de helechos, el más ampliamente estudiado es HupA, producido por individuos que pertenecen a la familia Huperziaceae y que fue aislado por primera vez de *Huperzia serrata* (Liu *et al.*, 1986). Su importancia radica en el hecho de que hasta ahora es uno de los inhibidores más selectivos y eficaces en la inhibición de la AChE, sólo por debajo de su homólogo semisintético ZT-1 (Ma *et al.*, 2007).

Debido a la importancia de HupA en el tratamiento de EA, ha existido una sobreexplotación de *H. serrata* de su hábitat natural, que la pone en peligro de extinción. Es por esto que en los últimos años se han estudiado plantas pertenecientes a la familia Huperziaceae que produzcan HupA, como son *Huperzia selago* y *Plegmariurus squarrosus* (Ma y Gang, 2008; Szypula *et al.*, 2013).

Cabe destacar que HupA es producida también por otras especies de la familia Huperziaceae, como lo es *Huperzia orizabae*, que se ha estudiado en nuestro grupo de trabajo. Debido a que el alcaloide HupA es un producto natural de las plantas del género *Huperzia* y que posee un alto valor farmacológico para tratar la EA, su investigación en el helecho mexicano *H. orizabae* es de gran relevancia. La síntesis química de HupA ya es conocida, pero no es viable económicamente. Sumado al hecho de que la planta se tarda 15 años para que pueda ser explotada agronómicamente, además de que presenta baja densidad poblacional y crecimiento en nichos ecológicos muy específicos, la presente propuesta buscó establecer una estrategia biotecnológica de cultivo *in vitro* de células en suspensión y su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L para la producción controlada y rentable de HupA.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Demencia

La demencia es un síndrome neurodegenerativo patológico, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, causado por una variedad de afecciones que afectan el cerebro y causan problemas de la memoria, el lenguaje, la comprensión y el juicio (Alzheimer's Society 2015). Estas afecciones incluyen la EA, la demencia vascular (DVa), la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), enfermedad de Parkinson (EP) y la demencia frontotemporal (DF) (Kindel *et al.*, 2017). Actualmente se estima que 50 millones de personas padecen demencia en todo el mundo y se prevé que alcance los 82 millones en 2030 y 152 millones en 2050 (OMS, 2019). De hecho, es considerada una prioridad de salud pública desde el año 2012, debido a su alta prevalencia e incidencia estimada (Demencia, OMS, 2013; Vilela *et al.*, 2017).

2.2.- Enfermedad de Alzheimer

La EA fue descubierta por primera vez en 1906 por Alois Alzheimer, un neuropatólogo y psiquiatra alemán. Es definida como un trastorno neurodegenerativo progresivo grave (Santos *et al.*, 2016), asociado a un deterioro mental (Bartus *et al.*, 1999). Es la forma más común de demencia, representa entre un 60% y un 70% de los casos (OMS, 2019). Se presenta con mayor frecuencia en personas de edad avanzada (Liskowsky y Schiebs, 2005), generalmente en mayores de 65 años (Konrath *et al.*, 2013). Se estima que alrededor de 30 a 35 millones de personas en el mundo padecen EA (OMS, 2019), cifra que incrementa a medida que la población mundial continúa envejeciendo (Ma y Gang, 2008). Actualmente se considera que la EA es la tercera causa de muerte en los países desarrollados, tan solo después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Jiang *et al.*, 2003; Ma y Gang, 2008).

2.2.1.- Características

La EA se caracteriza por un daño cognitivo, pérdida de la memoria (Santos *et al.*, 2016), deterioro del comportamiento, del rendimiento, del lenguaje, de las habilidades perceptivas y motoras, así como de la inestabilidad del estado de ánimo, esto ocurre porque las neuronas que se encuentran en partes del cerebro involucradas en la función cognitiva

han sido dañadas o destruidas (Alzheimer's Association, 2016). En etapas avanzadas, hay una falta de respuesta con la pérdida de movilidad y el control de las funciones corporales, lo que finalmente conduce a la muerte (Akram y Nawaz, 2017).

2.2.2.- Patología de la EA

Esta enfermedad se caracteriza histopatológicamente por la formación de placas seniles, que se originan por la deposición extracelular del péptido β -amiloide ($A\beta$) y la aparición de ovillos neurofibrilares (Selkoe, 1996), lo que con lleva a la pérdida de neuronas colinérgicas y, por tanto, cambios en la corteza cerebral, el hipocampo y otras áreas del cerebro esenciales para las funciones cognitivas (Wang *et al.*, 2006). Otra característica principal en la EA es la pérdida temprana y progresiva de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, produciéndose así reducciones en varios marcadores colinérgicos (Arendt *et al.*, 1983; Nordberg, 1992; Bierer *et al.*, 1995; Whitehouse *et al.*, 1981), dando como resultado alteraciones cognitivas observadas en las personas (Liskowsky y Schliebs, 2006).

2.2.3.- Etiología - Factores de riesgo

La edad es el principal factor de riesgo en la EA (Herbert *et al.*, 2013), presentándose con más frecuencia en personas mayores de 65 años, sin embargo, existen muchos otros factores de riesgo. De hecho, aunque en el 99% de los casos la EA es de inicio tardío o esporádico, en un 1 % o menos se presenta EA de inicio temprano, y de esto depende los factores de riesgo. Este tipo de EA involucra mutaciones en el gen para la proteína precursora de amiloide (PPA) y los genes para las proteínas presenilina 1 (PSN1) y presenilina 2 (PSN2). Aquellos que heredan una mutación en los genes APP o PSN 1 tienen la garantía de desarrollar EA. Aquellos que heredan una mutación en el gen de la PSN 2 tienen un 95% de probabilidades de desarrollar la enfermedad. Sin embargo, además de los factores anteriormente expuestos existen muchos otros factores que pueden ser más propensos para que una persona padezca la EA, **tabla 1**.

Enfermedad de Alzheimer	Factor	Cita
EA de inicio tardío (esporádico)	Edad avanzada	Hebert <i>et al.</i> , 2013
EA de inicio tardío y temprano	Antecedentes familiares	Green <i>et al.</i> , 2002
	Gen APOE ε4	Saunders <i>et al.</i> , 1993
Factores de riesgo genéticos (EA de inicio temprano)	Proteína PPA	Bekris <i>et al.</i> , 2010
	Gen Presinilina 1	Goldman <i>et al.</i> , 2011
	Gen Presinilina 2	Goldman <i>et al.</i> , 2011
Factores de riesgo modificables	Lesión cerebral traumática (LCB)	Smith <i>et al.</i> , 2013
	Enfermedad cardiovascular	Fitzpatrick, 2004
	Tabaquismo	Rusanen <i>et al.</i> , 2011
	Obesidad	Loef y Walach, 2013
	Diabetes	Gudala <i>et al.</i> , 2013
	Educación	Sando <i>et al.</i> , 2008

Tabla 1. Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer

2.2.4.- Tratamiento

Actualmente no hay cura para la enfermedad de Alzheimer, pero si existen tratamientos que ayudan a controlarla, los cuales consisten en mejorar el deterioro cognitivo y aliviar los síntomas, para mejorar las actividades de la vida diaria de las personas que la padecen (Ha *et al.*, 2011).

Los medicamentos recetados actualmente para el tratamiento de la EA se clasifican en tres grupos: Inhibidores de la acetilcolinesterasa; un antagonista de un receptor para el neurotransmisor glutamato, el *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y medicamentos para controlar la depresión y anomalías del comportamiento (Mucke, 2009).

2.2.5.- Fármacos y productos naturales inhibidores de la AChE utilizados para el tratamiento del Alzheimer

Los síntomas de la EA son causados principalmente por la disfunción colinérgica. Lo anterior es conocido como hipótesis colinérgica, y se trata con inhibidores de la AChE. Entre estos fármacos se encuentran la tacrina, donepezil, rivastigmina y galantamina que han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), todos ellos inhibidores de la AChE (Ma y Gang, 2008). La galantamina, a diferencia de los otros tres AChEI, es un alcaloide natural de la planta *Galanthus nivalis L.* y de plantas relacionadas a la familia Amaryllidaceae (Heinrich y Teoh, 2004), **tabla 2**. Si bien estos fármacos ayudan a disminuir los síntomas de EA, existe la problemática de que causan varios efectos secundarios en los pacientes. De hecho, la tacrina ya no se comercializa debido a que causa toxicidad hepática.

Por lo anterior se ha llevado a la búsqueda de nuevos inhibidores de la AChE que sean más efectivos en el tratamiento de la EA y tengan menos efectos secundarios en las personas, tal es el caso de HupA, **tabla 2**.

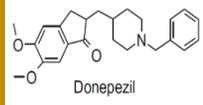
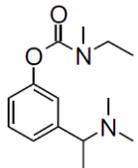
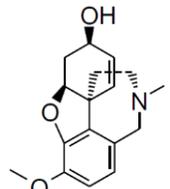
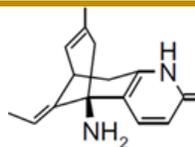
Estructura química	Nombre	Nombre comercial	Origen	Efectos secundarios	Cita
 Donepezil	Donepezilo	Aricept	Químico (1996)	Bloqueo ariculoventricular, diarrea, dolor de cabeza, náusea, vómito y pérdida de peso	Epperly <i>et al.</i> , 2017
 Rivastigmine	Rivastigmina	Exelon	Químico (2000)	Dolor abdominal, fibrilación auricular, disminuye el apetito, mareos, dolor de cabeza, náuseas	Epperly <i>et al.</i> , 2017
 Galanthamine	Galantamina	Razadyne Reminyl Nivalin	Natural (2001)	Bloqueo auriculoventricular, diarrea, mareos, dolor de cabeza, náusea, vomito, pérdida de peso	Epperly <i>et al.</i> , 2017
 Huperzine A	Huperzina A		Natural (1986)		Ma y Gang, 2008

Tabla 2. Fármacos utilizados en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

2.3.- Huperzina A

HupA es un alcaloide sesquiterpeno con un grupo piridona y un grupo amino primario, su fórmula empírica es $C_{15}H_{18}N_2O$ y tiene un peso molecular de 242 (Zangara, 2003) **Figura 1.** Es un inhibidor eficaz, reversible y selectivo de la enzima acetilcolinesterasa, que ha atraído una atención generalizada debido a su actividad farmacológica única y su baja toxicidad para tratar la EA (Tang *et al.*, 1996; Ma y Gang, 2008). En China fue aprobado en la década de 1990 como un fármaco para tratar la EA y en los EE.UU. se comercializa como un suplemento alimenticio (Ma y Gang, 2004).

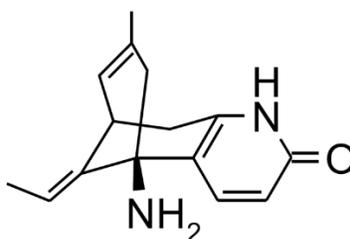


Figura 1. Estructura química de Huperzina A.

Ensayos clínicos realizados con HupA han demostrado que produce mejoras significativas en el déficit de la memoria en ancianos y pacientes con EA. La mayoría de estos estudios se han realizado en China, donde se estima que 100.000 personas han sido tratadas con HupA (Chiu y Zhang, 2000). Los resultados de estos estudios indican que HupA es un fármaco eficaz y seguro para mejorar la función cognitiva (Ma *et al.*, 2006). Además, HupA también puede reducir la muerte celular neuronal causada por un exceso de glutamato (Ved *et al.*, 1997).

2.3.1.- Familia Huperziaceae

La familia Huperziaceae se compone de dos géneros, *Huperzia* y *Plegmariurus* (Ching, 1978). Anteriormente se le clasificaba dentro de *Lycopodium* (s.1), pero fue taxonómicamente separada de esta por Rothmaler (Ma *et al.*, 1998, 2005, 2008). En buena parte esta clasificación se hizo en base quimiotaxonómica relacionado a la presencia de HupA, ya que este alcaloide es producido solamente por especies de plantas pertenecientes a esta familia.

Estas plantas han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional china para el tratamiento de diversos padecimientos, como son: contusiones, tensión, hinchazón, esquizofrenia, miastenia gravis y en el envenenamiento por organofosforados (Jiangsu, 1985; Ma *et al.*, 2006). Por lo que han sido el foco de diversas investigaciones, como es el caso de *Huperzia serrata* o también conocida como Qiang ceng ta, de la cual se aisló HupA en el año de 1986 por el científico chino Liu y colaboradores, compuesto que como se ha mencionado es de gran importancia en el tratamiento de la EA.

Esta familia presenta una distribución global, pero se encuentran relativamente en mayor abundancia en hábitats tropicales de América.

2.3.2.- *Huperzia orizabae*

Es una planta epífita, raramente rupícola, de tamaño pequeño (20-32 cm), conocida también como “*Lycopodium orizabae*” o “*Urostachys orizabae*”. Su clasificación taxonómica es la siguiente, **tabla 3**.

Reino	Plantae
División	Lycopodiophyta
Clase	Lycopodiopsida
Orden	Lycopodiales
Familia	Huperziaceae
Género	<i>Huperzia</i>
Especie	<i>Huperzia orizabae</i>

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Huperzia orizabae*

Se distribuye en Mesoamérica y México, en este último se ha reportado su presencia en los estados de Veracruz, Oaxaca, Guerrero y Chipas. **Figura 2**

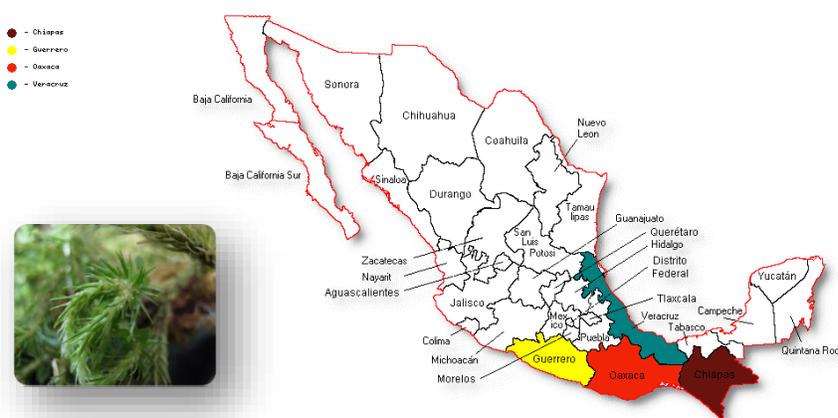


Figura 2. Distribución geográfica de *Huperzia orizabae*

2.4.- Aspectos biotecnológicos para la producción de metabolitos secundarios

Las plantas han sido utilizadas históricamente como fuente para la producción de metabolitos secundarios, como son productos farmacéuticos, bioplaguicidas, saborizantes, fragancias, colorantes y aditivos de alimentos (Rao y Ravishankar, 2002; Singh y Chaturvedi, 2012). Sin embargo, generalmente cuando son extraídos de plantas silvestres, existe la problemática de la sobreexplotación de especies, reducción significativa de la biodiversidad de plantas, largos periodos de tiempo de cultivo, bajos rendimientos de producto, crecimiento lento, así como la búsqueda de las condiciones geográficas óptimas para su crecimiento (Arias *et al.*, 2009; Georgiev y Weber, 2014).

En la actualidad el uso de estrategias biotecnológicas, como lo es el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales representa un área de aplicación prometedora para la producción de metabolitos secundarios y la síntesis de proteínas recombinantes (Huang y McDonald 2009; Georgiev *et al.*, 2009; FILOVÁ, 2014). Lo anterior se debe a que su crecimiento es independiente de los factores geográficos y climáticos, y, además, tienen una capacidad de ajuste que puede ayudar a implementar condiciones óptimas con un rendimiento reproducible, controlado y constante (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010; Singh y Chaturvedi, 2012).

Las técnicas de cultivo *in vitro* vegetal incluyen cultivo de órganos, micropropagación, cultivo de callos, cultivo de células en suspensión, cultivo de raíces, cultivo de protoplastos, cultivo de meristemos, cultivo de yemas, cultivo de anteras, cultivo de embriones, así como el escalamiento a biorreactor. Son un conjunto de técnicas usadas para crecer, tejidos, órganos y células vegetales en condiciones *in vitro*, bajo de forma controlada, aséptica, y libres de microorganismos (Street 1977). Es importante mencionar que el uso de reguladores de crecimiento vegetal RCV (**tabla 4**) es fundamental para el desarrollo de estas técnicas, debido a que regulan y promueven el crecimiento vegetal. Además, una característica crucial de las células vegetales que ha permitido el desarrollo de la biotecnología vegetal es la totipotencia (Georgiev, 2009), esto significa que cada célula contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella y, por lo tanto, puede producir una gama de sustancias químicas encontradas en la planta original, así como regenerar una nueva planta completa (Street, 1977; Ferl y Paul 2000; Calva y Pérez, 2017).

Las ventajas de estas tecnologías sobre la producción agrícola convencional son las siguientes:

- ❖ Es independiente de las variaciones geográficas y estacionales y de diversos factores ambientales.
- ❖ Ofrece un sistema de producción definido, que garantiza el suministro continuo de productos, calidad uniforme y rendimiento.
- ❖ Es posible producir nuevos compuestos que no son normalmente se encuentra en la planta madre.

Sin embargo, también presentan ciertas desventajas, entre las cuales se encuentran:

- ❖ Bajos rendimientos de producto
- ❖ Tasa de crecimiento lento
- ❖ Susceptibles a contaminación
- ❖ Inestabilidad genética

Grupo	Tipo	Función	Ejemplos
Promotores del crecimiento	Auxinas	Elongación celular	AIA, ANA, 2 4-D
	Giberelinas	Elongación celular	GA ₃ , GA ₁ , GA ₄
	Citocininas	División celular	Zeatina, BA
Inhibidores del crecimiento	Ácido abcísico	Tolerancia al estrés	
Etileno		Maduración de frutos Regula respuestas ambientales	

Tabla 4. Reguladores del crecimiento vegetal y sus funciones

2.4.1.- Cultivo *in vitro* de callos

Es el tipo de cultivo más ampliamente usado y se obtiene a partir de casi cualquier planta u órgano. Regularmente al medio nutritivo, se agregan auxinas y/o citocininas. Este tipo de cultivo se puede mantener indefinidamente, trasplantando periódicamente secciones de callos a medio fresco. El fenómeno más observado en el cultivo de callos ha sido el de generación de plantas, ya sea por el proceso que involucra la formación del tallo seguida del enraizamiento, o por la iniciación de la embriogénesis somática (Hurtado y Merino, 1987).

Los callos son utilizados para estudios de fisiología vegetal, organogénesis, embriogénesis, genética, fitotoxicología y estudios de ultraestructura celular; así como también en la propagación de plantas. Actualmente se le da énfasis en el área de síntesis y extracción de productos naturales, como son los fármacos (Deus y Zenk, 1982; Hurtado y Merino, 1987).

El cultivo de callos se divide en cuatro etapas:

- 1) Inducción: las células del inoculo inicial comienzan su crecimiento.
- 2) Proliferación celular: el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.
- 3) Inducción de la diferenciación: se obtienen meristemos apicales, radiculares, embriones, tejido vascular, etc.
- 4) Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

2.4.2.- Cultivo *in vitro* de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión se desarrolla transfiriendo una porción de callo relativamente friable al medio líquido, manteniéndolo en condiciones adecuadas de aireación, agitación, luz, temperatura y otros parámetros físicos para promover su disociación y crecimiento (Hurtado y Merino, 1987; FILOVÁ, 2014). Generalmente se cultivan heterotróficamente usando azúcares simples como fuente de carbono y el suministro inorgánico de otros nutrientes (Yesil-Celiktas et al., 2010). Por lo regular este tipo de cultivo es sostenible y económicamente viable para la obtención de metabolitos secundarios de alto valor a partir de especies de plantas raras y/o amenazadas (Georgiev y Weber, 2014). Como son fenilpropanoides, alcaloides, terpenoides, quinonas y esteroides, la mayoría de los cuales son utilizados para la producción de fármacos (Rao y Ravishankar, 2002).

Las células vegetales en cultivos en suspensión muestran una variedad de formas, siendo las más comunes las formas esféricas y alargadas. Normalmente exhiben varios grados de agregación celular, que varían dependiendo de la especie de planta, la etapa de crecimiento y las condiciones de cultivo (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010; Gueven, 2012). Sin embargo, aunque la agregación celular se requiere para el crecimiento y la producción de metabolitos, sí es muy grande puede tener un efecto perjudicial sobre la transferencia de sustratos potencialmente limitantes (O_2 y fuente de carbono) a las células, inhibiendo su crecimiento y producción de compuestos (Georgiev *et al.* 2009).

Por otro lado, las ventajas son que no están limitados por las condiciones ambientales, ecológicas o climáticas (Zhong *et al.*, 1995), se manipulan fácilmente para aumentar los rendimientos de los productos (Roberts y Shuler, 1997). Por ende, la producción puede ser más confiable, más simple, predecible, y el aislamiento de los metabolitos secundarios puede ser rápido y eficiente, en comparación con la extracción en plantas completas (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010).

Las desventajas que se pueden presentar son contaminación, crecimiento lento, bajos rendimiento de productos, inestabilidad de las líneas celulares y problemas en el escalamiento.

2.4.3.- Escalamiento de cultivos de células en suspensión a biorreactor *airlift*

El estudio para la producción de metabolitos secundarios a nivel laboratorio empieza típicamente con el estudio cultivos de callos en frascos, se desplaza a matraces en agitación y posteriormente su escalamiento a biorreactores, los cuales generalmente de acero inoxidable, vidrio o plástico y van de 1 a 75,000 L. Los biorreactores son una estrategia ventajosa para la producción de metabolitos secundarios en el cultivo de células y tejidos vegetales, ya que garantizan condiciones de proceso controladas, definidas y, por lo tanto, minimiza variaciones en el rendimiento y la calidad del producto (Eibl y Eibl, 2008). Sin embargo, encontrar el biorreactor y las condiciones correctas representa un gran reto técnico, ya que las células vegetales son más susceptibles a las fuerzas hidrodinámicas, fuerzas de corte, tensiones mecánicas por medio de la aireación y agitación del medio que las células microbianas (Georgiev *et al.*, 2009). Debido a cada tipo de tejido requiere de instrumentación y adaptaciones particulares, y de la eficiencia de esto depende un crecimiento celular efectivo, una producción rentable y, por tanto, la factibilidad del proceso.

Algunos de los biorreactores que se utilizan para el cultivo de células y tejidos vegetales son mostrados en la **tabla 5**. En el caso específico del cultivo de células en suspensión los más ampliamente utilizados son; biorreactores de tanque agitado, biorreactores *airlift* y biorreactores de columna de burbujas (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010).

Clasificación	Tipos	Referencia
Agitados mecánicamente	De tanque agitado De tambor rotatorio	Huang y McDonald, 2012
Accionados neumáticamente	<i>Airlift</i> Columnas de burbujeo	Georgiev et al., 2013
Sistemas no agitados	De membrana De cama fija De membrana tubular De lecho de niebla De lecho de goteo	Huang y McDonald, 2012
Sistemas de biorreactores desechables	Desechables estándar De inmersión temporal De onda mixta Microbiorreactores	Valdiani <i>et al.</i> , 2019

Tabla 5. Clasificación y tipo de biorreactores utilizados en el cultivo de células y tejidos vegetales

El biorreactor *airlift* (**figura 3**) consiste en una columna cilíndrica con un tubo interno llamado *Draft*, en la parte inferior cuenta con un dispersor de aire, esta columna esta sellada con una tapa de acero inoxidable con sellos (empaques de plástico), la cual tiene cinco accesos roscados en los cuales se coloca su instrumentación, la columna cuenta con una toma en su parte inferior. Este biorreactor es agitado de forma neumática, se inyecta aire a presión en la base el cual pasa por un aspersor (volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm), produciendo así dos tipos de potencias de agitación que generan burbujas. El paso de estas burbujas canalizadas por el *Riser* crea una fuerza de empuje y arrastre con la cara superficial de las burbujas, esta fuerza acarrea el líquido por el *Riser* arrojando este flujo a la cabeza de la columna (*Head-space*), al mismo tiempo introduce el líquido en el interior del *Draft*, el líquido se regresa por la parte anular (*Downcomer*), logrando con esto una agitación circular uniforme en todo el perímetro anular, las velocidades de agitación que alcanza este biorreactor dependen de la presión de inyección del gas y de las características de medio (Caleb, 2016).

- 1.-Head-space
- 2.-Downcomer
- 3.-Columna
- 4.-Riser
- 5.-Aspersor
- 6.-Draft
- 7.-Líneas de flujo
- 8.-Toma de muestra inferior
- 9.-Electrodos
- 10.-Venteo

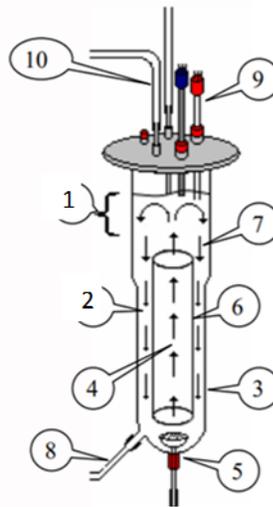


Figura 3. Biorreactor *airlift* de 2L

Los sistemas de biorreactores *airlift* suministran las bajas demandas de O₂ requeridas por los cultivos de células vegetales y son una buena solución para cultivar líneas celulares sensibles a las fuerzas de corte (Georgiev y Weber, 2014). Tienen varias ventajas, como la combinación de una alta carga de partículas sólidas, una buena transferencia de masa y oxígeno adecuada, bajas fuerzas de corte hidrodinámicas, bajos requisitos de energía y un diseño simple. Sin embargo, el principal inconveniente es su inadecuación para cultivos de plantas de alta densidad, así como la espumación extensiva que resulta de los polisacáridos extracelulares, ácidos grasos y altas concentraciones de azúcar en el medio de cultivo de células vegetales (Eibl y Eibl 2002; Su 2006; Eibl y Eibl, 2008). Esto último puede causar la obstrucción del filtro de salida de aire, que constituyen un riesgo de contaminación, pero puede controlarse mediante la adición de agentes antiespumantes (Cseke *et al.*, 2016).

3.- ANTECEDENTES DIRECTOS

En el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología se han realizado investigaciones cruciales encaminadas a la producción de HupA, empleando diferentes estrategias biotecnológicas para su cometido. Una fue enfocada al aislamiento de hongos endófitos de *H. orizabae* para su posterior cultivo y producción de HupA (Cruz M. Olga, tesis doctoral por concluir) y la otra al cultivo *in vitro* de callos generados a partir de explantes axénicos de frondes de la planta (Rodríguez S. Talía, tesis doctoral por concluir). Este último proyecto es la base de la presente propuesta.

Para los experimentos de callogénesis la colecta de la planta *H. orizabae* se realizó en el estado de Veracruz en la ciudad de Coatepec, en el mes de septiembre del año 2012. Dicho material fue recuperado de copas de árboles previamente cortados para la obtención de madera. El número de voucher para la identificación botánica de material vegetal se encuentra en trámite en el Herbario HUMO de la UAEM.

El cultivo *in vitro* de helechos es complicado, debido a que son plantas recalcitrantes, es decir que son difíciles de manejar en condiciones *in vitro*. De hecho, en el mundo existen tres trabajos de cultivo *in vitro* de helechos de la familia Huperziaceae (Ma y Gang., 2008; Szypuła *et al.*, 2013 y Ishiuchi, *et al.*, 2013). Es por esto que la generación de los callos es de gran importancia. El evento de callogénesis se logró a partir de explantes axénicos de frondes de la planta *H. orizabae*, los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos con fitorreguladores, siendo sus condiciones óptimas de crecimiento en Medio B5, con la adición de los fitorreguladores ANA y Zeatina (0.5 mg/L). A partir de un único evento de formación de callos, el mismo se cultivó bajo diferentes condiciones de fitorreguladores y luz. En la **figura 3** se puede apreciar la morfología y color de callos de *H. orizabae* (Talía Rodríguez).

Se realizó el cultivo y estandarización de crecimiento de callos generados a partir de explantes axénicos de frondes de la planta *H. orizabae* obtenidos por la estudiante de doctorado Talía Rodríguez Salgado.

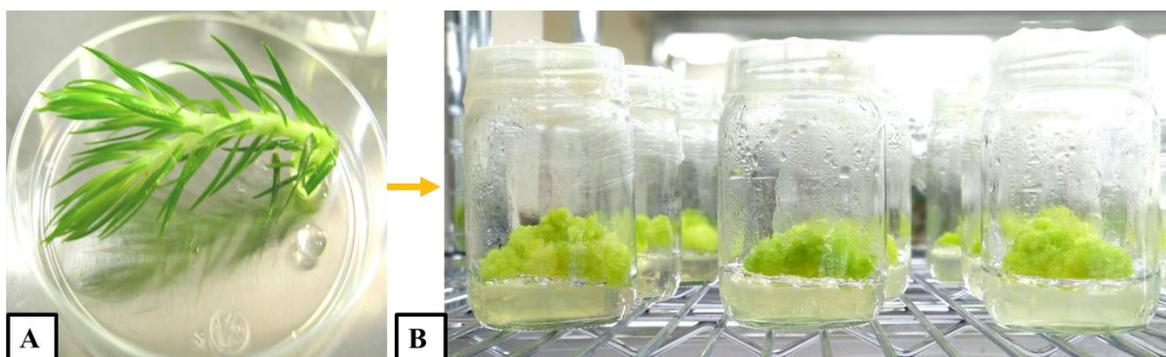


Figura 4. Establecimiento de callos (B) a partir de frondes axénicos de *Huperzia orizabae* (A). Figura 4-A, tomada por Cruz-Miranda 2019

Así mismo, se ha comprobado la presencia del compuesto de interés (HupA) por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) por Soto-Días, 2016. (**Tabla 5**). Sin embargo, los rendimientos de HupA en comparación con la planta silvestre y con otra especie perteneciente a la familia Huperziaceae (*Phlegmariurus squarrosus*) son bajos (**Tabla 5**). Es por esto que el presente proyecto pretendió incrementar la producción de HupA mediante la implementación de herramientas biotecnológicas como es el cultivo de células en suspensión, lo cual permitirá tener un cultivo continuo que produzca HupA de manera estable.

Especie	Tejido/Cultivo	Hup A (µg/g PS)	Autores
<i>P. squarrosus</i>	Fronde	378.83	Ma y Gang, 2008
<i>P. squarrosus</i>	Callo	434.73	Ma y Gang, 2008
<i>P. squarrosus</i>	Callo	675.69	Ma y Gang, 2008
<i>H. orizabae</i>	Fronde	265	Rodríguez y Soto, 2016
<i>H. orizabae</i>	Callo M15	0.53	Rodríguez y Soto, 2016
<i>H. orizabae</i>	Callo M57	0.28	Rodríguez y Soto, 2016

Tabla 6. Datos comparativos de la producción de HupA

4.- JUSTIFICACIÓN

El alcaloide Huperzina A es un producto natural producido por las plantas del género *Huperzia* y posee un alto valor farmacológico para tratar los síntomas de la EA. Actualmente, de acuerdo a reportes de la OMS, en el mundo de los 47.5 millones de personas que padecen demencia, cerca de 70% son del tipo Alzheimer, y tan sólo en México se calcula que esta enfermedad degenerativa afecta a 860,000 personas, cifras que van incrementando año con año. Considerando que la producción de HupA depende de su síntesis química, que es cara e inviable comercialmente; que las poblaciones de *Huperzia* son escasas y crecen en nichos ecológicos muy específicos, comprometiéndolas en materia de conservación; y que su crecimiento requiere entre 15-20 años para que sean redituables comercialmente; se hace imperativo el desarrollo de alternativas que permitan explotar estos recursos naturales de forma racional, eficiente y rentable. La presente propuesta de investigación posee un amplio potencial para el desarrollo de estrategias biotecnológicas que permitan superar las dificultades antes mencionadas. El empleo de biorreactores en cultivos celulares para la producción de fitomedicamentos permite el escalamiento para una mayor producción de algún compuesto deseado. Es por esto que se pretende lograr el establecimiento del cultivo de células en suspensión de *H. orizabae* y su posterior escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L. Dicho cultivo se desarrollará a partir de un cultivo de callos de *H. orizabae* productores de HupA previamente generado en el grupo de trabajo, con el objetivo de obtener una producción estable de HupA.

5.- HIPÓTESIS

El establecimiento de cultivos *in vitro* de células en suspensión de *H. orizabae* y su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L permitirá la producción estable de Huperzina A.

6.- OBJETIVOS

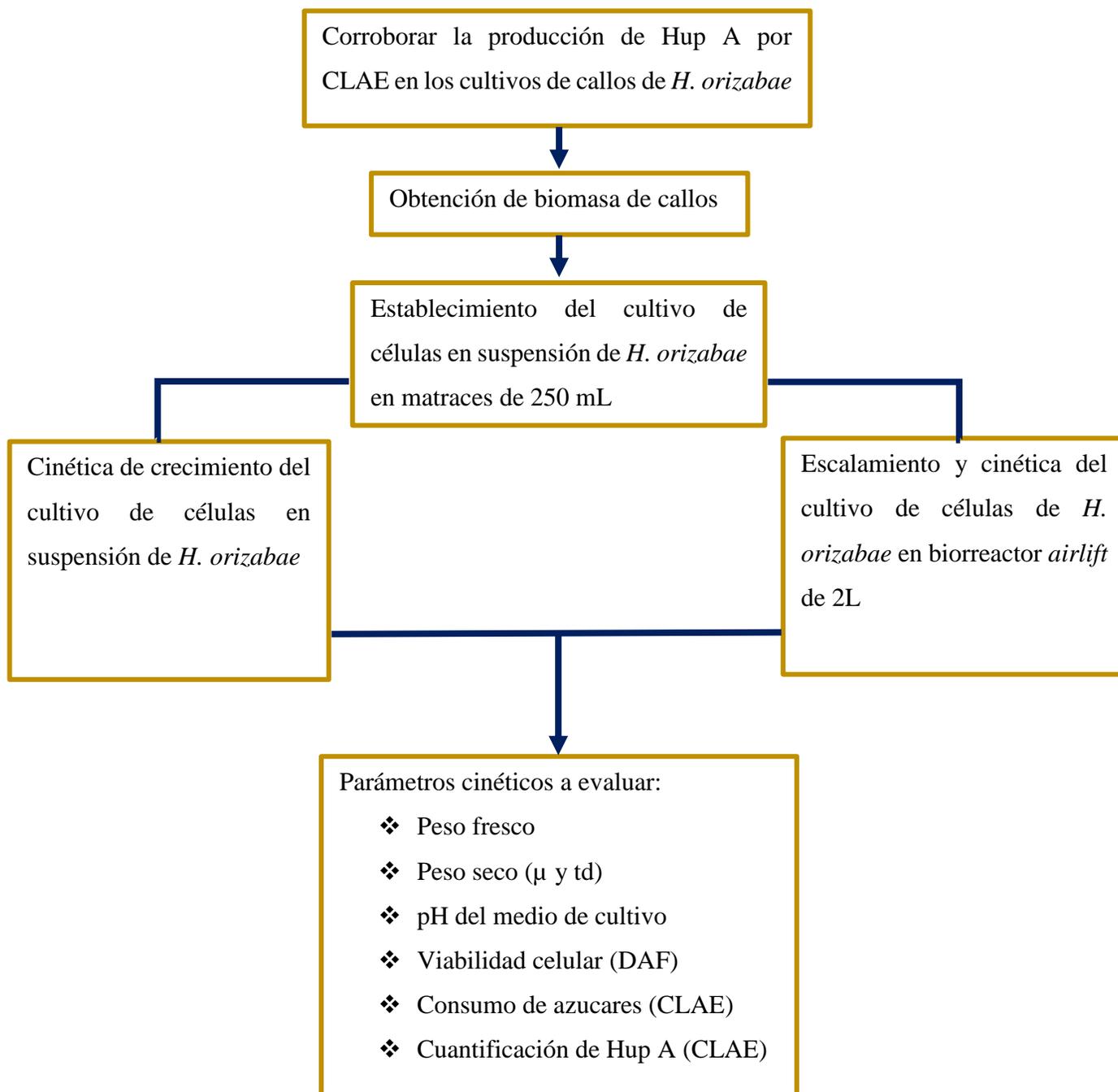
6.1.- Objetivo General:

- ❖ Establecer un cultivo de células en suspensión (Hup21) de *H. orizabae* en matraces de 250 mL y en biorreactor tipo *airlift* de 2L con la capacidad de producir Huperzina A.

6.1.2 Objetivos Particulares:

- ❖ Verificar que los callos de *H. orizabae* produzcan HupA y obtener biomasa.
- ❖ Establecer un cultivo de células en suspensión a partir de callos de *H. orizabae*.
- ❖ Caracterizar las cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión, con la identificación y la cuantificación de HupA presente en los extractos alcaloideos.
- ❖ Escalar el cultivo de células en suspensión Hup21 en biorreactores *airlift* de 2L.

7.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8.- METODOLOGIA

8.1.- Obtención del material vegetal

El material vegetal (callos) con el que se inició el presente proyecto fue generado por la M. en F. Thalia Rodríguez Salgado en el año 2016, **Figura 4**.



Figura 5. Callos de *Huperzia orizabae*

Los callos fueron resembrados en medio B5, en frascos de 250 mL, con un volumen de medio de 50 mL. Los cultivos se mantuvieron en cuarto de cultivo, se incubaron a 25°C, en fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad a una intensidad luminosa de 25 μ Mn⁻²S⁻¹.

8.2.- Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio B5 tanto para el cultivo de callos como para el cultivo de células en suspensión. El medio se preparó en botellas Pyrex de un litro, la cual se colocó en una agitadora con un magneto. En una probeta de vidrio de 500 mL se adicionaron las 5 soluciones del medio B5, los fitoreguladores ANA y Zeatina (0.5 mg/L⁻¹), AC (20 mL/L⁻¹), agua MQ estéril hasta aforar a 500 mL y se vació a la botella previamente colocada en agitación. Posteriormente, se pesó la sacarosa, (20g/L⁻¹), PVP (1 g/L⁻¹) y KNO₃ (5 g/L⁻¹) y se adicionaron a la botella en agitación. Se dejó que se mezclaron de manera homogénea todos los componentes del medio y se colocaron otros 500 mL de agua MQ estéril en la probeta, se vació a la botella y se dejó en agitación por 10 minutos. Finalmente, se ajustó el pH a 5.5, se esterilizó a 1.5 psi y 121°C durante 15 minutos.

Nota: En el caso del medio para el cultivo de callos, se adicionaron 3.5 g de phytigel/L⁻¹ después de ajustar el pH.

8.3.- Cultivo de callos

El cultivo de callos se realizó en una campana de flujo laminar, la cual se limpió con alcohol al 70% y se dejó con luz UV durante 30 minutos.

Se esterilizaron frascos de 250 mL, pinzas, así como el medio B5 a 1.5 psi y 121°C durante 15 minutos. Una vez que se tuvo el material y el medio estéril se procedió a vaciar 50 mL de medio a cada frasco, se taparon, se sellaron con parafilm y se retiraron de la campana.

Nota: Los frascos con medio se dejaron en un periodo de esterilidad de 5 días. Después de estos días se observó que los frascos no presentaron algún tipo de contaminación y se procedió a resembrar callos previamente crecidos, de una edad de 30 días aproximadamente.

8.4.- Establecimiento de cultivo en suspensiones celulares

Para el establecimiento de las células en suspensión se utilizaron matraces con 3 baffles laterales como los que se muestran en la figura 6, para una mejor y más rápida disgregación de los callos friables de *H. orizabae*.



Figura 6. Matraces con baffles laterales para el establecimiento de células en suspensión. Matraces con medio B5

Los callos de *H. orizabae* fueron inoculados en medio B5 líquido, adicionado con los fitorreguladores ANA y Zeatina y un pH de 5.5.

8.5.- Cinética en matraces de 250 mL

Se realizó una cinética tipo lote de 60 días, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL de medio B5, suplementado con los fitorreguladores ANA y Zeatina (0.5 mg/L^{-1}) y AC (20 mL/L^{-1}) y un inoculo del 2%. Se mantuvieron en una agitadora orbital a 100 rpm, luz constante ($25 \mu\text{Mn}^{-2}\text{S}^{-1}$) y 25°C . La toma de muestra se realizó por triplicado, cada 5 días, con un total de 13 puntos.

8.6.- Parámetros cinéticos para la evaluación del crecimiento y cuantificación de HupA en el cultivo de células en suspensión de *H. orizabae*

8.6.1.- Obtención de peso fresco

El peso fresco se tomó durante cada punto de la cinética por triplicado, para esto se procedió a filtrar las células con ayuda de una bomba de vacío, papel filtro de punto medio, un embudo cónico y un matraz Kitasato. Las células se filtraron en una campana de flujo laminar, posteriormente se pesaron en una balanza analítica OHAUS y se reportó el peso en g PF/L^{-1} . La biomasa se congelo y se guardó a -70°C para su posterior análisis.

8.6.2.- Obtención de peso seco

El crecimiento celular fue determinado midiendo el peso seco por triplicado. Para esto se liofilizó por 72 h por cada muestra previamente congelada a -70°C , hasta llegar a peso constante, posteriormente se pesó en una balanza analítica OHAUS y se reportó el peso como g PS/L^{-1} . Con los datos obtenidos se calculó el promedio, la desviación estándar y se realizaron las gráficas correspondientes a las cinéticas de crecimiento de peso seco (PS) en función del tiempo. Con los datos obtenidos se calculó la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y el tiempo de duplicación (td) de las células mediante las siguientes ecuaciones:

$$\mu = \text{Ln} \left(\frac{X_f}{X_i} \right) \left(\frac{1}{t} \right) \qquad td = \frac{\text{Ln}2}{\mu}$$

Donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento

Ln: Logaritmo natural

Xf: Biomasa final

Xi: Biomasa inicial

t: Tiempo

td: Tiempo de duplicación

Ln2: Logaritmo natural de 2

Además de la μ y el td, se calcularon los rendimientos de biomasa ($Y_{X/S}$), rendimiento de producto ($\mu_{\text{HupA/g S}}$), velocidad de consumo de sustrato $Q_S = ((1/Y_{X/S}) * (\mu))$ y productividad ($(\mu_{\text{g P/g B}}) * (\mu)$).

Donde:

$Y_{X/S}$: gramos de biomasa producida/gramo de sustrato consumido

$\mu_{\text{HupA/g S}}$: μ de HupA producido/gramo de sustrato consumido

$Q_S = (1/Y_{X/S} * \mu)$: gramos de sustrato consumido/gramo de biomasa por día

$(\mu_{\text{g P/g B}} * \mu)$: μ de producto (HupA)/por gramo de biomasa por día

8.6.3.- Viabilidad celular

La viabilidad se observó utilizando una reacción fluorocromática mediante diacetato de fluoresceína (DAF) (Wildholm, 1972). Para preparar la solución, se pesaron 5 mg de DAF, se disolvió en 1 mL de acetona y se almacenó a 4°C. Una alícuota de 0.1 mL del stock se adicionó a 5 mL de agua desionizada. Posteriormente, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se adicionó 500 μL de esta última dilución y se mezcló con 500 μL de la suspensión celular, se dejó reposar por 1 min, se tomaron 50 μL de esta suspensión y se colocó en un portaobjetos para ser observada al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E 400, Super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF), la reacción de células viables se contó y se expresó en porcentaje.

8.6.4.- Determinación de pH al medio

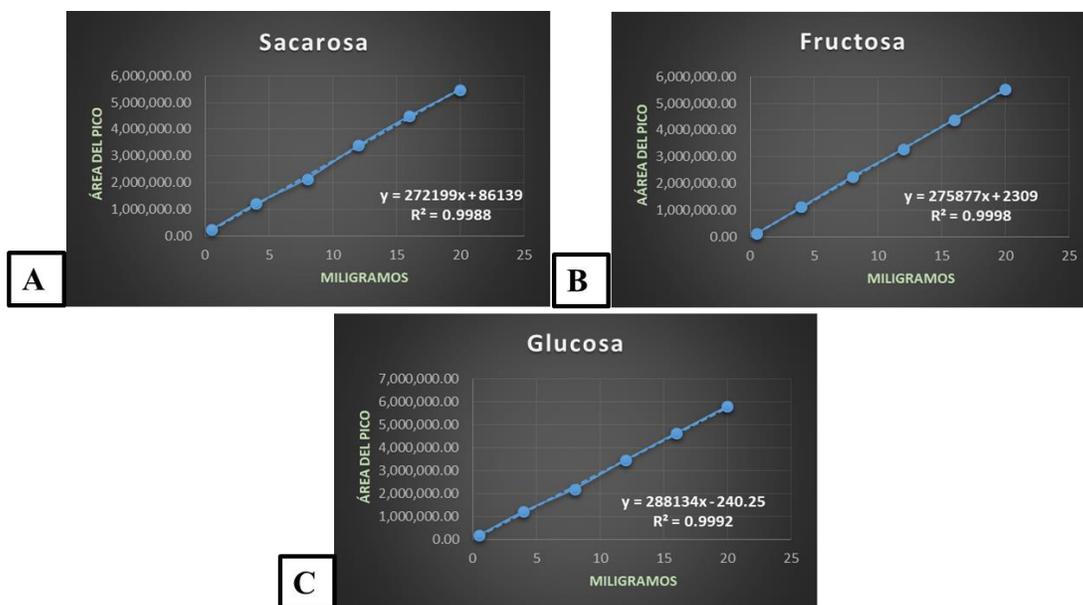
El pH se midió al medio del cultivo de las células en suspensión, con ayuda del potenciómetro Orion modelo 4110A.

8.6.5.- Cuantificación del consumo de azúcares en el medio de cultivo

Para la cuantificación del consumo de azúcares se realizaron curvas de calibración de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa para determinar el consumo de carbohidratos presentes en el medio de las células en suspensión. Para cada uno de los tres azúcares se realizó una curva utilizando 6 concentraciones diferentes, las cuales fueron: 20, 16, 12, 8, 4 y 0.5 mg/mL. Se eligieron estas concentraciones debido a que la concentración de sacarosa utilizada en el medio fue de 20 g/L⁻¹. La cuantificación se realizó por CLAE, en el equipo Waters 7117 plus Autosampler con un flujo de operación de 1mL/min a 25°C. Como fase estacionaria se utilizó una columna amino UG80, tamaño 5 µm (4.6 mm x 150 mm), como fase móvil H₂O:CH₃CN, en una proporción 80:20 respectivamente. Los datos obtenidos se reportaron como gramos de sustrato por litro de medio S (g/L⁻¹).

8.6.5.1.- Curvas de calibración de Sacarosa, Glucosa y Fructosa

Otro parámetro importante a evaluar en el cultivo en suspensión es el consumo de carbohidratos, lo cual se realizó analizando el medio de cultivo de las suspensiones en cada uno de los puntos de la cinética. Para esto primero se realizaron curvas de calibración de sacarosa, glucosa y fructosa, que se cuantificaron mediante CLAE en una columna de tipo amino (**gráfica 1**). Como se puede observar todas las gráficas de relación concentración y área bajo la curva presentaron un valor de R² (fructosa: 0.9998; glucosa: 0.9992; glucosa: 0.9988) muy cercano a 1, lo cual nos indica que son confiables para determinar el consumo de carbohidratos en la cinética.



Gráfica 1. Curvas de calibración de los azúcares; sacarosa A, fructosa B y glucosa C

8.7.- Fitoquímica de los extractos alcaloideos

Para la identificación y cuantificación del metabolito HupA presente en las extracciones de alcaloides de callos y células en suspensión se utilizaron las técnicas de CCF y CLAE.

8.7.1.- Extracción de alcaloides

Se realizó extracción de alcaloides tanto a la biomasa de callos, como de células en suspensión, para posteriormente analizar dichos extractos por CCF y CLAE. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- 1.- La biomasa seca y molida se desengrasó con hexano en una proporción 1:3 (v/v), posteriormente se sónico durante 5 min a 10 W potencia. Este procedimiento se realizó por triplicado.
- 2.- Se preparó un extracto metanólico a partir de la biomasa previamente desengrasada, por medio de maceración con metanol durante 12 horas, en una proporción 1:3 (v/v) y posteriormente se sónico por 5 minutos, este procedimiento se realizó por triplicado. Los extractos se evaporaron en el rotaevaporador y se pesaron. Por último, se prepararon los extractos alcaloideos a partir del extracto metanólico. Para tal fin se utilizó el protocolo ácido-base de Wink *et al.*, 1995 y Wu y Cu, 2006 con algunas modificaciones:

- 1.- Cada muestra se disolvió en agua acidificada al 0.5 M. El volumen de agua fue de 30 mL por muestra. Esto se realizó en tubos falcón de 50 mL.
- 2.- Se sonicaron los tubos falcón con la muestra y el agua acidifica durante 1 hora y se dejaron en agitación (120 rpm) durante 12 horas.
- 3.- Se centrifugaron las muestras a 4000 rpm y se recuperó el sobrenadante, es decir, la fase acuosa (fase en la que están presentes los alcaloides). Posteriormente ajustó el pH a 9 con NH_4OH al 2%.
- 4.- En un embudo de separación se colocó la fase acuosa con el pH ajustado y se colocó cloroformo en una proporción (1:1), para extraer los alcaloides. Una vez puestas la fase acuosa y el cloroformo en el embudo, se procedió a agitar durante 1 minuto. Se colocó el embudo de separación en la base y se esperó a que formaran dos fases. Posteriormente se recuperó la fase clorofórmica en un matraz de 125 mL.
- 5.- El extracto clorofórmico recuperado (90 mL), se filtró con un embudo cónico al cual se le colocó papel filtro y una cuchara mediana de Na_2SO_4 . El extracto filtrado se recuperó nuevamente en un matraz de 125 mL.
- 6.- Los extractos clorofórmicos se dejaron secar en la campana de extracción.
- 7.- Una vez secos los extractos clorofórmicos se recuperan añadiendo 5 mL de una mezcla de metanol: cloroformo en una proporción 1:1. Se pasa a un vial y se deja secar. (Para obtener el rendimiento de la extracción).
- 8.- Finalmente se le adicionó 300 μL de metanol al vial, se sonicó durante 3 minutos y se filtró a través de una membrana de 0.45 μm .

8.7.2.- Cromatografía en capa fina

Para identificar la posible presencia de HupA en los extractos alcaloideos se realizó el análisis por cromatografía en capa fina en un equipo semi-automatizado CAMAG. La fase móvil utilizada fue $\text{CHCl}_3:\text{CH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ en una proporción 120:20:2 (Vázquez García, 2017) y como fase estacionaria placas de sílice. Las placas se observaron en luz UV, y posteriormente se revelaron con reactivo de yodo para revelar la presencia de alcaloides. Como patrón de referencia se utilizó estándar de HupA de Sigma-Aldrich para determinar la posible presencia de este alcaloide en las muestras.

8.7.3.- Cuantificación de Huperzina A mediante cromatografía líquida de alta eficiencia

La cuantificación de HupA en los extractos alcaloides se realizó por CLAE. Para dicho fin se utilizó el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia JASCO modelo LC-Net II/ADC (50/60HZ). Como fase estacionaria se empleó una columna C18 de sílice fase reversa Shiseido CAPCELL PAK MG II S5, de las cuales se muestran sus especificaciones en la **tabla 7**.

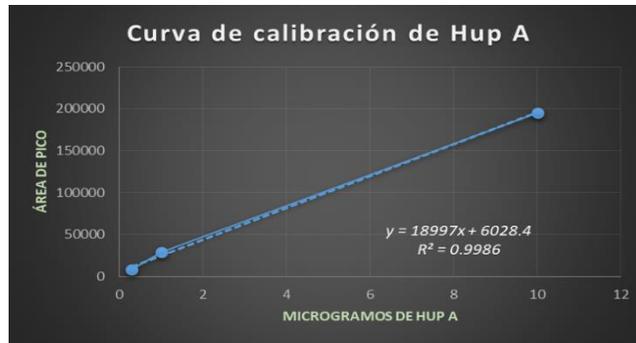
Diámetro medio de la partícula (μm)	4.40 -4.70
Distribución de la partícula (40% 90%)	< 1.28
Contenido de Carbón (%)	14.8 – 16.3
Resistencia a los ácidos (%)	> 80.0
Resistencia alcalina (%)	> 90.0
Condiciones cromatográficas	Columna; 4.6mm I.D. x 150 mm Velocidad del flujo de inyección: 1.0 ml/min

Tabla 7. Especificaciones de la columna cromatográfica C18

La fase móvil utilizada fue $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (0.0125 %): CH_3CN , en una proporción (85:15) respectivamente (Cruz, O y Soto, U. 2016). Las muestras se corrieron con un volumen flujo de 1 mL/min, a 25°C durante 40 minutos. La detección del analito fue a 235 y 310 nm, ya que estas son las máximas longitudes de absorción molar reportadas para el alcaloide Hup A (Ma *et al.*, 2005).

8.7.3.1.- Curva de calibración de HupA

Se realizó una curva de calibración de HupA, para poder cuantificarla en los extractos alcaloides del cultivo de callos y de células en suspensión y determinar así su producción durante las cinéticas. (**gráfica 2**). La curva se construyó con 4 puntos, los cuales corresponden a las concentraciones de 100, 10, 1, 0.5 y 0.2 μg de HupA por mL de metanol. Cada concentración se corrió por triplicado, se obtuvo un promedio y se procedió a graficar la curva y sacar la ecuación de la recta.



Gráfica 2. Curva de calibración de HupA, $R^2=0.998$

Para comprobar que se pueda utilizar la curva realizada para la cuantificación de HupA, nos guiamos por el valor de R cuadrado (R^2) o también llamado coeficiente de determinación, que se define como la proporción de la varianza total de la variable explicada por la regresión y refleja la bondad del ajuste de un modelo a la variable que se pretende explicar. Cabe mencionar que el valor del R^2 oscila entre 0 y 1, mientras más cerca de 1 se sitúe su valor, mayor es el ajuste del modelo a la variable que se requiere medir. De forma inversa, cuanto más cerca de cero, menos ajustado estará el modelo y, por tanto, menos fiable será. La curva presentó el valor de $R^2= 0.9982$, muy cercano a 1, por lo que mostró una correlación lineal entre las concentraciones y sus respectivos valores de absorción en el espectro de detección de ultravioleta.

8.14.- Escalamiento del cultivo de la línea de células en suspensión Hup21 a biorreactor airlift de 2L

El escalamiento del cultivo de células en suspensión Hup21, se realizó en un biorreactor *airlift* de 2L, el cual se esterilizó a 15 psi y 121°C durante 0.20 h, junto con 2L de medio B5. Posteriormente se puso en operación con un volumen de trabajo de 1.8 L de medio B5 y se puso en operación durante 1 día, a un flujo de 0.5 VVM, pasado este día se inoculó con el 10 % del volumen de trabajo (180 g PF de células). Finalmente se realizaron 2 cinéticas de crecimiento, evaluando los mismos parámetros que en la cinética de matraz de 250 mL, las condiciones del escalamiento fueron las señaladas en la **tabla 8**.

Temperatura	25 °C
-------------	-------

Luz	Luz constante (25 μ Mn ⁻² S ⁻¹)
Volumen de trabajo	1.8 L
Volumen de aire por volumen de medio por minuto (VVM)	0.5 (Día 0-13) 1.0 (Día 13-20)
Inoculo	10 %

Tabla 8. Condiciones de escalamiento en Biorreactor airlift de 2L

8.15.- Determinación de la actividad inhibitoria de la AChE

Para la determinación de la actividad inhibitoria de AChE, se utilizó el método colorimétrico descrito por Ellman *et al.*, 1961, con algunos cambios realizados por Vázquez *et al.*, 2018 para adaptarlo a las condiciones de placa de 96 pozos. Se utilizó la enzima purificada de anguila a una concentración de 0.02 U/mL (EC 3.1.1.7 Type VI-S, Sigma).

La enzima se incubo en buffer de fosfato 1.0 M (pH 8) con 10 μ L de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.5 Mm y 10 μ L de la muestra de extracto alcaloideo del cultivo Hup21 diluido en metanol. La placa se colocó a Baño María a 25°C durante 30 minutos. Posteriormente se adiciono a cada pozo 10 μ L de ioduro de acetilcolina 20 mM, para iniciar la reacción. La hidrólisis se monitoreo por la formación del anión 2-nitro-5-mercaptobenzoato, cuyo color es amarillo y su espectro de absorción es de 412 nm. Se registró la cinética de la reacción cada 30 segundos durante 3 minutos en el espectrofotómetro con lector de microplacas (Lector SpectraMax ID3). La actividad enzimática se calculó comparando la actividad de la reacción sin inhibidor. Se utilizó estándar de HupA (Sigma-Aldrich) como control positivo.

El porcentaje de inhibición se calculó como: % inhibición= (1-S/E) x 100, donde E y S son las actividades con y sin inhibidor, respectivamente (Vázquez, 2017).

XI. – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1.- Determinación de la producción de HupA en callos por CLAE

Con la finalidad de verificar que los callos de *H. orizabae* produjeran HupA, se realizó el análisis mediante CLAE de su extracto alcaloideo. Para tal fin se utilizó la fase móvil H₂O/TFA (0.0125 %):CH₃CN, en una proporción 85:15, como fase estacionaria una columna C18 de sílice fase reversa y los parámetros de especificados en el apartado de metodología. En la figura 7 se puede observar la presencia de un pico, que se produce en el mismo tiempo de retención (TR) que el estándar de HupA, **Figura 7**.

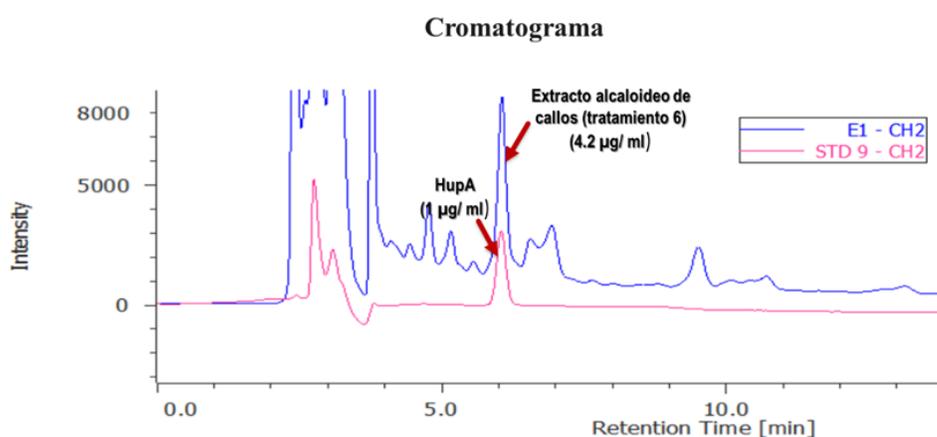


Figura 7. Perfil cromatográfico de HupA (cromatograma inferior) (inyección de 10 µL de una solución a 1 µg/mL) y del extracto alcaloideo del cultivo de callos en medio semi-sólido (cromatograma superior) (inyección de 10 µL de una solución a 4.2 µg/mL). Fase móvil H₂O/TFA (0.0125 %):CH₃CN, (85:15), C-18, flujo de 1 mL/min, a 235 y 310 nm

Los datos obtenidos dieron pauta para poder realizar el establecimiento del cultivo de células en suspensión a partir de callos de *H. orizabae*.

9.2.- Establecimiento del cultivo de células en suspensión

En la figura 8 se muestra el establecimiento del cultivo de células en suspensión. Se partió con la inoculación de callos friables de *H. orizabae* (figura 8-A) en matraces con baffles laterales que contenían medio B5 líquido, adicionado con los fitorreguladores ANA y Zeatina (0.5 mg/mL) y 20 mL de AC /L⁻¹, figura 8-B. Por último, una vez que se observó la

disgregación completa de los callos, se transfirió a matraces Erlenmeyer, el cultivo de células en suspensión establecido se le denominó **Hup21** (figura 8-C).

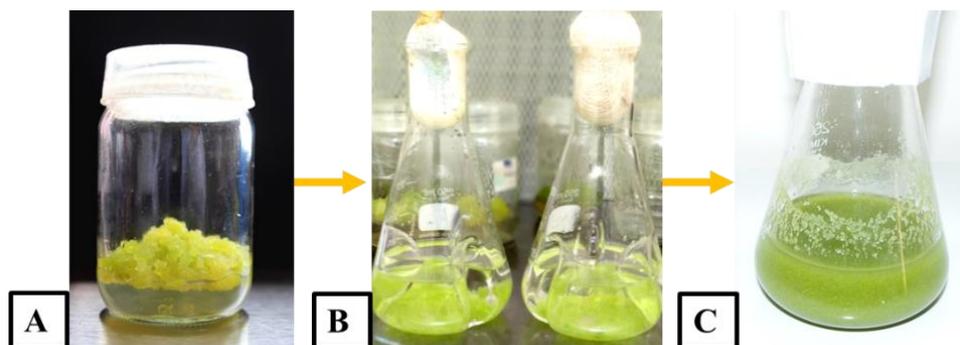


Figura 8. Establecimiento del cultivo células en suspensión. A) Callos de *H. orizabae*, B) Callos inoculados en matraces con tres baffles laterales, C) Cultivo de células en suspensión **Hup21** (30 días).

Una vez establecido el cultivo Hup21 se verificó que produjeran HupA. Para esto se resembró el cultivo para obtener biomasa y posteriormente se realizó extracción de alcaloides. Dichos extractos se analizaron por CLAE, utilizando los parámetros descritos en la metodología.

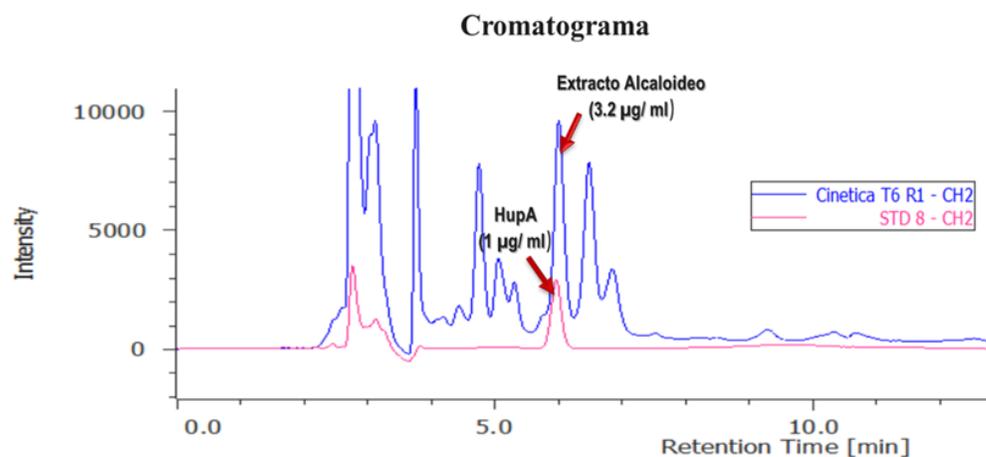


Figura 9. Perfil cromatográfico de HupA (rosa) (inyección de 10 µL de una solución a 1 µg/mL) y del extracto alcaloideo del cultivo Hup21(Azul) (inyección de 10 µL de una solución a 3.2 µg/mL). Fase móvil H₂O:CH₃CN (85:15), C-18, flujo de 1 mL/min, a 235 y 310 nm

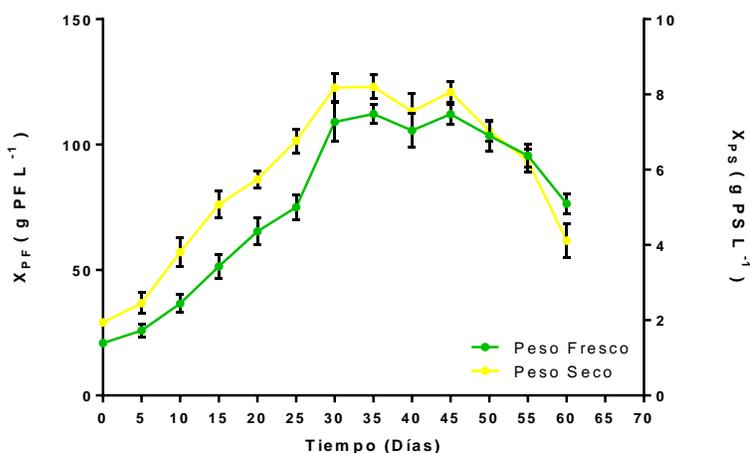
La **figura 9** muestra el perfil cromatográfico del extracto alcaloideo del cultivo Hup21 y del estándar de HupA, donde se observa la presencia de un pico que coincide con el mismo TR del estándar HupA. Esta evidencia permitió considerar que la línea Hup21 era capaz de producir HupA en niveles cuantificables y por lo tanto permitió continuar con el establecimiento de la cinética.

9.3.- Cinética del cultivo Hup21 en matraces de 250 mL

Una vez que se estableció el cultivo de células en suspensión Hup21 y que se verificó por medio de CLAE que produjera HupA, se realizó una cinética de crecimiento para saber cómo se comportaba el cultivo y comparar las diferencias en la producción de biomasa y de HupA a lo largo del tiempo. La cinética fue tipo lote, duró 60 días, se realizó en matraces de 250 mL, conteniendo 100 mL de medio B5. Las cosechas se realizaron cada 5 días y por cada punto se sacrificaron 3 matraces, en total la cinética tuvo un total de 13 puntos. Los cultivos se mantuvieron en luz continua ($25\mu\text{Mn}^{-2}\text{S}^{-1}$), con agitación constante a 100 rpm en una agitadora de orbital y a 25°C.

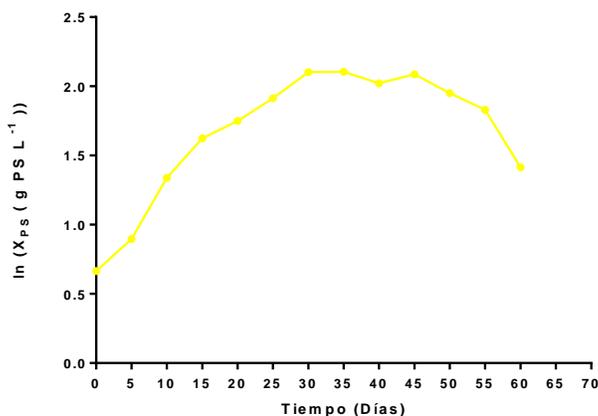
9.3.1.- Estudio cinético de crecimiento

En la **gráfica 3** se muestra las curvas de crecimiento obtenidas para PF y PS, las cuales presentan curvas sigmoideas típicas de una cinética, con una tendencia muy parecida para ambos parámetros.



Gráfica 3. Curvas de tiempo-concentración de la biomasa del cultivo Hup21 (cinética de 60 días). PF en verde y PS en amarillo

Se graficó el logaritmo natural (ln), de la biomasa (PS) contra el tiempo (**gráfica 4**), se puede observar que el cultivo Hup21 no presenta una fase de adaptación o fase lag, esto puede ser debido al estado fisiológico del inóculo, ya que las células en suspensión con las que se inocularon los matraces de la cinética fueron obtenidas de cultivos de 25 días, momento el que se encontraban en fase de crecimiento exponencial (Street, 1977, Szabados *et al.*, 1991). En esta fase, las células presentan su capacidad máxima de crecimiento, adaptándose fácilmente a las condiciones que apremia el cambio a un medio de cultivo fresco y rico en nutrientes (López C. *et al.*, 2017).

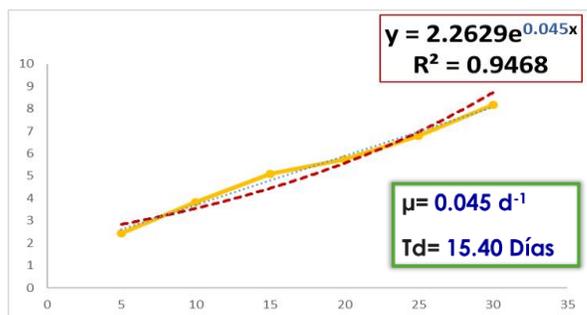


Gráfica 4. Crecimiento exponencial peso seco (PS) a lo largo de los 60 días del cultivo Hup21

El cultivo presentó una fase exponencial que va del día 5 al día 30, seguido de una fase estacionaria que va del día 30 al 45. Es precisamente en esta fase (día 35) donde se alcanza el mayor punto de producción de biomasa 8.2033 g PS/L⁻¹, lo que representó un incremento de 4.22 veces el tamaño del inóculo inicial. Así mismo, se presentan fluctuaciones en el PS de la biomasa, que puede ser debido a una descompensación del crecimiento por la falta de nutrientes en el medio. Por último, presenta una fase de muerte del día 45 al 60, en la cual cesa el crecimiento celular.

Se graficaron los valores de PS de la fase exponencial contra el tiempo y, mediante análisis de regresión, se obtuvo una línea de tendencia exponencial, cuya pendiente se determinó como la velocidad de crecimiento (μ) y con este dato se calculó el tiempo de duplicación (td), **gráfica 5**. El cultivo presentó una μ de 0.045 d⁻¹ y un td de 15.40 d⁻¹, datos

que difieren de otros cultivos de células en suspensión, ya que generalmente la μ oscila entre valores de 0.15 y 0.63 d^{-1} (Arias J., 2014). Esto podría atribuirse a que el cultivo proviene de un helecho y estas plantas superiores tienen un ciclo fenológico muy largo.



Gráfica 5. Ajuste de datos de PS de la fase exponencial del cultivo Hup21, μ y t_d

El cultivo presentó un índice de crecimiento (IC)=1.12, un rendimiento de producto (RP)=0.29 y un rendimiento de sustrato (RS)= 0.21

9.3.2.- Estudio cinético de viabilidad celular

La viabilidad celular la observamos con la técnica de diacetato de fluoresceína (DAF), observando al microscopio y expresando el porcentaje de número de células vivas. Las células presentes en el cultivo Hup21 forman microagregados (**figura 10 A-B**) y presentan una morfología esférica (**figura 10 C-D**). Estas formas se han 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).

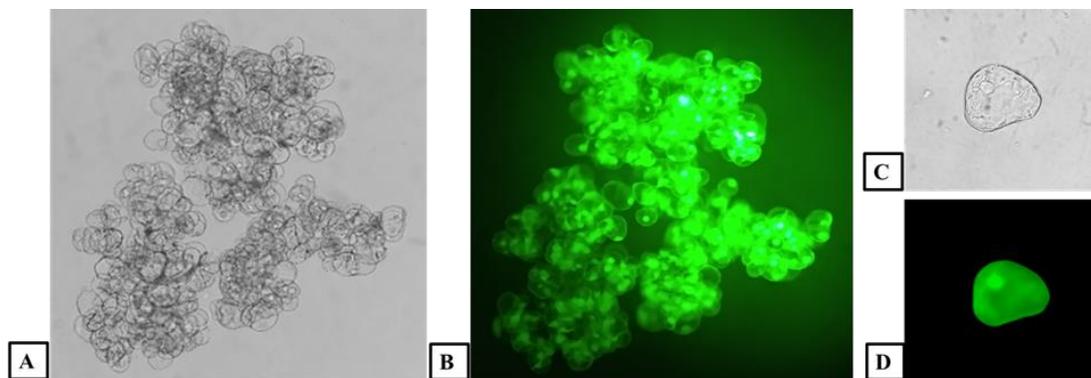
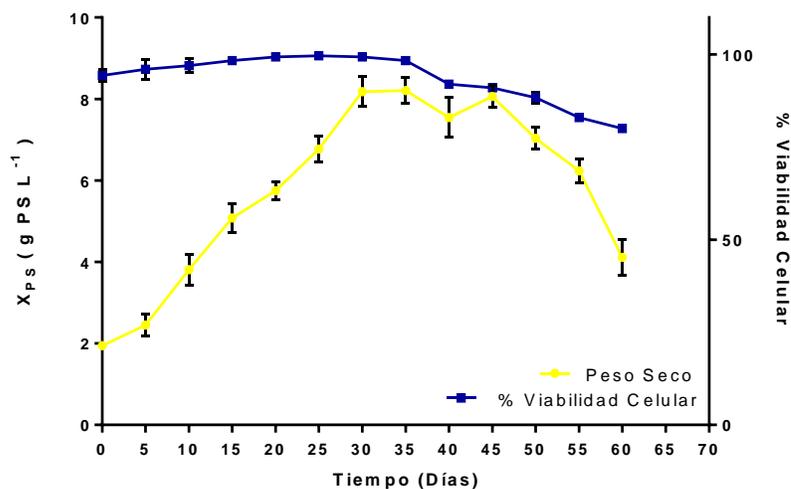


Figura 10. Viabilidad celular del cultivo Hup21 (Día 20). Microagregados celulares, en luz transmitida A, fluorescencia B (Objetivo 10X). Morfología esférica de las células, luz transmitida C, fluorescencia D (Objetivo 40X).

Las células en suspensión tienden a formar agregados de manera natural. 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 (Trejo-Tapia y Monroy-Rodríguez., 2007). Además, éstos generalmente promueven la organización celular y la diferenciación, que resulta en la mejora de la producción de metabolitos secundarios (Huang y McDonald, 2009).



Gráfica 6. Curvas de tiempo- concentración de células y % de viabilidad celular del cultivo Hup21

Medir la viabilidad celular de un cultivo es sumamente importante ya que proporciona información acerca del crecimiento del cultivo. En la **gráfica 6** se muestra la viabilidad del

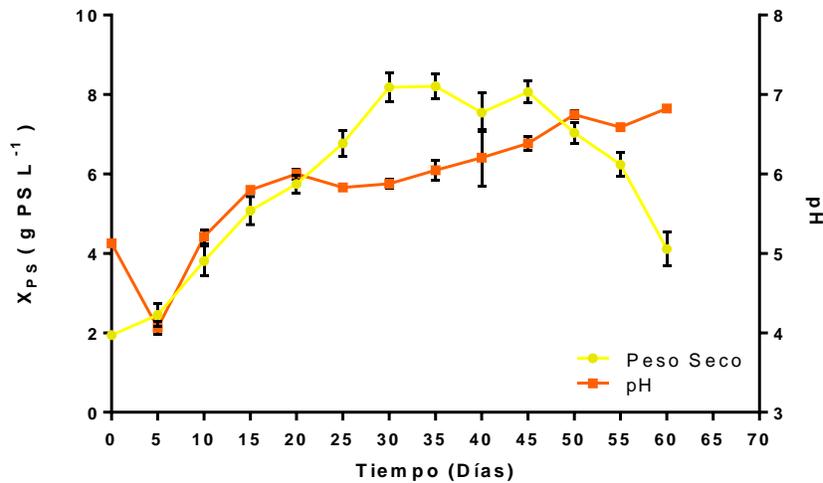
cultivo Hup21 durante la cinética. El cultivo inició con un 94 % de viabilidad, la cual fue incrementando conforme pasaba la fase exponencial, alcanzando el mayor porcentaje (99 %) al día 30 al término de la fase. La viabilidad decrece conforme pasaba la fase estacionaria, alcanzando su porcentaje más bajo (70%) al día 60. Esto a pesar de ser un cultivo que crece muy lento, presenta una buena viabilidad celular.

Para la línea transgénica C23 las células mostraron fluorescencia verde a los escasos segundos de ser observadas bajo el microscopio de epifluorescencia, indicando que estaban vivas, (figura 15 a, b). Al día 12 la viabilidad celular también fue del 90% y en la etapa de crecimiento exponencial se visualizaron células que se encontraban en división celular (figura 15b).

9.3.3.- Estudio cinético del pH en el medio de cultivo

El pH es la medida de la concentración de iones hidronio [H^+] en el cultivo *in vitro* vegetal, que usualmente se ajusta entre 5 y 6 (McDonald y Jackman, 1989). En el medio líquido B5, que se utilizó para el cultivo Hup21, se ajustó el pH a 5.5 antes de esterilizarlo.

Se midió el pH presente en el medio de cultivo (**gráfica 7**) en cada punto de la cinética y se comparó con el PS. Se puede observar que al día 0 éste tuvo un pH 5.12, cercano al que se ajusta el medio, sin embargo, decreció a 4.06 en el día 5, alcanzando el valor más bajo, y de este día hasta el día 60 se incrementó periódicamente, alcanzando su valor máximo al día 60 (pH 6.82). La concentración de iones de hidrógeno (pH) en el medio cambia durante el desarrollo del cultivo, ya que los tejidos vegetales tienden a acidificar ligeramente el medio de cultivo en las primeras horas, debido a la asimilación del amoníaco que provoca que baje el pH; posteriormente, cuando los nitratos son consumidos, el pH incrementa durante la absorción de nitrato (Caspeta L., 2004).

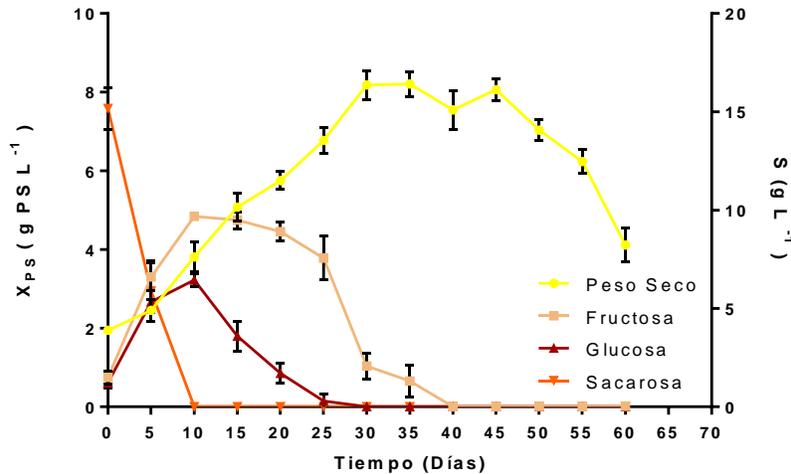


Gráfica 7. Curvas de tiempo-concentración de células y pH del cultivo Hup21

9.3.4.- Estudio cinético del consumo de azúcares en el medio de cultivo

Con ayuda de las curvas de calibración de los azúcares se procedió realizar la cuantificación del consumo de carbohidratos en el medio del cultivo Hup21, durante cada punto de la cinética. En la **gráfica 8** se muestra la comparación entre el PS y el patrón del consumo de sacarosa, glucosa y fructosa.

Las enzimas invertasas presentes en la pared de células vegetales son las responsables de hidrolizar la sacarosa en dos monosacáridos, fructosa y glucosa (Caspeta L., 2004). Inicialmente al medio se le agregan 20 g de sacarosa comercial como fuente de carbono, por lo que se esperaba que al día cero la concentración de este azúcar oscilara en los 20 g/L⁻¹, sin embargo, su concentración fue de 14.72 g/L⁻¹. Esto es debido a que la sacarosa tiene una naturaleza lábil al calor y se puede descomponer en gran medida en D-glucosa y D-fructosa después del autoclaveado (Wang J *et al.*, 2017). Lo anterior se corrobora ya que al día 0 hubo 1.22 g/L⁻¹ de glucosa y 1.49 g/L⁻¹ de fructosa, con una suma total de los tres azúcares de 17.45 g/L⁻¹. No se alcanzaron los 20 g/L⁻¹ de sustrato, que también puede ser explicado debido al grado de pureza el azúcar refinado, así como aun grado de hidratación (Castillo C., 2006).



Gráfica 8. Curvas de tiempo- concentración de células y consumo de azúcares del cultivo Hup21

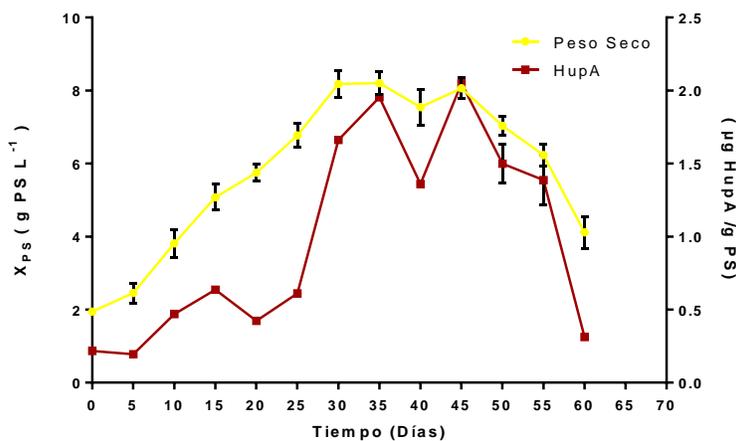
El consumo de carbohidratos en el cultivo de células en suspensión Hup21 estuvo asociada al incremento en la biomasa celular. La sacarosa se hidrolizó completamente al día 10 (0 g/L⁻¹), esta degradación enzimática se observó de forma temprana durante el cultivo y se correlaciona con un incremento en la concentración de los monosacáridos, glucosa (6.43 g/L⁻¹) y fructosa (9.67 g/L⁻¹). 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 y ha sido reportado por Caspeta, 2004 y Ramos, 2019. Sin embargo, el crecimiento del cultivo dependió en parte de la fructosa, ya que la glucosa llegó a su nivel más bajo el día 25 (0.29 g/L⁻¹) y fue hasta el día 30 cuando la célula alcanzó su fase estacionaria. La fructosa se consumió completamente al día 40 (0.02 g/L⁻¹), cuando el cultivo alcanzó su fase estacionaria y ya no se presentó crecimiento, lo cual es normal ya que al agotarse la fuente de carbono el crecimiento celular cesa y posteriormente hay muerte celular. Sin embargo, del día 40 al día 45 el PS se incrementó levemente, de 7.02 a 8.12 g PS/L⁻¹. Lo anterior podría deberse a que las células, al pensar una disminución en la fuente de carbono, podrían disminuir su metabolismo secundario para dar prioridad a su metabolismo primario y poder sobrevivir. El cultivo tuvo un rendimiento de biomasa (0.36 g B/g S) y la sacarosa se consumió con una velocidad (Qs) de (0.12 g B/g S d⁻¹).

En trabajos posteriores, sería conveniente realizar experimentos proporcionando diferentes fuentes de carbono como sustrato y variar la concentración de éstas en un rango de 15 a 30 g, ya que reportes en la literatura relacionan un incremento en la fuente de carbono con un mayor crecimiento del cultivo celular (Chiou *et al.*, 2001).

9.4.5.- Estudio cinético de la producción de HupA

Con los datos arrojados en los perfiles cromatográficos de los extractos alcaloideos del cultivo Hup21 y utilizando una curva de calibración de HupA, se cuantificó el contenido de dicho alcaloide en cada punto de la cinética. Se promediaron los valores de cada punto y se sacaron la media y desviación estándar. Los resultados fueron graficados y comparados con el peso seco (PS), **gráfica 10**.

La producción de HupA durante el tiempo en cultivo varió entre 0,42 $\mu\text{g/g PS}$ (día 0) y 2.03 $\mu\text{g/g PS}$ (día 45), donde alcanzó su producción máxima, es decir la producción de HupA tuvo un incremento 4.83 veces en el día 45 la cinética.



Gráfica 8. Curvas de tiempo-concentración de células y rendimiento de HupA del cultivo Hup21

HupA es un metabolito asociado al crecimiento, ya que conforme incrementa la biomasa hay un aumento de éste; y cuando llega a la fase estacionaria su producción empieza a

decaer, aunque fluctúa y su valor máximo de producción fue al día 45 (dentro de la fase estacionaria). A pesar de que se sabe que los metabolitos asociados al crecimiento mantienen su producción en la fase estacionaria, ya que no se degradan, para HupA en el cultivo Hup21, éste decayó. Este hecho podría ser debido a que el alcaloide pudiera estar se excretando al medio de cultivo. Por esta razón para posteriores cinéticas sería interesante realizar la extracción de alcaloides al medio líquido por cada punto de la cinética, para corroborar si se encuentra HupA en cantidades apreciables, y de ser así, determinar si este se excreta al medio todo el tiempo o sólo en algunas fases del crecimiento.

La producción de HupA en el cultivo Hup21 fue relativamente baja (2.03 μg), sin embargo, comparado con otros trabajos donde se busca la producción de HupA a partir del cultivo de hongos endófitos (producción de HupA 1 $\mu\text{g/gPS}$ de micelio, Shu *et al.*, 2014), en el cultivo Hup21 la producción de HupA fue 2.03 veces mayor. Lo mismo ocurre con el cultivo de callos (M57) del cual se partió para establecer el cultivo Hup21 (donde se produce 0.53 $\mu\text{g/g PS}$), siendo que para el cultivo Hup21 la producción fue **3.83** veces mayor (Soto y Rodriguez, 2016). En la **tabla 9** se muestran los parámetros cinéticos, los rendimientos de producto, los rendimientos de biomasa así como la productividad del cultivo Hup21. El cultivo tuvo un rendimiento de producto (0.093 $\mu\text{g HupA/g S}$) y una productividad de (0.012 $\mu\text{ HupA/g B d}^{-1}$).

Planta/ Cultivo	Escala	Biomasa		Velocidad de crecimiento (μ)	Tiempo de duplicación (td)	Y X/S (g B/g S)	RP ($\mu\text{ HupA/g S}$)	Qs (g S/g B d ⁻¹)	Productividad (g $\mu\text{ HupA/g B d}^{-1}$)
<i>H. orizabae</i> Cultivo Hup21	Matraz	B _i	1.94 g PS/L ⁻¹	0.045 d ⁻¹	15.40 días	0.36	0.093	0.12	0.012
		B _m	8.20 g PS/L ⁻¹						

Tabla 9. Para metros cinéticos del cultivo Hup21

Se logró exitosamente el objetivo de establecimiento del cultivo Hup21 y la producción estable de HupA. Sin embargo, comparanda con la producción de HupA con tejido de frondes del helecho *H. orizabae* que es de 265 $\mu\text{g/g PS}$, la producción es baja. Por lo que el presente trabajo de investigación abre las puertas para el desarrollo de otros proyectos de investigación, siendo uno de ellos buscar estrategias para aumentar la

producción de Hup A. En este sentido, se realizó el escalamiento del cultivo Hup21 a un biorreactor *airlift* de 2L para incrementar la producción de HupA.

9.5.- Escalamiento del cultivo Hup21 a biorreactor *airlift* de 2L

Se realizó el escalamineto del cultivo Hup21 de matraz a biorreactor *airlift* de 2L con la finalidad de aumentar la producción de HupA, partiendo de un inóculo de 10 % (m/v). Se realizaron 2 cinéticas de 20 días y se midieron los mismos parámetros que en la cinética en matraz. La **figura 11** muestra el crecimiento del cultivo Hup21, en el biorreactor *airlift* 2L a lo largo de 20 días de cultivo.

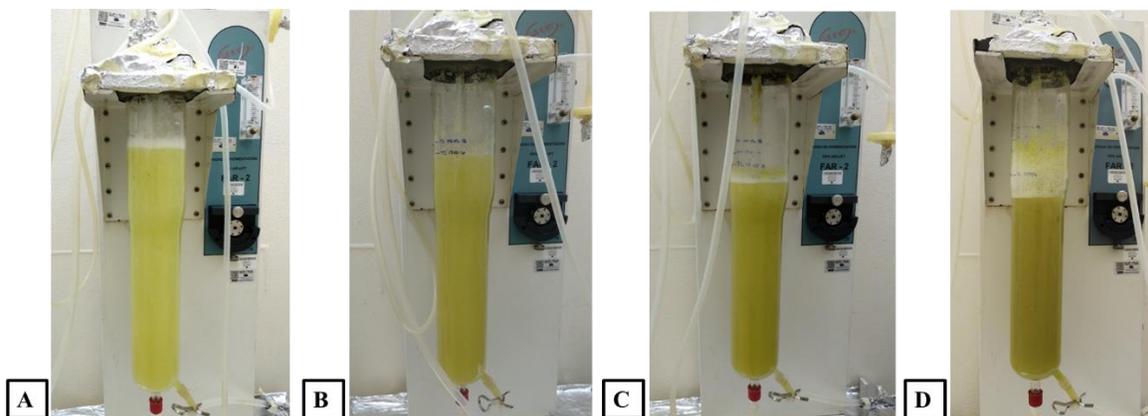
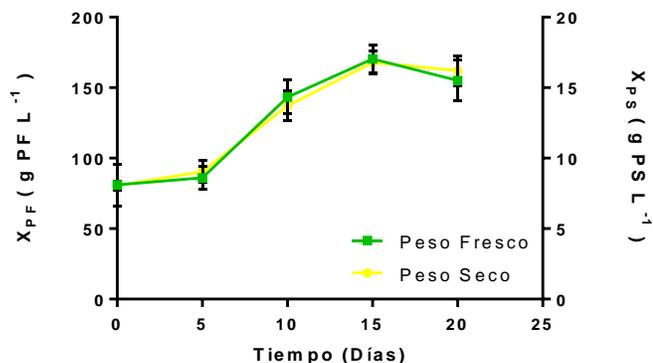


Figura 11. Escalamiento de cultivo Hup21 a biorreactor *airlift* de 2L. A) día 0, B) día 10, C) día 15, D) día 20

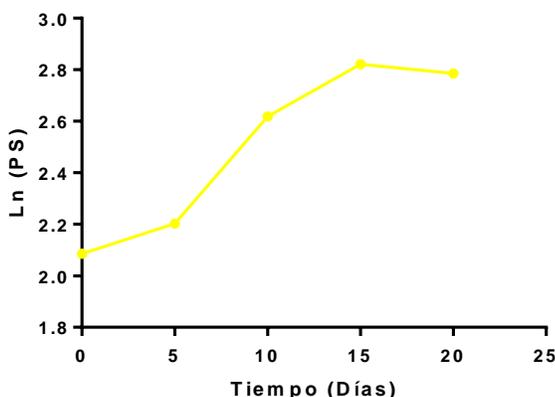
9.5.1.- Estudio cinético del crecimiento

Se graficaron el PF y PS obtenido durante la cinética del biorreactor, **gráfica 11**. Se observa que las dos curvas presentan curvas sigmoideas típicas de una cinética, con una tendencia muy parecida para ambos parámetros.



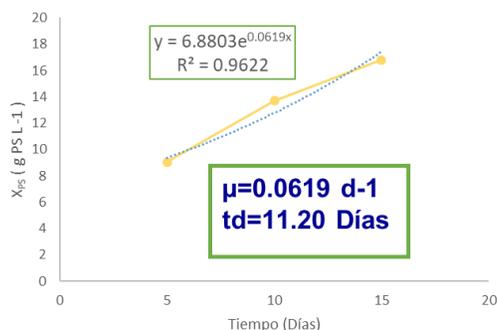
Gráfica 9. Curvas de tiempo-concentración del cultivo Hup21 en biorreactor *airlift* de 2L. Cinética de 20 días, PF en verde y PS en amarillo

La **gráfica 11** muestra los logaritmos (Ln) de la biomasa (PS) de las células obtenidos en el biorreactor. El cultivo presentó una fase lag de 5 días, una fase de crecimiento exponencial de 10 días que fue del día 5 al 15 y finalmente una fase estacionaria del día 15 al 20. Al final de la fase exponencial (día 15) se alcanza el mayor punto de producción de biomasa (16.70 g PS/L⁻¹), lo que represento de 2.08 veces el tamaño del inóculo inicial. Interesantemente el PS obtenido es 2.03 veces más que en matraz (8.2033 g PS/L⁻¹) y se obtuvo un lapso de tiempo más corto (15 días), en lugar de 35 (matraz).



Gráfica 10. Crecimiento exponencial del peso seco (PS), del cultivo Hup21. Cinética de 20 días

En la **gráfica 12** se muestran los datos de la fase de crecimiento exponencial, los cuales se ajustaron a una línea de tendencia exponencial. Con dichos datos se obtuvo la μ y el t_d , que indican la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación, respectivamente.



Gráfica 11. Ajuste de datos de PS de la fase exponencial del cultivo Hup21, μ y t_d

El cultivo Hup21 en biorreactor presentó una μ de 0.0619 y un t_d de 11.20 días. Estos se correlacionan con los datos de la producción de PS. La μ (0.045 en matraz de 250 mL) aumento y por tanto disminuyó la velocidad de crecimiento de 15.40 d^{-1} (matraz de 250 mL) a 11.20 d^{-1} en su escalamiento a biorreactor. Estos resultados son de gran valor, siendo los primeros reportados para un cultivo de helechos y, además, aunado al hecho de una mayor producción de biomasa (16.70 g PS/L⁻¹) y que comparado con el cultivo en matraz fue 2.33 veces más rápido, hacen de este escalamiento un modelo rentable para la producción de HupA en el cultivo Hup21.

9.5.2.- Estudio cinético de viabilidad celular

Las células crecidas en el biorreactor *airlift* de 2L tienden a formar microagregados celulares y presentan una morfología esférica al igual que en su cultivo en matraz, **figura 12**.

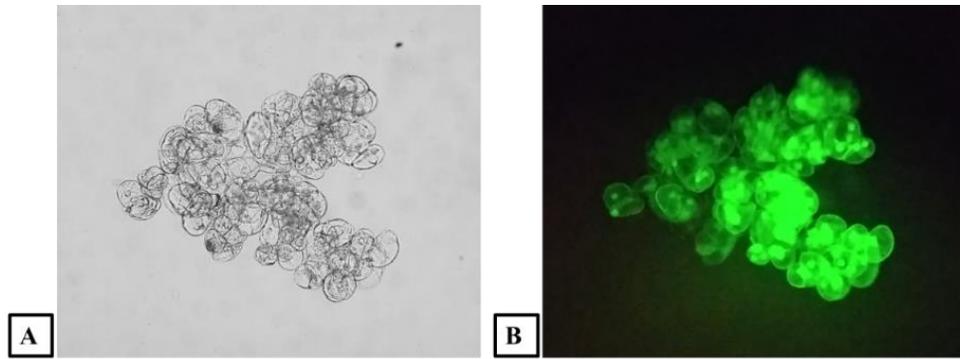
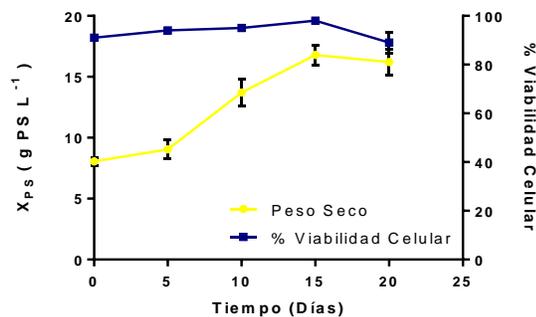


Figura 12. Viabilidad celular del cultivo Hup21 en su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L (Día 5). Microagregados celulares, en luz transmitida A, fluorescencia B (Objetivo 10X).

Sé graficó el porcentaje de viabilidad celular del cultivo y se compararon los datos con el PS, **gráfica 13.**

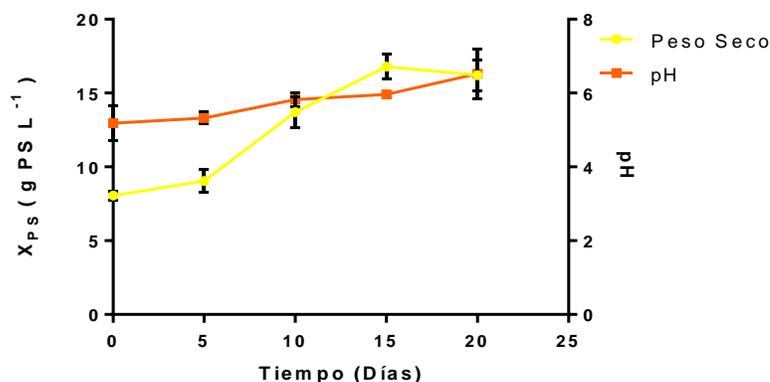


Gráfica 12. Curvas de tiempo- concentración de células y % de viabilidad celular del cultivo Hup21

El cultivo presentó una viabilidad celular similar a la que se dio en su cultivo en matraz. Inició con un 91% de viabilidad, la cual subió durante la fase exponencial, para alcanzar su valor máximo al día 15 (98.5 %), decreció en la de la fase estacionaria. Sin embargo, no se alcanza a observar valores muy bajos de viabilidad, debido a que el tiempo de cinética fue corto y si bien, se visualiza una fase estacionaria, esta podría ser más larga si la cinética hubiese durado más tiempo. En posteriores cinéticas podría plantearse el uso de un cultivo continuo, para mantener la producción de biomasa durante periodos de tiempo prolongados.

9.5.3.- Registro de pH en el medio de cultivo

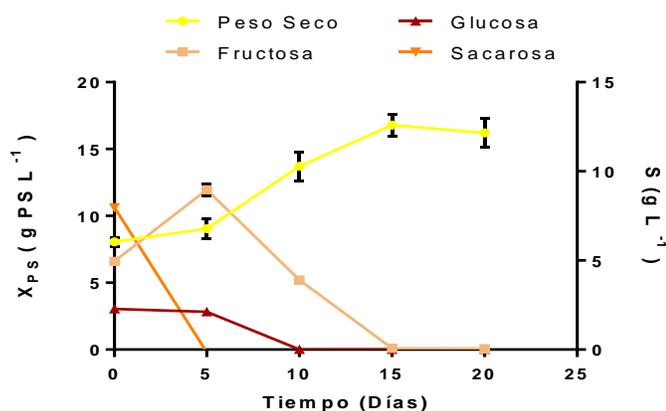
Se graficaron también los datos de pesos seco (PS) en función de las variaciones de pH. El pH inició con valor de 5.18, a partir de este día hasta el final de la cinética incremento paulatinamente hasta alcanzar su valor máximo de 6.52 al día 20, que como se ha mencionado anteriormente se debe a la asimilación de nitratos durante el crecimiento celular.



Gráfica 13. Curvas de tiempo-concentración de células y pH del cultivo Hup21

9.5.4.- Estudio cinético del consumo de azúcares en el medio de cultivo

Con el fin de tener un estudio más completo del crecimiento del cultivo Hup21 en biorreactor, se midió el consumo de azúcares durante la cinética, **gráfica 16**.



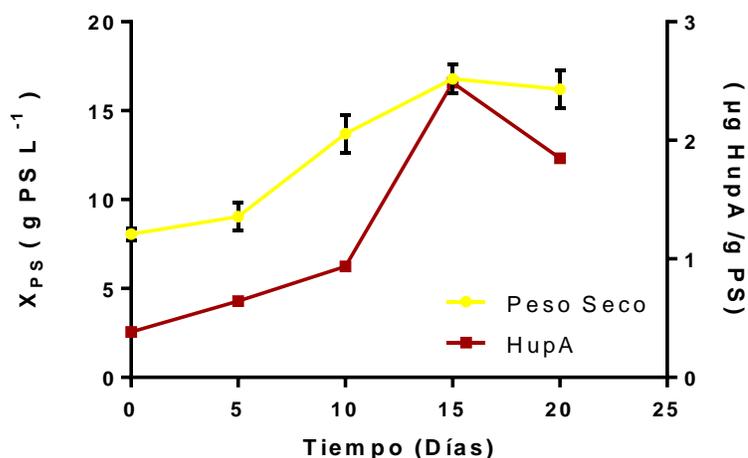
Gráfica 14. Curvas de tiempo- concentración de células y consumo de azúcares del cultivo Hup21

El consumo de carbohidratos en el cultivo de células en suspensión Hup21 en su escalamiento a biorreactor airlift de 2L estuvo asociada al incremento en la biomasa celular. La sacarosa se hidrolizó completamente al día 5, lo que se correlaciona con la máxima concentración en este día de la glucosa (2.28 g/L^{-1}) y la fructosa (8.96 g/L^{-1}). La glucosa se consumió completamente al día 10 y la fructosa al día 15, que coincide con el inicio de la fase de muerte. El cultivo tuvo un rendimiento de biomasa (0.71 g B/g S) y la sacarosa se consumió con una velocidad de consumo (Q_s) de ($0.09 \text{ g B/g S d}^{-1}$).

La sacarosa es la fuente de carbono de uso común en los cultivos vegetales, debido al transporte eficiente de la misma a través de la membrana plasmática, y su utilización mediante la intervención de invertasas de pared celular y citoplasmicas que la catalizan a sus unidades monoméricas (glucosa y fructosa) constitutivas (Borkowska y Szczebra, 1991; Náder, 2004). El perfil de consumo de sacarosa obtenido en el cultivo Hup21 en su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L, es similar al de matraz; no obstante, su hidrólisis completa ocurre al día 5 y en matraz al día 10, esto puede deberse a que en biorreactor los cultivos tienden a asimilar más rápido el consumo de nutrientes. El patrón en el consumo de glucosa y fructosa presentó un perfil similar al cultivo en matraz, consumiéndose preferencialmente glucosa sobre fructosa, patrón que se presenta generalmente en el cultivo de células en suspensión, Caspeta, 2004 y Ramos, 2019. Al igual que en cultivo en matraz las concentraciones máximas de glucosa y fructosa se alcanzan cuando la sacarosa se hidroliza completamente. La fructosa se consumió completamente al día 15 (0.05 g /L^{-1}), cuando el cultivo alcanzó su fase estacionaria y ya no se presentó crecimiento, debido a que al agotarse la fuente de carbono el crecimiento celular cesa y posteriormente hay muerte celular.

9.5.5.- Estudio cinético de la producción de HupA

La **gráfica 17** muestra la producción de HupA en la cinética establecida en el biorreactor *airlift* de 2 L.



Gráfica 15. Curvas de tiempo-concentración de células y rendimiento de HupA del cultivo Hup21

La producción de HupA en el cultivo Hup21 en la cinética en biorreactor *airlift* presentó una tendencia similar a la producción de este alcaloide en la cinética establecida en matraz. En esta cinética se puede corroborar que HupA es un metabolito asociado al crecimiento, ya que incrementó su producción a medida que el cultivo creció.

La producción de HupA obtenida en el cultivo Hup21 crecido en matraz (2.03 µg/g PS) y el sistema en biorreactor (2.48 µg/g PS), incremento 3 veces más que en el cultivo callos (0.53 µg/g PS). Sin embargo, para incrementar aún más su producción en trabajos futuros podrías realizarse estudios de elicitación con metiljasmonato, que ha sido utilizado para elicitar y, por tanto, incrementar la producción de alcaloides en suspensiones celulares (Yukimune *et al.*, 1996). En este mismo sentido, sería importante la adición de los precursores aminoácidos que participan en la biosíntesis del alcaloide de interés, que para el caso de HupA sería el aminoácido lisina, cambiar niveles de sacarosa, fosfato y nitratos para mejorar los niveles de producción (Rao y Ravishankarb, 2002) de HupA.

En la **tabla 10** se muestran los parámetros cinéticos, rendimientos de producto (HupA), rendimiento de biomasa, así como la productividad comparados con los datos obtenidos en su crecimiento en matraz de 250 mL. El cultivo tuvo un rendimiento de producto ($0.17 \mu\text{g HupA/g S}$) y una productividad de ($0.015 \mu\text{ HupA/g B d}^{-1}$).

Planta/ Cultivo	Escala	Biomasa		Velocidad de crecimiento (μ)	Tiempo de duplicación (td)	Y X/S (g B/g S)	RP ($\mu\text{ HupA/g S}$)	Qs (g S/g B d ⁻¹)	Productividad (g P/g B d ⁻¹)
		B _i	B _m						
<i>H. orizabae</i> / Cultivo Hup21	Matraz	B _i	1.94 g PS/L ⁻¹	0.045 d ⁻¹	15.40 días	0.36	0.093	0.12	0.012
		B _m	8.20 g PS/L ⁻¹						
<i>H. orizabae</i> / Cultivo Hup21	Biorreactor <i>airlift</i> 2L	B _i	8.05 g PS/L ⁻¹	0.0619 d ⁻¹	11.20 días	0.71	0.17	0.09	0.015
		B _m	16.80 g PS/L ⁻¹						

Tabla 10. Parámetros cinéticos del cultivo Hup21 en su escalamiento a biorreactor airlift de 2L y matraz de 250 mL

Comparando los datos de la tabla 10, el cultivo Hup21 en su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L, tuvo un rendimiento de biomasa, un rendimiento de producto y una productividad mayor que el cultivo crecido en matraz de 250 mL. Por lo tanto, el cultivo en su escalamiento a biorreactor airlift presenta hasta el momento un proceso más rentable para la producción de HupA que el cultivo en matraz de 250 mL. No obstante, en trabajos futuros sería importante realia para incrementar la producción de HupA secundarios sería interesante realizar variaciones en el formato del proceso, como puede ser un cultivo alimentado, de tal manera que se incremente la producción de biomasa y por ende la producción de HupA.

En los perfiles cromatográficos de los extractos alcaloideos obtenidos de biomasa del cultivo Hup21, crecido tanto a nivel matraz como biorreactor, se observó la presencia de otros compuestos que llegan a ser inclusivamente de mayor área que los de HupA. Al ser este un extracto alcaloideo, se estaría en la presencia de otros alcaloides, que en posteriores trabajos sería interesante estudiar. Estos alcaloides posiblemente pertenezcan a la clase Licopodiales, que es a la que se incluye HupA, lo que abre la posibilidad de encontrar precursores de HupA o moléculas derivadas que podrían presentar actividad inhibitoria de la AChE relevante.

9.6.- Resultados anexos

9.6.1.- Determinación de HupA por cromatografía en capa fina

Con el fin de determinar si HupA estaba presente en los extractos alcaloideos obtenidos a partir de cultivos de callos, del cultivo de células en suspensión Hup21 en matraz y el obtenido de biorreactor se realizaron placas de cromatografía en capa fina en un equipo semiautomatizado (CAMAG). Las placas cromatográficas se revelaron con la fase CHCl₃:CH₄OH:H₂O en una proporción (120:20:2), con reactivo de yodo, y se visualizaron en luz transmitida la **figura (A)**, 254 nm **figura (B)**, 366 nm **figura (C)**. En la primera y última columna se aplicó el estándar de HupA que es la mancha tenue con un (Rf=0.43). Como se puede apreciar las muestras M1(Extracto de callos), M3(Extracto del cultivo Hup21), M4 (Extracto del cultivo Hup21 crecido en biorreactor), se detectó la presencia de unos compuestos muy cercanos a HupA (Rf=0.44). Además, se revelo la presencia de otros alcaloides de polaridad más baja y más alta a HupA, lo que abre una a futuros trabajos para aislar y purificar dichos compuestos, así como para probar su actividad inhibitoria de la AChE.

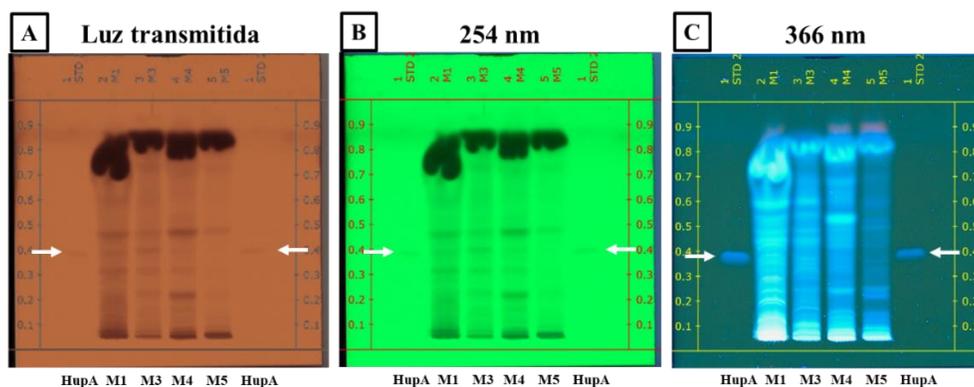
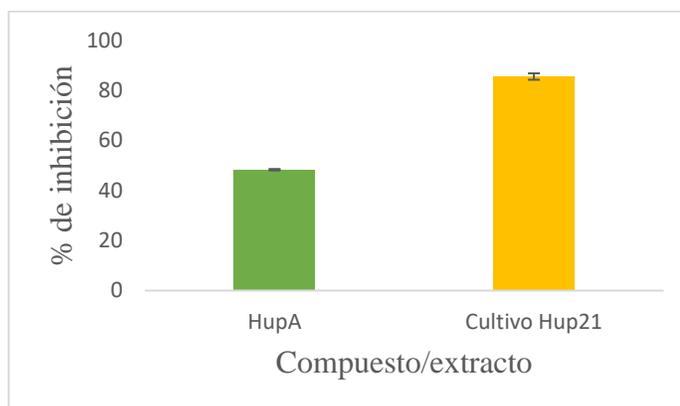


Figura 13. Cromatografía en capa fina de extractos alcaloideos del cultivo Hup21. Carriles laterales (HupA-Rf=0.43), carriles centrales M1(Extracto de callos), M3(Extracto del cultivo Hup21), M4 (Extracto del cultivo Hup21 crecido en biorreactor). Fase CHCl₃:CH₄OH:H₂O en una proporción (120:20:2). Revelado con Yodo, sistema semiautomatizado CAMAG

9.6.2.- Actividad inhibitoria de la AChE *in vitro*

Debido a los resultados obtenidos CCF y CLAE que revelaron la posible presencia de HupA, así como otros alcaloideos en los extractos de los cultivos se decidió realizar un ensayo de inhibición de la AChE al extracto perteneciente al cultivo de células en suspensión

Hup21. Se probó la concentración de 100 µg/mL y como control positivo se utilizó HupA a 0.16 µg/mL. Los resultados se muestran en la **gráfica 18**, el control positivo (HupA) tuvo una inhibición del 48.3% ± 0.28 y el extracto del cultivo Hup21 una inhibición del 85.6 % ± 1.27.



Gráfica 16. Actividad inhibitoria de la AChE, de extracto alcaloideo del cultivo Hup21

Tomando en cuenta el extracto alcaloideo del cultivo Hup21 pertenece a un cultivo *in vitro* y no un extracto puro de material vegetal, presenta una alta actividad inhibitoria de la AChE, Además, en comparación con actividades inhibitorias de otros extractos alcaloideos probados a la misma concentración que el extracto alcaloide del cultivo Hup21 (100µg/mL) de plantas que se utilizan para tratar la EA presenta un porcentaje de inhibición más alto, **tabla 8**. Los resultados obtenidos, dan pauta para realizar ensayos de actividad inhibitoria *in vivo*.

Especie	Tejido/Cultivo	% (actividad inhibitoria de la AChE)-100 µg/mL	Cita
<i>Huperzia orizabae</i>	Cultivo de células en suspensión Hup21	85.6 ± 1.27	Pérez, 2019
<i>Unacaria rhynchophylla</i>	Tallo	78.4	CHEN et al., 2016
<i>Nelumbo nucifera</i>	Hojas	76.5	
<i>Portulaca oleracea</i>	Tallo	74.2	
<i>Zingiber officinale</i>	Raíz	60.5	
<i>Camelia sinensis</i>	Hojas	40.2	
<i>Curcuma longa</i>	Raíz	35.8	
<i>Allium sativum</i>	Bulbos	33.8	
<i>Lobelia chinensis</i>	Planta completa	28.2	
<i>Areca catechu</i>	Fruto	19.3	

Tabla 11. Datos comparativos de la actividad inhibitoria del extracto alcaloideo de Hup21 y extractos de plantas (100 µg/mL) utilizadas para el tratamiento de EA

X. - CONCLUSIONES

Se estableció el cultivo de células en suspensión Hup21 en matraz de 250 mL, que constituye uno de los primeros reportes en el establecimiento *in vitro* de células en suspensión perteneciente a la familia Huperziaceae.

Se caracterizó por primera vez una cinética de crecimiento de células en suspensión (Hup21) a nivel matraz de 250 mL perteneciente a un licopodio de la familia Huperziaceae.

El rendimiento de biomasa y producción de HupA en el cultivo Hup21 a nivel matraz de 250 mL presentó valores máximos de biomasa de 8.20 g PS/L⁻¹ al día 35 (4.2 veces más que el inoculo inicial), y de producción de HupA de 2.03 μg/g PS al día 45 (9.22 veces más que su producción al día 0).

El cultivo Hup21 a nivel matraz de 250 mL tiene una velocidad específica de crecimiento a nivel matraz de 0.045 d⁻¹ y tiempo de duplicación de 15.40 días.

El cultivo Hup21 crecido en matraz de 250 mL tuvo un rendimiento de biomasa (0.36 g B/g S), la sacarosa se consumió con una velocidad (Qs) de (0.12 g B/g S d⁻¹), su rendimiento de producto fue de (0.093 μg HupA/g S) y una productividad de (0.012 μ HupA/g B d⁻¹).

Se escaló a biorreactor *airlift* de 2L por primera vez un cultivo de células en suspensión (Hup21), perteneciente a la familia Huperziaceae.

El rendimiento de biomasa y producción de HupA en su escalamiento a biorreactor presento valores máximos de biomasa de 16.80 g PS/L-1 al día 15 (2.09 veces más que el inoculo inicial), y de producción de HupA de 2.48 μg/g PS (6.53 veces más que su producción al día 0).

En su escala biorreactor *airlift* de 2L presento una velocidad de crecimiento específica de 0.619 d⁻¹ y un tiempo de duplicación de 11.20 días.

El cultivo Hup21 en su escalamiento a biorreactor *airlift* tuvo un rendimiento de biomasa (0.71 g B/g S), la sacarosa se consumió con una velocidad de consumo (Qs) de (0.09 g B/g S d⁻¹), su rendimiento de producto fue de (0.17 μg HupA/g S) y una productividad de (0.015 μ HupA/g B d⁻¹).

La producción de HupA en el cultivo Hup21 fue 2.83 veces más (matraz) y 4.67 veces mayor (biorreactor *airlift*), comparado lo reportado por Soto y Rodríguez en el 2016 para el cultivo de callos (**tabla 12**).

Especie	Tejido/Cultivo	Hup A (µg/g PS)	Autores
<i>H. orizabae</i>	Frondes	265	Rodríguez y Soto, 2016
<i>H. orizabae</i>	Callo M15	0.53	Rodríguez y Soto, 2016
<i>H. orizabae</i>	Callo M57	0.28	Rodríguez y Soto, 2016
<i>H. orizabae</i>	Cultivo Hup21 (Matraz)	2.03	Pérez, 2019
<i>H. orizabae</i>	Cultivo Hup21 (Biorreactor <i>airlift</i> 2L)	2.48	Pérez , 2019

Tabla 12. Datos comparativos de la producción de HupA, en callos de *H. orizabae* y el cultivo 21

Se probó la actividad inhibitoria de la AChE del cultivo Hup21 que fue del 85.6 % ± 1.27. Se detectó la presencia de otros compuestos en los extractos alcaloideos del cultivo Hup21, por lo que se abre una puerta para el aislamiento e identificación de estos compuestos que posiblemente presenten actividad anticolinesterasa.

11. PERSPECTIVAS

Realizar réplicas de la cinética en biorreactor *airlift*, para corroborar los datos obtenidos y aumentar el tiempo de la cinética.

Siendo HupA un metabolito asociado al crecimiento se recomienda optimizar las condiciones de cultivo Hup21 para mejorar la producción de biomasa y, por tanto, el rendimiento de HupA, variando la concentración de la fuente de carbono, nitratos y fosfatos. Así como el diseño de experimentos para estudiar el efecto de elicitores, y adición del precursor aminoácido (lisina).

Una vez optimizando las condiciones de crecimiento del cultivo se recomienda el escalamiento a biorreactor *airlift* de 10L.

Realizar réplicas de ensayos de inhibición de la AChE *in vivo*, a los extractos alcaloideos de las células en suspensión Hup21 a concentraciones de 75 y 125 $\mu\text{g/mL}$ para sacar el IC_{50} . Y posteriormente realizar ensayos *in vitro* de la actividad inhibitoria de la AChE.

12. - BIBLIOGRAFIA

- Akram, M., & Nawaz, A. (2017). Effects of medicinal plants on Alzheimer's disease and memory deficits. *Neural regeneration research*, 12(4), 660.
- Alzheimer's Association. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 12(4), 459-509.
- ALZHEIMER'S SOCIETY, 2015, *Types of Dementia* [Online] (disponible en: <http://www.alzheimers.org.uk/site/Scripts/documents.php?categoryID=200362>) (Accedido el 15 Mayo, 2019).
- Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A., & Tennstedt, A. (1983). Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's disease. *Acta neuropathologica*, 61(2), 101-108.
- ARIAS, M., AGUIRRE, A., ANGARITA, M., MONTOYA, C., & RESTREPO, J. (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*, 76(157), 109-121.
- 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).
- Barinaga, M. (1995). New Alzheimer's gene found. *Science*, 268(5219), 1845-1847.
- Bartus, R. T., & Emerich, D. F. (1999). Cholinergic markers in Alzheimer disease. *Jama*, 282(23), 2208-2209.

- Barreiro E. J., Fraga C. A. M. (2001). Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, 1ª ed., Ed. Artmed: Porto Alegre.
- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 23(4), 213-227.
- Berg, L., McKeel, D. W., Miller, J. P., Baty, J., & Morris, J. C. (1993). Neuropathological indexes of Alzheimer's disease in demented and nondemented persons aged 80 years and older. *Archives of Neurology*, 50(4), 349-358.
- Bidwell, R. G. S. (1979). Fisiología vegetal. 1ª. Edición. AGT Editor, SA México DF.
- Bierer, L. M., Hof, P. R., Purohit, D. P., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K. L., & Perl, D. P. (1995). Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Archives of neurology*, 52(1), 81-88.
- Calva Calva, G., & Pérez Vargas, J. (2017). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Trayectos*.
- Caspeta Guadarrama, L. (2004). Escalamiento de raíces transformadas de la especie *Galphimia glauca* en un biorreactor *Airlift* modificado. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Castillo Lormendez, C. (2006). Producción de saponinas antifúngicas en biorreactores tipo *Airlift*, a partir de cultivos de raíces transformadas de *Solanum chrysotrichum*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.

- Ching, R. C. (1978). The Chinese fern families and genera: Systematic arrangement and historical origin (Cont.). *Acta Phytotax. Sin*, 16(4), 16-37.
- Chiu, H. F., & Zhang, M. (2000). Dementia research in China. *International journal of geriatric psychiatry*, 15(10), 947-953.
- Chiou, S. Y., Su, W. W., & Su, Y. C. (2001). Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. *Journal of Biotechnology*, 85(3), 247-257.
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A., & Brielmann, H. L. (2016). *Natural products from plants*. CRC press.
- Curtis, W. R., & Emery, A. H. (1993). Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnology and bioengineering*, 42(4), 520-526.
- Demencia, O. M. S. (2013). Una prioridad de salud pública. *Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, World Health Organization*, 112.
- Devlin, R. M. (1980). Principios de fisiología vegetal. *Ediciones Omega, SA Barcelona*.
- Deus, B., & Zenk, M. H. (1982). Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotechnology and bioengineering*, 24(9), 1965-1974.
- Dörnenburg, H., & Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and microbial technology*, 17(8), 674-684.
- Eibl, D., & Eibl, R. (2002). Bioreactors for plant cell and tissue cultures. In *Plant biotechnology and transgenic plants* (pp. 152-183). CRC Press.

- Eibl, R., & Eibl, D. (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 593-598.
- Epperly, T., Dunay, M. A., & Boice, J. L. (2017). Alzheimer Disease: Pharmacologic and Nonpharmacologic Therapies for Cognitive and Functional Symptoms. *American family physician*, 95(12).
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the world health organization*, 63(6), 965.
- FILOVÁ, A. (2014). Production of secondary metabolites in plant tissue cultures. *Research Journal of Agricultural Science*, 46(1).
- Fitzpatrick, A. L., Kuller, L. H., Ives, D. G., Lopez, O. L., Jagust, W., Breitner, J. C., ... & Dulberg, C. (2004). Incidence and prevalence of dementia in the Cardiovascular Health Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 52(2), 195-204.
- Georgiev, M. I., Weber, J., & Maciuk, A. (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(5), 809-823.
- Georgiev, M. I., & Weber, J. (2014). Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnology letters*, 36(7), 1359-1367.
- Goldman, J. S., Hahn, S. E., Catania, J. W., Larusse-Eckert, S., Butson, M. B., Rumbaugh, M., ... & Bird, T. (2011). Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: joint practice

guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genetics in Medicine*, 13(6), 597.

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.

Gueven, A. (2012). Plant tissue cultures in production of secondary metabolites. *Scientific Works of the University of Food Technologies-Plovdiv*, 59, 553-556.

Gudala, K., Bansal, D., Schifano, F., & Bhansali, A. (2013). Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of diabetes investigation*, 4(6), 640-650.

Ha, G. T., Wong, R. K., & Zhang, Y. (2011). Huperzine A as potential treatment of Alzheimer's disease: an assessment on chemistry, pharmacology, and clinical studies. *Chemistry & biodiversity*, 8(7), 1189-1204.

Heinrich, M., & Teoh, H. L. (2004). Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of ethnopharmacology*, 92(2), 147-162.

Henderson, J. (1983). Some characteristics of cell-suspensions of sweet-potato (*Ipomoea batatas*) and tomato (*Solanum lycopersicoides*). *In vitro-journal of the tissue culture association* 19(3), 266-266

Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A., & Evans, D. A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*, 80(19), 1778-1783.

- Huang, T. K., & McDonald, K. A. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 45(3), 168-184.
- Hurtado, H. M., & Merino, M. M. (1987). *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Trillas.
- Ishiuchi, K. I., Park, J. J., Long, R. M., & Gang, D. R. (2013). Production of huperzine A and other Lycopodium alkaloids in Huperzia species grown under controlled conditions and in vitro. *Phytochemistry*, 91, 208-219.
- Jiang, H., Luo, X., & Bai, D. (2003). Progress in clinical, pharmacological, chemical and structural biological studies of huperzine A: a drug of traditional Chinese medicine origin for the treatment of Alzheimer's disease. *Current medicinal chemistry*, 10(21), 2231-2252.
- Kindell, J., Keady, J., Sage, K., & Wilkinson, R. (2017). Everyday conversation in dementia: a review of the literature to inform research and practice. *International journal of language & communication disorders*, 52(4), 392-406.
- Konrath, Eduardo Luis, et al. "Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65.12 (2013): 1701-1725.
- Leopold, A. C. (1975). Aging, senescence, and turnover in plants. *BioScience*, 25(10), 659-662.
- Liskowsky, W., & Schliebs, R. (2006). Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein. *International journal of developmental neuroscience*, 24(2-3), 149-156.

- Liu, J. S., Zhu, Y. L., Yu, C. M., Zhou, Y. Z., Han, Y. Y., Wu, F. W., & Qi, B. F. (1986). The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*, *64*(4), 837-839.
- Loef, M., & Walach, H. (2013). Midlife obesity and dementia: meta-analysis and adjusted forecast of dementia prevalence in the United States and China. *Obesity*, *21*(1), E51-E55.
- López, C. J. N., Pérez, J. M. M., Serrano, L. F. G., Zabala, M. E. A., & Isaza, R. E. A. (2017). Expression of recombinant Cry 1Ac protein in potato plant cell suspension culture: Establishment of culture and optimization of biomass and protein production by nitrogen supply. *DYNA: revista de la Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín*, *84*(201), 34-41.
- McDonald, K. A., & Jackman, A. P. (1989). Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. *Plant cell reports*, *8*(8), 455-458.
- McDonald, K. A., Jackman, A. P., & Hurst, S. (2001). Characterization of plant suspension cultures using the focused beam reflectance technique. *Biotechnology letters*, *23*(4), 317-324.
- Ma, X. Q., Jiang, S. H., & Zhu, D. Y. (1998). Alkaloid patterns in *Huperzia* and some related genera of Lycopodiaceae sensu lato occurring in China and their contribution to classification. *Biochemical systematics and ecology*, *26*(7), 723-728.
- Ma, X., & Gang, D. R. (2004). The lycopodium alkaloids. *Natural product reports*, *21*(6), 752-772.
- Ma, X., Tan, C., Zhu, D., & Gang, D. R. (2005). Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of Huperziaceae species in China. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(5), 1393-1398.

- Ma, X., Tan, C., Zhu, D., & Gang, D. R. (2006). A survey of potential huperzine A natural resources in China: the Huperziaceae. *Journal of ethnopharmacology*, *104*(1), 54-67.
- Ma, X., Tan, C., Zhu, D., Gang, D. R., & Xiao, P. (2007). Huperzine A from Huperzia species—an ethnopharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*, *113*(1), 15-34.
- Ma, X., & Gang, D. R. (2008). In vitro production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, *69*(10), 2022-2028.
- Mucke, L. (2009). Alzheimer's disease. *Nature*, *461*(15), 895-897.
- Nordberg, A., Alafuzoff, I., & Winblad, B. (1992). Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *Journal of neuroscience research*, *31*(1), 103-111.
- Organización Mundial de la Salud, 2019, *Demencia* [Online] (disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>) (Accedido el 15 Mayo, 2019).
- Ramos Pérez, A. (2004). Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Carica papaya* que expresa el péptido protector contra la cisticercosis KETc7 y evaluación de su actividad antiparasitaria. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, *20*(2), 101-153.
- Rusanen, M., Kivipelto, M., Quesenberry, C. P., Zhou, J., & Whitmer, R. A. (2011). Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Archives of internal medicine*, *171*(4), 333-339.

- Sando, S. B., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M., Sletvold, O., Saltvedt, I., ... & Aasly, J. (2008). Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences*, 23(11), 1156-1162.
- Santos, M. A., Chand, K., & Chaves, S. (2016). Recent progress in repositioning Alzheimer's disease drugs based on a multitarget strategy. *Future medicinal chemistry*, 8(17), 2113-2142.
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. S., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., ... & Hulette, C. (1993). Association of apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8), 1467-1467.
- Schäfer, H., & Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology journal*, 4(12), 1684-1703.
- Schlaepfer, L., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.
- Selkoe, D. J. (1996). Amyloid β -protein and the genetics of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18295-18298.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., & Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-362.
- Shu, S., Zhao, X., Wang, W., Zhang, G., Cosoveanu, A., Ahn, Y., & Wang, M. (2014). Identification of a novel endophytic fungus from *Huperzia serrata* which produces huperzine A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 3101-3109.

- Smith, D. H., Johnson, V. E., & Stewart, W. (2013). Chronic neuropathologies of single and repetitive TBI: substrates of dementia?. *Nature Reviews Neurology*, 9(4), 211.
- Singh, M., & Chaturvedi, R. (2012). Evaluation of nutrient uptake and physical parameters on cell biomass growth and production of spilanthol in suspension cultures of *Spilanthes acmella* Murr. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(6), 943-951.
- Street, H. E. (1977). Applications of cell suspension cultures. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*, 649-667.
- Su, W. W. (2008). Bioreactor engineering for recombinant protein production using plant cell suspension culture. In *Plan tissue culture engineering* (pp. 135-159). Springer, Dordrecht.
- Szabados, L., Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, 173-210.
- Szypuła, W. J., Mistrzak, P., & Olszowska, O. (2013). A new and fast method to obtain in vitro cultures of *Huperzia selago* (Huperziaceae) sporophytes, a club moss which is a source of huperzine A. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 82(4), 313.
- Tang, X. C. (1996). Huperzine A (shuangyiping): a promising drug for Alzheimer's disease. *Zhongguo yao li xue bao= Acta pharmacologica Sinica*, 17(6), 481-484.
- 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.

- Trejo-Tapia, G., & Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32(10), 669-674.
- Vázquez García, M. (2017). ESTUDIO FITOQUIMICO Y METABOLÓMICO DE ESPECIES SELECTAS DEL GÉNERO *Huperzia*. (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Ved, H. S., Koenig, M. L., Dave, J. R., & Doctor, B. P. (1997). Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. *Neuroreport*, 8(4), 963-967.
- Vilela, V. C., Pacheco, R. L., Latorraca, C. O. C., Pachito, D. V., & Riera, R. (2017). What do Cochrane systematic reviews say about non-pharmacological interventions for treating cognitive decline and dementia?. *Sao Paulo Medical Journal*, 135(3), 309-320.
- Wang, R., Yan, H., & Tang, X. C. (2006). Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(1), 1-26.
- Wang, J., Li, J. L., Li, J., Li, J. X., Liu, S. J., Huang, L. Q., & Gao, W. Y. (2017). Production of active compounds in medicinal plants: from plant tissue culture to biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 9(2), 115-125.
- Wareing, P. F., & Phillips, I. D. J. (1970). The control of growth and differentiation in plants. *The control of growth and differentiation in plants*.
- Widholm, J. M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain technology*, 47(4), 189-194.

- Wilson, G. (1980). Continuous culture of plant cells using the chemostat principle. *Advances in Biochemical Engineering, Volume 16*, 1-25.
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, A. W., Coyle, J. T., & DeLong, M. R. (1981). Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of neurology, 10*(2), 122-126.
- World Health Organization. Media centre. Dementia. [Online] (Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>) (Accedido 15 de Mayo, 2019).
- Wu, Q., & Gu, Y. (2006). Quantification of huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 40*(4), 993-998.
- Yesil-Celiktas, O., Gurel, A., & Vardar-Sukan, F. (2010). Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. *Transworld Research Network, 37*(661), 2.
- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y., & Hara, Y. (1996). Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnology, 14*(9), 1129.
- Zangara, A. (2003). The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 75*(3), 675-686.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 8 Abril 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Co Tutor)
Dra. Gabriela Trejo Tapia
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Tesis: Producción de huperzina A a partir de cultivo en suspensión de células de *Huperzia orizabae* y su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L

Alumno que la presenta a revisión: **ROCIO DEL CARMEN PEREZ AGUILAR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 9 de Abril de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Co Tutor)
Dra. Gabriela Trejo Tapia
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Tesis: Producción de huperzina A a partir de cultivo en suspensión de células de *Huperzia orizabae* y su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L

Alumno que la presentó a revisión: **ROCIO DEL CARMEN PEREZ AGUILAR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

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
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a Abril de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Co Tutor)
Dra. Gabriela Trejo Tapia
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Tesis: Producción de huperzina A a partir de cultivo en suspensión de células de *Huperzia orizabae* y su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L

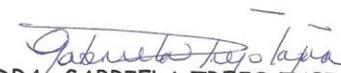
Alumno que la presenta a revisión: **ROCIO DEL CARMEN PEREZ AGUILAR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE


DRA. GABRIELA TREJO TAPIA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 9 de Abril de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Co Tutor)
Dra. Gabriela Trejo Tapia
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Tesis: Producción de huperzina A a partir de cultivo en suspensión de células de *Huperzia orizabae* y su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L

Alumno que la presenta a revisión: **ROCIO DEL CARMEN PEREZ AGUILAR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 9 de Abril de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Co Tutor)
Dra. Gabriela Trejo Tapia
Dra. Verónica Rodríguez López
Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Tesis: Producción de huperzina A a partir de cultivo en suspensión de células de *Huperzia orizabae* y su escalamiento a biorreactor *airlift* de 2L

Alumno que la presenta a revisión: **ROCIO DEL CARMEN PEREZ AGUILAR**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. MARIA LUISA VILLARREAL ORTEGA