



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Establecimiento y caracterización de la línea Z4 de
Daucus carota para la producción de la proteína
LTB-Syn de interés contra Parkinson**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

Sahara Dubraiicka Elguea Zarate

Director: Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Co-director: M. en B. Christian Carreño Campos

CUERNAVACA, MORELOS

Mayo, 2024

“Porque incluso las cicatrices que fueron formadas por mis errores son mis propias
constelaciones”
-BTS

Agradecimientos

A mis directores de tesis:

- Dra. Anabel Ortiz Caltempa, por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme formar parte de él. Por guiarme durante este proyecto y enseñarme un mundo nuevo de posibilidades. Gracias por todo el conocimiento, por su confianza y apoyo.
- Dr. Christian Carreño Campos, por compartir todos sus conocimientos y las técnicas que ha perfeccionado, por siempre apoyarme incluso en mis tropiezos. Gracias por siempre resolver mis dudas, motivarme a aprender más y sobre todo por la paciencia, sin su apoyo no hubiera sido posible este proyecto.

A los miembros del comité sinodal:

- Dr. José de Jesús Arellano García
- M. en C. Laura Patricia Lina García
- Dra. Elba C. Villegas Villarreal

Gracias por todos sus comentarios y el tiempo que dedicaron a la evaluación de este proyecto. Muchas gracias por las preguntas y observaciones, que ayudaron a mejorar mi trabajo.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por permitirme cumplir mi sueño de formarme como universitaria.

Al Centro de Investigaciones en Biotecnología, gracias a sus instalaciones y herramientas pude llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mi tan estimada Facultad de Ciencias Biológicas, que me enseñó la belleza en la biología, alimento mi pasión por mi carrera y me otorgo una entrañable vida universitaria.

A todos los maestros que a lo largo de mi estancia supieron enseñar sus materias y guiarme a este punto, su pasión por la enseñanza de las ciencias fue parte de mi motor.

A mis compañeros de laboratorio Mónica, Paloma, Martín, Cinthya, Clara, Javier y Miriam, por sus consejos, palabras de apoyo y todos los momentos gratos (y tal vez uno que otro no tan grato pero al menos no faltaron las risas).

A mis amigas Mónica, Wendoline, Dara, Ita y Sofía por ser mi sostén, por la hermandad y el amor que me hacen sentir. Por secar mis lágrimas y sanar mi corazoncito cuando

más lo necesito. Por todas sus palabras de apoyo, por escucharme hablar horas y horas de temas que no entendían. Por nunca soltar mi mano. Por eso y mil cosas más, gracias.

A mis amigos y compañeros de la Facultad, por motivarme, apoyarme e ilustrarme a lo largo de la carrera.

A mis bolitas de pelos, mis gatitos, perritos y conejos, que me acompañaron en mis noches de desvelo. Con sus travesuras, mimos, ronroneos y participaciones en las clases en línea hicieron esta aventura más entretenida.

A mi preciosa Cheeto, mi compañera de 4 patas, por tus cálidas bienvenidas después de la escuela y por aferrarte a mi todos los años que pudiste.

A BTS por acompañarme con sus canciones a lo largo de estos años, por enseñarme que el camino hacia el éxito puede estar lleno de baches pero con determinación y amor puede ser recorrido. Abrazo a mi yo del pasado, a mi yo del presente y a quien me convertiré con amor gracias a ellos.

A Taylor Swift por el empoderamiento que me ha dado, por demostrarme que cada cosa que llegamos a perder es un paso más que damos. Gracias por darme el ejemplo de no temer ser quien soy.

Dedicatorias

A mi familia:

A mi mamá por el don de la vida, por darme un ejemplo de resiliencia y echarme porras en las buenas y en las malas.

A mi papá, por siempre apoyarme y recordarme cuanto me amas. Por aplaudir con tanto orgullo todos los pasos que doy, incluso los más torpes y pequeños.

A mi hermana, por ser mi compañera en crímenes y por motivarme a dar todo de mí.

A mis titos

Yolanda Bermúdez, Jesús Villa, Armando Zarate y María de los Ángeles Agatón, por todo el amor que me han brindado. Por ser fuente de inspiración y alimentar mis sueños.

A mí, por soltar los miedos para aferrarme y cumplir mis sueños.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	ii
Abreviaturas.....	iii
Resumen.....	iv
I. Introducción.....	1
II. Marco teórico.....	2
2.1 Enfermedades neurodegenerativas.....	2
2.2 Enfermedad de Parkinson (EP).....	2
2.2.1 Epidemiología.....	3
2.2.2 Tratamientos farmacológicos contra el Parkinson.....	3
2.3 Proteína α -syn.....	5
2.3.1 Estructura de α -syn.....	6
2.4 Características generales de la especie <i>Daucus carota</i>	7
2.4.1 Clasificación taxonómica de zanahoria.....	8
2.4.2 Importancia del cultivo de zanahoria.....	8
2.5 Producción de proteínas recombinantes en <i>D. carota</i>	9
2.6 Producción de vacunas en plantas transgénicas.....	11
2.7 Vacunas contra enfermedades neurodegenerativas.....	14
2.8 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	16
2.8.1 Medio de cultivo.....	16
2.8.1.2 Medio Murashige y Skoog (MS).....	17
2.8.2 Tipos de cultivos.....	17
2.8.3 Cultivos de callos.....	17
2.8.4 Cultivos de células en suspensión.....	18
III. Antecedentes directos.....	20
3.1 Origen de la línea transgénica Z4.....	20
3.2 Establecimiento de cultivo de callos y células en suspensión.....	20
IV. Justificación.....	21
V. Hipótesis.....	22
VI. Objetivos.....	22
6.1 Objetivo general.....	22
6.2 Objetivos específicos.....	22
VII. Estrategia Experimental.....	23
VIII. Materiales y métodos.....	24

8.1 Material vegetal.....	24
8.2 Medio de cultivo MSU-9.....	24
8.3 Condiciones del cultivo y propagación de callos de la línea Z4U de <i>D. carota</i>	24
8.4 Cinética de crecimiento en callos de la línea Z4 de <i>D. carota</i>	25
8.5 Métodos analíticos.....	25
8.5.1 Análisis de biomasa en peso fresco.....	25
8.5.2 Análisis de biomasa en peso seco.....	25
8.5.3 Datos cinéticos:.....	26
8.5.4 Viabilidad celular.....	26
8.6 Detección del transgén <i>LTB-Syn</i> por PCR.....	27
8.7 Cuantificación de la proteína LTB-Syn por ELISA.....	27
8.8 Presencia de la proteína LTB-Syn por Dot blot.....	28
IX. Resultados.....	29
9.1 Adaptación de callos de la línea Z4U al medio MSU-9.....	29
9.2 Cinética de crecimiento de callos de la línea Z4U de <i>D. carota</i>	30
9.2.2 Viabilidad celular.....	31
9.3 Detección del transgén LTB-Syn durante la cinética de crecimiento.....	33
9.4 Detección de la proteína LTB-Syn por Dot-blot.....	33
9.5 Producción de la proteína LTB-Syn.....	35
X. Discusión.....	37
10.1 Cinética de callos de la línea Z4U en medio MSU-9.....	37
10.2 Análisis comparativo de producción de biomasa y proteína LTB-syn.....	38
X. Conclusiones.....	40
XI. Perspectivas.....	40
XII. Bibliografía.....	41

Índice de figuras

	Páginas
Figura 1.Regiones principales de la proteína α -sinucleína.	7
Figura 2. Adaptación de callos de la línea Z4U de <i>Daucus carota</i> en medio de cultivo MSU-9.	30
Figura 3. Curva de crecimiento en peso seco de callos de la línea Z4U de <i>Daucus carota</i> en medio MSU-9.....	31
Figura 4. Curva de crecimiento en callos de la línea Z4U de <i>Daucus carota</i>	32
Figura 5. Morfología y viabilidad de callosde la línea Z4U en diferentes días de la cinética de crecimiento observadas bajo el microscopio de fluorescencia a 40X en presencia de DAF.....	32
Figura 6. Detección del transgén LTB-Syn por PCR.....	33
Figura 7. Detección de la presencia de la proteína LTB-Syn por Dot-blot.....	34
Figura 8. Producción de proteína LTB-Syn y producción de biomasa (PS) de la cinética de crecimiento de la línea Z4U.....	35

Índice de tablas

	Páginas
Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Daucus carota</i>	8
Tabla 2. Ejemplo de algunos biofármacos producidos en <i>D. carota</i> (zanahoria).....	10
Tabla 3: Comparación de valores máximos de producción de biomasa y proteína LTB-Syn en en medio MS basal y medio MSU-9 a nivel de callos.....	36

Abreviaturas

SNpc	Sustancia negra de pars compacta
GB	Ganglios basales
LD	Levodopa
EP	Enfermedad de Parkinson
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
MOMP	Proteína principal de la membrana externa
Z4	Línea transgénica de <i>D. carota</i>
Z4U	Línea transgénica de <i>D. carota</i> adaptada en medio MSU-9
MS	Murashige y Skoog
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
L	Litros
mL	Mililitros
µL	Microlitros
°C	Grados Celsius
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
Ti	Inductores de tumores
TSP	Proteína total soluble
psi	Libra de fuerza por pulgada cuadrada
PVP	Polivinilpirrolidona
GBD	Carga mundial de enfermedades
DAF	Diacetato de fluoresceína
PBST	Buffer fosfato salino con interpolación
t	Tiempo
Td	Tiempo de duplicación
X _i	Biomasa inicial
X _f	Biomasa final
APP	Proteína precursora amiloide

Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que se puede clasificar como trastorno del movimiento y la postura. El efecto de la EP en el sistema nervioso central es crónico y progresivo, convirtiéndola en una enfermedad persistente y con síntomas que empeoran con el tiempo. Cuenta con una etiología desconocida y, en términos generales, la causa subyacente podría ser una combinación de factores genéticos y ambientales. Se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de pars compacta del mesencéfalo, así como la presencia de agregados insolubles de la proteína α -sinucleína anormalmente plegada. En muchos casos los diagnósticos no se obtienen en un estadio temprano de la patología, sino hasta que los síntomas visibles aparecen como temblores, problemas de equilibrio y rigidez. La falta de diagnósticos oportunos sumados a la escases de tratamientos efectivos disponibles han posicionado a la EP como la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia a nivel mundial, por ello se busca la generación de tratamientos alternativos como son las vacunas orales expresadas en plantas transgénicas.

En 2020, Arévalo-Villalobos y colaboradores clonaron y transformaron el gen sintético de la proteína LTS-Syn en zanahoria (*Daucus carota*), obteniendo múltiples líneas de callos transgénicos de la cual la línea Z4 tuvo un rendimiento de 2.3 μ g LTB-Syn/g peso seco (PS). Se comprobó la presencia de anticuerpos anti-syn en el suero de ratones inmunizados por vía oral con callos de la línea Z4. El objetivo de este proyecto de investigación fue establecer los cultivos de callos con la línea Z4 de *D. carota* en medio de cultivo MS suplementado con urea y en ausencia de fitorreguladores, posteriormente se caracterizaron los parámetros cinéticos de crecimiento celular. Los resultados obtenidos mostraron que la línea Z4U tuvo un rendimiento celular de 0.1g PS al día 24, con una velocidad de crecimiento de 0.028/d y un tiempo de duplicación de 24 días. La máxima producción de la proteína LTB-Syn fue de 0.25 μ g/g PS en el día 18 y una viabilidad celular de más de 90% después de 21 días. La presencia de la proteína LTB-Syn en los callos de la línea Z4U crecidos en medio MSU-9 se comprobó por Dot blot y ELISA. Estos resultados sustentan las bases para la optimización de los cultivos en ausencia de fitorreguladores, haciendo al cultivo biotecnológicamente más atractivo para su escalamiento en biorreactores.

I. Introducción

Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa compleja, generalmente se hace presente en pacientes de edad adulta, con un rango de 50-60 años, y es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor impacto a nivel mundial (Willis, 2013; Schapira, 2013). A pesar de la alta prevalencia de la enfermedad aun no se cuenta con una cura, sin embargo, existen múltiples tratamientos para el control de los síntomas motores clínicos que presenta. En la búsqueda de nuevos tratamientos se ha propuesto la formulación de biofármacos usando como plataforma células vegetales transformadas.

El uso de plantas transgénicas tiene ventajas como la producción de biofármacos recombinantes de manera controlada y segura. Algunos ejemplos destacan el uso de células de tabaco para la producción de una vacuna, ya aprobada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) contra el virus Newcastle (Mihaliak *et al.* 2005). En cuanto a las vacunas producidas en tejidos de zanahoria *Daucus carota* (*D. carota*) se han desarrollado cuatro con potencial inmunoprotector en animales de prueba contra el sarampión, clamidias, tuberculosis y cólera (Uvarova *et al.* 2013). Además, se han producido tres enzimas, una citocina y un anticuerpo (Kizhner *et al.* 2014). El desarrollo más notable en *D. carota* es la producción comercial de la alfa taliglucerasa aprobada como terapia de reemplazo enzimático en pacientes diagnosticados con la enfermedad de Gaucher de tipo 1 (Shaaltiel *et al.*, 2007).

II. Marco teórico

2.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por provocar un deterioro progresivo en el Sistema Nervioso Central (SNC) su causa es desconocida, y con pocas probabilidades de un diagnóstico en un estadio temprano de la patología, estas patologías pueden ser heredadas o adquiridas y generalmente el factor de riesgo en común es el envejecimiento.

Existen más de 600 enfermedades neurodegenerativas, de las que destacan por su alta prevalencia a nivel mundial son la Enfermedad de Parkinson (EP), la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Estas enfermedades tienen un alcance universal y en algunos de los factores genéticos combinados con los factores ambientales pueden influir en cuándo y cómo se presentará la enfermedad (NINDS, 2015).

2.2 Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer (Schapira, 2013). Su etiología es desconocida y, en términos generales, se considera que la causa subyacente sería la combinación de múltiples factores como envejecimiento, factores ambientales, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y factores genéticos (Jellinger, 2014).

Su base anatomopatológica es caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de pars compacta (SNpc) del mesencéfalo, así como la presencia de cuerpos de Lewy, los cuales son inclusiones intracelulares formadas por agregados insolubles de la proteína alfa sinucleína (α -syn) que se encuentra anormalmente plegada (Martínez-Fernández *et al.*, 2016).

Estas neurodegeneraciones provocan la denervación dopaminérgica de las proyecciones de la SNpc hacia el núcleo estriado, lo que provoca una alteración en la fisiología normal de los ganglios basales, lo cual origina las principales

manifestaciones clínicas de la enfermedad. Presenta una serie de manifestaciones clínicas motoras como bradicinesia, temblor de reposo, rigidez, alteración de los reflejos posturales y no motoras como disfunción autonómica, sensorial, trastornos del sueño o de la esfera cognitiva y conductual.

La mayoría de los pacientes con EP son idiopáticos (de causa desconocida) sin algún tipo de antecedente familiar directo. Aun así, más del 10% de los casos son genéticos derivados de alguna herencia autosómica dominante, como son los casos con mutaciones en el gen que codifica para α -syn (SNCA), en el cual los agregados de α -syn son el principal signo patológico a nivel celular (Goedert, 2001).

2.2.1 Epidemiología

El GBD (Carga Mundial de Enfermedades, por sus siglas en inglés) informó que, en el año 2017, existían un total de 1,02 millones de personas con la EP sumándose a la cifra estimada del 2016 que fue 6,1 millones de personas a nivel mundial, esto último representó un aumento de más del doble en comparación con la cifra de 1990 (2,5 millones). Para el 2040 se estima que habrá alrededor de 17 millones de afectados. Haciendo que la EP sea la de más rápido crecimiento a nivel mundial de todas las enfermedades neurodegenerativas (Poewe *et al.* 2017). Este cambio puede deberse a múltiples factores como exposición a factores de riesgo, envejecimiento de la población, detección de la enfermedad e inclusive aumento de la supervivencia de los pacientes debido a la disponibilidad de tratamiento adecuado. La edad es el factor de riesgo más consistentemente asociado a la EP. Existe un pico de prevalencia entre los 85 y 89 años y una disminución a partir de esta edad. Esta enfermedad es más frecuente en hombres, con una relación mujer-hombre de 1:4 (Pringsheim *et al.* 2014).

2.2.2 Tratamientos farmacológicos contra el Parkinson

En la actualidad existen diferentes fármacos usados para el control de EP. Se identificó que la falta de dopamina estriatal como la causa principal de los síntomas motores parkinsonianos (Carlsson *et al.*, 1958). Por eso se ha buscado que los

tratamientos controlen los signos y síntomas de la enfermedad el mayor tiempo posible.

Uno de los fármacos más usado para el tratamiento del Parkinson es la levodopa (LD), la cual es un profármaco de dopamina que actúa a nivel central tras ser transportada en el intestino delgado con mecanismo activo. Es necesario evitar su transformación periférica por la enzima descarboxilasa (ubicua en múltiples tejidos) mediante carbidopa o benserazida, lo cual aumenta 10 veces su biodisponibilidad, por lo que la dosis requerida disminuye un 80% (Hauser, 2010). La LD alcanza la barrera hematoencefálica y es introducida por otro transportador de aminoácidos neutros al interior cerebral. Ahí se convertirá en dopamina gracias a la descarboxilasa cerebral (Mercuri y Bernardi, 2005).

Para prevenir el metabolismo periférico de LD y de esta forma incrementar la duración de sus efectos terapéuticos, se hace el uso de inhibidores de la COMT (catecol-O-metiltransferasa), que aumentan la vida media de la levodopa y su concentración en el cerebro, permitiendo mejorar la función motora del paciente, con una dosis diaria menor. Los COMT (como la entacapona) aumentan el tiempo de acción de 1.3-1.8 h al día en dosis de 200mg con cada levodopa (Stocchi *et al.*, 2008).

Los Agonistas Dopaminérgicos (AD) no ergóticos son útiles fármacos antiparkinsonianos. Los AD son eficaces en monoterapia en un estadio temprano de la patología y reducen complicaciones motoras, incluyendo las discinesias (frente a LD) en estudios controlados (Whone *et al.*, 2003). Los AD no ergóticos (forma oral pramipexol, ropinirol y el transdérmico rotigotina) son eficaces en la EP con fluctuaciones motoras, y reducen en términos generales el tiempo off aproximadamente 1,5-2 h y la dosis de LD en unos 150 mg (Stowe *et al.*, 2010). El pramipexol y ropinirol actúan sobre los receptores D2 y D3 localizados en distintas áreas del sistema nervioso central (SNC) pero se reconoce que los receptores D1 y D2 son el tipo predominante en el sistema nigroestriado. Por ser muy selectivos presentan menos efectos secundarios autonómicos, cardiovasculares y digestivos, siendo eficaz en el control del temblor y tiene un potente efecto antidepresivo (Chwieduk y Curran, 2010).

La rotigotina es un tratamiento de liberación transdérmica, con mayor afinidad a receptores D2 que por el D1. Entre sus ventajas están la administración de dosis única diaria, ausencia de interacción con alimentos, con una estimulación dopaminérgica continua. Los inhibidores de la monoaminoxidasa-B (IMAO-B) selectivos (selegilina y rasagilina) bloquean el metabolismo de la dopamina en el cerebro, aumentando su tiempo de acción en la sinapsis. Son bien tolerados y suelen administrarse en dosis única diaria (Linazasoro, 2007). Estos han demostrado ser eficaces en todas las fases de la EP, pero son menos potentes que la levodopa o los agonistas dopaminérgicos (Hauser, 2010).

La amantadina (o clorhidrato de amantadina) es un fármaco clásico antiparkinsoniano de múltiples aplicaciones y mecanismos de acción; inicialmente era usado por sus propiedades antivirales, su efecto antiparkinsoniano fue hallado de forma casual (Schwad *et al.*, 1969). Sus múltiples mecanismos de acción incluyen efecto antiglutamatérgico, acción anticolinérgica, incremento de receptores estriatales D2 e incluso incremento de expresión de GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía, por sus siglas en inglés) (Danysz *et al.*, 1997).

2.3 Proteína α -syn

La α -sinucleína (α -syn) es una proteína citoplasmática que se expresa principalmente en el cerebro, se encuentra específicamente en estructuras como el hipocampo, neocórtex, tálamo, bulbo olfatorio, cuerpo estriado y cerebelo (Mori *et al.*, 2002). Pertenece a la familia de las sinucleínas junto a la β y γ sinucleína. Esta familia de proteínas se expresa en diferentes regiones del encéfalo de vertebrados, no habiéndose encontrado genes ortólogos en otros grupos (Burré, 2015). La α -syn se expresa en el cerebro y su sobreexpresión produce daño neuronal, que no se muestran cuando se suprime su expresión (Ibañez *et al.*, 2004). El nombre de sinucleína deriva de su aparente localización en terminales nerviosas presinápticas y membranas nucleares, sin embargo, la α -syn no está presente en todas las terminales sinápticas y

curiosamente no todas acumulan la proteína en desordenes neurodegenerativos (Clayton y George, 1999).

2.3.1 Estructura de α -syn

La proteína α -syn está compuesta por 140 aminoácidos, con un peso molecular de 14.460 Da y un punto isoeléctrico teórico de 4,67 que resulta en una carga neta negativa a pH neutro (Uversky *et al.*, 2002). La conformación estructural primaria de α -syn muestra tres diferentes regiones (Figura 1):

1. El segmento N-terminal anfipático (residuos aminoacídicos 1 a 60) que contiene dominios de secuencias repetidas (KTKEGV) muy similar al dominio α -helicoidal de unión a membrana de las apolipoproteínas. Las mutaciones encontradas para la EP están localizadas en esta región, en las posiciones A30P, E46K y A53T. Este dominio tiene como característica la presencia de aproximadamente 7 repeticiones imperfectas con un motivo hexamérico altamente conservador.
2. Una región central hidrofóbica (residuos aminoacídicos 61 a 95) también conocida como “componente no amiloide de las placas A β amiloides” (NAC), que ha sido identificada por numerosos grupos como la región implicada en la agregación y toxicidad de la alfa-sinucleína (Bonini y Giasson, 2005). Este dominio cuenta con dos motivos KTKEGV adicionales.
3. Una región C-terminal de carácter ácido por la presencia de residuos de ácido glutámico (residuos 96-140) con 3 residuos de tirosina que se encuentran nitrificados cuando se presentan las inclusiones lipoproteicas, de posible implicación en la interacción con otras proteínas (Bonini y Giasson, 2005). La presencia de aminoácidos cargados negativamente y de prolinas, sugiere que esta región tiene tendencia a mantener una conformación desordenada y es la zona de la proteína más susceptible de sufrir cambios post-traduccionales (Uversky *et al.* 2002).

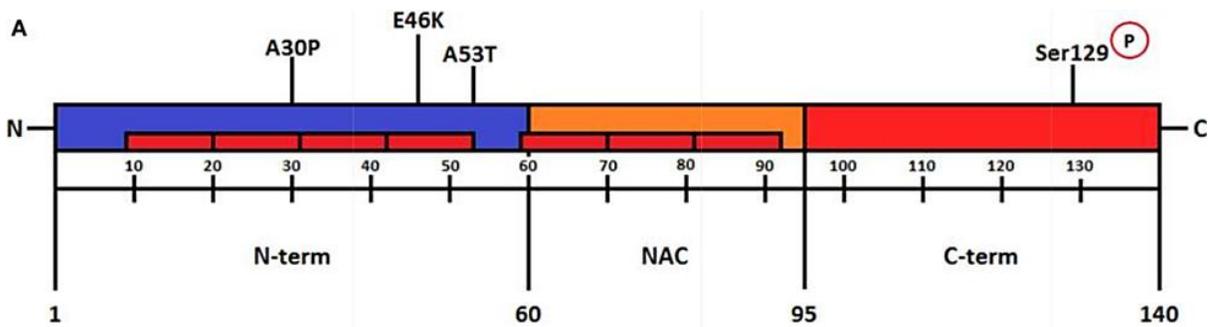


Figura 1. Representación esquemática de las tres regiones principales (N-terminal, NAC y C-terminal) de la α -sinucleína. Las mutaciones encontradas para la EP están resaltadas en las posiciones A30P, E46K y A53T, así como la fosforilación de Ser129.

2.4 Características generales de la especie *Daucus carota*

La zanahoria (*D. carota*) es una planta bianual que crece de una raíz comestible la cual se desarrolla desde los tejidos de la raíz principal y el hipocótilo durante el primer año de crecimiento. Esta raíz es de tipo napiforme, o sea, con forma de nabo, cuya raíz central es principal, nítida y dominante sobre las raíces laterales y se engrosa total o principalmente por la acumulación de sustancias de reserva.

La raíz es un órgano de almacenamiento principalmente compuesto de floema parenquimatoso y xilema penetrado por tejido vascular con secciones de cambium juntándose todo en un cilindro (Rubatzky *et al.*, 1999). El color anaranjado y amarillo de las raíces está ligado a la presencia de pigmentos tales como α y β carotenos. Los betacarotenos pueden representar más del 50% de los carotenoides totales y por lo general duplican a los alfacarotenos. El contenido de carotenoides no está uniformemente distribuido en la raíz, debido a que la síntesis proviene de tejidos proximales a distales, y el floema contiene comúnmente más carotenoides que el xilema. Es una hortaliza rica en caroteno, con cantidades de tiamina y riboflavina (Valadez, 1993). Esta raíz puede ser consumida tanto en estado crudo como cocida.

Su mayor importancia se encuentra desde el punto de vista alimentario, debido a su contenido elevado en provitamina A en la zona cortical.

La zanahoria es una especie que posee la cualidad de adaptarse bien a diferentes ambientes, aunque depende del tipo y cultivar que se use. La germinación es lenta y dispareja debido a la diferente maduración del embrión, que está influenciado por la posición de la flor en la umbela. La humedad y temperatura son fundamentales para la germinación de la semilla, siendo la temperatura óptima del suelo 26°C, la máxima es de 35°C demorando la germinación alrededor de 9 días, mientras que con la mínima de 5°C tarda 51 días en germinar.

2.4.1 Clasificación taxonómica de zanahoria

La clasificación taxonómica de *D. carota* se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Daucus carota*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Género	<i>Daucus</i> L., 1753
Especie	<i>D. carota</i> L., 1753

2.4.2 Importancia del cultivo de zanahoria

El país con mayor producción de zanahoria a nivel mundial es China con una producción que representa al 45%, seguido por países como Rusia con un 4.9% y EUA con 3.7%. En los últimos 10 años la producción de zanahoria ha llegado de 22 millones de toneladas hasta 36 millones (FAO, 2017).

La zanahoria no es una fuente de calorías significativa en la dieta humana, sin embargo, es una fuente importante de nutrientes debido a su contenido de pigmentos,

de los cuales destacan los carotenoides, antocianinas y otros flavonoides. Entre los beneficios para la salud de estos compuestos podemos mencionar la reducción de riesgos cardiovasculares, la eliminación de radicales libres y la disminución de riesgo de contraer distintos tipos de cáncer (Van den Berg et al., 2000).

Los α y β carotenos son precursores de la vitamina A y se encuentran principalmente en las zanahorias de coloración anaranjada. Los carotenos tienen propiedades antimutagénicas, fotoprotectoras y de realce del sistema inmune, debido a sus propiedades antioxidantes. El β caroteno, en particular, colabora con la salud de la piel y reduce el riesgo de la formación de cataratas. En EUA, por ejemplo, la zanahoria es la fuente más importante de provitamina A, proveyendo 30% del total en la dieta de sus habitantes (Rubatzky et al., 1999).

2.5 Producción de proteínas recombinantes en *D. carota*

D. carota, representa una plataforma con gran potencial para la producción e introducción de biofármacos en el mercado, destacando así el potencial de esta especie en la biotecnología. Las células de *D. carota* al no contener compuestos tóxicos ofrecen la ventaja adicional de generar una biomasa segura para el suministro de vacunas orales en humanos, permitiendo una formulación directa de antígenos bioencapsulados que evitan costosos procesos de purificación posterior.

Desde 1939 se tienen reportes sobre el establecimiento de callos de zanahoria utilizando segmentos del tallo, cotiledones o raíces como explantes, así mismo, es una especie ampliamente utilizada en biotecnología en el desarrollo de biofarmacéuticos. Este avance proyecta un futuro alentador para el campo biofarmacéutico de origen vegetal. En cuanto a las vacunas, la primera vacuna a partir de *D. carota* como sistema de expresión transgénica consistió en un modelo de inmunización contra el sarampión (Marquet-Blouin et al., 2003)

En 2008 se realizó una investigación para la producción de una proteína quimérica en *D. carota* que comprende las regiones de VS2 y VS4 del dominio MOMP (proteína principal de la membrana externa), con el fin de disminuir su hidrofobicidad

y mejorar la expresión de la MOMP, logrando así una mejor respuesta inmune celular y humoral para *Chlamydia trachomatis*. En el 2012 la FDA aprobó el uso en humanos de ELELYSO™, la primera terapia biológica para tratar la enfermedad de Gaucher a partir de cultivos transgénicas de *D. carota*. Por otro lado, Uvarova y colaboradores en 2013, lograron expresar dos proteínas (ESAT6 y CFP10) en *D. carota* como vacunas contra *M. tuberculosis*.

Se han descrito alrededor de 10 prototipos de vacunas producidas en tejidos de *D. carota* (Tabla 2). Contando con múltiples ventajas, una de las más destacables es el bajo costo de producción de biofarmacéuticos, debido a que su tejido es comestible y no cuenta con patógenos. Con esto se pueden producir vacunas comestibles encapsuladas o congeladas.

Tabla 2. Ejemplo de algunos biofármacos producidos en *D. carota* (zanahoria)

Biofármaco	Rendimiento	Características funcionales	Referencia
Hemaglutinina Vacuna contra el sarampión.	2 µg/g PF	Los ratones inmunizados por vía intraperitoneal desarrollaron una respuesta humoral y celular.	Marquer-Blouin <i>et al.</i> , 2003
Proteína LTB Vacuna oral contra colera y diarrea provocada por <i>E. coli</i>	3 µg/g PF en raíces	Los ratones inmunizados vía oral desarrollaron inmunidad sistémica e intestinal contra la toxina.	Rosales-Mendoza <i>et al.</i> , 2008
Proteína viral PreS2-S Vacuna para Hepatitis B	>42 ng/g PF	La retención de ER mejoro los rendimientos de la vacuna.	Deineko <i>et al.</i> , 2009
Proteína p24 Vacuna para VIH subtipo C	62 ng p24g PF	La retención de ER mejoro los rendimientos	Lindh <i>et al.</i> , 2009
Proteína Ure B Vacuna para <i>Helicobacter pylori</i>	25 µg/g en raíces	Los ratones inmunizados de manera oral desarrollaron respuestas humorales tanto mucosas como sistémicas.	Zhang <i>et al.</i> , 2010

Proteína quimérica MOMP Vacuna para <i>Chlamydia trachomatis</i>	Hasta un 3% de TSP	La proteína quimérica producida en zanahoria fue antigénica.	Kalbina <i>et al.</i> , 2011
F1-V fusión de proteínas Vacuna para <i>Yersinia pestis</i>	0.12-0.3% TSP	Los ratones inmunizados por vía subcutánea desarrollaron anticuerpos séricos anti-F/V IgG en suero.	Rosales-Mendoza <i>et al.</i> , 2011
Interferón α -2b enfermedades virales y cáncer	16.5 x 10 ³ IUg PF en raíces	Estudios <i>in vitro</i> probaron su actividad antiviral.	Luchakivskai <i>et al.</i> , 2012
Proteínas ESAT6 y CFP10 Vacuna para tuberculosis	0.056% TSP para rESAT6 y 0.024% TSP para rCFP10	Los conejos inmunizados por vía oral desarrollaron una inmunidad celular y humoral.	Uvarova <i>et al.</i> , 2013

PF (peso fresco), TSP (proteína total soluble)

2.6 Producción de vacunas en plantas transgénicas

Las plantas han sido usadas como tratamiento para enfermedades desde inicios de las civilizaciones, actualmente con la ayuda de la biotecnología se puede retomar este camino de forma más específica y efectiva, la biotecnología garantiza la producción de farmacéuticos a mayor escala, con gran eficiencia y a menor costo.

Desde su invención las vacunas han tenido un constante desarrollo que ha mejorado gracias a los avances y descubrimientos. El uso de la biotecnología moderna para la producción de vacunas recombinantes es un camino prometedor debido a que permite obtener vacunas más seguras, ya que no acarrean patógenos potenciales, y se pueden producir a gran escala más fácilmente. Bajo este argumento, se han realizado diversas investigaciones utilizando plataformas con células vegetales como biorreactores para la obtención de productos de interés farmacéutico (Goldstein y Thomas, 2004).

En 1997, Curtis y Cardineau lograron patentar la primera vacuna extraída a partir de plantas de tabaco transgénicas contra *Streptococcus mutans*. El antígeno obtenido de esta planta provocó una respuesta inmune cuando se administró vía oral en humanos o animales y era capaz de inhibir la colonización de *S. mutans* a través de la superficie mucosa. Desde este punto, múltiples investigadores iniciaron la tendencia a generar vacunas a partir de plantas transgénicas las cuales expresan antígenos específicos hacia distintas enfermedades.

La mayoría de las vacunas hasta la fecha han sido expresadas en tabaco, aunque también se han utilizado papa, soya, alfalfa, arroz y trigo. En 2001, Yu y Langridge en EUA insertaron VP6 de un rotavirus (RV) de ratón en papa (*Solanum tuberosum*) por transformación con *A. tumefaciens*. La inmunización oral (día 0, 7, 17 y 24) de ratones CD-1 con papa transgénica (5g conteniendo aproximadamente 15 µg de VP6) más TC resultó en la aparición de anti-VP6 IgG en suero (títulos: 1:80-1:1280) e IgA en intestino (títulos: 1:8-1:32). En el 2001, Huang y colaboradores transformaron plantas de tabaco para expresar la hemaglutinina (H) del virus del sarampión, una glicoproteína expuesta en la superficie del virus, desarrollando IgG anti-sarampión en suero con actividad neutralizante *in vitro*. En un siguiente reporte, el mismo grupo mostró que la inmunogenicidad de la vacuna oral podía aumentarse con la bio-encapsulación del antígeno recombinante dentro de las células vegetales, el cual puede proteger de la degradación por proteinasas gastrointestinales y permitir que se reconozcan epítomos importantes.

La molécula más importante, en cuanto a inmunización contra ántrax, es el denominado antígeno protector (AP). Aziz y colaboradores en 2002, transformaron plantas de tabaco con el gen de AP y demostraron su expresión por análisis de Western blot usando antisuero contra AP. El AP derivado de plantas (junto con otra proteína de *B. anthracis* denominada Factor Letal) mostraron citotoxicidad en líneas celulares de macrófagos.

Wu y colaboradores en 2003, insertaron VP7 de RV humano (serotipo G1) en *S. tuberosum* y administraron el tubérculo transgénico (42 µg VP7) más TC (10 µg) oralmente a ratones (día 0, 7, 14 y 42). Los animales inmunizados desarrollaron IgG

en suero e IgA (niveles más altos) en el intestino; los anticuerpos en suero no eran neutralizantes pero los anticuerpos en intestino sí lo eran. TetC es un polipéptido (47 kDa), fragmento no-tóxico de la toxina tetánica, que puede usarse como una probable vacuna contra el tétano. Tregoning y colaboradores en 2003, transformaron cloroplastos de tabaco con el gen tetC. La inmunización (día 0, 28 y 35) de ratones con tetC derivado de la planta indujo IgG en suero e IgA en secreciones nasales e intestinales. Los animales inmunizados mostraron protección y no desarrollaron parálisis luego de una dosis de toxina tetánica (50 veces la dosis paralítica 50%).

Saldaña y colaboradores en 2006, transformaron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) con las proteínas de cápside VP2 y VP6 del rotavirus. La co-expresión de las proteínas resultó en su ensamblaje en PVAs. Un extracto de proteína (100 µg, equivalente a 1 µg proteína de RV) más adyuvante de Freund se administró vía intraperitoneal (i.p.) 3 veces en ratones BALB/c y resultó en un aumento significativo 9 veces de anticuerpos anti-RV. Fujiyama y colaboradores en 2006, insertaron fragmentos de ADN que codifica para una secuencia de 15 aminoácidos derivados de las proteínas VP3 y VP1 de la cápside del poliovirus tipo 1 Sabin en el virus mosaico del tabaco (VMT), con los virus modificados genéticamente transformaron plantas de *N. tabacum*. Cuando se inyectó a ratones, las partículas virales quiméricas indujeron anticuerpos contra ambos: proteínas de poliovirus y del VMT.

Helicobacter pylori genera una de las infecciones bacteriana más frecuentes, causa gastritis, cáncer gástrico y la enfermedad ulcero-péptica. El desarrollo de una vacuna se complica debido a que la infección no induce una inmunidad protectora. De las múltiples estrategias planteadas destaca el trabajo de Zhang y colaboradores en 2010, insertaron la proteína HspA de *H. pylorii* en tabaco y después inmunizaron a ratones con extractos del tabaco transgénico lo que indujo la producción de anticuerpos específicos.

La enfermedad de Lyme es causada por la bacteria *Borrelia burgdorferi*, esta enfermedad es transmitida a través de la picadura de una garrapata. La inmunidad para esta infección es mediada por la lipoproteína bacteriana OspA, esta proteína debe

ser lipídada, es decir, que se le agreguen fragmentos de lípidos (pudiendo ser estos ácidos grasos o grupos poliisopreno), para generar inmunogenicidad. Por lo que Glenz K y colaboradores en 2006 expresaron la proteína OspA en los cloroplastos de tabaco. Los ratones inmunizados con OspA a partir de extractos de la planta desarrollaron anticuerpos a niveles óptimos.

2.7 Vacunas contra enfermedades neurodegenerativas

El uso de las vacunas se ha visto reflejado principalmente en el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas, pero actualmente se ha buscado que este tipo de tratamiento sea implementado también en afecciones no infecciosas como lo son las enfermedades neurodegenerativas, esta alternativa apenas está empezando a desarrollarse por lo cual hasta ahora son solo fármacos atenuantes de los síntomas progresivos como es el desarrollo de inmunoterapias contra las enfermedades no transmisibles. También, se han evaluado métodos basados en genes que expresan antígenos mediante vectores virales o plásmidos de ADN. La mayoría de las investigaciones sobre el desarrollo de vacunas en esta área se han centrado en las dos enfermedades neurodegenerativas más comunes, la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), que se caracterizan por la demencia progresiva y trastornos del sistema motor (Ugen *et al.*, 2015).

En 2011 fue aprobada por la oficina de patentes de Estados Unidos la vacuna EB-101 de EuroEspes contra la Enfermedad de Alzheimer. Esta vacuna tiene un diseño bimodal, es decir que es preventiva y terapéutica. La EB-101 incorpora liposomas enriquecidos con factores tróficos que le otorgan ese efecto dual. Para el mismo año AFFiRiS presentó la evaluación de un estudio clínico en fase 1 para la vacuna AFFITOPE® AD02, la cual es una vacuna dirigida contra EA. Consiste en péptidos sintéticos compuestos por 6 aminoácidos que simula el extremo N-terminal de A β , se estima que este fragmento ayuda a reconocer exclusivamente a A β sin una reacción cruzada con APP (proteína precursora amiloide). A diferencia de otros tratamientos, la EB-101 usa el epítipo B en lugar del epítipo T, lo cual puede que ayude a la producción de anticuerpos-A β y también minimiza la respuesta inflamatoria.

Una de las primeras vacunas para el tratamiento de la EP fue la vacuna AFFITOPE® PD01, la cual tiene como objetivo inducir anticuerpos que reconocen los agregados de α -syn, que están involucrados con la patogénesis. La vacuna consiste en un conjugado de un formulado peptídico con hidróxido de aluminio como adyuvante. Los estudios preclínicos implicados en la administración de AFFITOPE® PD01 demostraron la inducción de una respuesta inmune humoral hacia α -Syn, mientras que los experimentos realizados en modelos de ratones transgénicos mostraron que la inmunización con AFFITOPE® PD01 redujo los niveles cerebrales de α -syn (Schneeberger *et al.*, 2010).

Hasta el momento solo AFFiRiS (Viena, Austria) ha logrado traducir un enfoque de vacunación activa diseñada para α -syn a nivel clínico. Implementando péptidos cortos, denominados AFFITOPES, se logra imitar la región de la molécula de α -syn ya que sus secuencias difieren de la proteína nativa. La falta de identidad de secuencia con las moléculas nativas implica que no es necesario superar los mecanismos de tolerancia. Debido a su tamaño pequeño, los péptidos no pueden por si mismos activar las células T, y requieren conjugación con los portadores para provocar una respuesta de anticuerpos. El desarrollo clínico se hizo en base a la inmunogenicidad, especificidad de la respuesta inmune que inducen y los resultados de los estudios prueba de concepto en modelos animales. PD01A y PD03A han sido evaluadas en tres modelos (PB, DLB y MSA) de ratones transgénicos independientes establecidos para la EP. En estos estudios, las vacunas AFFITOPE como PD01A y PD03A fueron capaces de inducir una respuesta inmune mediada por anticuerpos caracterizada por el reconocimiento selectivo de la α -syn agregada mientras se evita la reactividad cruzada con la β -syn. Los candidatos (PD01A y PD03A) redujeron los niveles de α -syn cerebral patológica (agregada) en diferentes tipos de células, incluidas las neuronas y oligodendrocitos sin cambiar significativamente los niveles de α -syn fisiológicos en los modelos. En todos los casos, se produjo una reducción en la neurodegeneración asociada a α -syn. La vacuna AFFITOPE® no generó una neuroinflamación evidente o algún daño tisular.

2.8 Cultivo *in vitro* de plantas

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es una fuente valiosa para la producción de compuestos activos. Pueden cultivarse plantas enteras, semillas, órganos o células no diferenciadas (generalmente propagadas en forma de callos) y algunos de estos tipos de cultivos pueden ser interconvertibles mediante el uso de fitohormonas. Normalmente son establecidos bajo condiciones controladas y asépticas para producir diferentes metabolitos secundarios en plantas e incluso han permitido la obtención de nuevos compuestos de gran interés para la industria farmacéutica, principalmente.

2.8.1 Medio de cultivo

Para la elección del medio de cultivo se necesita un conocimiento previo sobre la especie, tipo de cultivo *in vitro*, condiciones químicas y ambientales requeridas, no obstante, los medios de cultivo en su mayoría son formulados en forma más o menos empírica.

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953; Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1976 Schenk y Hildebrandt, 1972). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Los requerimientos básicos para el crecimiento de los tejidos vegetales son satisfechos al aportar las sales necesarias al medio. Elementos como el potasio, calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo y azufre denominados como “macronutrientes” ya que se requieren en grandes cantidades, mientras que elementos como el boro, hierro, cobre y manganeso denominados como “micronutrientes” son requeridos en menor cantidad.

Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita crecimiento celular adecuado; además el medio debe ir enriquecido con aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento (Schillberg *et al.*, 2013).

2.8.1.2 Medio Murashige y Skoog (MS)

El medio MS fue descrito en 1962 por Toshio Murashige y Folke K. Skoog, actualmente es el más usado a nivel mundial para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Se destaca por su alto contenido de sales, principalmente nitrato de amonio y potasio, así también los requerimientos nutricionales para la mayoría de las especies vegetales que se trabajan. Los callos vegetales a diferencia de las plantas completas no son fotoautótrofos, por lo que es necesario que los medios de cultivo cumplan con las necesidades metabólicas de la planta. La adición de sacarosa al medio cumple como fuente de carbono en células cultivadas *in vitro*, las cuales mayormente son heterotróficas. De esta forma actúa como fuente energética y de carbono, incrementando el potencial osmótico del medio.

Los macroelementos (N, P, K, S, Ca y Mg) requeridos en grandes cantidades, son de suma importancia para el cultivo *in vitro* de plantas. Mientras que los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, I, Al y Fe) son requeridos en menor cantidad, ambos tipos de nutrientes deben estar en una concentración que permita el crecimiento adecuado de la planta.

2.8.2 Tipos de cultivos

La producción de plantas, órganos o tejidos de plantas y de metabolitos o moléculas de interés puede realizarse mediante cultivos de tejidos vegetales diferenciados o indiferenciados. Poniendo enfoque en la producción de células indiferenciadas se derivan dos tipos de cultivos. El cultivo en callos y el cultivo de células en suspensión.

2.8.3 Cultivos de callos

El cultivo en callos es el tipo de cultivo más usado y se obtiene a partir de casi cualquier planta u órgano. La inducción del callo se da a partir de un explante vegetal (tallo, hoja, raíz), que se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y

mantenga su crecimiento y una división celular continúa. Los cultivos de callos cuentan a menudo con un crecimiento lento y heterogéneo, debido fundamentalmente a la disponibilidad vectorial de los nutrientes del medio de cultivo sólido. Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos cortos, variables según la especie (30-45 días). La tasa de crecimiento y las características de friabilidad dependen de la especie, del balance hormonal, de la concentración del medio, macronutrientes y micronutrientes, así como de la intensidad luminosa (Gómez-Kosky, 1998). El cultivo de callos sirve de inóculo para iniciar el cultivo de células en suspensión, lo cual permite mantener a las células en condiciones adecuadas de agitación y dispersión de nutrientes, lo cual promueve su crecimiento y disociación. Generalmente se cultivan heterotróficamente usando azúcares simples como fuente de carbono y el suministro de otros nutrientes inorgánico como potasio, magnesio, calcio e incluso hierro (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010).

2.8.4 Cultivos de células en suspensión

El cultivo de células vegetales en suspensión es una técnica que permite conocer diversos aspectos del cultivo, como su comportamiento metabólico, fisiológico y bioquímico, así como controlar y optimizar las condiciones de cultivo para la producción de biomasa (Moscatiello *et al.*, 2013). Se constituyen principalmente por células meristemáticas indiferenciadas, más débiles e inestables en comparación con su estado en el ambiente natural, sin embargo, con respecto a los cultivos de células diferenciadas (raíces y brotes), presentan las ventajas de poder ser cultivadas a mayores concentraciones celulares y a mayores velocidades de crecimiento (Schlatmann *et al.*, 1996). Las suspensiones celulares son de los sistemas *in vitro* más utilizados en investigaciones debido a que es el más práctico para el cultivo a gran escala y presenta múltiples ventajas para el control de parámetros en biorreactores. La cinética de crecimiento de los cultivos de células vegetales cuenta con varias similitudes a la cinética de crecimiento microbiana, son diferentes fases de crecimiento. Primer fase adaptación, seguida de la fase de crecimiento o exponencial, donde se

produce un aumento constante de la biomasa, incrementando tanto el número como el tamaño celular, el índice mitótico comienza a declinar por limitación de nutrientes, hasta llegar a la fase estacionaria y posteriormente la fase de muerte celular.

III. Antecedentes directos

3.1 Origen de la línea transgénica Z4

En 2017, Arévalo-Villalobos y colaboradores realizaron un trabajo enfocado en la transformación de líneas de callos transgénicos en tabaco (*N. tabacum*) que expresaban la proteína quimérica (LTB-Syn) compuesta por la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) y tres epitopes de la proteína α -sinucleína (Syn1, Syn2 y Syn3), los cuales son relevantes para la enfermedad de Parkinson. Así mismo, se comprobó la expresión del transgén mediante PCR y LA presencia DE las proteínas por Western blot. Para el análisis de la expresión de la proteína se utilizaron dos anticuerpos diferentes (anti-LTB y anti-Syn) y mediante ensayos de ELISA-GM1 se cuantificó obteniendo rendimientos de hasta 160 ng/g PF de proteína LTB-Syn. Finalmente, mediante ensayos de inmunogenicidad de la proteína quimérica (LTB-Syn) en murinos comprobaron la presencia de anticuerpos anti-syn en el suero de los animales inmunizados, indicando la existencia de una respuesta humoral después de la administración oral.

Con el propósito de desarrollar una vacuna de bajo costo, segura y efectiva, y considerando que las plantas son un vehículo seguro para la administración oral se logró la transformación estable en células de zanahoria (*D. carota*), obteniendo así varias líneas de callos transgénicos que fueron establecidos en medio de cultivo MYT; siendo la línea Z4 la de mayor rendimiento capaz de producir hasta 2.3 μ g de LTB-Syn/g PS. Este antígeno recombinante logró estimular respuestas humorales significativas en ratones después de una combinación oral con el refuerzo parenteral usando un conjugado OVA-Syn (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2020).

3.2 Establecimiento de cultivo de callos y células en suspensión de la línea Z4

Posteriormente, en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales (LIPM) del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) se estableció por primera vez el cultivo *in vitro* de callos transgénicos y células en suspensión de la línea Z4 de

D. carota en medio de cultivo MS basal con el fin de producir la proteína LTB-Syn a nivel matraz y biorreactor airlift, obteniendo un rendimiento de 1.5 µg/g PF de la proteína LTB-Syn en biorreactor (Carreño-Campos *et al.*, 2022). Con estos resultados se ha generado conocimiento operacional para la producción de la proteína LTB-Syn con buenos rendimientos en matraz y biorreactor, por lo que actualmente en el grupo de trabajo del LIPM se aplicó el modelo estadístico multi factorial de Plackett-Burman (Plackett y Burman, 1946), el cual permitió seleccionar y predecir el comportamiento del cultivo de forma simultánea con siete factores esenciales en el medio de cultivo que incluían sus componentes nutritivos (sacarosa, fitorreguladores, urea, glutamato) y factores físicos (luz, pH y densidad del inóculo) (Carreño-Campos *et al.*, 2024). Este análisis factorial mostró que existía un mayor incremento en la variable respuesta con el medio MSU-9 (el cual contenía medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa, 1.6 g/L de urea, pH 5.7, luz constante y sin fitorreguladores). El medio MSU-9 alcanzó un rendimiento de biomasa máxima de 17.8 g/L PF y una expresión de la proteína LTB-syn de 0.21 µg/g PF al día 15, respectivamente. En base a estos resultados predictivos, en este trabajo se estableció y caracterizó en el medio de cultivo MSU-9 los callos la línea Z4U de *D. carota* para la producción de biomasa y proteína LTB-syn en ausencia de fitorreguladores.

IV. Justificación

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor impacto a nivel mundial, lamentablemente existe una falta de tratamientos efectivos y diagnósticos oportunos actualmente, por lo que se le considera una enfermedad de interés clínico. Actualmente las vacunas orales de origen vegetal son convenientes como un tratamiento alternativo contra la agregación de la proteína α -syn relevante en la EP, ya que activan a nivel local y sistémico anticuerpos específicos, además la producción de vacunas vegetales presenta una biomasa libre de patógenos con un procesamiento mínimo para su administración vía oral. Una especie con este potencial es *D. carota*. En el 2020 se generaron los primeros

cultivos transformados de callos y células en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* productores de la proteína LTB-Syn, la cual es importante para el desarrollo de un biofármaco contra la EP. En base a los resultados recientemente establecidos en el LIPM, se pretende con este trabajo caracterizar el cultivo *in vitro* a nivel de callos la línea Z4U empleando el medio de cultivo MSU-9, el cual cuenta con la adición de urea y ausencia de fitorreguladores de crecimiento, con el propósito de producir la proteína LTB-Syn de interés contra Parkinson.

V. Hipótesis

Los cultivos de callos transgénicos de la especie *Daucus carota* crecidos en el medio de cultivo MS con una fuente adicional de nitrógeno (urea) y en ausencia de fitorreguladores, producirá la proteína LTB-Syn de interés contra Parkinson.

VI. Objetivos

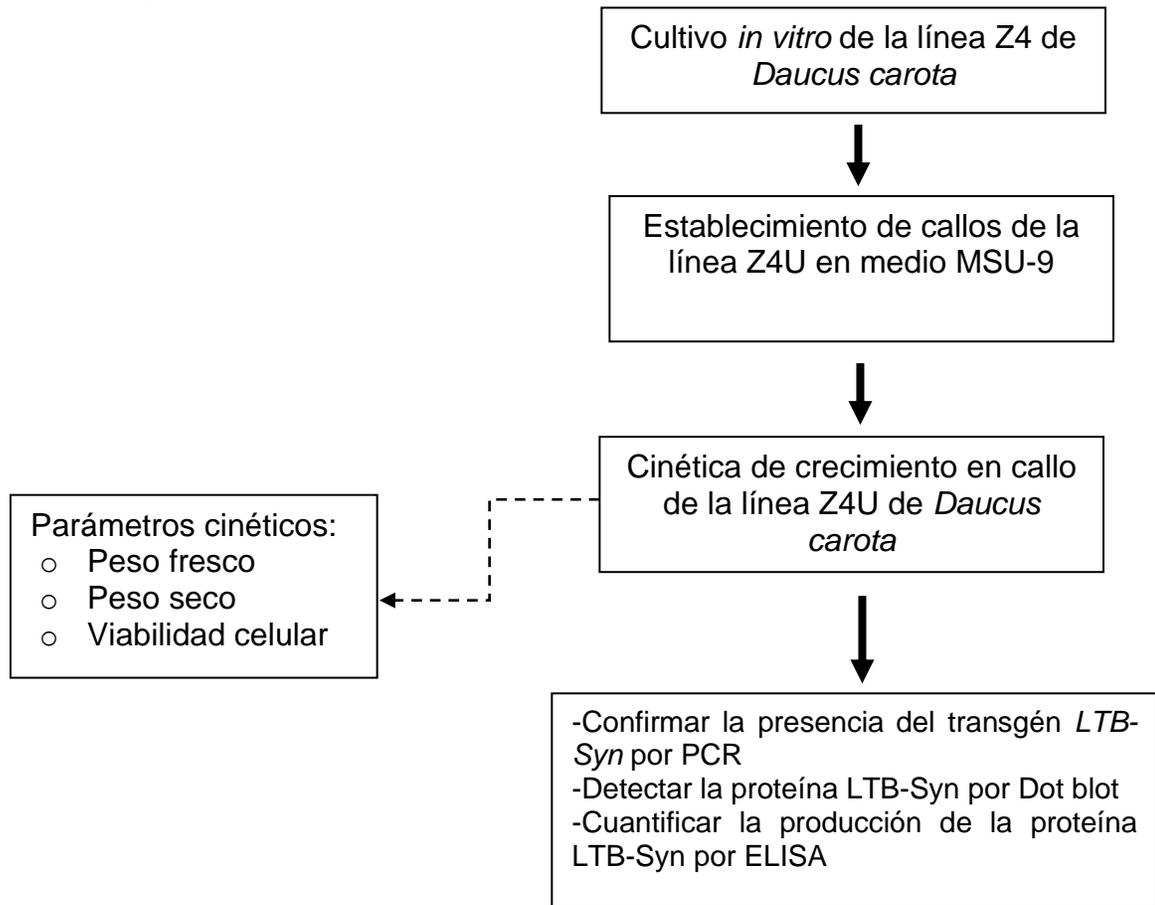
6.1 Objetivo general

Establecer y caracterizar los cultivos de callos generados a partir de la línea Z4 de *D. carota* crecidos en medio de cultivo MS modificado para producir la proteína LTB-Syn de interés contra Parkinson.

6.2 Objetivos específicos

1. Establecer los cultivos de callos de la línea Z4U de *Daucus carota* en medio de cultivo suplementado con urea y en ausencia de fitorreguladores (MSU-9).
2. Caracterizar la cinética de crecimiento de callos de la línea Z4U de *D. carota* en medio de cultivo MSU-9 por 24 días.
3. Determinar la producción y expresión de la proteína LTB-Syn de la línea Z4U de *D. carota* por PCR, ELISA y Dot blot.

VII. Estrategia Experimental



VIII. Materiales y métodos

8.1 Material vegetal

Para este trabajo se utilizó la línea transgénica Z4 de *Daucus carota*, desarrollada y utilizada en trabajos previos (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2020; Carreño-Campos *et al.*, 2022).

8.2 Medio de cultivo MSU-9

- MSU-9: el Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog *et al.*, 1962) contiene macroelementos, microelementos, EDTA, mioinositol, vitaminas, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 1.5g/L de polivinilpirrolidona (PVP) como agente antioxidante, 1.6 g/L de urea, y sin fitorreguladores de crecimiento. El medio MSU-9 sólido se le adicionó 2.5 g/L de Phytigel como agente gelificante, se ajustó el pH a 5.7 y se esterilizó por 15 min a 121°C y 15 psi.

8.3 Condiciones del cultivo y propagación de callos de la línea Z4U de *D. carota*

La adaptación de los callos se realizó en frascos de vidrio con 20 mL de medio MSU-9 sólido donde se inoculó un 1% de callos de la línea Z4U y se dejaron por 30 días en luz constante a 25% de humedad y 25°C. Posteriormente se realizó la propagación de los callos haciendo subcultivos cada 20 días en medio MSU-9 sólido fresco.

8.4 Cinética de crecimiento en callos de la línea Z4 de *D. carota*

La cinética de crecimiento se inició con un inóculo de ± 1 g de callos friables de la línea Z4U (nombrada así por su adaptación en el medio de cultivo MSU-9) de *D. carota*, se utilizaron 12 frascos de vidrio de 100 mL con un volumen de 20 mL de medio MSU-9 sólido y se mantuvieron en condiciones de luz constante a 25% de humedad y 25°C por 24 días. Se tomaron muestras por duplicado los días 0, 6, 12, 15, 18, 21 y 24 los cuales sirvieron para determinar los principales parámetros cinéticos de crecimiento (peso fresco, peso seco, viabilidad celular, producción de proteína LTB-Syn). Las curvas de crecimiento cinético fueron realizadas en función al tiempo en días.

8.5 Métodos analíticos

8.5.1 Análisis de biomasa en peso fresco

El peso fresco se determinó colectando la biomasa de los callos de la línea Z4U obtenidos durante la cinética de crecimiento, se colocó en papel filtro y posteriormente se pesó en una balanza analítica. Las muestras obtenidas se pusieron en tubos falcón de 50 mL y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

8.5.2 Análisis de biomasa en peso seco

La biomasa fresca previamente obtenida se dejó secar durante 3 días en una liofilizadora marca LABCONCO a -50°C y 0.02mbar de vacío, hasta mantener un peso seco constante. Con los datos generados se realizaron los análisis estadísticos.

8.5.3 Datos cinéticos:

Con los datos obtenidos de biomasa en peso seco se calculó la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y el tiempo de duplicación (td) de las células mediante las siguientes ecuaciones:

$$\mu = \text{Ln} (X_f/X_i) (1/t)$$

$$td = \text{Ln}2/\mu$$

Donde:

μ : velocidad específica de crecimiento; X_i : biomasa inicial; X_f : biomasa final; t : tiempo; td : tiempo de duplicación y $\text{Ln}2$: logaritmo natural de 2.

8.5.4 Viabilidad celular

La viabilidad celular se obtuvo mediante una reacción fluorocromática mediada por diacetato de fluoresceína (DAF) (Widholm, 1972). El stock de DAF se preparó disolviendo 5mg de DAF en 1mL de acetona y se almacenó a 4°C. Del stock se tomaron 0.1 mL y se disolvió en 5 mL de agua desionizada. Después en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se añadió 500 μL de esta solución junto con una porción del callo y se resuspendió en 500 μL de agua desionizada. Se dejó reposar por 30 segundos para después tomar 0.1 mL de esta suspensión y colocar en un portaobjetos para ser observado bajo el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E 400, super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF). El porcentaje de células viables se calculó por cuatro cuadrantes, en donde se contaron las células que emitieron fluorescencia, se dividieron entre las células presentes y el resultado se multiplicó por 100.

8.6 Detección del transgén *LTB-Syn* por PCR

La presencia del transgén *LTB-syn* se realizó mediante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) en el laboratorio de biofármacos recombinantes de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. El DNA genómico se purificó siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983), a partir de 10 mg de PS de callos de la línea Z4U obtenidos de la cinética. La mezcla de reacción (25 μ L) contenía buffer de PCR 1x [200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 100 ng de DNA, 1.5 mM cloruro de magnesio, Taq DNA polimerasa 2.5 U/ μ L (New England BioLabs), 1 mM dNTPs y 1 μ M oligonucleótidos específicos (primers). Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% en un buffer TAE 1X a 100 V por 20 minutos. Después fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Los primers utilizados para detectar el transgén LTB-syn fueron:

- sentido directo: 5'-CGCACAATCCCACTATCCTTCGC-3';
- sentido reverso: 5'-CAAGACCGGCAACAGGATTCAATC-3'.

Las condiciones de amplificación comprendieron una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos, seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2020)

8.7 Cuantificación de la proteína LTB-Syn por ELISA

Partiendo de los callos de la línea Z4U de la cinética de crecimiento se realizó la extracción de proteínas totales siguiendo el método reportado por Franklin *et al.* (2002). La estimación de la producción de proteína LTB-Syn a partir de los extractos solubles se hizo mediante un ensayo de ELISA-GM1 de acuerdo con el protocolo de Chikwamba *et al.*, (2002).

8.8 Presencia de la proteína LTB-Syn por Dot blot

La presencia e integridad de la proteína LTB-Syn en los callos de la línea Z4U se evaluó mediante el análisis de inmunodetección por Dot-blot. Se aplicaron 8 μ L de los extractos solubles de cada punto cinético de crecimiento, estos se colocaron sobre una membrana de nitrocelulosa y se dejaron secar, posteriormente se bloqueó con leche libre de grasa al 5% durante 2 horas. Se lavó la membrana con PBST y se colocó el anticuerpo primario anti-CTB (dilución 1:500) y se incubó a 4°C por una noche. Al siguiente día se lavó la membrana con PBST, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:2000) por 2 horas y finalmente se reveló por quimioluminiscencia en el equipo iBright system FL1000.

IX. Resultados

9.1 Adaptación de callos de línea Z4U de *D. carota* en medio MSU-9

A partir de los callos friables de la línea Z4 previamente establecidos en el LIPM en medio MS basal, se comenzó la adaptación de callos de la línea Z4U al medio MSU-9. El cual contiene una fuente de nitrógeno adicional con urea (1.6 g/mL) y se eliminó el uso de fitorreguladores. Los callos generados fueron subcultivados cada 20 días en medio fresco, esto permitió obtener después de 7 subcultivos continuos su adaptación y establecimiento celular, como se muestra en la figura 2.

En el proceso de adaptación los callos de la línea Z4U al medio MSU-9 se observó un cambio de coloración verde-amarillo a crema con coloración café al día 21, indicando una posible oxidación por compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa que produce quinonas, las cuales generan daño y hasta muerte celular (Bray *et al.*, 2000). Este tipo de oxidación ya se ha visto en otros cultivos sin fitorreguladores, como reportó Gómez *et al.*, (2006) y Feeney *et al.*, (2007), que lo atribuían a la producción de fenoles. Una solución planteada por Valdez-Balero y colaboradores en 2002, es la adición de agentes antioxidantes, como ácido ascórbico, ácido cítrico o un adsorbente al medio (carbón activado) para evitar el daño en los callos. Sin embargo, en este caso al pasar varios subcultivos y como el medio MSU-9 contenía PVP, no fue necesario adicionar o cambiar de antioxidante ya que después de 7 subcultivos las células crecieron bien.



Figura 2. Adaptación de callos de la línea Z4U de *Daucus carota* en medio de cultivo MSU-9.

9.2 Cinética de crecimiento de callos de la línea Z4U de *D. carota*

Una vez establecidos los callos de la línea Z4U en medio MSU-9 sin fitorreguladores, se llevó a cabo una cinética de crecimiento durante 24 días en las condiciones mencionadas en la metodología.

En la Figura 3, se muestran los resultados de la curva de crecimiento de los callos en peso seco (PS) por 24 días. Al inicio de la cinética se observó una fase de adaptación llamada fase de adaptación o fase lag, la cual abarcó del día 0 al día 15, indicando que los callos requerían mayor tiempo para adaptarse a las nuevas condiciones nutricionales del medio comparados con los medios estándares en los que crecía la línea Z4. Posteriormente, del día 18 al 24 se observó la fase exponencial (log) de crecimiento con una máxima producción de biomasa de 0.1g/PS al día 24, esto representa 2.5 veces más que el inoculó inicial (0.031 $\mu\text{g/g}$ PS). Con estos datos se calculó la $\mu = 0.028/\text{d}$ y $t_d = 24$ días. La fase estacionaria y de muerte celular no se reporta, ya que era importante para este trabajo verificar los días de mayor crecimiento en callos y producción de la proteína LTB-Syn.

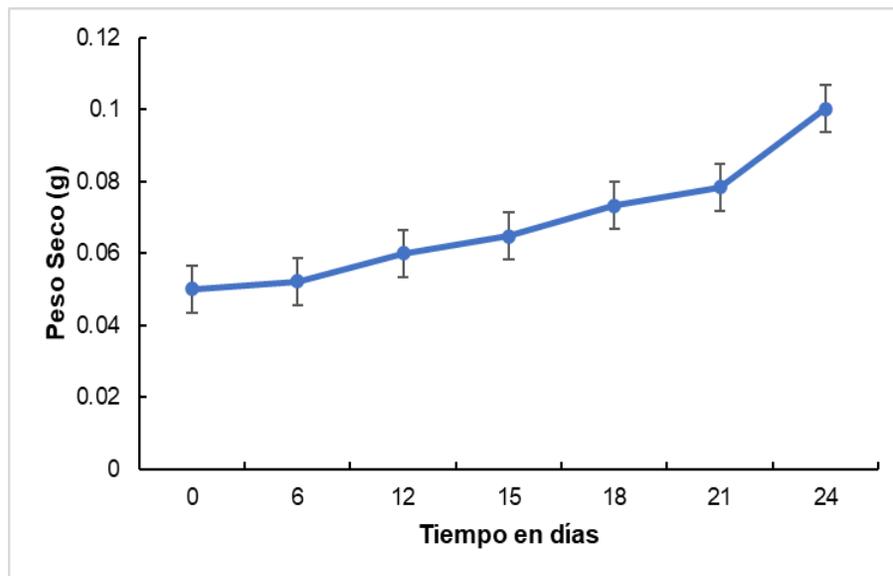


Figura 3. Curva de crecimiento en PS de callos de la línea Z4U de *D. carota* en medio MSU-9.

9.2.2 Viabilidad celular de cultivo de callos de *D. carota*

Para validar el crecimiento celular durante la cinética de crecimiento se usó la técnica de diacetato de fluoresceína (DAF) y se calculó el % de viabilidad celular. Al ingresar el DAF por la membrana celular, se hidroliza por las esterasas intracelulares en células viables, lo cual genera la fluorescencia. Para retener la fluoresceína dentro de la célula es necesaria la integridad de la membrana y se puede visualizar la fluorescencia con ayuda de un microscopio de fluorescencia.

Al observar los callos de la línea Z4U de *D. carota* al microscopio de fluorescencia, se observó que el cultivo mantuvo una viabilidad del 100% durante 14 días, posteriormente al día 15 disminuyó ligeramente a 96% y posteriormente al día 21 se observó un 95% de viabilidad celular (Figura 4).

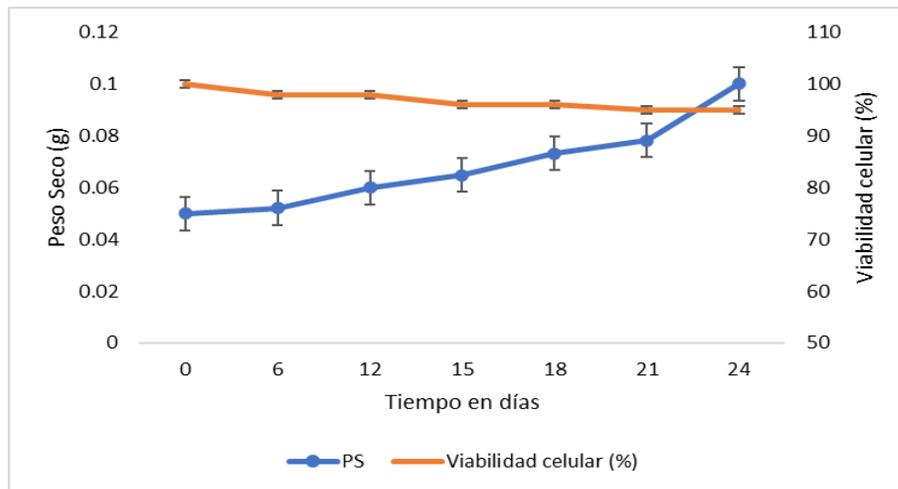


Figura 4. Curva de crecimiento en PS y viabilidad celular de callos de la línea Z4U de *D. carota* en medio MSU-9.

En cuanto a la morfología celular, a partir del día 6 de la cinética, se observaron células redondeadas y algunas alargadas, donde se aprecia la fase de división celular. Para los días 12 a 18, las células alargadas se observaban más que las células redondeadas y posteriormente entre los días 21 y 24 se empezaron a observar en su mayoría agregados celulares, indicando una adhesión de la pared celular entre células, lo cual ayuda al transporte de metabolitos (Figura 5).

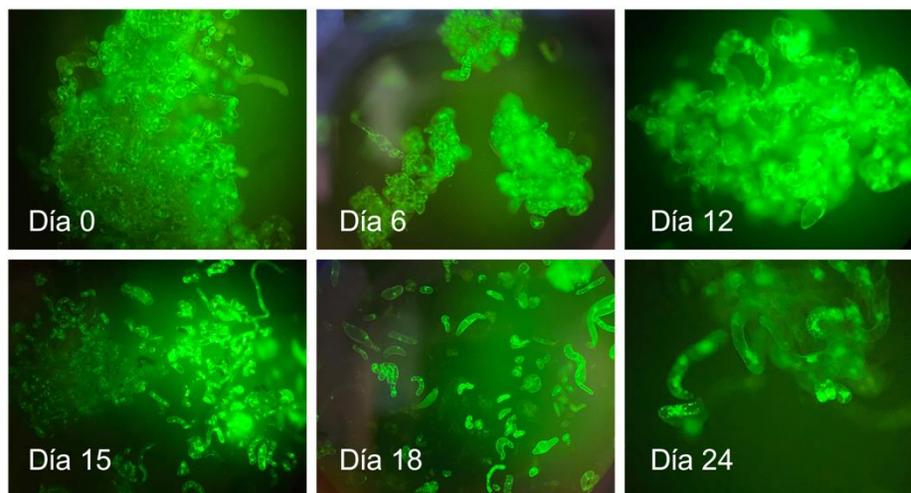


Figura 5. Morfología y viabilidad de callos de la línea Z4U en diferentes días de la cinética de crecimiento observadas bajo el microscopio de fluorescencia a 40X en presencia de DAF.

9.3 Detección del transgén LTB-Syn durante la cinética de crecimiento de *D. carota*

Para comprobar la expresión del transgén *LTB-Syn* expresado en la línea Z4U durante la cinética de crecimiento con el medio MSU-9 se realizó un PCR con primers específicos para el transgén. Una vez obtenido DNA nuclear, se confirmó la presencia del transgén *LTB-Syn* con bandas de peso molecular esperado de 737pb en los callos de la cinética al día 0 (carril 5) y día 24 (carril 6), mientras que la línea no transformada WT (carril 3) no mostró amplificación (Figura 6).

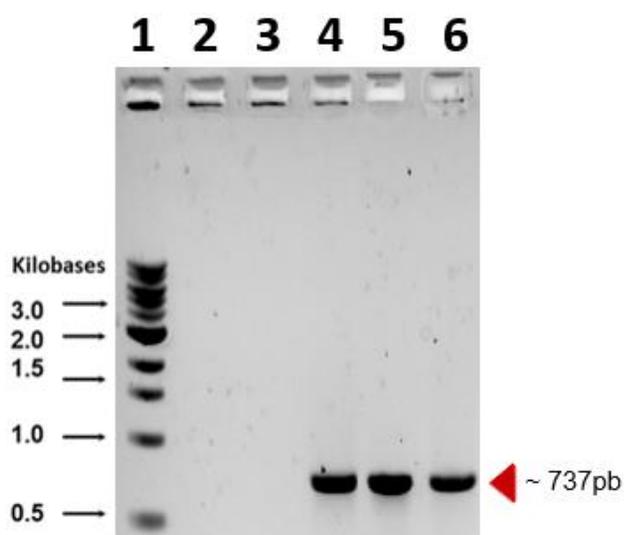


Figura 6. Detección del transgén *LTB-Syn* por PCR durante la cinética de crecimiento. Carril 1, marcador de peso molecular (1kb); Carril 2, control negativo reactivos (-); Carril 3, control negativo línea no transformada (WT); Carril 4, control positivo; Carril 5, día 0; Carril 6, día 24 cinética. Peso molecular esperado del transgén (737pb) en la flecha roja.

9.4 Detección de la proteína LTB-Syn por Dot-blot en cultivos de *D. carota*.

La presencia de la proteína LTB-Syn en los callos de la línea Z4U durante la cinética se realizó mediante la técnica de Dot-blot. Los resultados mostraron que existía una reactividad positiva en todas las muestras respecto al control negativo (WT) al generarse la inmunodetección en la membrana de nitrocelulosa como se muestra en la Figura 7.

Para este análisis, se colocó una muestra de CTB como control positivo (+), una muestra de la línea no transformada (WT) como control negativo, una muestra de Z4 confirmada como control positivo y las muestras de extractos de proteína total de la línea Z4U durante los diferentes días la cinética en medio MSU-9 (puntos 1 al 7, de la Fig. 7). Con este análisis se confirmó la expresión y la presencia de la proteína LTB-Syn en la línea Z4U crecidos en el medio de cultivo MSU-9.

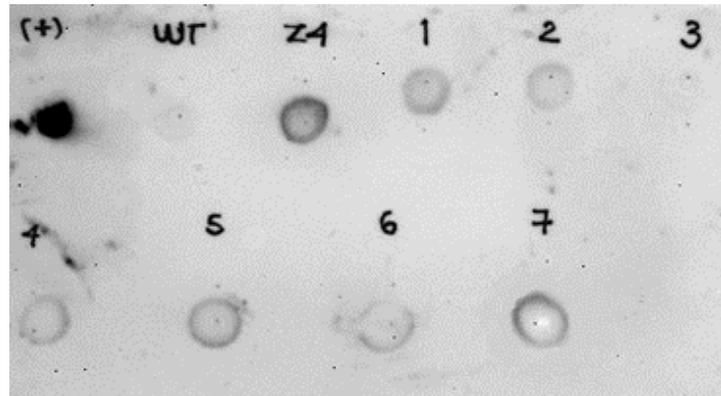


Figura 7. Detección de la presencia de la proteína LTB-Syn por Dot-blot. Los extractos de proteínas solubles totales de cada una de las muestras obtenidas en la cinética y los controles se sometieron a inmunodetección con suero anti-CTB. Carriles: (+) CTB control positivo; (WT) control negativo línea no transformadas; (Z4+) control positivo; (1) Día 0 cinética; (2) Día 6 cinética; (3) Día 12 cinética; (4) Día 15 cinética; (5) Día 18 cinética; (6) Día 21 cinética; (7) Día 24 cinética.

9.5 Producción de la proteína LTB-Syn

En la Figura 8, se observa la curva de producción de la proteína LTB-Syn producida por *D. carota* durante los diferentes días de la cinética. Se observó que los días con mayor producción de LTB-Syn fueron al día 15 con 0.23 $\mu\text{g/g}$ PS y al día 18 con 0.25 $\mu\text{g/g}$ PS, posteriormente la expresión de LTB-Syn fue disminuyendo del día 21 al 24 con una producción final de 0.09 $\mu\text{g/g}$ PS.

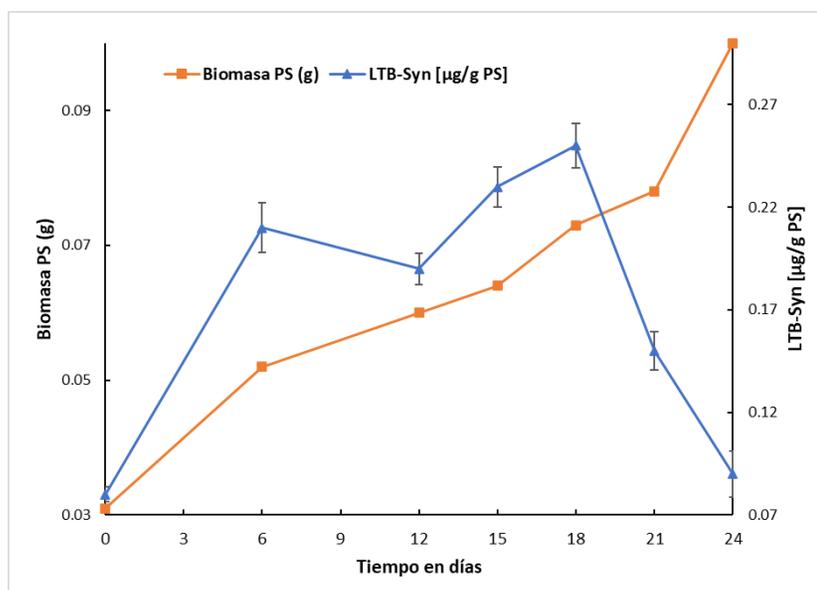


Figura 8. Producción de proteína LTB-Syn y curva de crecimiento (PS) de la línea Z4U de *D. carota* en medio MSU-9.

En la Tabla 3 se muestra una comparación de los valores máximos de producción de biomasa y proteína LTB-Syn obtenidos en los cultivos de *D. carota* en medio MS basal y medio MSU-9, los cuales serán detallados en la discusión.

Tabla 3: Comparación de valores máximos de producción de biomasa y proteína LTB-Syn en medio MS basal y medio MSU-9 a nivel de callos de *D. carota*, crecidos.

Medio de cultivo	Biomasa	Proteína LTB-Syn	Días de mayor producción
MSU-9 con urea y sin fitorreguladores	1.7 – 2.2 g PF	0.23 – 0.25 µg/g PS	15 y 18
MS basal con fitorreguladores	3.0 – 3.6 g PF	0.16 – 0.17 µg/g PF	15 y 25

X. Discusión

10.1 Cinética de callos de la línea Z4U en medio MSU-9

A partir de un análisis factorial previamente reportado (Carreño-Campos *et al*; 2024) se inició el establecimiento de cultivos de callos celulares de la línea transgénica Z4U de *D. carota* en un medio MS adicionado con urea y en ausencia de fitorreguladores denominado MSU-9. El comportamiento de los callos de la línea Z4U durante la cinética, es similar a lo reportado con la línea Z4 en medio MS basal adicionado con 2,4-D y Cinetina (Carreño-Campos, 2019), en donde la curva de crecimiento tenía una fase lag de 15 días, y una fase exponencial entre los días 20 y 25 en condiciones de fotoperiodo (16h luz/8h oscuridad) a 25°C. Es importante mencionar que los días de cinética entre ambos cultivos son distintos, en este trabajo se hizo cada tercer día con el fin de encontrar el inicio y el fin de las fases de adaptación y exponencial que puedan servir más adelante para el establecimiento de células en suspensión. Caballero y Cardona (2007) señalan que una fase lag se puede extender debido a la densidad del inóculo, al origen de este y condiciones de crecimiento. Durante la cinética de callos se observaron cambios morfológicos en forma de agregados celulares conforme los días pasaron, esto se debe a la tendencia natural de agregarse que es mediada por la cohesividad de la pared celular, la cual permite la comunicación de célula a célula que ayuda al transporte de intermediarios necesarios para la biosíntesis de metabolitos secundarios y proteínas (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007). Curtis y Emery en 1993, reportaron el aumento de la presencia de agregados celulares en los últimos días de cinéticas en células de *Nicotiana tabacum* cultivadas *in vitro*. A su vez, Carreño-Campos en 2019, reportó agregados celulares en el cultivo en callos de la línea Z4 de *D. carota* en medio MS basal adicionado con fitorreguladores.

El cultivo con el medio MSU-9 resulta muy atractivo biotecnológicamente, ya que es importante para la obtención de condiciones de operación rentables y estrategias de cultivo que reduzcan el costo de producción de la proteína LTB-syn

sobre todo cuando se busca un biofármaco que evada el proceso de purificación para su administración por vía oral, además de que el uso de fitorreguladores puede ser dañino para la salud humana. La agencia internacional de investigación del cáncer de la OMS añadió en el 2015 a ciertos fitorreguladores, destacando 2,4-D, en la categoría de “posiblemente cancerígeno para el ser humano” (OMS, 2015). Por ahora, no hay informes en donde se hayan cultivado células de *D. carota* sin el uso de fitorreguladores para la producción de vacunas orales.

10.2 Análisis comparativo de producción de biomasa y proteína LTB-syn

La comparación de los valores máximos de biomasa y proteína LTB-Syn obtenidos con los medios de cultivos MS basal y MSU-9 en callos se resumen en la Tabla 4. En la producción de callos se observa una mayor biomasa con valores de 3.0 a 3.6 g/PF en los cultivos de MS basal adicionados con 2,4-D y cinetina, lo cual concuerda con lo reportado con el uso de auxinas, ya que tienen la capacidad de estimular una mayor división celular e influir en la regulación del ciclo celular, así como influir en la proliferación de callos (Alvarenga *et al.*, 2002; George, 2008). Sin embargo; aunque la producción de biomasa en la línea Z4U con el medio MSU-9 durante la cinética fue más lento, se obtuvieron valores de 1.7 a 2.2 g PF de biomasa, similares al medio MS basal. Esto podría deberse a que estos callos provenían de cultivos establecidos con fitorreguladores de crecimiento, siendo una respuesta de adaptación a las nuevas condiciones y una expresión tardía del efecto con el tratamiento previo. Resultados similares se han obtenidos con medio MS sin fitorreguladores respecto al medio MS suplementado con diferentes concentraciones de fitorreguladores de crecimiento (Pelah *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que la transformación genética de la línea Z4 de *D. carota* que fue mediada por *Agrobacterium* que contiene las secuencias de plásmidos Ti (inductores de tumores) y los genes 1 pTiA6 y 2 pTiA6 implicados en la producción de auxinas endógenas (Willmitzer *et al.*, 1983). Se ha demostrado que el gen 2 pTiA6 que codifica para una amino hidrolasa es capaz de convertir la indol-3-acetamida en

ácido indol-3-acético, que es la auxina natural activa en los tejidos vegetales (Schröder *et al.*, 1984). Por lo que después de siete subcultivos continuos los callos proliferaron sin problemas y se adaptaron al medio MSU-9 sin la adición de fitorreguladores exógenos, deduciendo así que la línea Z4U estaba produciendo sus propias auxinas en el medio. Además actualmente los cultivos de callos de la línea Z4U tienen creciendo 23 meses, lo que correspondería a 34 resiembras en el medio MSU-9 sin fitorreguladores.

La producción de la proteína LTB-Syn fue favorecida en ausencia de los fitorreguladores en el medio MSU-9 como se puede observar en la Tabla 3, fue beneficiada por la adición de urea inicialmente. La urea representa una fuente eficiente de nitrógeno por ser fácilmente disponible y por incorporarse a la planta más rápido que otro tipo de nitrógeno como la adición de aminoácidos (Ma *et al.*, 2019). Las células vegetales pueden sintetizar glutamina a partir de la urea mediante la sintetasa de glutamina, a su vez la glutamina es uno de los aminoácidos que interviene a la composición de proteínas. Se ha comprobado que el aumentar las cantidades de fuentes de nitrógeno ayuda a incrementar la producción de proteínas recombinantes de 10 a 20 veces más (Holland *et al.*, 2010). Por lo tanto, determinar los días de mayor producción de la proteína LTB-Syn durante la cinética de crecimiento en el medio MSU-9 fue uno de los parámetros importantes en este trabajo, ya que esto ayudará más adelante a establecer la producción constante de proteína LTB-Syn en un cultivo tipo lote alimentado a nivel de biorreactor.

El análisis de PCR se realizó principalmente debido a que el medio MSU-9 no cuenta la adición de fitorreguladores y existía la posibilidad que la línea transformada perdiera el gen recombinante, sin embargo; los resultados confirmaron que tanto al inicio como al final de la cinética estaba presente el transgén *LTB-Syn* en la línea Z4U y no afectó en nada su expresión en ausencia de fitorreguladores mostrando la presencia del transgén *LTB-Syn* con un tamaño esperado de 737 pb. Así mismo, en el ensayo de Dot blot se confirmó la presencia e integridad de la proteína LTB-Syn durante toda la cinética de crecimiento.

Estos resultados son importantes para la producción de proteína LTB-Syn, ya que una vez establecidos los cultivos en suspensión de la línea Z4U de *D. carota* se podrá mejorar el rendimiento de biomasa y producción de la proteína LTB-Syn en un futuro. Además, establecer el cultivo de células en suspensión de la línea Z4U será importante para incrementar la velocidad de crecimiento celular y a su posible escalamiento a biorreactor.

X. Conclusiones

- Se estableció por primera vez un cultivo celular de callos de línea celular Z4U de *D. carota* sin fitorreguladores.
- Se caracterizaron los parámetros de crecimiento celular de callos de la línea celular Z4U con una μ y t_d similar al cultivo de MS basal.
- Se detectó el transgén *LTB-Syn* de la línea celular Z4U por PCR al inicio y final de la cinética de crecimiento.
- Se comprobó por Dot blot y ELISA la presencia e integridad de la proteína LTB-Syn expresada en callos de la línea celular Z4U de *D. carota* al inicio y final de la cinética de crecimiento.

XI. Perspectivas

- Establecer cultivos en suspensión de la línea celular Z4U de *D. carota* en medio de cultivo MSU-9.
- Caracterizar la cinética de crecimiento en suspensión en matraz de la línea celular Z4U de *D. carota*, para incrementar la producción de la proteína LTB-Syn y tener un procesamiento biotecnológico más rentable.
- Escalar a nivel de biorreactor los cultivos de la línea celular Z4U de *D. carota*.

XII. Bibliografía

- Alvarenga S, Alán E, Peraza J. (2002). Informe Final. Estudio de la biología, la propagación vegetativa y el cultivo *in vitro* de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). Cartago, C.R.: Fundación Neotrópica-ITCR.
- Arévalo-Villalobos JI, Rosales-Mendoza S, Govea-Alonso DO, Monreal-Escalante E, Zarazúa S. (2017). LTB-Syn: a recombinant immunogen for the development of plant-made vaccines against synucleinopathies. *Planta*; 245(6):1231-1239.
- Arévalo-Villalobos JI, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. (2020). Using carrot cells as biofactories and oral delivery vehicles of LTB-Syn: A low-cost vaccine candidate against synucleinopathies. *J Biotechnol.* 309, 75-80.
- Aziz MA, Singh S, Kumar PA, Bhatnagar R. (2002). Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochem Biophys Res Comm.* 299:345-351.
- Bonini NM, Giasson BI. (2005). Snaring the function of α -synuclein. *Cell*; 123(3), 359–361.
- Bray E, Bailey-Serres, J, Weretilnyk E. (2000). Responses to abiotic stresses. En: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (Ed.) American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA, p. 1158-1203.
- Burré J (2015). The synaptic function of α -synuclein, *J Parkinsons Dis.* 5(4) 699-713.
- Caballero C, Cardona, N. (2007). Evaluación del crecimiento celular y consumo de sustrato a partir del establecimiento de suspensiones celulares de *Borojoa patinoi* Cuatrec. Obtenido de <http://bdigital.eafit.edu.com/bdigital/PROYECTO/P660.6DCC112/mT.pdf>
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*; 127: 471-472.
- Carreño-Campos C. (2019). Producción a nivel de matraz y reactor air-lift de células de *Daucus carota* que expresan una vacuna experimental contra la enfermedad de

Parkinson (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.

- Carreño-Campos C., Arévalo-Villalobos, JI., Villarreal, ML., Ortiz-Caltempa, A., Rosales-Mendoza, S. (2022). Establishment of the Carrot-Made LTB-Syn Antigen Cell Line in Shake Flask and Airlift Bioreactor Cultures. *Planta Med.* 88(12):1060–1068.
- Carreño-Campos C., Villegas, E., Villarreal, ML., Morales-Aguilar, M., Govea-Alonso, D, Romero-Maldonado A., Jimenez-Capdeville ME., Rosales-Mendoza S. Ortiz-Caltempa, A. (2024). Statistical Experimental Designs for cLTB-Syn Vaccine Production Using *Daucus carota* Cell Suspension Cultures. *Planta Med.* Publicado en línea Mayo 2, 2024. doi:10.1055/a-2307-0400
- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002). A functional antigen in a practical crop: LTB producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and Cholera toxin (CT). *Transgenic Res.* 11:479-493.
- Chwieduk CM, Curran MP. (2010). Pramipexol extended release in Parkinson's disease. *CNS Drugs*; 24(4): 327-36.
- Clayton DF, George JM. (1999). Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res.* 58, 120-129.
- Curtis R, Cardineau GA. (1997). Oral immunization by transgenic plants. United States Patent. 5,654,184
- Curtis W. Emery, AH. (1993). Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnol Bioeng.* 42:4, 520-6
- Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G. (1997). Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents preclinical studies. *Neurosci. Biobehav.*; 21: 455-68.
- Deineko EV, Zagorskaya AA, Pozdnyakov SG, Filipenko EA, Permyakova NV, Sidorchuk YV, Uvarova EA, Pozdnyakova LD, Shumny VK, Vlasov, VV, Hammond, RV, Shchelkunov SN. (2009). Comparative analysis of HBV M-antigen production in leaves of individual transgenic carrot plants. *Dokl Biochem Biophys.* 425, 76–79.

- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol. Rep.*, 1:19-21.
- Doran PM (1995). *Bioprocess engineering principles*, 1st edn. Academic, London.
- ELELYSO. Prescribing information. Pfizer Inc.; 2022. 2. Data on file. Pfizer Inc., New York, NY. 3. Sobreira E, Pires RF, Cizmarik M, Grabowski GA. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest-of-the-world. *Mol Genet Metab.* 2007;90(1):81-86.
- FAO (2017). Organización de la Naciones Unidas para Alimentación y Agricultura. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s08.htm>
- Feeney JA, Passmore NL, Peterson CC. (2007). Adoption, attachment, and relationship concerns: A study of adult adoptees. *Personal Relationships*, 14(1), 129–147.
- Franklin S, Ngo B, Efuat E, Mayfield SP. (2002). Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J.* 30: 733-744.
- Fujiyama K, Saejung W, Yanagihara I, Nakado J, Misaki R, Honda T, Watanabe Y, Seki T. (2006). In planta production of immunogenic poliovirus peptide using tobacco mosaic virus-based vector system. *J Biosci Bioeng.* 101:398-402
- Gamborg OL. (1976). Plant tissue culture media. *In Vitro*, vol. 12, no. 7, p. 473-477.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50:151-158.
- GBD Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* (2019) 18:459–80.
- George EF (2008). *Plant Tissue Culture Procedure – Background*. En E. F. George M.A. Hall y De Klerk G. (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture.*, 3 ed. The Netherlands: Springer
- Glenz K, Bouchon B, Stehle T, Wallich R, Simon MM, Warzecha H. (2006). Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nat Biotechnol J.* 24(1):76-7.

- Goedert M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2:492-501.
- Goldstein DA, Thomas JA. (2004). Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM.* 97:705-716.
- Gómez C, Uribe M, Ríos D, Sánchez-Olate M. (2006). Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *Interciencia,* 31:10, 734-738. Recuperado el 18 de noviembre de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0378-18442006001000008&lng=es&tlng=es
- Gómez-Kosky R. (1998). Selección *in vitro* a enfermedades. En Pérez Ponce JN (Ed.) *Propagación y Mejora Genética por Biotecnología.* Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 327-353.
- Hauser RA. (2010). Early pharmacologic treatment in Parkinson's disease. *Am J Manag Care.* 16: S100-7.
- Heller R. (1953). Recherches sur la nutrition minerale des tissue végétaux cultivés "in vitro". *Ann Sci Nat Bot Veg.* 14: 1-223.
- Holland T, Sack M, Rademacher T, Schamake K, Altmann F, Stadlmann J, Ficher R y Hellwig S. (2010). Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture, *Biotechnol Bioeng.* 107(2):278-289.
- Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesselingh S. (2001). Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine;* 19:2163-2171.
- Ibañez P, Bonnet AM., Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A. (2004). Causal relation between alpha synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet.* 364:1169-1171.
- Jellinger KA. (2014). Neuropathology of Parkinson's' disease. In: Thomas M, editor. *Inflammation in Parkinson's Disease: Scientific and Clinical Aspects.* Springer; NY. p. 25-47.

- Kalbina I, Wallin A, Lindh I, Engstrom P, Andersson S, Strid K. (2011). A novel chimeric MOMP antigen expressed in *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, and *Daucus carota* as a potential Chlamydia trachomatis vaccine candidate. *Protein Expr Purif.* 80(2), 194–202.
- Kizhner T, Azulay Y, Hainrichson M, Tekoah Y, Arvatz G, Shulman A, Ruderfer I, Aviezer D, Shaaltiel Y. (2014). Characterization of a chemically modified plant cell culture expressed human α -Galactosidase-A enzyme for treatment of Fabry disease. *Mol Genet Metab.* 114, 259-267
- Linazasoro G. (2007). Classical Parkinson disease versus Parkinson complex: reflections against staging. *Eur J Neurol.* 14:721-8.
- Lindh I, Wallin A, Kalbina I, Savenstrand H, Engstrom P, Andersson S, Strid A. (2009). Production of the p24 capsid protein from HIV-1 subtype C in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* using an endoplasmic reticulum-directing SEKDEL sequence in protein expression constructs. *Protein Expr Purif.* 66(1), 46–51.
- Luchakivskai IS, Olevinskaia ZM, Kishchenko EM, Spivak N, Kuchuk NV. (2012). Obtaining of hairy-root, callus and suspension carrot culture (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b. *TSitologiya I genetika*, 46(1), 18-26.
- Ma C, Ban T, Yu H, Li Q, Li X, Jiang W, Xie J. (2019). Urea Addition Promotes the Metabolism and Utilization of Nitrogen in Cucumber. *Agronomy.* 9(5):262.
- Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP. (2003). Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.) derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol.* 51(4), 459-469.
- Martínez-Fernández, DR, Gasca-Salas C, Sánchez-Ferro, D. Álvaro, Obeso, DJ. (2016). Actualización En La Enfermedad De Parkinson. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(3).
- Mercuri NB, Bernardi G. (2005). The ‘magic’ of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson’s disease therapy? *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 341-4.
- Mihaliak CA, Webb S, Miller T, Fanton M, Kirk D, Cardineau G. (2005). Enhanced resistance to *Rhizoctonia solani* by combined expression of chitinase and ribosome

inactivating protein in transgenic potatoes (*Solanum tuberosum* L.). Spanish Journal of Agricultural Research. 10:778-785.

- Mori F, Tanji K, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K. (2002). Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system. Brain Res. 941, 118-126.
- Moscatiello R, Baldan B, Navazio L. (2013). Plant Cell Suspension Cultures. In: Maathuis F. (eds) Plant Mineral Nutrients. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol. 953. Humana Press, Totowa, NJ.
- Murashige TSF. (1962). A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. vol. 15, p. 473- 497.
- Pelah D, Kaushik R, Mizrahi Y, Sitrit, Y. (2002). Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using Thidiazuron. PCTOC. 71:81–84
- Plackett RL, Burman JP (1946). The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 33:305–325.
- Poewe W, Seppi K, Tanner C, Halliday G, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. (2017). Parkinson disease. Nat Rev Dis Primers. 3:17013.
- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. (2014). The prevalence of Parkinson’s disease: a systematic review and meta-analysis. Mov Disord. 29(13):1583-90.
- Rodríguez-Monroy, M. (2009). Protocolos de inducción de callo y establecimiento in vitro de células en suspensión de *U. tomentosa*. Morelos, México: CEPROBI (Centro de Desarrollo de Productos Bióticos), IPN (Instituto Politécnico Nacional).
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, López-Revilla R, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solís A. (2008). Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. Plant Cell Rep. 27(1), 79–84.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Han Y, Alpuche-Solís, AG, Korban SS. (2011). Transgenic carrot tap roots expressing an immunogenic

F1-V fusion protein from *Yersinia pestis* are immunogenic in mice. *J Plant Physiol.* 168(2), 174–180.

- Rubatzky VE, Quiroz CF, Simon PW. (1999). Carrots and related vegetable umbelliferae. Oxon, UK: CABI Publishing. pp. 286.
- Saldaña S, Guadarrama FE, Flores T, Arias N, López S, Arias C, Ruiz-Medrano R, Mason H, Mor T, Richter L, Arntzen CJ, Lim M. (2006). Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculatum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunol.* 19:42-53
- Schapira AH. (2013). Recent developments in biomarkers in Parkinson disease. *Curr Opin Neurol.* 26, 395-400.
- Schenk, RV. Hildebrandt, AC. (1972). Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50, 199-204.
- Schillberg S, Raven N, Fischer R, Twyman RM, Schiermeyer A. (2013). Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures. *Curr Pharm Des.* 19(31):5531-42.
- Schlatmann J, Hoopen H, eijnen J. (1996). Plant cell culture secondary metabolism: toward industrial application. New Cork: CRS Press, 11-52.
- Schneeberger A, Mandler M, Mattner F, Schmidt W. (2010). AFFITOME(R) technology in neurodegenerative diseases: The doubling advantage. *Hum Vaccin.* 6:64-68.
- Schröder G, Waffenschmidt S, Weiler EW, Schröder, J. (1984). The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3- acetic acid. *Eur J Biochem.* 138, 387-391.
- Schwad RS, England AC, Poskanzer DC, Young RR. (1969). Amantadine in the treatment of Parkinson's disease. *JAMA.* 208: 1168-70.
- Shaaltiel Y, Bartfeld Y, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, Dym O, Boldin-Adamsky SA, Silman I, Sussman JL, Futerman AH, Aviezer, D. (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme

replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J.* 5:579–590.

- Stocchi F, Hersh BP, Scott BL, Nausieda PA, Giorgi L. (2008). Ropinirole 24-hour prolonged release and ropinirole immediate release in early Parkinson's disease: a randomized, double-blind, non-inferiority crossover study. *Curr Med Res Opin.* 24(10): 2883-95.
- Stowe R, Ives N, Clarke CE, Deane K, Wheatley K, Gray R, Handley K, Furmston, A. (2010). Evaluation of the efficacy and safety of adjuvant treatment to levodopa therapy in Parkinson's disease patients with motor complications. *Cochrane Database Syst Rev.* (7):CD007166.
- Trejo-Tapia G, Rodriguez-Monroy R. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia*, 32(10):669-674.
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P. (2003). Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acid Research.* 31:1174-1179.
- Ugen KE, Lin X, Bai G, Liang Z, Cai J, Li K, Song S, Cao C, Sanchez-Ramos J. (2015). Evaluation of an alpha synuclein sensitized dendritic cell-based vaccine in a transgenic mouse model of Parkinson disease. *Hum Vaccin Immunother.* 11:922-30.
- Uvarova EA, Belavin PA, Permyakova NV, Zagorskaya AA, Nosareva OV, Kakimzhanova, AA, Deineko EV. (2013). Oral immunogenicity of plant-made *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10. *Biomed Res Int.* 316304.
- Uversky VN, Fink AL. (2002). Biophysical properties of human alpha-synuclein and its role in Parkinson's disease. *Rec Res Dev Prot.* 1:153-186.
- Valadez, A. (1993). Producción de hortalizas. Noriega Editores. 3era reimpresión. Limusa S.A. de C.V. México. pp. 109-116.
- Valdez-Balero A, Orellana P, García L, Veitia N, Bermudez-Carabaloso I, R. García L, Padrón Y. (2002). Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. Sp 70-1284) en la formación de callos. *Biotecnología*

Vegetal, 2(1). Recuperado de
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/125>

- Van Den Berg HR, Faulks HF, Granado J, Hirschberg B, Olmedilla G, Sandmann S, Southon W, Stahl (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J Sci Food Agri*. 80:880–912.
- Whone AL, Watts RL, Stoessl AJ, Davis M, Reske S, Nahmias C, Lang AE, Rascol O, Ribeiro MJ, Remy P, Poewe WH, Hauser RA, Brooks DJ, REAL-PET Study Group (2003). Slower progression of Parkinson’s disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. *Ann Neurol*. 54(1): 93-101.
- Widholm JM (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol*. 4:189-94.
- Willis AW. (2013). Parkinson disease in the elderly adult. *Mo Med*. 110, 406-410
- Willmitzer L, Dhaese P, Schreier PH, Schmalenbach W, Van Montagu M, Schell J. (1983). Size, location and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; evidence for common transcripts present in both octopine and nopaline tumors. *Cell*, 32, 1045-1056.
- Wu YZ, Li JT, Mou ZR, Fei L, Ni B, Geng M, Jia ZC, Zhou W, Zou LY, Tang Y. (2003). Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. *Virology*. 313:337-342.
- 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.
- Yu J, Langridge HR. (2001). A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnol*. 19:548-552.
- Zhang H, Liu M, Li Y, He H, Yang G, Zheng C. (2010). Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot derived vaccine candidate expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. *Protein Expr Purif*. 69(2), 127–131.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Mor., 09 de mayo del 2024

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES

P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. Sahara Dubraiicka Elguea Zarate**, con el título del trabajo: **Establecimiento y caracterización de la línea Z4 de *Daucus carota* para la producción de la proteína *LTB-Syn* de interés contra Parkinson.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCÍA

SECRETARIO: DR. JOSÉ DE JESÚS ARELLANO GARCÍA

VOCAL: DRA. ANABEL ORTÍZ CALTEMPA

SUPLENTE: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

SUPLENTE: M. EN B. CHRISTIAN CARREÑO CAMPOS



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Unidad Biomédica,
Tel. (777) 329 7047, 329 7000, Ext. 3527 / titulaciones.biologia@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2024-05-09 15:10:27 | FIRMANTE

V+PI7/55JL7uc41p5WU2Nm1NQqRIV6BaErkGnlXbqPgQv2m12igr6DP2krsqZ6g6eHpK8/jv8AEIQYdF7nD1XAizAj7pIUmqQBCdqXoa++X0MWdnDKdMSLqhwSZRHsg97owB
DH6kf9PYx1QOtPx57ke1cAvOx4dIG9bHBhqBS6mKu+y4RkkAECz5kLOR+kCFRhm6SpZ4rYQMYxDBQ+W9p5SbEZQmP71b6zGYL+vcYdxn4FuOTY4KQ+GoJ+ed5y6O1peUw
Oq01o9alqqUOYGzY0xg+wd8z/plGdYHDMAb3uNon8En4c+e+k/uhqudafGC00/FTF/eZsrahv18HeNg==

JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2024-05-09 15:22:01 | FIRMANTE

is4SiblmKMhul4joyjN1SvAzum5dQjf+o5cGt8MR0SpGLsJE9e99TzLysWO9vYCCN0MYPNgDi4ggQ+TKGHYU3E+VhkB7AHNFVE9+oujx5eLhn5DdQXRt+ListpGf/7UUZ+YvEBCM
SAbfB0gu8Yd23ilBVjYI33ZHARlyLqXOEsrjBs5sP1eemh6DE/aVytvc78owk4XYGACSIHRm7NOzY65KCLJC3+F1EQghShpDpw7/e2Owge0C0O44jEJsBGxMGN6lz3l15rSZ5q
Ynu3rtkZQBYXjo6lbp+RPOYki7eBdlqzM833D1pPXNys61G3u9xQv9AM4adKq5D9/CcXakA==

LAURA PATRICIA LINA GARCIA | Fecha:2024-05-09 16:32:39 | FIRMANTE

OHhUghCjDKRQMQQOqyF9JqIRUveKQE0fEaa/iQs7p+g7WfDvqO0jp0KVsqeulrjYubzARzW8qiOiXhQ6We1v/AmmLbaYY49NO9xgBy8J9JdzE+AaQ8qa207nO1sP2LJvL9feplX
wjgiGuvLvimaZrXeoLFIPITo80jFrqLasJg0OvODF5RDcMwCkXbk/NYoeJpqxSm6IRzoQToxO+LPS8hnR0rkZmiN4LX/UbS1DsmMild6H2Xhc/v5hV2SjPmimoXnvStcv+NluFk7Puk
ViHfMtP6C0E3cdbl8Kz/yOwI5SzzGwaTXUaZQYJfRrlsgAZ8ZD0imOQvQ2CPY9cbpA==

CHRISTIAN CARREÑO CAMPOS | Fecha:2024-05-09 17:09:44 | FIRMANTE

rAE67T+aiylLdAYn7iil0VFm02V4YNjVg6C5FSB0y995BjiJRRCG9KNPZbnrYx55KiUY3LhsD1Juv44kuKmyG/FacIFrMdnGRwLJF2MsNqWhXyVRR9xsPqk81I5bsoBMoDMEM
qeNCZwwYTT5QWFW9AiaYutKXd+EUuibm2csdWXU0Dro4EnMy0OwqrSZeBzYaQ3pRjvsaA4t2qY1NVKM2A6W9xNYoaW9oRY/kGCDvaTRu68t+sk/y4OEAYcrWH858qSDwL
RvLpgvPOeFildVuEtD8xNveQlvG0kEq+1Kjq9NwK16lfK2YgsAUedeStOpTwn7W1SqPsEEKs+8npQw==

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2024-05-10 09:53:11 | FIRMANTE

OxGqaVPR/4toDdNENRdLL442+OxJs01xwKaQhJNfrWghH7Tk3afs/KmaqzcU+Mj5iWFGZU4cScs45rjfVmcQyDSlocY9qxfA1qhok+nG2/GxZl3bF9PairAi9XYbeWQDf3l1cSGiYf
V0YiCaDhTKPRfdqhpFFTrF67NLULeygJGofZQUL/SberisSqYIMPK/7hUNRXQH7ebPzyNB2LV/quhMPU+TvbzcZCWQ0CKanwpOoXNouY9hyd+Rs+uTrb+GCGgjD8ZJimPztW
kvFIKJkUjVpho74g+gsR9+btrOkQ1hGQyAVVfEONnlk4pixfoXQNVJzyREFA70i0GNyW==

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



cISJOGIM0

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/OYkXxKmKxLHx6BmfzGlnK3lnHkxn4BR>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029