



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Universidad Autónoma del Estado De Morelos



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAI

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales

“Producción a nivel de matraz y reactor *air-lift* de células de *Daucus carota* que expresan una vacuna experimental contra la enfermedad de Parkinson”

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Biol. Christian Carreño Campos

DIRIGIDO POR:

Tutor: **Dra. Anabel Ortiz Caltempa**

Cotutor: **Dr. Sergio Rosales-Mendoza**

Cuernavaca, Morelos

Agosto, 2019



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

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que es fuente permanente e inagotable de bondad, paciencia, sabiduría, comprensión y amor, por estar conmigo en todo momento y guiar mi camino para salir adelante en mis propósitos.

A mi tutora la Dra. Anabel Ortiz Caltempa por su apoyo y por la confianza brindada desde el primer momento, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de trabajo para la realización de este proyecto y sobre todo por las enseñanzas transmitidas hasta ahora. Al Dr. Sergio Rosales-Mendoza por brindarme su apoyo, disposición y confianza para la elaboración del presente trabajo. Gracias

Al comité tutorial integrado por la Dra. María Luisa Villarreal Ortega, Dra. Edda Sciutto Conde y Dr. Alexandre Cardoso Taketa, por sus valiosas aportaciones, por su disponibilidad, comentarios y recomendaciones sugeridas para la culminación de este proyecto, muchísimas gracias.

Al Dr. Iván Arévalo-Villalobos y la Dra. Dania Govea-Alonso por su asesoría y apoyo en los ensayos realizados en el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la UASLP.

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

Al L.I. Víctor Martínez, C.P. Elena Hidalgo y Biol. Fernanda Barrera por el apoyo administrativo brindado durante este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio Reinier, Miguel, Mónica, Cinthia, Itzel, Brenda y Leonel, por sus consejos y apoyo en el laboratorio. Así como su amistad y momentos divertidos.

A mis amigos que me han acompañado en la ciencia Arturo, Daniel, Julián y Caheri.

Al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de este proyecto No. 858164.

DEDICATORIAS

A MI MADRE

Por darme la fortaleza y enseñanza. Gracias por tu amor y confianza, eres mi gran motivación, mi mayor tesoro.

A MIS HERMANAS

Silvia, Isabel y Key por ser parte fundamental en mi vida. Por todo su invaluable apoyo y amor, por su motivación diaria y por estar conmigo en las buenas y en las malas. Esto es por y para ustedes, las amo.

A MAGGY

Por tu cariño, tu tiempo, tu apoyo y compañía. Sobre todo, porque nadie más que tú sabe el esfuerzo que he puesto, y sobre todo la satisfacción que me ha dejado conocerte. Por tus palabras, amor bonito y todos los momentos que hemos compartido hasta ahora, por estar en este logro en mi vida.

	Páginas
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Enfermedades neurodegenerativas	2
2.2 Enfermedad de Parkinson	3
2.3 Tratamiento farmacológico contra Parkinson	6
2.4 Tratamientos alternativos contra Parkinson	8
2.5 Epidemiología de la enfermedad de Parkinson	9
2.6 La proteína alfa sinucleína (α -Syn).....	9
2.6.1 Expresión y localización de alfa sinucleína	9
2.6.2 Estructura y función de alfa sinucleína.....	10
2.6.3 Mutaciones de alfa sinucleína	12
2.7 Las especies reactivas del oxígeno y la enfermedad de Parkinson	13
2.8 Vacunas	16
2.8.1 Vacunas contra enfermedades neurodegenerativas.....	17
2.9 Plantas transgénicas productoras de vacunas	20
2.10 Estrategias biotecnológicas para mejorar los rendimientos de vacunas recombinantes.....	22
2.10.1 Sistema de transformación nuclear	23
2.10.2 Promotor	23
2.10.3 Uso preferencial de codones.....	24
2.10.4 Expresión órgano específica	24
2.10.5 Inhibidores de las proteasas	25
2.11 Aspectos generales de la especie <i>Daucus carota</i>	26
2.11.1 Clasificación taxonómica y comercialización nacional de <i>D. carota</i>	27
2.11.2 Propiedades de la especie <i>D. carota</i>	28

2.12 Producción de proteínas recombinantes en <i>D. carota</i>	29
2.13 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	31
2.13.1 Tipos de cultivos en plantas	31
2.13.2 Cultivo <i>in vitro</i> de callos.....	31
2.13.3 Cultivos de células en suspensión	32
2.13.4 Cultivos continuos de células en suspensión	33
2.13.5 Cultivos en matraz Erlenmeyer	35
2.13.6 Cultivos vegetales en biorreactores	36
2.14 Biorreactores	38
2.14.1 Diseño de biorreactores	39
2.14.2 Escalamiento.....	40
2.14.3 El biorreactor tipo <i>air-lift</i>	40
III. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	43
3.1 Importancia de la proteína quimerica LTB-Syn	43
IV. JUSTIFICACIÓN	45
V. HIPÓTESIS.....	45
VI. OBJETIVOS	46
6.1 Objetivo general	46
6.2 Objetivos específicos	46
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	46
7.1 Análisis estadístico.....	47
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	48
8.1 Obtención de las líneas transformadas de <i>Daucus carota</i>	48
8.2 Medio de cultivo	48
8.3 Cultivo de callos	49
8.3.1 Cinética de crecimiento de callos.....	49
8.4 Establecimiento de células en suspensión	49
8.4.1 Cinética de crecimiento de células en suspensión en matraz de 250 ml	50
8.5 Cultivo en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	50
8.5.1 Condiciones del biorreactor <i>air-lift</i>	50
8.5.2 Material vegetal.....	51
8.5.3 Preparación y operación del biorreactor.....	51

8.5.4 Inoculación al biorreactor	51
8.5.5 Cinética de crecimiento en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	52
8.6 Métodos analíticos	52
8.6.1 Medición de la conductividad en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	52
8.6.2 Cuantificación de azúcares totales.....	53
8.6.3 Análisis de biomasa en peso fresco	53
8.6.4 Medición del pH	53
8.6.5 Análisis de biomasa en peso seco	54
8.6.6 Obtención de parámetros cinéticos.....	54
8.6.7 Viabilidad celular	55
8.7 Análisis de la proteína LTB-Syn de la línea Z4 de <i>D. carota</i>	56
8.7.1 Extracción de la proteína LTB-Syn de la línea Z4 de <i>D. carota</i>	56
8.7.2 Cuantificación de la proteína LTB-Syn por ELISA.....	56
8.7.3 Detección de la proteína LTB-Syn por Western blot	57
8.8 Extracción de DNA y detección del transgén de la línea Z4 de <i>D. carota</i>	58
IX. RESULTADOS	59
9.1 Establecimiento de callos de las líneas Z4 y WT de <i>D. carota</i>	59
9.1.2 Cinética de crecimiento de callos de las líneas Z4 y WT de <i>D. carota</i>	60
9.1.3 Cuantificación de LTB-syn en callos de la línea Z4 de <i>D. carota</i>	62
9.2 Establecimiento de células en suspensión de la línea Z4 en matraz de 250 ml.....	63
9.2.1 Caracterización del cultivo en matraces de 250 ml.....	64
9.2.3 Parámetros cinéticos de células en suspensión en matraz de 250 ml	64
9.2.4 Estudio cinético del pH del medio de cultivo en matraz de 250 ml	66
9.2.5 Estudio cinético del consumo de azúcares en matraz de 250 ml	67
9.2.6 Viabilidad celular de células en suspensión en matraz de 250 ml	69
9.2.7 Cuantificación de proteína LTB-syn en matraz de 250 ml.....	71
9.3 Cultivo de células en suspensión de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	72
9.3.1 Diseño básico y operación	72
9.3.2 Inoculación con tubos de vidrio al biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	73
9.3.3 Estudio cinético de incremento de biomasa medido por la conductividad en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	74
9.3.4 Parámetros cinéticos en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	75

9.3.5 Estudio cinético del consumo de azúcares en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	77
9.3.6 Estudio cinético del pH del medio de cultivo en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	77
9.3.7 Viabilidad celular en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	78
9.3.8 Cuantificación de proteína LTB-Syn en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	80
9.3.9 Caracterización de la dispersión del aire en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	82
9.3.10 Detección de la proteína LTB-Syn por Western blot	83
9.3.11 Detección del transgén de las líneas Z4 y WT de <i>D. carota</i>	83
X. DISCUSIÓN	85
10.1 Establecimiento de callos de la línea Z4 y WT de <i>D. carota</i>	85
10.2 Cinética de callos de la línea Z4 y WT de <i>D. carota</i>	85
10.3 Establecimiento de células en suspensión de la línea Z4 en matraz de 250 ml..	86
10.4 Cinéticas en matraz agitado y biorreactor	87
10.5 Consumo de azúcares en matraz y biorreactor	88
10.6 Comportamiento del pH en matraz y biorreactor	89
10.7 Viabilidad y agregados celulares	90
10.8 Producción de proteína LTB-Syn en matraz y biorreactor	91
XI. CONCLUSIONES	93
XII. PERSPECTIVAS	94
XIII. BIBLIOGRAFÍA	95

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Representación de la neuropatología de la enfermedad de Parkinson.....	05
Figura 2. Regiones de la proteína α -syn	11
Figura 3. Representación estructural de las regiones de alfa sinucleína	12
Figura 4. Especies reactivas de oxígeno.....	14
Figura 5. Zanahoria (<i>Daucus carota L</i>).....	26
Figura 6. Biorreactor <i>air-lift</i> con draft interno y su aspersion.....	41
Figura 7. Circulación de líquido en biorreactores tipo <i>air-lift</i>	42
Figura 8. Descripción del vector de expresión pBI-LTB-Syn.....	44
Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica LTB-Syn.....	44
Figura 10. Diagrama de flujo para el cultivo de la línea Z4 y WT de <i>D. carota</i>	47
Figura 11. Callos <i>in vitro</i> de las líneas Z4 y WT de <i>D. carota</i> de 10 y 25 días de crecimiento sembrados en dos condiciones de crecimiento (luz constante y fotoperiodo	59
Figura 12. Morfología y viabilidad de callos con la técnica de fluoresceína de la línea Z4 y WT de <i>D. carota</i>	62
Figura 13. Establecimiento de células en suspensión de la línea Z4 de <i>D. carota</i> sembrados en medio MS líquido en matraz agitado de 250 ml	63
Figura 14. Cultivo de células en suspensión de <i>D. carota</i> en matraz de 250 ml.....	64
Figura 15. Visualización de células en suspensión con la técnica de fluoresceína de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en diferentes días de la cinética en matraz agitado de 250 ml.....	71
Figura 16. Cultivo de células en suspensión de <i>D. carota</i> en el biorreactor <i>air-lift</i> de 2L .	73
Figura 17. Visualización de células en suspensión con la técnica de fluoresceína de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en diferentes días de la cinética en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	80
Figura 18. Detección de la proteína LTB-Syn por Western blot en matraz y biorreactor..	83
Figura 19. Análisis en gel de agarosa de la amplificación del gen LTB-Syn por PCR de cinética en matraz y biorreactor	84

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Páginas
Gráfica 1. Curva de crecimiento de callos de las líneas Z4 y WT de <i>D. carota</i>	60
Gráfica 2. Porcentaje de células viables de callos de la línea Z4 y WT de <i>D. carota</i>	61
Gráfica 3. Producción de la proteína LTB-Syn en callos de la línea Z4 de <i>D. carota</i>	63
Gráfica 4. Curva de crecimiento en PS de células en suspensión de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en matraz agitado de 250 ml.....	65
Gráfica 5. ln [biomasa en peso seco] contra el tiempo; cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en matraz agitado de 250 ml.....	66
Gráfica 6. Curva de crecimiento en PS y comportamiento de pH del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en matraz agitado de 250 ml	67
Gráfica 7. Curvas de calibración para azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa)	68
Gráfica 8. Curva de crecimiento en PS y consumo de carbohidratos del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en matraz agitado de 250 ml	69
Gráfica 9. Curva de crecimiento en PS y porcentaje de viabilidad de células en suspensión del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en matraz agitado de 250 ml	70
Gráfica 10. Curva de crecimiento en PS y producción de la proteína LTB-Syn del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en matraz agitado de 250 ml	72
Gráfica 11. Curva de crecimiento en PS y conductividad del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	74
Gráfica 12. Curva de crecimiento en PS del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	76
Gráfica 13. ln de biomasa [X_{PS}] contra el tiempo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	76
Gráfica 14. Curva de crecimiento en PS y consumo de carbohidratos del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	77
Gráfica 15. Curva de crecimiento en PS y comportamiento de pH del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	78
Gráfica 16. Curva de crecimiento en PS y porcentaje de viabilidad del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	79
Gráfica 17. Curva de crecimiento en PS y producción de proteína LTB-Syn del cultivo de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Ejemplos de vacunas recombinantes producidas en plantas	21
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Daucus carota</i>	27
Tabla 3. Productos establecidos a través del cultivo de células de zanahoria	30
Tabla 4. Condiciones de operación del cultivo en biorreactor <i>air-lift</i> de 2L.....	51
Tabla 5. Valores máximos de biomasa obtenida a los 10 y 25 días de crecimiento de callos en dos condiciones de crecimiento	60
Tabla 6. Parámetros de crecimiento y producción de la línea Z4 de <i>D. carota</i> en los cultivos de matraz y biorreactor	81

ABREVIATURAS

EP	Enfermedad de Parkinson
ENDs	Enfermedades Neurodegenerativas
Z4	Línea transgénica de <i>D. carota</i>
WT	Línea sin transformar (silvestre)
CIN	Cinetina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
MS	Murashine y Skoog
UV	Luz ultravioleta
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
L	Litros
ml	Mililitros
µl	Microlitros
cm	Centímetros
°C	Grados Celsius
M	Molaridad
mM	Milimolar
psi	Libras por pulgada cuadrada
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS	Peso seco
PF	Peso fresco
PVP	Polivinil pirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
VVM	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
td	Tiempo de duplicación celular
µ	Velocidad específica de crecimiento (d^{-1})
X _{PS}	Concentración de biomasa en peso seco ($g L^{-1}$ PS)
X _{PF}	Concentración de biomasa en peso fresco ($g L^{-1}$ PF)
Y	Rendimiento del producto respecto a la biomasa producida
Δ (mS/cm)	Conductividad eléctrica (miliSiemens/centímetro)
Syn [µg/g]	Concentración de proteína LTB-Syn

RESUMEN

A partir de callos friables de una línea silvestre (WT) y una transgénica (Z4) transformada con el gen *LTB-Syn* en *Daucus carota* adaptados en medio MS sólido suplementados con 30 g L⁻¹ de sacarosa, y fitorreguladores (2,4-D y cinetina a 2 mg L⁻¹) en condiciones de fotoperíodo. Se evaluaron los parámetros cinéticos de crecimiento de estas dos líneas a partir de 1g de inóculo por 40 días, los cuales fueron importantes para determinar la velocidad de crecimiento específica (μ) y el tiempo de duplicación (td).

Se iniciaron los cultivos de células en suspensión solo de la línea Z4 de *D. carota* en medio líquido MS adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, y fitorreguladores (2,4-D y cinetina a 2 mg L⁻¹) en condiciones de luz constante a 25 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y en agitación a 110 rpm. Se llevó a cabo la determinación de parámetros cinéticos de las suspensiones creciendo en matraz agitado con 10 % de inóculo por 45 días y en biorreactor *air-lift* de 2L por 30 días. Se analizaron la viabilidad celular, el pH del medio de cultivo, el consumo de azúcares totales, el peso fresco, peso seco y la producción de la proteína quimérica LTB-Syn. En una cinética tipo-lote para el cultivo en suspensión en matraz agitado de 250 ml se registró una biomasa máxima de 16.9 g L⁻¹PS a los 15 días, una velocidad de crecimiento específica de (μ) 0.084 días⁻¹ y un tiempo de duplicación (td) de 8.2 días. Mientras que en el cultivo en biorreactor *air-lift* de 2L se obtuvo una biomasa máxima de 35.2 g L⁻¹ PS, una μ de 0.072 días⁻¹ y un td de 9.6 días, a los 15 días. El crecimiento de la biomasa se incrementó un 200% en biorreactor. La producción máxima de la proteína LTB-Syn en matraz fue de 0.922 $\mu\text{g/gPF}$ al día 18 y de 1.52 $\mu\text{g/gPF}$ al día 15 en el biorreactor *air-lift*. Si bien la obtención de la máxima biomasa fue similar en ambos sistemas (a los 15 días), la producción máxima de la proteína LTB-Syn fue tres días menos en el biorreactor, debido probablemente a un menor estrés de agitación lo cual mejora la transferencia de nutrientes y oxígeno disuelto.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son de suma importancia, ya que el cultivo de la línea transformada Z4 representa el primer reporte de un cultivo *in vitro*

de células en suspensión proveniente de zanahoria generado a nivel matraz de 250 ml y biorreactor *air-lift* de 2L para la producción de una vacuna experimental con bajo costo contra la enfermedad de Parkinson. Además, los resultados obtenidos en las cinéticas sientan las bases para la realización de nuevos proyectos con otras estrategias de cultivo que permitan mejorar de forma continua el rendimiento de la biomasa y la producción de la proteína LTB-Syn.

ABSTRACT

Cell cultures of friable callus from a *Daucus carota* wild-type line (WT) and a transgenic one (Z4) transformed with the *LTB-Syn* gene, previously adapted in photoperiod condition. The kinetic growth parameters of these two lines were evaluated from 1g of inoculum for 40 days, which were important in determining the specific growth rate (μ) and the doubling time (td).

Cell suspension cultures were initiated in *D. carota* in liquid medium MS added with 30 g L⁻¹ of sucrose and phytohormones 2,4-D and kinetin 2 mg L⁻¹, under constant light conditions at 25 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ and agitation at 110 rpm. Kinetic parameters in the stirred flasks with 10% inoculum were carried out for 45 days and in the *air-lift* bioreactor of 2L for 30 days were determined. Cell viability, pH of the culture medium, consumption of total sugars, fresh weight, dry weight and the concentration of chimeric protein LTB-Syn were analyzed. A maximum biomass of 16.9 g L⁻¹ DW at 15 days, a specific growth rate of (μ) 0.084 days⁻¹ and a doubling time (td) of 8.2 days were recorded in a batch kinetics for the suspension culture in stirred flasks. In the case of 2L *air-lift* bioreactor culture, a maximum biomass of 35.2 g L⁻¹ DW, μ of 0.072 days⁻¹ and td of 9.6 days were obtained at 15 days. Biomass growth increased by 200% in the bioreactor. The maximum production of the LTB-Syn protein in the stirred flasks were 0.922 $\mu\text{g/gFW}$ at day 18, whereas the *air-lift* bioreactor led to 1.52 $\mu\text{g/gFW}$ at day 15. Although obtaining the maximum biomass was similar in both systems (at 15 days), the maximum production of the LTB-Syn protein was three days less in the bioreactor, probably due to less agitation stress which improves the transfer of nutrients and dissolved oxygen.

The results obtained in the present work are outstanding, since the cultivation of the transformed line Z4 represents the first report of an *in vitro* culture of cells in suspension from carrot generated at the level of flask of 250 ml and *air-lift* bioreactor of 2L to produce an experimental vaccine against Parkinson's disease at low cost. In addition, the results obtained in the present work open new research possibilities,

including cultivation strategies to improve the yield of the biomass and the production of the LTB-Syn protein.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas (ENDs) tienen un gran impacto en la salud humana a nivel mundial. Hasta la fecha no existen tratamientos efectivos disponibles. Se han propuesto como alternativa terapéutica la vacunación, para las enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis múltiple. En las últimas dos décadas se han propuesto la producción de vacunas orales relevantes contra las ENDs, a partir de sistemas basados en plantas transgénicas como fuente de biofarmacéuticos recombinantes (BF). Entre las ventajas de los productos biofarmacéuticos a partir de plantas se incluyen: el bajo costo y seguridad, el procesamiento pos-traducciona, entre otras. La obtención de productos BF mediante el uso de cultivos de células vegetales en biorreactores es prometedora, ya que ofrece la posibilidad de producir sustancias de interés de una manera más controlada a un mayor volumen y calidad, en comparación con los sistemas tradicionales de producción.

Varias especies de plantas se han utilizado para la producción de productos BF entre ellos las vacunas. Por ejemplo, en las células de tabaco se desarrolló la primera vacuna ya aprobada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) para el virus Newcastle (Mihaliak, *et al.* 2005). En cuanto a las vacunas producidas en tejidos de zanahoria se han desarrollado cuatro con potencial inmunoprotector en animales de prueba contra el sarampión, clamidias, tuberculosis y cólera (Rosales-Mendoza *et al.*, 2011, Uvarova *et al.* 2013). Además, se han producido tres enzimas, una citocina y un anticuerpo (Kizhner, *et al.* 2014, Osman, *et al.* 2013), sin embargo, los cultivos de células en suspensiones en biorreactores no se han aplicado en el desarrollo de vacunas. El caso más notable hasta ahora en *Daucus carota* es la producción comercial de la alfa taliglucerasa (Elelyso®) aprobada en humanos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus sigla en inglés) en mayo de 2012 para la terapia de reemplazo enzimático (ERT, por sus sigla en inglés) en pacientes con la enfermedad de Gaucher de tipo 1 (Shaaltiel, *et al.* 2007). Esto, sin duda, refleja el interés de

producir biofármacos más accesibles y económicos bajo una administración oral, sin purificaciones ni procesamientos adicionales, por lo que, el objetivo del trabajo que aquí se presenta consiste es establecer cultivos de células en suspensión en matraz agitado de 250 ml y biorreactor *air-lift* de 2L de la línea Z4 transformada con el gen *LTB-Syn* en *Daucus carota* para la producción de la proteína quimérica LTB-Syn, la cual se ha demostrado mediante ensayos de inmunogenicidad tener la capacidad de inducir respuestas humorales en ratones BALB/c con la presencia de anticuerpos anti-Syn en el suero de los animales inmunizados después de la administración oral (Arevalo-Villalobos *et al.* 2017), lo que sugiere el desarrollo de una vacuna experimental de origen vegetal contra la enfermedad de Parkinson con ventajas potenciales como bajo costo, fácil escalamiento y administración.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de desórdenes del sistema nervioso, multifactoriales y debilitantes que afectan a aproximadamente 60 millones de individuos en el mundo. Entre ellas destacan la enfermedad de Alzheimer (EA), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la enfermedad de Huntington (EH) y la enfermedad de Parkinson (EP). Estas enfermedades son perniciosas y difíciles de detectar cuando comienzan, desarrollándose de forma progresiva y con un curso que no puede ser retardado (Jameel *et al.*, 2016)

La neurodegeneración se da como resultado de disfunción y muerte neuronal, debido a la degeneración axonal/dendrítica y la ruptura de las transmisiones sinápticas. Los síntomas más comunes de las enfermedades neurodegenerativas son la demencia, desórdenes del movimiento y enfermedades de las neuronas motoras (Skovronsky *et al.*, 2006). Adicionalmente, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y/o los factores asociados a la edad han sido implicados en la

neurodegeneración. La etiología molecular exacta de las enfermedades neurodegenerativas continúa siendo desconocida, a pesar de que se han propuesto múltiples hipótesis a lo largo del tiempo. Muchos de los rasgos patológicos compartidos entre estas enfermedades proporcionan una base robusta para la búsqueda de compuestos capaces de combatir la toxicidad inducida por glutamato, compuestos antiinflamatorios y neurotrópicos, así como inhibidores de las monoamino oxidasas. Actualmente los neurocientíficos buscan entender los datos obtenidos a partir de los estudios de estos mecanismos básicos dentro de las neuronas sinápticas la cuales se encuentran fuera de control ocasionando la neurodegeneración. Descifrar estas novedosas evidencias representa un desafío para la identificación de fármacos y biomarcadores genéticos específicos como herramienta de apoyo en el diagnóstico temprano y tratamiento de estas enfermedades neurodegenerativas.

2.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las principales patologías de carácter neurodegenerativo, que fue descrita por primera vez en el año 1817 por el médico inglés James Parkinson. Posteriormente, se modificó la descripción de la sintomatología, destacando el temblor en reposo, la rigidez, alteraciones en el equilibrio y la lentificación en los movimientos, y la denominó “enfermedad de Parkinson” en honor a James Parkinson (Goetz, 2002). Actualmente, la EP se considera la segunda enfermedad de trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad del Alzheimer (Tanner y Aston, 2000). Se estima que afecta al 1-2% de la población por encima de los 65 años (Alves *et al*; 2008). La fundación de la enfermedad de Parkinson (Parkinson’s Disease Foundation) estima que actualmente hay más de 10 millones de personas con Parkinson a nivel mundial (http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics). La lesión fundamental de la EP recae en el daño y degeneración de las neuronas ubicadas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc), que forma parte de los ganglios basales (GB). La función de estas

neuronas es producir dopamina para un buen control del movimiento, mientras que la función de los GB es mantener la postura del cuerpo y extremidades, la producción de movimientos espontáneos (como parpadeo) y automáticos, que acompañan a un acto motor voluntario (como el balanceo de brazos al andar). La mayoría de los pacientes con EP son idiopáticos (de causa desconocida) sin antecedentes familiares directos. Sin embargo, más del 10% de los casos son genéticos con una herencia autosómica dominante como en los casos con mutaciones en el gen alfa-sinucleína (SNCA), en la cual los agregados de la proteína alfa sinucleína (α -syn) son el principal signo patológico a nivel celular (Goedert, 2001). Las causas precisas de la EP siguen siendo desconocidas, pero los siguientes factores de riesgo están asociados a la patogénesis: envejecimiento, factores ambientales, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, factores genéticos (Jellinger, 2014). De los factores de riesgo ambientales se sabe que algunos agentes tóxicos están involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, un agente ambiental inductor de Parkinson es el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Langston, *et al.* 1983).

Clínicamente, la EP se caracteriza por tres síntomas motores principales: rigidez muscular, bradicinesia (lentitud de movimientos) y temblor en reposo. Además, a menudo se observa inestabilidad postural (Savitt, *et al.* 2006), mientras que el deterioro cognitivo está presente principalmente en pacientes con etapas avanzadas de la enfermedad. Adicionalmente, los pacientes con EP presentan diferentes manifestaciones no motoras, que incluyen trastornos neuropsiquiátricos, disfunción autonómica, hipoxemia (anomalías en la percepción olfativa), fatiga, ansiedad, depresión y trastornos del sueño. Otra de las características fundamentales de la enfermedad de Parkinson es la presencia de inclusiones citoplasmáticas proteínicas intraneuronales, denominadas cuerpos de Lewy (figura 1, C). Los cuerpos de Lewy son agregados esféricos de proteínas citoplasmáticas, compuestos por numerosos tipos de proteínas: α -sinucleína, parkina, ubiquitina y neurofilamentos. Se encuentran presentes en todas las áreas cerebrales afectadas (Spillantini *et al.*, 1998).

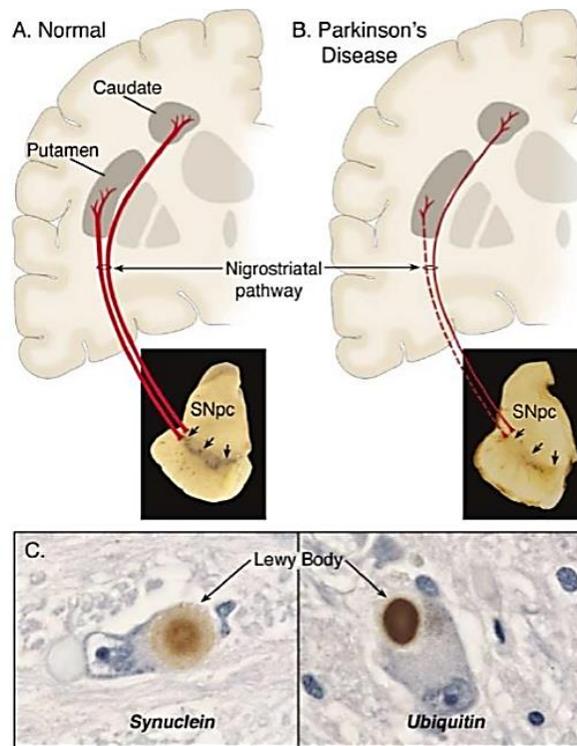


Figura 1. Representación característica de la neuropatología de la enfermedad de Parkinson. Proyección de axones del sistema nigroestriatal localizado en la SNpc hacia el putamen (A y B). En (C) inclusiones citoplasmáticas de cuerpos de Lewy (imagen tomada de Dauer y Przedborski, 2003)

Las neuronas del sistema nigroestriatal tienen su cuerpo celular localizado en la SNpc, proyectando sus axones principalmente hacia el putamen. Dado que estas neuronas poseen un alto contenido de neuromelanina (Marsden, 1983), la pérdida de estas producida en la EP es la responsable de uno de los rasgos neuropatológicos de esta enfermedad; la despigmentación observada en la SNpc (figura 1, A y B). Esta despigmentación va siempre acompañada de una disminución en la expresión de mRNA del transportador de dopamina (DAT), llevando asociada una disminución en los niveles de dopamina en la región dorsolateral del putamen, lugar de proyección de estas neuronas. Al comienzo de la sintomatología de la enfermedad, la disminución en los niveles de dopamina en el putamen es de un 80%, habiéndose perdido un mínimo del 60% de estas neuronas. Aunque la vía nigroestriatal es la más afectada en la enfermedad de Parkinson, todas las vías

dopaminérgicas ascendentes degeneran, aunque en distinta cantidad. Así, las neuronas del sistema mesolímbico, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el área tegmental ventral en contacto con la SNpc, se ven menos afectadas. Como consecuencia de ello, hay una disminución menor en los niveles de dopamina en núcleo caudado (Price *et al*; 1978). El tratamiento contra la EP se enfoca en controlar los síntomas y reducir la velocidad de progreso de la enfermedad y controlar los efectos secundarios procedentes de los fármacos que se usan para combatirla. No obstante, en la actualidad no es posible curar la EP, solo se pueden tratar los síntomas mediante el uso de diversos fármacos, los cuales ayudan a que los pacientes puedan continuar con su vida diaria y disfruten en la medida de lo posible de una calidad de vida durante varios años.

2.3 Tratamiento farmacológico contra el Parkinson

El equipo del Dr. Carlsson identificó la falta de dopamina estriatal como la causa principal de los síntomas motores parkinsonianos (Carlsson *et al*; 1958). Desde entonces, el objetivo del tratamiento contra EP es controlar los signos y síntomas de la enfermedad durante el mayor tiempo posible, minimizando sus efectos adversos. El tratamiento actual mejora la calidad de vida y la capacidad funcional de 3 a 5 años, sin embargo, a medida que pasa el tiempo la respuesta a los fármacos disminuye y el paciente se incapacita (Marras y Lang, 2009).

La administración de levodopa es el tratamiento más eficaz que se dispone para disminuir los síntomas motores de la EP y el mejor tolerado por los pacientes (Hauser *et al*; 2009). Solo el 1% de una dosis oral de levodopa llega al cerebro debido a su baja absorción en el duodeno proximal por el sistema de aminoácidos neutros. Esto hace que tenga una biodisponibilidad muy limitada y una escasa tolerabilidad. Por ello se desarrollaron fármacos capaces de inhibir la actividad de la enzima dopa descarboxilasa (DDC) a nivel periférico, aumentando de este modo la cantidad capaz de alcanzar el cerebro, mejorando la seguridad y tolerabilidad del

tratamiento (Nagatsu y Sawada., 2009). Los inhibidores de la dopa-decarboxilasa (IDDC), al ser administrados en conjunto con levodopa, aumentan 10 veces sus biodisponibilidad, por lo que la dosis requerida disminuye hasta un 80% (Hauser, RA; 2009). Los IDDC (carbidopa o benserazida) no atraviesan la barrera hematoencefálica, solo actúan en el metabolismo periférico de la levodopa inhibiendo su descarboxilación. Es así como al asociarse disminuyen los efectos secundarios más relevantes, como náuseas, vómitos, anorexias, sedación e hipotensión ortostática. Para prevenir el metabolismo periférico de L-dopa, y de esta forma incrementar la duración de sus efectos terapéuticos, se hace el uso de inhibidores de la ICOMT (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 ICOMT (ej., entacapona) aumentan el tiempo *on* de 1.3-1.8h al día en dosis de 200mg con cada levodopa (Stocchi *et al*; 2008).

Los agonistas dopaminérgicos no ergóticos (pramipexol, ropinirol, rotigotina) son fármacos eficaces, que actúan sobre los receptores dopaminérgicos postsinápticos, muy efectivos en fases avanzadas de la enfermedad, a pesar de la degeneración progresiva dopaminérgica (Martínez-Corral *et al*; 2008). El pramipexol y ropinirol actúan sobre los receptores D2 y D3. 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 (MAO-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, 2010). 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 amantidina es otro fármaco bien tolerado, con un efecto antiparkinsoniano, que puede ser usado como

un tratamiento inicial. Suele ser efectivo en discinesias, por sus propiedades antagonistas del glutamato (Stocchi *et al*; 2008). Los anticolinérgicos (biperideno, prociclidina, trihexifenidilo) son discretamente eficaces en el control del temblor (Veiga y Gutiérrez, 2009).

2.4 Tratamientos alternativos contra Parkinson

Un punto de inflexión en el tratamiento de Parkinson avanzado fue el descubrimiento de la implicación del circuito de ganglios basales en el desarrollo de la enfermedad. Esto renovó el interés por el uso de cirugías como forma de terapia para EP. A pesar de que los cirujanos optaron inicialmente por técnicas ablativas, el tratamiento quirúrgico más usado en pacientes con Parkinson avanzado es la estimulación cerebral profunda bilateral del núcleo subtalámico (Benabid *et al.*, 2009) o del segmento interno del globo pálido tiene una mejora sostenida en la función motora con reducciones de discinesias en los paciente con Parkinson. Con esta técnica se benefician los pacientes que responden bien a la levodopa, con complicaciones motoras graves que no se controlan fácilmente con tratamiento médico y que no presentan deterioro cognitivo (Pahwa *et al*; 2009). Sin embargo, en los últimos años se han publicado una cantidad de efectos secundarios importantes como consecuencia de este procedimiento, siendo estos de origen no motor; como depresión, psicosis, confusión y desórdenes de control, pudiendo ser debidos a la incorrecta colocación de los electrodos en el núcleo subtalámico (STN).

En cuanto a los tratamientos futuros se pretende ofrecer formulaciones de liberación sostenida o parches de liberación transdérmica de levodopa, que prolonguen su biodisponibilidad. Entre los fármacos más prometedores que exploran otros mecanismos de acción destacan los antagonistas de los receptores de la adenosina A2A, como la istradefilina, que podrían tener un efecto neuroprotector (Jenner *et al*; 2009). Hay un creciente interés en el uso de células madre como tratamiento para EP. De momento, el uso de este método en humanos está limitado debido a la regulación y control de seguridad al que están sometidas

estas técnicas (Li *et al.*, 2008). Otro hecho importante sobre las terapias actuales de EP es que no reducen la tasa de pérdida de neuronas dopaminérgicas y, por lo tanto, no afectan al curso de la enfermedad. Hasta la fecha, los intentos por generar neuroprotección en humanos, han sido infructuosos.

2.5 Epidemiología de la enfermedad de Parkinson

Se ha estimado que la incidencia de la EP es de 6,3 millones a nivel mundial y se prevé que para el 2030 llegarán a ser más de 12 millones (WHO, 2016). La prevalencia de la EP se estima del 3% al 10% de personas mayores de 65 y 80 años. La edad de inicio de los síntomas suele ser entre los 40 y 70 años. Algunos estudios reportan una mayor prevalencia en hombres que en mujeres, debido a los factores neuroprotectores de los estrógenos como posible explicación, aunque aún es controvertido su papel (Lang y Lozano, 1998). En México se ha estimado una prevalencia entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes/año, calculándose que para el año 2030 esta cifra podría duplicarse o triplicarse por lo que conlleva a un problema de salud pública debido a los altos costos de tratamiento, aunado a que la EP es difícil su detección en las primeras etapas (SSA, 2017). Según el informe presentado en el Registro Mexicano de Enfermedad de Parkinson (ReMePARK), los pacientes que presentan síntomas motores tardan entre 2.4 y 2.6 años en ser diagnosticados causando un impacto en el sistema económico, de ahí la importancia de la detección temprana, ya que, al igual que otras enfermedades neurodegenerativas, es fundamental que el tratamiento se otorgue desde el primer momento en que se diagnostica (Cervantes-Arriaga, *et al.*, 2013).

2.6 La proteína alfa sinucleína (α -Syn)

2.6.1 Expresión y localización de alfa sinucleína (α -syn)

La alfa sinucleína (α -syn) es una proteína predominantemente expresada en el cerebro, específicamente se encuentra en estructuras como neocórtex, hipocampo, bulbo olfatorio, tálamo, cuerpo estriado y cerebelo (Mori *et al.*; 2002). El

nombre de sinucleína deriva de su aparente localización en terminales nerviosas presinápticas y membranas nucleares, sin embargo la sinucleína no está presente en todas las terminales sinápticas, y curiosamente no todas las terminales acumulan la proteína en desordenes neurodegenerativos (Clayton y George, 1999). Esto sugiere una expresión selectiva y vulnerabilidad patogénica en ciertas poblaciones neuronales. La α -syn pertenece a una familia de proteínas integrada por β -sinucleína o fosfoneuroproteína, γ -sinucleína o persina. Solamente α -syn y β -syn se expresan en cerebros de mamíferos (Maroteaux *et al*; 1988). Estas proteínas son pequeñas, solubles, están altamente expresadas en los tejidos nerviosos y no poseen una estructura secundaria y/o terciaria definida en condiciones fisiológicas.

2.6.2 Estructura y función de alfa sinucleína (α -syn)

La α -syn es una proteína pequeña de 140 residuos de aminoácidos codificada por el gen SNCA localizado en el brazo largo del cromosoma 4 en humanos (4q β 1. γ -q β β). Posee 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). Se expresa en el cerebro y su sobreexpresión produce daño neuronal, que no se muestran cuando se suprime su expresión (Ibañez *et al.* 2004). Su secuencia de aminoácidos está dividida en tres regiones (figura 2):

- 1.- El dominio N-terminal comprende los residuos aminoacídicos de 1 a 60. Las tres mutaciones encontradas en la EP familiar están localizadas en esta región, en las posiciones A30P, E46K y A53T. Este dominio se caracteriza por presentar aproximadamente 7 repeticiones imperfectas de 11 aminoácidos con un motivo hexamérico altamente conservado que consiste en la secuencia KTKEGV. En su interacción con lípidos, este dominio adopta una estructura anfipática de α -hélice.
- 2.- El dominio central: es altamente hidrofóbico y se piensa que es la región que explica la propensión de α -syn a formar agregados. Incluye el componente no amiloide (Non-A β) de la enfermedad de Alzheimer conocido como NAC (non

amyloid component), y abarca los residuos 61 a 95. Este dominio contiene dos motivos KTKEGV adicionales.

3.- El dominio C-terminal: contiene una gran proporción de residuos ácidos, prolina y tres residuos conservados de tirosina, que son característicos de α y β -sinucleína. 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).

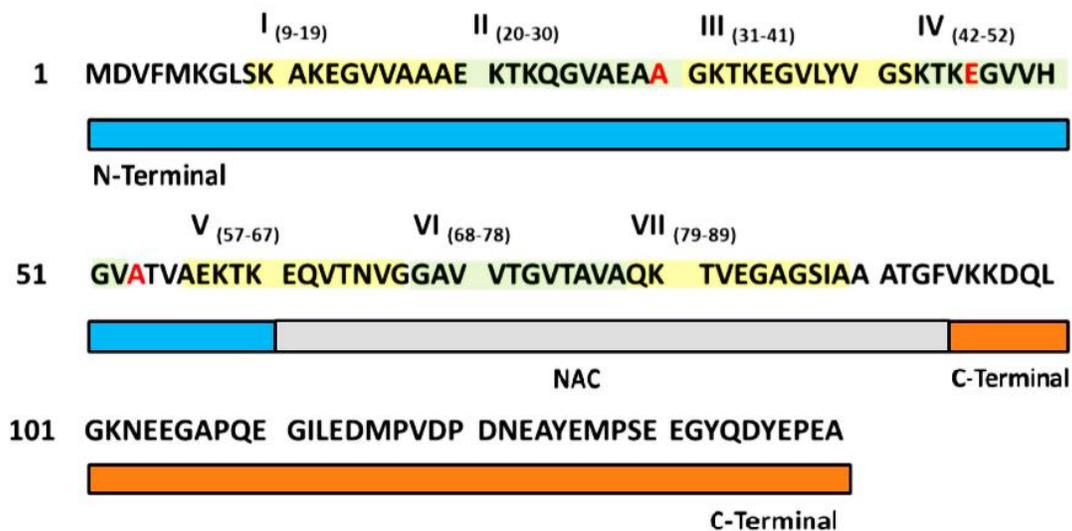


Figura 2. Regiones de la proteína α -syn humana. Los números romanos indican las 7 repeticiones imperfectas de 11 aminoácidos que presentan la secuencia consenso KTKEGV (resaltadas en amarillo). El componente no amiloide (NAC) se muestra en gris, el cual comprende los residuos de E61 hasta V95. Y la región C-terminal en color naranja. Las tres mutaciones puntuales relacionadas con el desarrollo de EP se marcan con letras rojas (adaptado de Uversky *et al.*; 2012).

Existe evidencia sólida de que α -syn interactúa directamente con lípidos de membrana tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En presencia de vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos esta proteína adopta una estructura secundaria de α -hélice. En la interacción con las membranas los aminoácidos del extremo N-terminal se disponen de tal manera de exhibir una distribución diferencial de aminoácidos polares y no polares formando una cara hidrofílica y una cara hidrofóbica de forma similar a las apolipoproteínas y otras proteínas unidas a lípidos

(Figura 3). Parecer ser que solamente 102 residuos del N-terminal participarían en la unión con lípidos y que los residuos negativos del C-terminal permanecerían desordenados y actuarían como andamiaje para el reclutamiento de más α -syn a membranas (Auluck *et al.*, 2010).

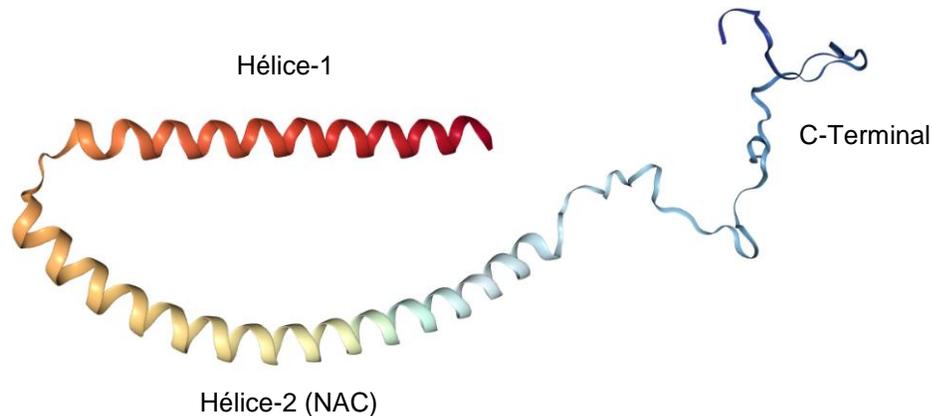


Figura 3. Representación estructural de las tres regiones de alfa sinucleína (α -syn). Región N-terminal (hélice-1) sitio de unión a lípidos de membrana, (hélice-2) dominio hidrofóbico central NAC y región C-terminal ácida cargada negativamente.

2.6.3 Mutaciones de la α -sinucleína

Durante mucho tiempo se pensó que la EP se manifestaba únicamente de forma esporádica y que no existían componentes genéticos involucrados. Ahora se sabe que alrededor del 20% de los pacientes con EP tienen una historia familiar relacionada con esta patología. En 1997, Polymeropoulos y colaboradores reportaron por primera vez que el gen SNCA estaba ligado al desarrollo de EP.

Se han identificado varias mutaciones puntuales en el gen SNCA y se relacionaron a la forma hereditaria autosómica dominante de la EP. Entre ellos, se encuentran las sustituciones de aminoácidos A53T (Polymeropoulos *et al.*, 1997), A30P (Kruger *et al.*; 1998) y E46K (Zarranz *et al.*; 2004). Estas fueron las que se

identificaron primero y, por lo tanto, sus efectos sobre las propiedades de las proteínas están mejor caracterizados. La mutación A53T es la más frecuente y la única asociada con un fenotipo específico: los portadores desarrollan síntomas de EP en la cuarta a sexta década y experimentan una rápida progresión de la enfermedad en los siguientes diez años. Recientemente se ha ampliado la familia de mutaciones relacionadas con EP con tres nuevas mutaciones: H50Q (Proukakis *et al.*; 2013), G51D (Kiely *et al.*; 2013) y A53E (Pasanen *et al.*; 2014). La mutación H50Q se asocia preferentemente con el inicio tardío de la EP y el deterioro cognitivo. La mutación G51D se asocia con un fenotipo de EP inusual caracterizado por el inicio temprano de la enfermedad, respuesta moderada a la levodopa, progresión rápida y con frecuencia síntomas psiquiátricos. Las mutaciones A53T, E46K y H50Q mejoran la fibrilación α -syn, en cambio las mutaciones G51D y A53E lo atenúan y favorecen la formación de agregados amorfos (Rutherford y Giasson, 2015). Los estudios funcionales mostraron que G51D α -syn oligomeriza más lentamente y sus fibrillas son más tóxicas que las de la proteína de tipo salvaje. Mientras que los mutantes A30P y G51D exhiben una interacción defectuosa con las membranas, la mutación E46K aumenta la afinidad de unión de α -syn a fosfolípidos (Choi *et al.*, 2004).

2.7 Las especies reactivas del oxígeno y la enfermedad de Parkinson

Las especies reactivas del oxígeno, (ROS, por sus siglas en inglés), se definen como un grupo de moléculas derivadas del O_2 que generalmente tienen una vida muy corta y son altamente reactivas debido a que poseen electrones de valencia desapareados (figura 4) (Kim *et al.*, 2015). Las ROS incluyen especies radicales como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y también especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El $O_2^{\bullet-}$ interviene en distintos pasos en el proceso de generación de ROS. Puede ser transformado a la especie más estable H_2O_2 por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) o formar aniones hidroxilos ($\bullet OH$) altamente tóxicos. Además, por acción de las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y otras peroxidases produce H_2O y O_2 . El $\bullet OH$ es

conocido por ser una de las ROS más reactivas y uno de los principales responsables de los efectos citotóxicos. Esta especie puede ser generada a partir de H_2O_2 mediante la reacción de Fenton, en presencia de Fe^{2+} (Bolisetty y Jaimes, 2013).

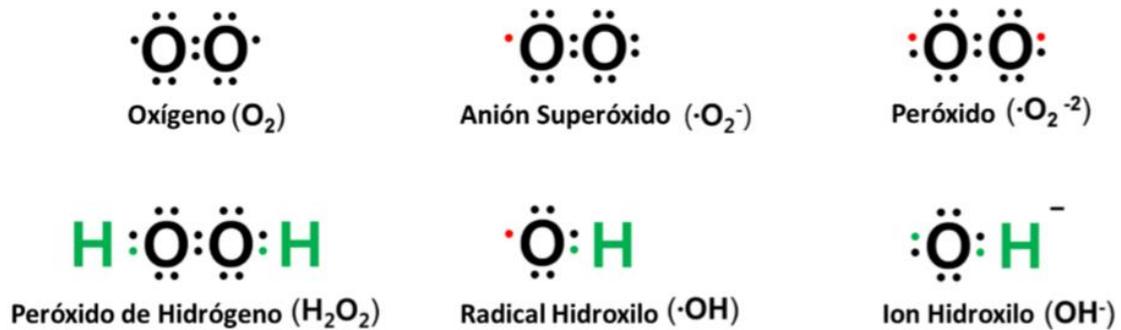


Figura 4. Especies reactivas de oxígeno. Se muestra la reducción consecutiva del oxígeno molecular que genera la formación de ROS. Los puntos rojos representan los electrones desapareados. (Adaptado de Kim *et al.*, 2015).

La producción de ROS es contrarrestada por un intrincado sistema de defensa antioxidante que incluye a las enzimas SOD, catalasa y glutatión. El desbalance entre la producción de ROS y la acción de las defensas antioxidantes genera estrés oxidativo que daña a las macromoléculas biológicas conduciendo al envejecimiento y a la muerte (Indo *et al.*, 2015). Una de las principales fuentes de producción de ROS es la cadena respiratoria mitocondrial. Bajo condiciones fisiológicas normales, más del 2% del consumo de O_2 celular mitocondrial se relaciona con la generación de ROS, incluyendo $O_2^{\cdot-}$. Los complejos CI (NADH deshidrogenasa, CI y CIII (citocromo c reductasa) son los principales responsables de la producción de $O_2^{\cdot-}$. La capacidad de estas enzimas de generar ROS puede variar entre órganos y durante el progreso de ciertas patologías. Por ejemplo, el CI es el principal responsable de la generación de $O_2^{\cdot-}$ en el cerebro (Turrens, 2003). La generación de ROS por parte del CI ejerce el rol primario en condiciones patológicas, entre ellas, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. En particular, en la EP, el estrés oxidativo ha sido considerado como uno de los principales

mecanismos responsables de la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Reportes previos indican que la actividad reducida del CI en el sistema nervioso central de pacientes con EP podría contribuir a la generación excesiva de ROS e inducir apoptosis (Blesa *et al.*, 2015). Además, compuestos inhibidores del CI tales como la neurotoxina 1-metil-4-fenil-6-tetrahidropiridina (MPTP) y su metabolito, 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) ejercen efectos tóxicos sobre las neuronas dopaminérgicas, resultando en un fenotipo clínicamente parkinsoniano con degeneración nigroestriatal y presencia de α -syn citoplasmática. Asimismo, la acumulación de α -syn silvestre o de sus mutantes en las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas provoca un defecto en la actividad del CI mitocondrial incrementando la producción de ROS (Devi *et al.*, 2008).

Por otra parte, las ROS pueden reaccionar con componentes celulares esenciales que se hallen próximos, tales como fosfolípidos de membrana, proteínas y ADN, oxidándolos, y de este modo dando lugar a una variada gama de efectos perjudiciales. En el caso de las proteínas, las ROS pueden oxidar directamente restos de aminoácidos, lo que conduce a la pérdida de su función proteica. Dentro de las neuronas, interfieren en la transducción de señales, así como en la expresión de genes, afectando a la supervivencia celular. Debido a la alta actividad metabólica y a la baja defensa celular, en relación con otros órganos, se considera que el cerebro es especialmente vulnerable a los efectos dañinos ocasionados por las ROS. En un adulto, el cerebro consume el 20% del oxígeno basal, esto es muy alto para un órgano de tan bajo peso. Este alto consumo de oxígeno es debido a las necesidades que tiene el cerebro de ATP para mantener la homeostasis iónica intraneuronal, con la continua apertura y cierre de los canales iónicos necesarios para generar y propagar potenciales de acción. Para producir ATP, las mitocondrias cerebrales consumen un 80% del oxígeno del cerebro. La dopamina puede reaccionar con el oxígeno molecular, dando lugar a la formación de $O_2^{\bullet-}$ y la correspondiente *p*-quinona. Tal como se indicó anteriormente, el $O_2^{\bullet-}$ formado producirá también H_2O_2 y $\bullet OH$, contribuyendo a aumentar el estrés oxidativo. A partir de la *p*-quinona tendrán lugar una serie de reacciones de ciclación y

polimerización, que acabarán formando un pigmento oscuro denominado neuromelanina, que será la que pigmenta a las neuronas dopaminérgicas

2.8 Vacunas

La inmunización activa (es decir, la vacunación) implica la administración de un antígeno formulado para provocar una respuesta inmune específica dirigida hacia el antígeno, mientras que la inmunización pasiva se refiere a la administración de anticuerpos específicos generados en otro organismo para neutralizar una molécula blanco específica. La vacunación tiene varias ventajas sobre la inmunización pasiva. Económicamente, es probable que la producción y purificación de anticuerpos para el tratamiento pasivo siga siendo costosa y lenta. A la inversa, la vacunación se adapta a las indicaciones que abarcan poblaciones más grandes debido a sus costos de producción comparativamente bajos junto con su administración simple y menos frecuente, lo que mejora el cumplimiento del paciente. En éstos, la vacunación da lugar a respuestas de anticuerpos relativamente lentas pero sostenibles (mediante refuerzo).

Hay dos opciones para la administración de la vacuna: inyección (principalmente intramuscular o subcutánea) y administración a través de las mucosas (principalmente oral o nasal). Las vacunas inyectables provocan una fuerte inmunidad protectora al inducir preferentemente la producción de IgG. Estas son más adecuadas contra patógenos que infectan por vía sistémica o respiratoria; sin embargo, los antígenos tienen que ser purificados antes de la administración. Las vacunas de tipo oral o nasal inducen inmunidad tanto a nivel de las mucosas como a nivel sistémico (Azegami *et al.* 2014). En un sentido conceptual, las vacunas orales basadas en plantas son ideales porque el proceso de fabricación es simple y de bajo costo; no se necesitan dispositivos médicos adicionales para la inyección; y la inmunogenicidad y las actividades biológicas del antígeno se conservan en el tracto gastrointestinal debido a su bioencapsulación en las células vegetales. Las vacunas basadas en plantas se han desarrollado en plantas comestibles,

incluyendo arroz, maíz, papa, lechuga y zanahoria. Una vez que estas vacunas pasan a través del ambiente gástrico y llegan al intestino delgado, los antígenos son capturados por las células M en el epitelio asociado al folículo (FAE) para la inducción de respuestas inmunes sistémicas y de mucosas (Czerkinsky y Holmgren, 2010).

2.8.1 Vacunas contra enfermedades neurodegenerativas

La expansión de la vacunación y las estrategias inmunoterapéuticas es muy reciente. Éstas incluyen el control de enfermedades infecciosas hasta la detección de afecciones no infecciosas como son las enfermedades neurodegenerativas, hasta ahora son solo fármacos atenuantes de los síntomas progresivos como es el desarrollo de inmunoterapias contra las enfermedades no transmisibles (la diabetes y Alzheimer). 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).

La vacuna AFFITOPE® PD01 fue desarrollada para el tratamiento de pacientes con EP. Representa la primera vacuna contra la EP en su clase y tiene como objetivo inducir anticuerpos que reconocen los agregados de α -Syn, que se sabe que están involucrados en su patogénesis. Esta vacuna consiste en un conjugado de un formulado peptídico con hidróxido de aluminio como adyuvante. Los estudios preclínicos implicados en la administración subcutánea 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). Un posible modo de acción sugerido para los efectos de los anticuerpos es su unión a la α -Syn humana anormal

asociada con la membrana neuronal y la posterior degradación de los agregados de la α -Syn humana a través de las vías lisosomales. Es importante destacar que, en este modelo, la inmunización activa contra el α -Syn no desencadenó una respuesta neuroinflamatoria perjudicial como lo demuestra la evaluación inmunohistológica de cerebros de ratones inmunizados con marcadores microgliales y astrogiales.

El Instituto Jenner utiliza partículas similares a virus (VLP) como vehículos para mostrar péptidos α -Syn cortos. Las VLP permiten la expresión de múltiples moléculas antigénicas y tienen un efecto adyuvante. Un enfoque similar se ha implementado previamente para las vacunas contra la enfermedad de Alzheimer en entornos clínicos y preclínicos. Declion Pharmaceuticals anunció en su sitio web que iniciarían el desarrollo de una vacuna contra α -Syn. Sus péptidos, llamados péptidos declensionales, incluyen una mezcla de sustituciones de aminoácidos para reflejar el patrón completo de residuos de aminoácidos trinitrados y fosforilados anormalmente dentro de la α -Syn, todos los cuales estaban implicados para contribuir a la patogénesis de las sinucleinopatías. Actualmente, no se han publicado resultados preclínicos sobre esta estrategia. Se ha demostrado que una aplicación de vacunas contra α -Syn basadas de ácidos nucleicos para la EP induce la sobreexpresión de factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado de células gliales y el factor de crecimiento de hepatocitos para promover la protección neuronal. Chen y colaboradores realizaron la evaluación una vacuna de ADN multivalente optimizada. Encontraron que la vacunación incrementó significativamente los anticuerpos específicos de α -Syn y aumentó los niveles de interleucina 4 (IL-4) y de interferón gama en el suero de ratones inmunizados con C57BL/6 de tipo silvestre en comparación con el grupo de control. Los ratones inmunizados también mostraron síntomas motores mejorados en una prueba de campo abierto e inhibieron parcialmente la pérdida de las neuronas positivas para tirosina hidroxilasa en la sustancia negra. Los autores sugieren que los anticuerpos producidos por ratones inmunizados pueden haber reconocido un α -Syn anormal y promover su degradación a través de la vía lisosomal.

Solo AFFiRiS (Viena, Austria) ha traducido hasta ahora un enfoque de vacunación activa dirigido a α -Syn a nivel clínico. AFFiRiS utiliza péptidos cortos, denominados AFFITOPEs, que imitan una región de la molécula alfa-Syn. 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. Dado su pequeño tamaño, los péptidos no pueden por sí mismos activar las células T, y requieren conjugación con los portadores para la provocación de una respuesta de anticuerpos. Dos vacunas candidatas, PD01A y PD03A, capaces de apuntar y disminuir el α -Syn en ambas indicaciones, fueron identificadas en estudios preclínicos. La selección para el desarrollo clínico se basó en un conjunto de características que incluyen su inmunogenicidad, la especificidad de la respuesta inmune que inducen y los resultados de los estudios de prueba de concepto en modelos animales. Los candidatos PD01A y PD03A se han evaluado en tres modelos de ratones transgénicos independientes bien 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. No se observó evidencia de inducción de una reacción autoinmune humoral o celular en estudios preclínicos. Los candidatos redujeron los niveles de α -Syn cerebral patológica (es decir, agregada) en diferentes tipos de células, incluidas las neuronas (modelos PD, DLB) y oligodendrocitos (modelo MSA) sin cambiar significativamente los niveles de α -Syn fisiológicos (es decir, monoméricos) en estos modelos. En todos los casos, se produjo una reducción en la neurodegeneración asociada a α -Syn, incluyendo la desmielinización y la pérdida neuronal. La vacunación AFFITOPE no dio lugar a una neuroinflamación evidente o daño tisular.

Específicamente, para los modelos de EP, los animales vacunados mostraron mejoras en la función motora según lo evaluado por la prueba de suspensión corporal, la memoria espacial y el aprendizaje evaluados por la prueba del laberinto de agua de Morris. El primer ensayo se introdujo en 2012 mediante el ensayo de fase I de PD01A candidato, un AFFITOPE contra el extremo C-terminal de α -Syn

como antígeno conjugado con el portador hemocianina de la lapa californiana (KLH) y adyuvante con oxihidróxido de aluminio AIO (OH). Aunque el desarrollo preclínico de PD01A y PD03A reveló características comunes de las dos vacunas distintas, también demostró diferencias tanto en la especificidad fina de los anticuerpos inducidos como en su actividad biológica clínica en los diferentes modelos de enfermedad analizados. Se seleccionó la atrofia de multisistémica (MSA) como un modelo de sinucleinopatía, porque la enfermedad progresa más rápidamente en comparación con la EP y la DLB y, por lo tanto, tiene el potencial de mostrar un efecto modificador de la enfermedad de la vacunación en un tiempo mucho más corto, lo que ahorra tiempo y costos de desarrollo. Aunque es prometedor como modelo de enfermedad, tiene limitaciones: el diagnóstico es más difícil en las etapas tempranas de la enfermedad (en comparación con la EP), lo que impide el poder de los ensayos clínicos respectivos. Además, la progresión de la enfermedad puede ser demasiado agresiva para ser susceptible de vacunación activa y puede requerir enfoques alternativos, como la inmunización pasiva.

Al presente, se han desarrollado algunas vacunas en plantas contra la enfermedad de Alzheimer con un potencial favorable a partir de los resultados de modelos de ratones transgénicos (Rosales-Mendoza *et al.* 2014). En cuanto a la enfermedad de Parkinson, en el 2017, se produjo un antígeno recombinante dirigido a la α -Syn a partir de células vegetales de tabaco que expresan la proteína inmunogénica (LTB-Syn), obteniendo un rendimiento de 0.15 μ g/g de peso fresco, capaz de inducir respuestas humorales en ratones después de su administración oral (Arévalo-Villalobos *et al.* 2017).

2.9 Plantas transgénicas productoras de vacunas

La vacunología ha tenido progresos significativos desde la implementación de las primeras vacunas por Luis Pasteur. Se ha logrado un avance valioso con las nuevas tecnologías en el ADN recombinante y la conjugación de proteínas con polisacáridos, además de los avances en el uso de adyuvantes (Sette y Rappuoli,

2010). Desde su invención, el desarrollo de las vacunas ha avanzado sustancialmente y las nuevas técnicas están actualmente encaminadas a mejorar los beneficios de la vacunación en términos de costo, seguridad y cobertura. 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). Por ejemplo, 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. Fue así como se inició la tendencia en generar vacunas por parte de varios grupos de investigación utilizando este enfoque con plantas transgénicas principalmente en tabaco, arroz, papa, tomate, lechuga, zanahoria y maíz, las cuales expresan antígenos específicos hacia distintas enfermedades (Tabla 1).

Patógeno	Antígeno	Planta	Nivel de expresión	Referencia
Hepatitis B	Antígeno de superficie	Lechuga	200µg/g _{PS}	Czyz <i>et al</i> ; 2014
Cólera	CTB	Arroz	2.1% PTS	Tokuhara <i>et al</i> ; 2010
Tuberculosis	ESAT6	Zanahoria	0.056% PTS	Uvarova <i>et al</i> ; 2013
Enterotoxina <i>E. coli</i>	LTB	Maíz	0.19% PTS	Streatfield <i>et al</i> ; 2002
Rotavirus humano	HRV-VP7	Papa	3.84µg/mg PTS	Wu Yu-Zhang <i>et al</i> ; 2003
Virus Norwalk	NVCP	Tomate	20 µg/g _{PF}	Huang <i>et al</i> ; 2005

Tabla 1. Ejemplos de vacunas recombinantes producidas en plantas. PS (peso seco), PTS (proteína total soluble)

Además de las ventajas asociadas con las vacunas convencionales, el uso de plantas para la producción de vacunas recombinantes presentan las siguientes características adicionales: (1) son más económicas, se estima que los costos de producción por ejemplo en plantas transgénicas es de 10 a 50 veces más bajo que por medio de la producción en *E. coli* (Giddings *et al.*, 2000); (2) las plantas pueden mantener la actividad inmunogénica de las vacunas debido a que poseen la maquinaria necesaria para el plegamiento, ensamblaje y glicosilación; (3) No transmiten patógenos humanos o animales, tales como virus o priones; (4) algunas especies sirven como vehículos de administración oral seguros, por medio de sus tejidos como granos, frutas y hojas. Estos tejidos pueden procesarse fácilmente por liofilización. Por su parte, las vacunas producidas en plantas han sido evaluadas por distintas vías, como son vía intraperitoneales, subcutáneas, intramusculares, intranasales y orales. Los primeros ensayos de vacunas orales obtenidas en plantas fueron con ratones inmunizados contra la enterotoxina termolábil B y la toxina colérica de *E. coli* (Rosales-Mendoza *et al.* 2008). Sin embargo, existen pocos ensayos clínicos probados con vacunas transgénicas producidas por plantas para patógenos humanos y solo se han ensayado a partir de hojas y frutos (Lugade *et al.* 2010). De las vacunas con más datos clínicos que se tienen contra patógenos humanos son de la Enterotoxina de *E. coli* (ETEC), y de los virus Norwalk, Influenza, Rabia y Hepatitis B (Yusibov *et al.* 2011). En resumen, la producción de vacunas a partir de plantas ha avanzado en las últimas dos décadas gracias al desarrollo de distintas herramientas biotecnológicas utilizadas en la búsqueda y aplicación de inmunógenos candidatos a distintas enfermedades.

2.10 Estrategias biotecnológicas para mejorar los rendimientos de proteínas recombinantes

Las plantas han demostrado ser biorreactores atractivos para producir proteínas biofarmacéuticas, que incluyen vacunas, anticuerpos y moléculas como las citocinas. Los principales desafíos para los antígenos recombinantes derivados

de plantas incluyen los bajos rendimientos, el largo proceso requerido para generar líneas de plantas transgénicas y los costos asociados (Hernández *et al.*, 2014). Por lo tanto, las siguientes estrategias recientes han ayudado a mejorar el rendimiento de antígenos recombinantes.

2.10.1 Sistema de transformación nuclear

La transformación nuclear estable implica la integración del transgén en el genoma nuclear de la planta, lo que lleva a la expresión de proteínas terapéuticas y la herencia mendeliana del rasgo introducido. La integración estable en el genoma nuclear permite la producción continua de proteínas recombinantes, al mismo tiempo que reduce los costos y simplifica la producción (Tremblay *et al.*, 2010). Las proteínas recombinantes expresadas en forma nuclear se someten a modificaciones postraduccionales típicas en eucariotas y pueden almacenarse en orgánulos subcelulares o secretarse, según los péptidos de señalización fusionados (Egelkrout *et al.*, 2012).

2.10.2 Promotores

Se considera a los promotores como regiones reguladoras *cis*-acting que dirigen la transcripción de otras regiones adyacentes o cercanas al ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el cual es traducido en proteínas. Funcionalmente, un promotor es una secuencia de ADN localizada “*upstream*” o “rio arriba” (hacia el extremo 5’ de la región codificante de un gen) que incluye las regiones de enlazamiento para factores de transcripción (Potenza *et al.*, 2004). Se han elegido diferentes promotores según las propiedades de la proteína producida. En términos de promotores constitutivos cuyo objetivo es promover altos niveles de expresión transgénica independiente del tejido o estadio. En este sentido el promotor 35S obtenido del virus del mosaico del coliflor (CAMV35S) y los promotores de la ubiquitina obtenidos del maíz (Ubi 1 y Ubi 2) han sido ampliamente utilizados en la transformación de mono y dicotiledóneas, especialmente para la detección y/o

selección de células o plantas transformadas (Park *et al.*, 2010, Odell *et al.*, 1985, Callis *et al.*, 1990). La principal ventaja de los promotores constitutivos es que expresan continuamente el gen en todas las partes de la planta.

2.10.3 Uso preferencial de codones

Los codones preferidos varían significativamente entre las diferentes plantas, por lo que cuando el gen extraño deseado contiene codones raros en la planta huésped, el codón se convierte en un factor limitante en la traducción de proteínas. Este es un gran inconveniente en el objetivo de la producción en masa de proteínas recombinantes en plantas. Para superar esta limitación, una estrategia plausible implica aumentar la eficiencia de traducción a través de modificaciones de codones de la secuencia de ADN original a otras más adecuadas en la planta huésped sin cambiar la secuencia de aminoácidos (Streatfield *et al.*; 2001).

2.10.4 Expresión órgano específica

Los antígenos derivados de plantas pueden acumularse y estar protegidos por compartimentos tales como plastos u orgánulos de almacenamiento, como retículo endoplásmico (RE), así como las vacuolas. La degradación proteolítica de proteínas recombinantes puede disminuir con las síntesis de proteínas dirigidas al RE en lugar del citoplasma (Conrad y Fiedler, 1998). Secuencias con péptidos señal como KDEL y HDEL son usadas para la retención de proteínas en RE y así minimizar su degradación. El almacenamiento en RE puede aumentar de 10 a 100 veces la expresión que las obtenidas por la vía secretora (Hellwing *et al.*; 2004). Por ejemplo, los niveles de acumulación de la proteína vicilina de almacenamiento vacuolar en guisantes, aumentaron hasta 100 veces en las hojas de alfalfa transgénicas cuando la señal tetrapeptídica de retención en RE (KDEL), se fusionó a su extremo C (Wandelt *et al.*, 1992). Otro estudio mostró que el EGF humano dirigido a KDEL en el tabaco aumento de 104 veces en los rendimientos de proteínas se atribuyó directamente a la retención de la proteína recombinante en el RE (Wirth *et al.*, 2004). Sin embargo, esta estrategia no siempre es apropiada, como es el caso de algunas

proteínas terapéuticas que requieren un procesamiento postraduccionaL significativo en Golgi para su funcionalidad (Shaaltiel *et al.*; 2007). Aún quedan preguntas importantes con respecto a las funciones exactas de los motivos KDEL y HDEL en las células de las plantas (Toyooka *et al.*, 2000) y sobre los factores que permiten que estas señales de orientación retengan de manera efectiva las proteínas en el RE, el secuestro de proteínas recombinantes en el ER presenta varias ventajas, incluido un fuerte aumento de la estabilidad de los productos farmacéuticos de origen vegetal y la prevención de la biosíntesis inmunogénica de N-glicanos (Conrad *et al.*, 1998).

2.10.5 Inhibidores de las proteasas

Otra estrategia propuesta recientemente para aumentar el recombinante implica el uso de hospederos transgénicos con capacidades proteolíticas reducidas. En teoría, los procesos de proteasa que afectan la acumulación de proteínas recombinantes podrían contenerse mediante el uso de estrategias anti-sentido o de silenciamiento de ARN implementadas en plantas hospederas transgénicas. Alternativamente, los inhibidores de la proteasa recombinante activos contra proteasas endógenas específicas podrían resultar funcionales para modular las actividades proteolíticas *in situ*. La evidencia reciente en la literatura ha sugerido que la expresión ectópica de los inhibidores de la proteasa puede tener un impacto positivo en los niveles de proteína en las hojas, con efectos insignificantes en el crecimiento y el desarrollo. El inhibidor de amplio espectro de la catepsina D de tomate (CDI, por sus siglas en inglés), por ejemplo, se ha demostrado que produce un aumento de los niveles de PTS (en un 35%) en hojas de líneas de papa transgénicas que acumulan este inhibidor en el compartimento citosólico (Michaud *et al.*; 2000).

2.11 Aspectos generales de la especie *Daucus carota*

La zanahoria es una especie cuya raíz es la principal fuente de provitamina A en la dieta humana (figura 5). Es una planta bianual que durante el primer año se forma una roseta de hojas finamente divididas y acumula nutrientes en la raíz que crece y se engrosa, mientras que durante el segundo año del ciclo de vida es cuando ocurre la floración y la reproducción. Por su ciclo de vida, se puede cultivar y cosechar raíces sin generar semillas, lo que disminuye los riesgos durante la producción en el campo. Es una planta que crece en los climas templados. La temperatura mínima de crecimiento se encuentra a los 9°C y una óptima entre los 16 y 18°C. Las temperaturas elevadas (más de 28°C) provocan una aceleración en los procesos de envejecimiento de la raíz y pérdida de coloración.

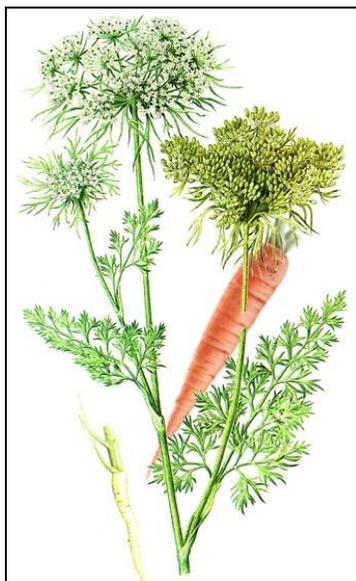


Figura 5. Zanahoria (*Daucus carota* L). (Pinto y Fonseca, 2009)

La producción de zanahoria a nivel mundial se estima en 35.5 millones de toneladas (FAO, promedio 2010-2012), lo que significa un 50% de aumento sobre los 10 últimos años. China es el mayor productor, con un volumen de 17 millones de toneladas. Le sigue Rusia y los Estados Unidos (aprox. 1.5 millones t cada uno). Polonia es el cuarto en el mundo (800.000 t). Este cultivo se consume ampliamente

en todo el mundo en su forma cruda, lo que lo convierte en un sustituto ideal para la expresión de una proteína inmunogénica para el desarrollo de una vacuna comestible.

2.11.1 Clasificación taxonómica y comercialización nacional de *D. carota*

La familia Umbelliferae comprende de 455 géneros con más de 3500 especies (Pimenov y Leonov, 1993), lo que hace de esta familia uno de los taxones más grandes entre las plantas superiores. Los miembros de la familia más comúnmente cultivados por su importancia económica son la zanahoria (*Daucus carota*), el apio (*Apium graveolens*), el perejil (*Petroselinum crispum*) y el cilantro (*Coriandrum sativum*) utilizados como hortalizas o cultivos alimentarios. Ciertamente, la zanahoria es la especie más notable, por ser utilizada ampliamente en la industria y la biotecnología, su clasificación taxonómica se muestra en la tabla 2.

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

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Daucus carota*

En México, la zanahoria se produce todo el año, pero en los meses mayo, agosto, septiembre y octubre se genera 46% de la producción nacional. En 2017 su cosecha alcanzó 334 mil toneladas, y una tercera parte de ella se exportó (SAGARPA, 2016). La producción de zanahoria en promedio es mayor en el ciclo primavera-verano con 62%, mientras que el 38% restante se genera en el otoño-invierno. Solo siete entidades federativas producen 67% del volumen total nacional, entre las que destacan: Guanajuato, Puebla y Zacatecas (SIAP, 2017).

2.11.2 Propiedades de la especie *Daucus carota*

La zanahoria (*Daucus carota*) es la hortaliza más importante y de mayor consumo a nivel mundial, su raíz es una fuente elevada en β -caroteno (precursor de la vitamina A), pues cada molécula de caroteno que se consume es convertida en dos moléculas de vitamina A (FAOSTAT, 2017). Asimismo, es fuente de vitamina E, vitaminas del grupo B como los folatos y la vitamina B3 o niacina. En cuanto a los minerales, destaca el aporte de potasio, y cantidades discretas de fósforo, magnesio, yodo y calcio. En general se caracteriza por un bajo contenido en lípidos y proteínas. El agua es el componente más abundante, seguido de los hidratos de carbono. La zanahoria presenta un contenido en hidratos de carbono superior a otras hortalizas, y en fibra, mayoritariamente en forma soluble como pectina. Al tratarse de una raíz, absorbe los nutrientes y los asimila en forma de azúcares. El contenido de dichos azúcares disminuye tras la cocción y aumenta con la maduración. Teniendo en cuenta que las zanahorias son parte de la dieta de todo el mundo y que se pueden consumir sin un proceso adicional, esto ofrece un camino conveniente, ya que se puede producir formulaciones orales de bajo costo (USDA, 2017). La principal ventaja nutritiva de la zanahoria consiste en ser una fuente excelente de β -carotenos, cuya ingestión protege frente al daño provocado por la presencia de radicales libres. La provitamina A, tras ser absorbido por el organismo, se transforma en vitamina A, sustancia esencial en los problemas de la piel como la dermatosis, refuerza el sistema inmunitario o defensivo, actúa como tónico general, acelera la curación y alivia las molestias de las aftas bucales, previene enfermedades degenerativas, cardiovasculares y algunos tipo de cáncer.

Dado que la zanahoria produce tejidos comestibles, es una fuente atractiva de biomasa para la formulación de vacunas orales que requiere un procesamiento mínimo, por ejemplo, por congelación y envasado en cápsulas de gelatina, manteniendo así los niveles de la proteína recombinante en estas zanahorias diseñadas. Además, las zanahorias tienen una vida útil relativamente larga en

comparación con otros cultivos de hortalizas. Debido a estas innumerables ventajas, algunos grupos de investigación han utilizado la zanahoria como plataforma de expresión para vacunas. Como las vacunas basadas en plantas se han adaptado a los procesos de postproducción, como el uso del secado por congelación de los tejidos de las plantas, esto permitiría un suministro eficiente de los tejidos en polvo encapsulados producidos a partir de plantas no tóxicas. Dicho producto permanecería estable a temperatura ambiente, podría enriquecerse a concentraciones más altas, garantizaría una dosificación precisa y podría mezclarse con adyuvantes en polvo.

2.12 Producción de proteínas recombinantes en *Daucus carota*

La zanahoria es una plataforma viable para producir e introducir productos biofarmacéuticos en el mercado, contribuyendo a convertir los beneficios del campo del cultivo molecular. Además, los productos actualmente en desarrollo por Protalix reflejan el interés de la industria por estas plataformas y se espera que la experiencia adquirida durante el proceso de aprobación del primer producto induzca la introducción de otros productos biofarmacéuticos hechos de zanahoria en el mercado. Sorprendentemente, los cultivos de suspensiones celulares en biorreactores no se han aplicado en el desarrollo de vacunas, lo que sería perfectamente plausible con las ventajas de un crecimiento fácil en sistemas confinados a bajo costo. A diferencia de las células de tabaco que pueden contener compuestos tóxicos, como los alcaloides, las células de zanahoria ofrecen la ventaja adicional de que constituyen una biomasa segura para el suministro de vacunas orales en humanos. El hecho de que las células de zanahoria carezcan de compuestos tóxicos permite una formulación directa de vacunas bioencapsuladas que evitan costosos procesos de purificación. En contraste, una vez que se desarrollan las líneas celulares, los sistemas de células de zanahoria ofrecen tiempos de producción cortos en biorreactores, que al mismo tiempo constituyen un proceso compatible con las buenas prácticas de manufactura (GMP) que mejora la

bioseguridad y la productividad. En conclusión, la zanahoria es una especie con un gran potencial para la producción de productos biofarmacéuticos y una evaluación adicional de los prototipos en ensayos clínicos, así como el uso de nuevas estrategias de expresión y sistemas de producción de biomasa que conducirán sin duda a nuevos productos e innovaciones en el campo de la agricultura molecular.

El desarrollo de los cultivos moleculares tuvo sus inicios a finales de la década de 1980, y desde entonces se han elaborado una gran cantidad de productos biofarmacéuticos expresados en plantas consideradas como huéspedes de expresión ventajosas, estos incluyen vacunas, anticuerpos, citocinas y enzimas (Virdi y Depicker, 2013; Da Cunha, *et al.* 2014). En el caso de las zanahorias, desde 1939 se tienen reportes sobre el establecimiento de callos utilizando segmentos del tallo, cotiledones o raíces como explantes. La zanahoria es una especie ampliamente utilizada en biotecnología en el desarrollo de productos biofarmacéuticos; en el 2012 se lanzó al mercado el primer producto farmacéutico para el tratamiento contra la enfermedad de Gaucher aprobado para uso humano (Tabla 3). Este avance proyecta un futuro alentador para el campo biofarmacéutico de origen vegetal. En cuanto a las vacunas, la primera vacuna a partir de zanahoria como sistema de expresión consistió en un modelo de inmunización contra el sarampión (Marquet-Blouin, *et al.* 2003).

Producto	Compañía	Uso
<i>Glucocerebrosidasa humana (ULYPSO)</i>	Protalix Biotherapeutics*	Terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Gaucher
<i>α-galactosidasa-A recombinante (PRX-102)</i>	Protalix Biotherapeutics*	Tratamiento potencial de la enfermedad de Fabry en desarrollo preclínico
<i>Acetilcolinesterasa recombinante humana (PRX-105)</i>	Protalix Biotherapeutics*	Uso potencial en biodefensa contra ataques de agentes nerviosos
<i>Factor de necrosis antitumoral (PRX-106)</i>	Protalix Biotherapeutics*	Potencial terapéutico para enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide

Tabla 3. Productos establecidos a través del cultivo de células de zanahoria.

*<http://www.protalix.com>.

2.13 Cultivo *in vitro* de plantas

2.13.1 Tipos de cultivos en plantas

Los cultivos celulares de plantas *in vitro* normalmente se establecen en condiciones controladas asépticas para la producción de diferentes metabolitos con aplicaciones biomédicas, como por ejemplo las vacunas. Los cultivos de células en suspensión se utilizan cuando se requiere trabajar con células indiferenciadas en distintas condiciones como heterotróficas, mixotróficas y fotoautótrofas. También se pueden utilizar los cultivos de órganos propagados en medios con fitohormonas a partir de raíces y brotes; o utilizar cultivos de tejidos indiferenciados como los callos. Sin duda, estas distintas formas de trabajar con células vegetales *in vitro* hacen que sean una herramienta útil en la biotecnología aplicada. A continuación, se discutirán brevemente las principales características de los cultivos de callos y de células en suspensión.

2.13.2 Cultivo *in vitro* de callos

Es el tipo de cultivo más ampliamente usado y se obtiene a partir de casi cualquier planta u órgano. Regularmente se utiliza un medio enriquecido con sales en alta concentración de nitrógeno como “macronutrientes” y otros en menor cantidad como los “micronutrientes”, los cuales son necesarios para una buena actividad metabólica de las células vegetales, se adiciona sacarosa como fuente de carbono y reguladores del crecimiento como auxinas y/o citocininas. Este tipo de cultivo se puede mantener indefinidamente, trasplantando periódicamente secciones de callos a medio de cultivo fresco. El fenómeno más observado en el cultivo de callos ha sido el de generación de plantas, ya sea por el proceso que involucra la formación del tallo seguida del enraizamiento, o por la iniciación de la embriogénesis somática (Hurtado y Merino, 1987).

Los callos son utilizados para estudios de fisiología vegetal, organogénesis, embriogénesis, genética, fitotoxicología y estudios de ultraestructura celular; así como también en la propagación de plantas. Actualmente se le da énfasis en el área de síntesis y extracción de productos naturales, como son los fármacos (Deus y Zenk, 1982). El cultivo de callos se divide en cuatro etapas: (1) Inducción: las células del inoculo inicial comienzan su crecimiento; (2) proliferación celular: el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo; (3) Inducción de la diferenciación: se obtienen meristemos apicales, radiculares, embriones, tejido vascular, etc; y (4) envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

2.13.3 Cultivos de células en suspensión

En particular, los cultivos de células vegetales en suspensión se usan ampliamente en la biología de las plantas como una herramienta conveniente para estudiar una amplia gama de fenómenos. Además, la homogeneidad de una población celular *in vitro*, la gran disponibilidad de material, la alta tasa de crecimiento celular y la buena reproducibilidad de las condiciones hacen que las células cultivadas en suspensión sean una plataforma valiosa para la producción de biofármacos. El cultivo de células en suspensión se desarrolla transfiriendo una porción de callo relativamente friable al medio líquido, manteniéndolo en condiciones adecuadas de aireación, agitación, luz, temperatura y otros parámetros físicos para promover su disociación y crecimiento. Generalmente se cultivan heterotróficamente usando azúcares simples como fuente de carbono y el suministro inorgánico de otros nutrientes (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010).

Por otra parte, los cultivos en suspensión pueden presentar el inconveniente de formar agregados celulares cuando están en la fase de crecimiento exponencial, lo cual limita la captación del oxígeno disuelto y la distribución de nutrientes. Para contrarrestar esto, se debe realizar un cambio de medio de cultivo periódicamente por otro nuevo, que reduce la viscosidad mejorando el flujo del fluido, así como la transferencia de masa y el oxígeno del sistema (Doran 1995). La producción de

proteínas recombinantes en cultivos de suspensión de células vegetales puede lograrse transformando células silvestres ya en suspensión y seleccionando aquellas que llevan un gen marcador de selección, o iniciando cultivos de plantas transgénicas. El incremento de biomasa a partir de cultivos en suspensión puede mejorarse modificando las condiciones del medio de cultivo o agregando agentes al medio, como sustancias que incluyen aminoácidos inorgánicos, precursores de proteína, agentes estabilizantes tales como dimetilsulfóxido, glicol, polivinilpirrolidona, polietileno. Éstos funcionan protegiendo a las proteínas de la degradación y evitando la precipitación (Hellwing *et al.*; 2004).

Los cultivos de suspensión de células de arroz se utilizan casi tan ampliamente como las células BY-2 de tabaco debido a la disponibilidad del sistema promotor de α -amilasa sensible a los carbohidratos (RAmy3D), que funciona en sincronización con el ciclo de fermentación. Este promotor es inducido por la falta de azúcar, y la expresión de los genes puede optimizarse por medio de los intercambios de medios de manera que las células estén expuestas a fases consecutivas de crecimiento y producción (Lee *et al.*, 2007). Los cultivos de suspensión de células de arroz tienen un tiempo de duplicación de 1.5 a 1.7 días (Trexler *et al.*, 2002). Muchos productos farmacéuticos se han expresado en células de arroz y al menos una compañía importante ha adoptado células de arroz como plataforma de producción industrial, aunque para ingredientes cosméticos de grado no farmacéutico y reactivos de investigación (Corea; <http://www.nbms.co.kr/>). Las líneas celulares de zanahoria pueden derivar de tejidos de hipocótilo, epicótilo o cotiledón. La transformación de las células de la zanahoria se puede lograr mediante el co-cultivo con *A. tumefaciens*, con el bombardeo de partículas o con la electroporación de protoplastos (Rosales-Mendoza y Tello-Olea, 2015).

2.13.4 Cultivos continuos de células en suspensión

Los cultivos continuos de células en suspensión son usados cuando se requiere la producción y liberación de metabolitos secundarios. La recuperación del

producto es relativamente fácil debido a la existencia de una fase líquida y una sólida. Por lo tanto, estos tipos de cultivos ofrecen un potencial frente a los inconvenientes presentes en otros tipos de cultivos de células vegetales como la inestabilidad celular y los bajos rendimientos de los compuestos deseados. Este tipo de cultivo se les conoce también como cultivos de perfusión que pueden satisfacer las necesidades de obtención de vacunas principalmente víricas a gran escala y los biorreactores que podrían utilizarse como el *air-lift*, (Orozco *et al.* 2002). Para optimizar la recuperación del producto en este tipo de cultivos en células, se han usado varias metodologías como el ajuste de temperatura, permeabilización eléctrica, cambiando la composición del medio y permeabilización con sustancias químicas como dimetil sulfóxido (Buitelaar y Tramper, 1992). Dentro de las ventajas al usar este tipo de cultivo se tienen los siguientes: (1) una operación continua con una alta proporción de dilución, (2) evita el esfuerzo de corte debido a que las células se retienen en un recipiente mecánico, (3) debido a la operación continua hay un mejor tiempo de fermentación y productividad; y (4) hay una disminución de los costos de procesamiento (Sajc, *et al.* 2000).

En un futuro cercano, los cultivos de suspensión de células vegetales ciertamente se convertirán en la opción preferida entre los sistemas basados en plantas para la producción de proteínas recombinantes de alto valor, porque combinan las ventajas de todos los demás sistemas. Los sistemas basados en plantas aún enfrentan un importante cuello de botella que debe ser superado: por ejemplo, los rendimientos más bajos en comparación con los cultivos de células de mamíferos. Esto refleja en parte la aparición mucho más reciente de las células vegetales como una plataforma competitiva, por lo que hasta ahora ha habido menos inversión en la optimización, el medio y el proceso en comparación con las células de mamíferos. Sin embargo, hay muchos investigadores que trabajan actualmente para abordar este desafío, y varios informes recientes que se analizan en este documento han logrado avances en el desarrollo de una sólida producción y estrategias de procesamiento posterior. Estos desarrollos incluyen optimización de medios, ingeniería de procesos, diseños estadísticos experimentales y

tecnologías analíticas de procesos. En general, estos procedimientos de optimización conducirán a mayores rendimientos. Otros factores que también contribuirán al éxito de las células vegetales en suspensión incluyen el cumplimiento con las buenas prácticas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés) que mejora la bioseguridad y productividad.

2.13.5 Cultivos en matraz Erlenmeyer

El cultivo en matraz Erlenmeyer es empleado para el establecimiento y evaluación de nuevos cultivos, la determinación de factores básicos en los cultivos como son la temperatura, pH, tiempo de cultivo, relación de inoculación, concentraciones de nutrientes, así como estudios más avanzados como el análisis en el crecimiento y producción en respuesta a diversos factores, elucidación de vías metabólicas, etc. (Büchs, 2001). A pesar de que los cultivos en matraz agitado representan la base de los estudios de caracterización, se conoce poco sobre los procesos de transferencia de masa y energía (Büchs y Zoels, 2001).

Estos sistemas presentan algunos problemas de operación, como es el control de la temperatura, que casi siempre se realiza por el medio ambiente generado en un cuarto de cultivo o en una incubadora, pero no es posible asegurar que la temperatura sea la misma. El pH en estos sistemas no tiene control (Nakahara *et al.*, 1992). Los matraces son poco eficientes en la transferencia de gases (O_2 y CO_2) y el monitoreo continuo es complicado, causando que la demanda de oxígeno del cultivo y la velocidad de transferencia de oxígeno al cultivo (VTO) sean parámetros que se toman poco en consideración (Hilton, 1999). En respuesta a la baja transferencia de gases al medio de cultivo que se realiza en los matraces agitados, se han adicionado con baffles, con lo cual se ha incrementado la transferencia de O_2 , a bajas velocidades de agitación. Los matraces con baffles tienen áreas de contacto irregulares, en la interfaz líquido-gas que están determinadas por factores como son diferencias geométricas en los matraces, volumen de llenado, diferencias en la excentricidad, etc. A diferencia de los matraces con baffles, los matraces Erlenmeyer convencionales tienen un área de transferencia bien caracterizada. Sin embargo, el

empleo de baffles genera perfiles de agitación difíciles de caracterizar (Büchs, 2001). No obstante, los altos niveles de estrés hidrodinámico pueden estimular la actividad del metabolismo en los cultivos celulares creciendo en esta condición.

Los procesos de cultivo líquido a pequeña escala con matraces agitados se han estudiado muy poco desde el punto de vista de su escalamiento a biorreactor. En algunas ocasiones es difícil o imposible reproducir en los biorreactores de laboratorio los resultados obtenidos en el matraz. Se ha caracterizado el matraz agitado en función de la potencia consumida (Büchs *et al.*, 2000). La potencia suministrada al matraz por la agitación orbital genera dos fenómenos, el primero se lleva a cabo en las paredes del matraz al ser cubiertas por el medio líquido. Este forma una película, cuya área está en función de la velocidad de rotación. El segundo fenómeno ocurre con el líquido que es agitado y no se detiene para formar la película. El primer fenómeno se comporta de forma similar a un reactor de película, mientras que el segundo lo hace como un reactor de tanque agitado (Maier *et al.*, 2004).

2.13.6 Cultivos vegetales en biorreactores

Los cultivos de células vegetales a menudo tienen éxito en el laboratorio porque se pueden cultivar en matraces bien aireados y los productos se pueden extraer en pequeños volúmenes de almacenamiento, permitiendo el uso de inhibidores de la proteasa y otros aditivos costosos que no se pueden usar a escala del proceso. La selección y optimización de la línea celular también tienden a llevarse a cabo utilizando pequeños matraces o incluso placas de microtitulación, por lo que la ampliación de la producción es un desafío importante (Fischer y Alfermann; 1995). Los cultivos de células vegetales se han hecho en diferentes biorreactores, como reactores de tanques agitados (Doran, 1999), reactores de onda (Eibl y Eibl, 2006), columna de burbuja (Terrier *et al.*, 2007), reactor de columna de burbuja (Shaaltiel *et al.*, 2007), reactores tipo *air-lift* (Chisti, 1989), reactores de membrana (McDonald *et al.*, 2005) y reactores de tambor con rotación

(Tanaka, 2003). En muchos informes, se han usado biorreactores de tanque agitado con impulsores grandes y un anillo rociador para reducir el esfuerzo de corte, proporcionando valores de biomasa máximos de 60 a 70% de volumen de células empaquetadas. En el contexto de los cultivos de suspensión celular, el biorreactor debe adaptarse a la línea de producción para sinergizar con sus características biológicas, por ejemplo, tasa de crecimiento, morfología, tendencia de agregación, sensibilidad al corte, demanda de oxígeno y propiedades reológicas. Los méritos relativos de los diferentes diseños de reactores se han discutido y revisado intensamente (Huang y McDonald, 2012).

Los cultivos en los diferentes diseños de reactores abarcan una gama de volúmenes y ofrecen tres estrategias de fermentación principales: procesos discontinuos, alimentados por lotes y continuos. La fermentación por lotes es el proceso más simple y más comúnmente utilizado. Una fermentación discontinua se llena con medio, se inocula y, después de la inoculación, el reactor es un sistema cerrado, excepto por algunos aditivos como el oxígeno, bases y ácidos para controlar el valor del pH. El cultivo celular experimenta un retraso, una fase de crecimiento exponencial y estacionario y el crecimiento celular generalmente ocurre en condiciones variables y algunas veces desfavorables. Un modo de fermentación más avanzado es la fermentación por lotes alimentados, que comienza con una fase de lotes clásica y una vez que se alcanzan ciertas condiciones, se inicia la alimentación, es decir, se proporcionan nutrientes adicionales. En los lotes alimentados también están cambiando varios parámetros de cultivo y las células experimentan fases de crecimiento clásicas. Además, las fermentaciones de lotes y de lotes alimentados sufren de una baja relación entre los tiempos de ejecución y preparación (preparación, esterilización antes del cultivo y limpieza posterior), que pueden compensarse con inversiones de personal e infraestructura.

Se han desarrollado diferentes estrategias de fermentación continua para los cultivos de células vegetales para superar los tiempos de ejecución y configuración. Las estrategias clásicas de fermentación continua son procesos de perfusión y quimiostato. En los procesos de perfusión, las células en el reactor son compatibles

con la alimentación continua de medios frescos y el caldo de fermentación libre de células se extrae constantemente en el mismo volumen. La fermentación de perfusión se ha realizado con éxito con cultivos de células vegetales (De Dobbeleer *et al.*, 2006). En una fermentación de quimiostato, el cultivo también está siendo soportado por una alimentación continua de medio fresco, pero en este caso el mismo volumen de caldo de fermentación que se está eliminando también contiene células, por lo que en una perfusión la densidad celular aumenta mientras que en un quimiostato la densidad celular se mantiene constante. Un cultivo de quimiostato puede durar mucho tiempo y las células se mantienen en la fase de crecimiento exponencial, lo que hace que esta estrategia sea atractiva para la producción a gran escala (Miller *et al.*, 2006). A pesar de las características ideales del biorreactor continuo, el proceso en sí mismo es sensible y está sujeto a influencias de diversos factores, como los riesgos de contaminación, la inestabilidad genética y los cambios en la fase biótica del biorreactor. Para evitar estas condiciones, se han desarrollado estrategias de fermentación, donde una fracción del caldo de fermentación se elimina una vez y se reemplaza por medio fresco (Hogue *et al.*, 1990).

Los méritos de las diferentes estrategias de cultivo se resumen y analizan de forma exhaustiva a partir de Xu *et al.* (2011). Algunos ejemplos recientes de cultivos a gran escala son la fabricación de anticuerpos en células BY-2 de tabaco, que se ha incrementado desde matraces hasta biorreactores desechables de 200L sin pérdida de rendimiento (Raven *et al.*, 2014).

2.14 Biorreactores

Los biorreactores representan una estrategia muy ventajosa para el crecimiento de los cultivos de células y tejidos vegetales, ya que pueden alcanzar volúmenes mayores a los que alcanzan los matraces agitados; sin embargo, aun cuando es posible utilizar reactores tradicionales con modificaciones para cultivar células en suspensión, los cultivos de tejidos y órganos vegetales representan un gran reto técnico. Puesto que cada tipo de tejido requiere de adaptaciones

particulares, de la implementación eficiente de estas dependerá su factibilidad. Para los cultivos de células vegetales en suspensión los tipos de biorreactores que se pueden utilizar son: de tanque agitado, columna de burbujas o tipo *air-lift*. Los biorreactores de tanque agitado se recomiendan para cultivos de alta densidad celular (20-30 kg de peso seco/m³), mientras que para los tipos *air-lift* se recomiendan para cultivos de menor densidad celular (15-20 kg de peso seco/m³) (Doran, 2000). Se ha desarrollado un biorreactor para cultivos de plantas vegetales de alta densidad sensibles al esfuerzo de corte llamados biorreactor de impulsor centrífugo (CIB, por sus siglas en inglés) tiene las ventajas de menor turbulencia superficial, menor esfuerzo de corte y mayor capacidad de suministro de oxígeno útiles para obtener altos rendimientos (Wang y Zhong, 1996). Actualmente se han desarrollado otro tipo de biorreactores de bajo costo de producción para cultivos de células vegetales como son: de flujo y reflujo, forrado de plástico, de ondas y de burbuja tipo slug (Georgiev *et al.* 2009).

2.14.1 Diseño de biorreactores

La habilidad de explotar los cultivos vegetales para la obtención de compuestos bioactivos depende del desarrollo de biorreactores propios para afrontar el crecimiento de tejidos interconectados (Giri y Narasu, 2000). Son varios los tipos de biorreactores a escala laboratorio y piloto que han sido usados para el estudio integral del cultivo de células en suspensión. Éstos consisten en adecuar los tipos básicos ya existentes, de manera que pueden afrontar las estructuras formadas por las acumulaciones de raíces, con el fin de lograr un crecimiento más homogéneo, que facilite el paso de las fases continuas hacia el interior del empaque de raíces, y así mejorar la transferencia de masa. Aun cuando el tanque agitado es el biorreactor por excelencia para el cultivo de células en suspensión y cultivo de raíces, la agitación con impulsores mecánicos no es posible porque causa rompimiento del tejido, desorganización del crecimiento y formación de callos, con la pérdida subsecuente de la productividad (Nuutila *et al.*; 1994). Se han reportado mejores condiciones de crecimiento y formación de producto en biorreactores sin

agitación mecánica (*air-lift* y columna burbujeada) que con ella (Buitelaar *et al*, 1991).

2.14.2 Escalamiento

El escalamiento depende de la habilidad para llevar a cabo la distribución de nutrientes entre las células debidamente distribuidas en todo el espacio interno del biorreactor, por lo que se requiere analizar parámetros de flujo de gases y líquidos dentro de biorreactores piloto (Kanokwaree y Doran, 1997). Asimismo, es muy importante considerar la morfología de las células vegetales transformadas como factor para el escalamiento, en lo cual, el paso de la escala de matraz agitado a biorreactor es el más difícil (Sighn y Curtis, 1994), dado que la relación superficie radial/volumen es diferente. En este contexto, los resultados del escalamiento de cultivos transformados de matraz a biorreactor han sido diversos. Por ejemplo, Taya y colaboradores (1989) encontraron que el escalamiento de matraz a tanque agitado de 0.3 L, bajaba dramáticamente las concentraciones de células transformadas de *Beta vulgaris*. Los rendimientos de atropina fueron superiores en cultivos en biorreactor *air-lift* de 2.5 L que en matraz agitado (Sharp y Doran, 1990), aun cuando la concentración de suspensiones era menor. En otros resultados, el escalamiento de cultivos vegetales transformadas de *C. roseus* de matraz a biorreactor *air-lift* de 1 L produjo concentraciones similares (Toivonen *et al*, 1990).

2.14.3 El biorreactor tipo *air-lift*

En los biorreactores *air-lift* con draft interno (Figura 6) la potencia suministrada proviene de dos fuentes: la expansión isotérmica del gas a manera que asciende por el *riser* y la energía cinética del gas inyectado. Además, la diferencia de densidades ocasionada por la expansión isotérmica y la diferencia en los gas-*holdups* (volumen del gas/volumen del líquido gaseado) entre el *riser* y el *downcomer*, genera recirculación del líquido y de burbujas que juegan un papel crítico en la distribución de biomasa, nutrientes y desechos a bajos niveles de estrés

(Chisti, 1989). Sin obstrucción, el biorreactor *air-lift* opera en un amplio rango de velocidades de flujo de líquido y de aireación, lo cual genera velocidades de recirculación en el orden de los 0.10 m s^{-1} (Weiland, 1981). Sin embargo, cuando aumenta la cantidad de sólidos no disueltos, las burbujas de gas colisionan y la extensión del *gas-holdup* decae ocasionando una disminución en la velocidad del líquido con la pérdida subsecuente de turbulencia. Dado que los procesos de transporte están relacionados de manera directa a la turbulencia, al disminuir ésta, los procesos de transferencia de masa y energía también se limitan.

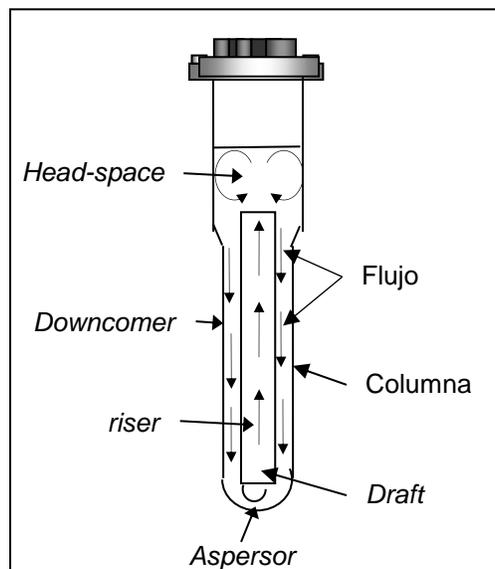


Figura 6. Biorreactor *air-lift* con *draft* interno y su aspersion.

Este tipo de biorreactor pertenece a los de columna de burbujas, por lo tanto, no utiliza una agitación mecánica, en su lugar existe un flujo de aire en la base del reactor que mezcla el contenido. El aire inyectado pasa por un difusor que dirige el flujo de aire al centro del *draft*, haciendo un flujo de líquido ascendente (*riser*), provocando así que el líquido de la zona anular en el biorreactor descienda (*downcomer*), generando de esta forma agitación axial. Hay algunas condiciones de operación que pueden mejorar los mecanismos de transferencia de masa y energía. Se ha observado que la altura del líquido en la parte no bafleada, por encima del *draft*, es de gran importancia dado que es aquí donde se genera la turbulencia ocasionada por la expansión isotérmica. En un estudio realizado por Weiland

(1981), se observó que para un biorreactor *air-lift* con *draft* y *loop* interno (relación $(d_D/d_c=0.76$ y $U_{Gr} = 0.015 \text{ ms}^{-1}$), el tiempo de mezclado en el biorreactor bajaba considerablemente conforme se acortaba el *draft*. En otros aspectos, la introducción de puntos de conexión entre el *draft* y la columna reduce la recirculación del líquido en el *downcomer*, y las perforaciones en el *draft* crean mayor circulación hacia éste.

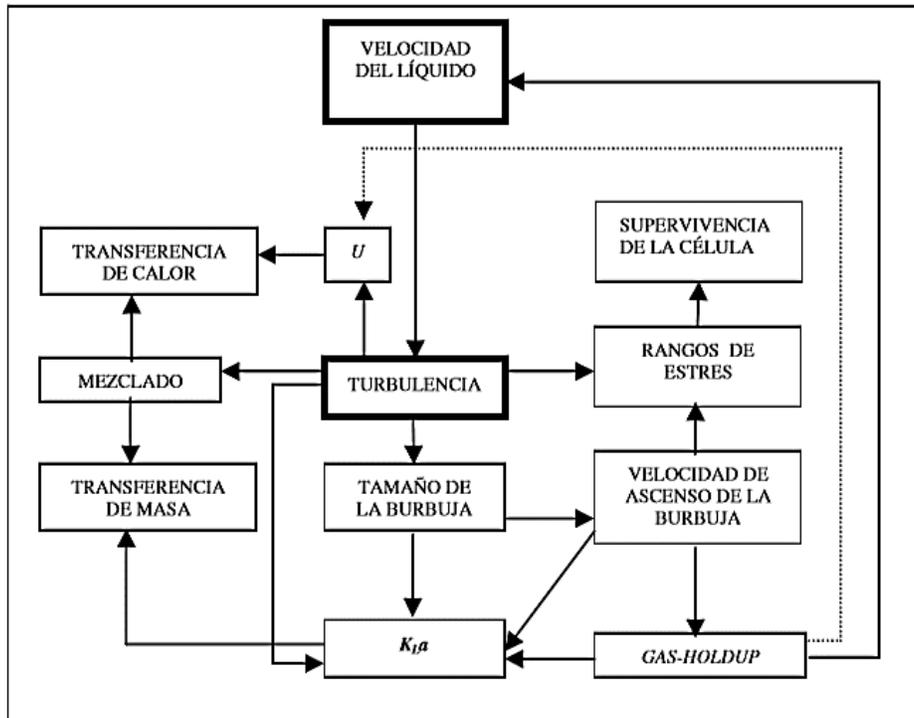


Figura 7. Circulación de líquido en biorreactores tipo *air-lift* (tomada de Caspeta, 2004 y Chisti, 1989).

III. ANTECEDENTES DIRECTOS

3.1 Importancia de la proteína quimérica LTB-Syn

La evidencia de que la proteína α -syn podría ser la causa en la enfermedad de Parkinson proviene del análisis de formas autosómicas raras por tres mutaciones puntuales diferentes en el gen α -syn (SNCA) que conduce a la formación de proteínas mal plegadas. Se identificó que la proteína cuando está mal plegada inducía la EP y una extensa patología de cuerpos de Lewy (Lansbury y Brice, 2002). La evidencia experimental por métodos inmunológicos fue proporcionada por el trabajo de Masliah *et al*; en 2005. Usando el enfoque de inmunoterapia activa, ellos encontraron que los ratones inmunizados con la proteína de humano α -syn completa desarrollaron anticuerpos con una afinidad relativa alta hacia α -syn. Estos animales mostraron una acumulación disminuida de agregados α -syn en las células neuronales, que se asoció con una neurodegeneración reducida y una función mejorada. Además, en este estudio se identificaron tres epítopes reconocidos por los anticuerpos inducidos (α -Syn₈₅₋₉₉, α -Syn₁₀₉₋₁₂₆, α -Syn₁₂₆₋₁₄₀) que posteriormente se usaron como péptidos sintéticos conjugados con un adyuvante y se probaron en ratones dando como resultado respuestas humorales capaces de reconocer agregados de la proteína α -syn en cerebros de pacientes con EP, sugiriendo una actividad inmunogénica conveniente para la formulación de una vacuna (Ghochikyan *et al.* 2014).

A partir de esa evidencia directa, el trabajo realizado por Arevalo-Villalobos en 2017 consistió en la obtención de callos de tabaco que expresan una proteína quimérica (LTB-Syn) compuesta por la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) y los tres epítopes de la proteína α -sinucleína (nombrados Syn1, Syn2 y Syn3), los cuales como ya se mencionó son relevantes en la enfermedad de Parkinson (figura 8 y 9). La proteína quimérica LTB-Syn se expresó y caracterizó en tabaco (*N. tabacum*); comprobando la presencia del transgén por medio de PCR y Western-blot. Para el análisis de la expresión de la proteína se utilizaron dos

diferentes anticuerpos (anti-LTB y anti-Syn3) y mediante ensayos de ELISA-GM1 realizaron la cuantificación obteniendo rendimientos de hasta 160 ng/g_{PF}. 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.

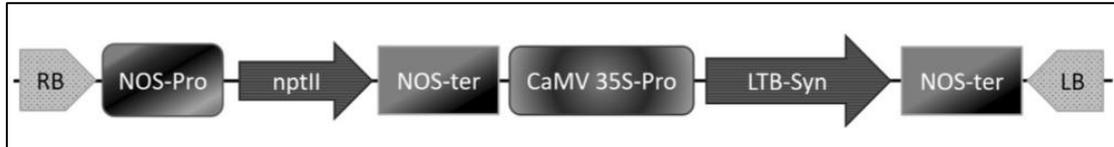


Figura 8. Descripción del vector de expresión pBI-LTB-Syn. Esta construcción se basa en el vector binario pBI121 y se usó para transformar las zanahorias por *A. tumefaciens*. RB borde derecho, LB borde izquierdo. El vector alberga el gen de resistencia nptII bajo el control del promotor de la nopalina sintasa para la selección de transformantes. El gen de interés se expresa bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S).

MKMKVLVFFVATILVAWQCHA APOSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKRREMVI I
 TFKSGATFQVEVPGSOHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAISME
 NDPRVPSRAGSIAAATGFVKKDQQEGILEDMPVDPDNEAYEEMPSEEGYQDYEPEASEKDEL

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica LTB-Syn. El diseño del inmunógeno se basa en los siguientes elementos: péptido señal (en amarillo), la subunidad B de la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (líneas continuas), un conector flexible que contiene prolina (negritas), los tres epítopes de α -sinucleína (Syn1, Syn2 y Syn3, en gris) y el péptido de retención en RE (SEKDEL en rojo).

Este trabajo sugiere que la proteína quimérica LTB-Syn es un antígeno funcional en evaluaciones de inmunogenicidad vía oral con animales de prueba. Así mismo es el primer informe sobre la expresión de un antígeno que podría conducir a la fabricación de posibles vacunas en tejidos vegetales comestibles con un potencial terapéutico en modelos preclínicos contra la enfermedad de Parkinson.

IV. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer. La prevalencia de EP ha aumentado del 1 al 2% a nivel mundial en adultos mayores de 60 años, ya que la edad es un factor de riesgo para la enfermedad (De Lau y Breteler, 2006). Hoy en día con las técnicas moleculares y de cultivo celular se han podido fabricar vacunas y biofármacos contra las enfermedades neurodegenerativas a partir de cultivos vegetales a bajos costos y en ausencia de patógenos humanos. Entre las que destaca la especie *Daucus carota*, ya que esta especie ofrece un recurso atractivo para la producción de vacunas orales con un procesamiento mínimo para su administración, por ejemplo, el empaquetado en cápsulas de gelatina. Sin embargo, este potencial aún no se ha aplicado en el desarrollo de vacunas orales a partir de cultivos de células en suspensiones en biorreactores. Es por esto que es importante establecer cultivos de células en suspensión transformados con el gen *LTB-Syn* de *Daucus carota*, así como optimizar dichos cultivos para poder obtener un mayor rendimiento de la proteína quimérica LTB-Syn en biorreactores tipo *air-lift* y así lograr un incremento en la productividad de la biomasa activa, lo que representa una alternativa original para la producción de la proteína de interés con un procesamiento mínimo y con la capacidad de ser administrada por vía oral, por ejemplo, en forma de píldoras con material liofilizado. Lo anterior representa una alternativa de gran impacto para el control de la enfermedad de Parkinson, ya que hará posible la aplicación de vacunas en ensayos preclínicos en zonas pobres o en desarrollo.

V. HIPÓTESIS

El establecimiento y optimización de cultivos *in vitro* de células en suspensión transformados con el gen *LTB-Syn* de la especie *Daucus carota* (Umbelliferae) permite incrementar la biomasa y el rendimiento de la proteína quimérica LTB-Syn en matraz y en biorreactor tipo *air-lift* de 2L.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Establecer cultivos transformados con el gen LTB-Syn de *Daucus carota* para la producción a nivel de matraz agitado y biorreactor *air-lift* de 2L la proteína quimérica LTB-Syn, la cual es una vacuna experimental contra la enfermedad de Parkinson.

6.2 Objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones de crecimiento de callos y células en suspensión de la línea transformada Z4 y silvestre (WT) de la especie *D. carota*.
2. Caracterizar los parámetros cinéticos de crecimiento en callos y células en suspensión de la línea transformada Z4 de *D. carota* a nivel matraz de 250 ml.
3. Caracterizar los parámetros de crecimiento y producción de la línea transformada Z4 de *D. carota* a nivel biorreactor *air-lift* de 2L.
4. Evaluar la producción de la proteína quimérica LTB-Syn por ELISA, a nivel matraz y biorreactor *air-lift* de 2L.
5. Determinar la presencia de la proteína quimérica LTB-Syn por Western-blot, a nivel matraz y biorreactor *air-lift* de 2L.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El diseño experimental se planteó en dos etapas simultáneas (figura 10). La primera, involucró el establecimiento de los cultivos de callos (líneas Z4 y WT) en frascos de vidrio de 100 ml, posteriormente el cultivo de células en suspensión de la línea transgénica Z4 en matraz agitado de 250 ml y en biorreactor *air-lift* de 2L. Finalmente, se realizaron las cinéticas de crecimiento de callos y células en suspensión en matraz y biorreactor. La segunda etapa del proyecto consistió en el análisis fitoquímico a partir de la detección y cuantificación de la proteína quimérica LTB-Syn presente en los cultivos a nivel de matraz y biorreactor en los que se realizó las cinéticas.

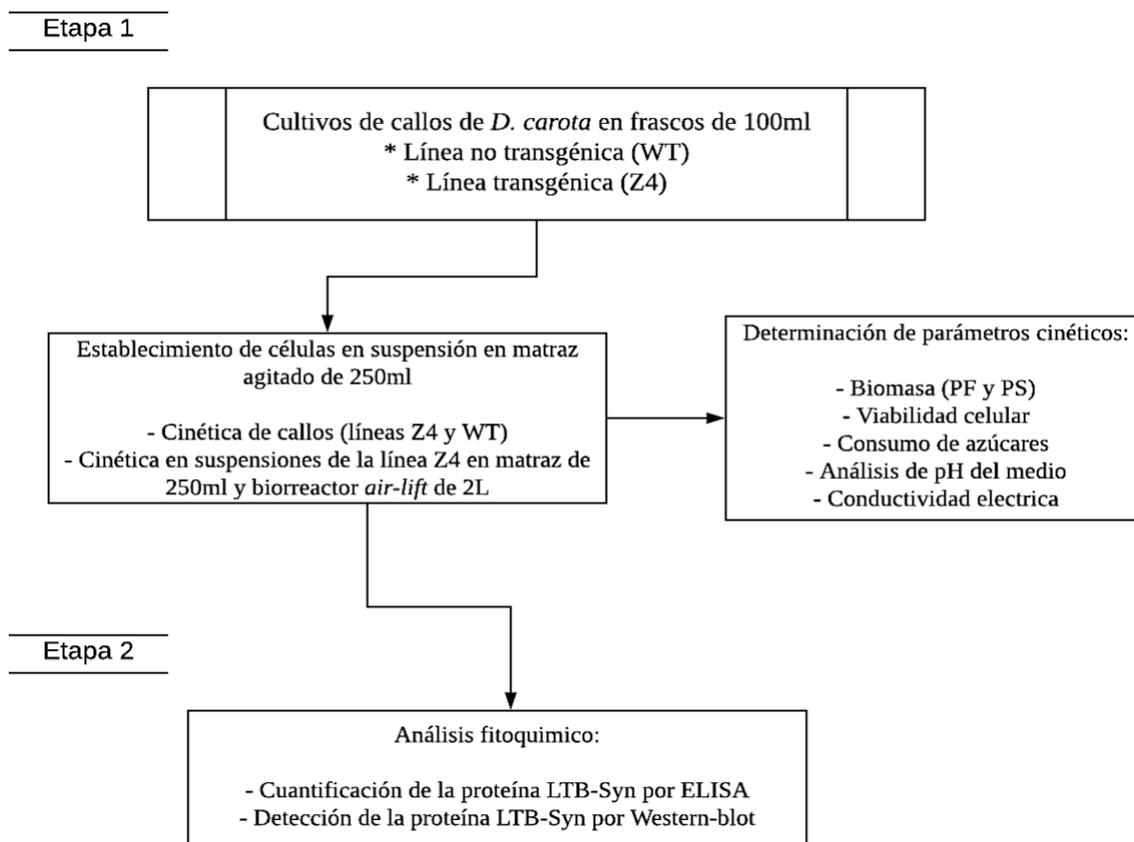


Figura 10. Diagrama de flujo para el cultivo de la línea Z4 y WT de *Daucus carota*.

7.2 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas presentados en tablas y figuras corresponden a la media de al menos dos réplicas biológicas realizadas por triplicado para los puntos cinéticos en matraz y biorreactor \pm valores de error estándar.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Obtención de las líneas transformadas de *Daucus carota*

Los callos iniciales de *Daucus carota* fueron proporcionados por el grupo de trabajo a cargo del Dr. Sergio Rosales-Mendoza del laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). Los callos se transformaron genéticamente mediante el co-cultivo con *A. tumefaciens* utilizando un vector de expresión binario donde se clonó el gen *LTB-Syn* bajo el control del promotor CaMV35S y un gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) como marcador de selección (Arévalo-Villalobos *et al.* 2017). Estos se establecieron bajo las siguientes condiciones de cultivo [medio rico en sales MS, adicionado con 20 aminoácidos, sacarosa 3%, 2,4-D (1ml/L), BA (300µg/L), luz continua, kanamicina (25mg/L), cefotaxina (125mg/L); obteniendo cuatro líneas independientes transgénicas (Z1-Z4) y la silvestre (WT), de las cuales para este trabajo solo se utilizó la línea Z4 por ser la que tuvo un mejor rendimiento en la producción de la proteína de interés y la línea WT como control.

8.2 Medio de cultivo

El medio nutritivo que se utilizó para cultivar los callos y células en suspensión de *Daucus carota* en el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB/UAEM), fue MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 30g de sacarosa, 3g/L PVP y los fitorreguladores: 2,4-D (2mg/L) y cinetina (2mg/L). El pH del medio se ajustó a 5.7 antes de su esterilización en autoclave. Al medio de cultivo sólido se le adicionó 3.2g/L de Phytigel y se esterilizó por 15 minutos a 121°C y 15 psi.

8.3 Cultivo de callos

El cultivo de callos se realizó en una campana de flujo laminar, la cual se limpió con alcohol al 70% y se dejó con luz UV durante 30 minutos. Posteriormente se hizo la siembra de callos en frascos de vidrio de 100 ml con 20 ml de medio MS sólido para generar suficiente biomasa. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de luz constante ($24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y fotoperiodo (16hrs luz/ 8hrs oscuridad) a 25°C con una humedad relativa de 90% con resiembras cada 20 días aproximadamente.

8.3.1 Cinética de crecimiento de callos

La cinética de crecimiento se inició a partir de subcultivos de callos friables de la línea transformada (Z4) y de la línea silvestre (WT) partiendo de un inóculo de 0.5g con el fin de evaluar la producción de biomasa (peso fresco) y proteína de interés respecto al tiempo bajo las condiciones de fotoperiodo. Para esta cinética de crecimiento se tomaron tres repeticiones por condición al azar cada cinco días por 40 días. Se pesó la biomasa empleando una balanza analítica y se determinaron los rendimientos de la proteína de interés producida en cada uno de los puntos, como se describe a detalle más adelante.

8.4 Establecimiento de células en suspensión

Para obtener las suspensiones celulares se utilizaron los callos friables previamente subcultivados de la línea Z4 de *D. carota* que estaban en fase exponencial, según el protocolo de Rodríguez-Monroy (2009). Para esto se agregó un inóculo de 10% (v/v) de biomasa en matraces bafleados de 250 ml con un volumen de 100 ml de medio MS líquido. Los matraces se mantuvieron en un agitador orbital de plataforma (Modelo LSI-1005R) a una velocidad de agitación de 115rpm, en un cuarto de cultivo con luz constante ($24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y 25°C. A los 12

días de la transferencia de los callos al medio líquido, se descartó el sobrenadante (medio de cultivo con restos de células muertas), procurando que las células se mantuvieran en el matraz, posteriormente se agregó medio de cultivo fresco hasta completar nuevamente el volumen establecido inicialmente. Para la generación de biomasa cada dos semanas se repitió el procedimiento anterior, con la diferencia de que, una vez colocado el medio fresco se traspasó el contenido en dos matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen 100 ml de medio de cultivo, procurando que los grumos y agregados más grandes no fueran transferidos con el fin de ir estableciendo suspensiones celulares finas y eliminando la mayor cantidad de agregados.

8.4.1 Cinética de crecimiento de células en suspensión en matraz de 250 ml

Una vez que se obtuvo biomasa suficiente de suspensiones celulares finas con 15 días de crecimiento, se inició la cinética de crecimiento. Para esta cinética de crecimiento con células en suspensión de la línea Z4 se utilizaron 48 matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml de medio MS y un inóculo de 10%. Se mantuvieron en agitación orbital de 110rpm, bajo condiciones de luz constante ($24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a 25°C , durante 45 días. Se utilizaron datos de tres replicas independientes para mediciones analíticas cada 3 días y se calculó la media y desviación estándar.

8.5. Cultivo en biorreactor *air-lift* de 2L

8.5.1 Condiciones del biorreactor *air-lift*

El biorreactor tipo *air-lift* utilizado en este trabajo consta de una columna con draft interno, cuya relación entre diámetros (d_D/d_C) es de 1.94, y entre alturas (h_D/h_C) de 1.74. En este equipo la aspersion del aire se realiza en la parte inferior del *draft*,

de manera que se genera un loop interno en el cual el *upcomer* se encuentra en el *draft*, y el *downcomer* en el anillo. Se operó con las condiciones señaladas en la tabla 4. Finalmente se realizaron 2 réplicas de cinéticas de crecimiento de 30 días, evaluando los mismos parámetros que en la cinética de matraz agitado.

Temperatura	25°C
Luz constante	3000 Lux
Volumen de trabajo	80% (1.7L)
VVM	1.0 (día 0 a 12)
Inóculo	10% (180 g _{PF} de células)
Muestreo	20 ml cada 72h

Tabla 4. Condiciones de operación del cultivo en biorreactor *air-lift* de 2L

8.5.2 Material vegetal

Las células en suspensión de la línea Z4 se propagaron en dos matraces de 1L para generar biomasa suficiente como inóculo para el biorreactor *air-lift* de 2L.

8.5.3 Preparación y operación del biorreactor

El biorreactor se esterilizó a 120°C y 15 psi, junto con 1.7L (80 % del volumen nominal) del medio de cultivo MS. Antes de inocular, se puso en operación durante 2 días a un flujo de 0.17 L min⁻¹ (0.1 vvm). Realizado lo anterior, se aseguró la esterilidad del sistema, y se procedió a inocular mediante el método que se describe a continuación.

8.5.4 Inoculación al biorreactor

La inoculación es un punto fundamental. Este proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar. Los matraces de 1L con la biomasa generada se introdujeron en la campana; posteriormente, se filtraron en vacío y se pesaron 180g. Se depositaron las células en un volumen de

500 ml de medio fresco en otro matraz de 1L y se succionaron mediante un tubo de vidrio de 15 cm conectado al *draft* y al anillo mediante una manguera de silicón de $\frac{3}{8}$ x $\frac{1}{2}$ pulgadas para así poder transferir la biomasa poco a poco arrastrando las células en suspensión con ayuda de una bomba peristáltica operada a un flujo de 5L min^{-1} . El proceso se repitió hasta adicionar el total de las células en suspensión. Con esta recirculación, se logró contar con cualquier cantidad de medio que se requería para introducir en el biorreactor el 100 % del inóculo.

8.5.5 Cinética de crecimiento en biorreactor *air-lift* de 2L

Para la cinética tipo-lote en el biorreactor *air-lift* de 2L con la línea Z4 se utilizó un volumen de trabajo del 80% de medio MS y un inóculo de 10%. Se mantuvo en condiciones de luz constante (3000 lux) a 25°C, durante 30 días. Se tomó una muestra de 20 ml en condiciones controladas asépticas del medio de cultivo cada 3 días, hasta completar los 30 días de cultivo. En este caso se midió la conductividad para la determinación indirecta de las concentraciones de biomasa en peso fresco y peso seco.

8.6 Métodos analíticos

8.6.1 Medición de la conductividad en biorreactor *air-lift* de 2L

La conductividad del medio de cultivo en el biorreactor se midió con un conductímetro marca Orion, modelo 105. Dado que la conductividad varía de manera exponencial con la temperatura, las mediciones se hicieron a 25°C. Las mediciones de conductividad sirvieron para establecer la relación entre el crecimiento de las células y la conductividad del medio de cultivo del biorreactor, y con esto, el establecimiento de un modelo que nos permitiera la medición indirecta de la concentración de biomasa (Peraza *et al*; 2001).

8.6.2 Cuantificación de azúcares totales

Para la cuantificación de azúcares en el medio nutritivo de las células en suspensión se realizaron curvas de calibración de sacarosa, fructosa y glucosa para determinar el consumo de carbohidratos presentes en el medio de cultivo de las muestras en matraz agitado y biorreactor. Esta cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) de la marca Waters 7117 plus Autosampler. Como fase estacionaria se utilizó una columna amino (NH₂) UG80 de tamaño 5µm (4.6 mm x 150 mm) y como fase móvil CH₃CN:H₂O (acetonitrilo: agua) en una proporción 80:20 respectivamente y un flujo de operación de 1.0 ml min⁻¹ a 25°C. Los datos obtenidos se reportan como gramos de sustrato por litro de medio S (g L⁻¹).

8.6.3 Análisis de biomasa en peso fresco

En el caso de los callos el peso fresco (PF) se determinó retirando la biomasa del medio de cultivo sólido y colocándola en una charola de plástico para poder pesarlo en una balanza analítica. Posteriormente los callos se guardaron por separado en tubos Falcon, y se conservaron a -80 °C para su posterior análisis. Para las células en suspensión tanto en matraz como en biorreactor se filtraron las biomásas de cada muestra a través de papel filtro de poro medio (4µm de retención) al vacío y se pesaron en una balanza analítica.

8.6.4 Medición del pH

El pH del medio de cultivo es muy importante, ya que éste afecta tanto al crecimiento celular como a la actividad de los reguladores del crecimiento. El medio

de cultivo filtrado de la cinética de suspensión a nivel matraz y biorreactor se les midió el pH con un potenciómetro marca ORION modelo 410A.

8.6.5 Análisis de biomasa en peso seco

De igual forma para obtener el peso seco las biomásas filtradas se secaron por 2-3 días en una liofilizadora (marca LABCONCO FreeZone) a -50°C y 0.02 mbar de vacío, hasta mantener un peso constante y se pesaron en una balanza analítica. Con los datos obtenidos se calculó la media y desviación estándar. Se realizaron los gráficos de cinéticas de crecimiento de peso fresco (g L^{-1} PF) y peso seco (g L^{-1} PS) en función del tiempo.

8.6.6 Obtención de parámetros cinéticos

A partir del análisis de las biomásas se calculó la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) con las siguientes ecuaciones:

Velocidad específica de crecimiento (μ)

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

$$t_d = \frac{\text{Ln}2}{\mu}$$

Donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento

X_i : Biomasa inicial

X_f : Biomasa final

t : Tiempo

t_d : Tiempo de duplicación

$\text{Ln}2$: Logaritmo natural de 2

Además de la μ y el t_d , se calcularon los rendimientos de biomasa ($Y_{X/S}$), rendimiento de producto ($Y_{P/X}$), índice de crecimiento (IC) y productividad.

Donde:

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

($\mu\text{gP/gS}$): (μ gramos de LTB-Syn producido/gramo de sustrato consumido)

($\mu\text{gP/gX}\cdot\mu$): (μ gramos de LTB-Syn/ gramo de biomasa por día)

(IC) (gramos de biomasa final/gramos de inóculo inicial)

8.6.7 Viabilidad celular

La viabilidad celular de callos, de suspensiones celulares a nivel matraz y de biorreactor se evaluaron mediante la técnica de fluoresceína, empleando diacetato de fluoresceína (DAF) (Widholm, 1972). El DAF es una sustancia no polar que atraviesa la membrana celular y es hidrolizado por esterasas intracelulares en células viables, produciéndose la fluoresceína, que se excita a 490nm. Es necesaria una integridad de membrana para la retención intracelular de la fluoresceína, mientras que las células no viables son incapaces de hidrolizar el DAF y/o de retener la fluoresceína. Para preparar la solución, se disolvieron 5mg de DAF en 1ml de acetona y se almacenó a 4°C. A partir de una alícuota de 0.1 ml del stock se adicionaron 5 ml de agua desionizada. Posteriormente, se tomaron 500 μ l de esta última dilución y se mezclaron con las muestras en 500 μ l y se dejó reposar por 1min, después se tomaron 50 μ l de esta suspensión y se colocaron en un portaobjetos para ser observada en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E 400, Super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF) y la reacción de células viables se confirmó por la fluorescencia emitida.

8.7 Análisis de la proteína LTB-Syn de la línea Z4 de *Daucus carota*

8.7.1 Extracción de la proteína LTB-Syn de la línea Z4 de *D. carota*

A partir de los cultivos obtenidos de callos y de células en suspensión en matraz y en biorreactor se inició la extracción de proteínas totales por el método de extracción reportado por Franklin Scott, *et al.* (2002), el cual consistió en mezclar 200mg de tejido fresco con 600µl de buffer de extracción PMSF [750mM Tris HCl, 15% sacarosa, 100mM β-mercaptoetanol, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pH 8.0]. La mezcla se sónico suavemente por 10s en un homogeneizador ultrasonificador de punta (Vibra-Cell™ Ultrasonic) a 4°C hasta obtener un homogenizado uniforme. Después se agitó con vórtex por 5s, posteriormente la mezcla se centrifugó por 15min a 8000 rpm a 4°C y se colectó el sobrenadante (200µl) en tubos Eppendorft nuevos. Finalmente, con estos extractos se llevó a cabo la cuantificación de la proteína quimérica LTB-Syn como se describe a continuación.

8.7.2 Cuantificación de la proteína LTB-Syn por ELISA

La cantidad de proteína de los extractos solubles se estimó usando gangliósido-dependiente ELISA (GM1-ELISA) de acuerdo con Chikwamba *et al.* (2002). Primeramente, se fijó el glucolípido GM1 (1.5µl/cada pozo) a la base de la placa de poliestireno en un volumen de 50µl durante toda la noche a 4°C, al día siguiente se lavó 4 veces con PBST 0.5% y se secó. Posteriormente, se bloqueó con leche libre de grasa (Svelty 5%) con 50µl en cada pozo por 2h a 25°C, se lavó PBST para después incubar con el extracto de cada muestra (50µl) con 50µl de PBST por pozo y se dejó durante toda la noche a 4°C; al siguiente día se lavó 4 veces con PBST y se agregó el anticuerpo primario anti-LTB de ratón en una dilución optimizada (PBST en 1:400) 50µl por pozo durante 2h a 25°C, se lavó dos veces con PBST, después se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG (anti-CT) de

ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:2000) y se dejó por 2h a 25°C, en seguida se lavó la placa con PBST para eliminar el exceso de enzima no unida. Finalmente se colocaron 100µl de la solución de sustrato ABTS [0.6mM 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiasolina-6-ácido sulfónico), 0.1M ácido cítrico, pH 4.35 con 1mM de H₂O₂] por pozo, y después de 30min a 25°C se realizó la detección a 405nm. Se construyó una curva estándar usando CTB puro para estimar los niveles de expresión en muestras de los cultivos transgénicas.

8.7.3 Detección de la proteína LTB-Syn por Western blot

La presencia e integridad de la proteína quimérica LTB-Syn se evaluó mediante análisis de transferencia Western-blot. Los extractos de proteínas se obtuvieron por sonicación a partir de 200mg de células en suspensión y células de biorreactor, se resuspendieron en 500µl de buffer de carga [50mM Tris-HCl (pH, 6.8), 100mM DTT, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol]. Las muestras se desnaturalizaron hirviéndolas durante 5min a 95°C, eliminando los residuos mediante centrifugación a 13000rpm durante 10min. Las muestras se sometieron a geles de acrilamida SDS-PAGE al 12% en condiciones de desnaturalización. El gel se transfirió posteriormente sobre una membrana de nitrocelulosa. Después se bloqueó con leche sin grasa 5% por una noche; al otro día la membrana se incubó con anticuerpo primario anti-CT en una dilución de 1:400 por una noche. Se añadió el anticuerpo secundario (anti-CT) conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1: 2000) y se dejó incubando por 2h a 25°C. La inmunodetección se reveló por incubación con la solución SuperSignal West Dura siguiendo las instrucciones del fabricante. Para detectar señales positivas, se expuso una película de rayos X a la membrana que posteriormente se trató con soluciones estándar de revelador y fijador.

8.8 Extracción de ADN y detección del transgén de la línea Z4 de *D. carota*

La extracción del ADN se realizó de acuerdo con el método de Dellaporta *et al.* (1983). Se aisló a partir de 200mg de tejidos de las líneas en células suspensión y biorreactor, así como de la línea no transformada (silvestre). Los tejidos se homogenizaron para separar las células con PMSF 0.5% en un mortero y se colectó la mezcla en tubos Eppendorf 1.5 ml, después se colocaron a baño María (65°C) por 1h (mezclar cada 10min), posteriormente se centrifugó a 8000rpm por 10min. El sobrenadante se colectó y se resuspendió en 450µl de cloroformo isoamílico (24:1), se mezcló suavemente por 10min y se centrifugó a 13000rpm por 10min. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo con 1 ml de cloroformo isoamílico y se repitió el paso anterior. Posteriormente se quita el sobrenadante y se agregan 150µl de acetato (3M) con 750µl de isopropanol frío (dejar a -20°C por 20min), y se centrifugó a 13000rpm por 20min. Finalmente se lavó la pastilla con etanol 70% (500µl), se dejó secar y se resuspendió con buffer TE (5µl), agua (10 µl) y RNAsa 2mg/ml (8µl).

La detección del transgén se realizó por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen LTB-Syn de las células transformadas (suspensiones y biorreactor). Se utilizaron los siguientes cebadores: sentido directo 5'—TGGCTGGAAAGAGGGAAATG—3', sentido reverso 5'—TGGGAATCAATGTGCTGACTAC—3', para amplificar un fragmento de 737pb. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25µl, el cual contenía buffer PCR 10x (2.5µl), 100ng de DNA (0.5µl), 1.5mM cloruro de magnesio (3µl), 2.5 U Taq DNA polimerasa (1µl), 1mM dNTPs (0.5µl) y 1µM de primers (0.3µl). Las condiciones de cada ciclo fueron: 95°C por 5min (desnaturalización), 35 ciclos a 95°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 30s, y una extensión final a 72°C por 5min. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se colocó un control positivo de 100ng de DNA de una línea Z4 confirmada, y un control negativo de reactivos (solo agua).

IX. RESULTADOS

9.1 Establecimiento de callos de las líneas Z4 y WT de *Daucus carota*

A partir de los subcultivos de callos de la línea transformada (Z4) y de la línea silvestre (WT) se obtuvieron callos friables bajo dos condiciones de crecimiento (luz constante y fotoperiodo) partiendo de un inóculo de 1g como se indicó en la metodología. Se observó que a partir del día 10 el crecimiento de los callos mostraba una coloración crema-amarillo, friables y sin signos de oxidación (figura 11). Las mejores condiciones de crecimiento para la línea Z4 fue en condiciones de luz constante al día 25 con un peso fresco de 3.6g, lo que representa un incremento de tres veces del inóculo inicial. En cuanto a la línea WT los valores máximos de crecimiento fueron en las condiciones de fotoperiodo al día 25 con 3.5g (Tabla 5).

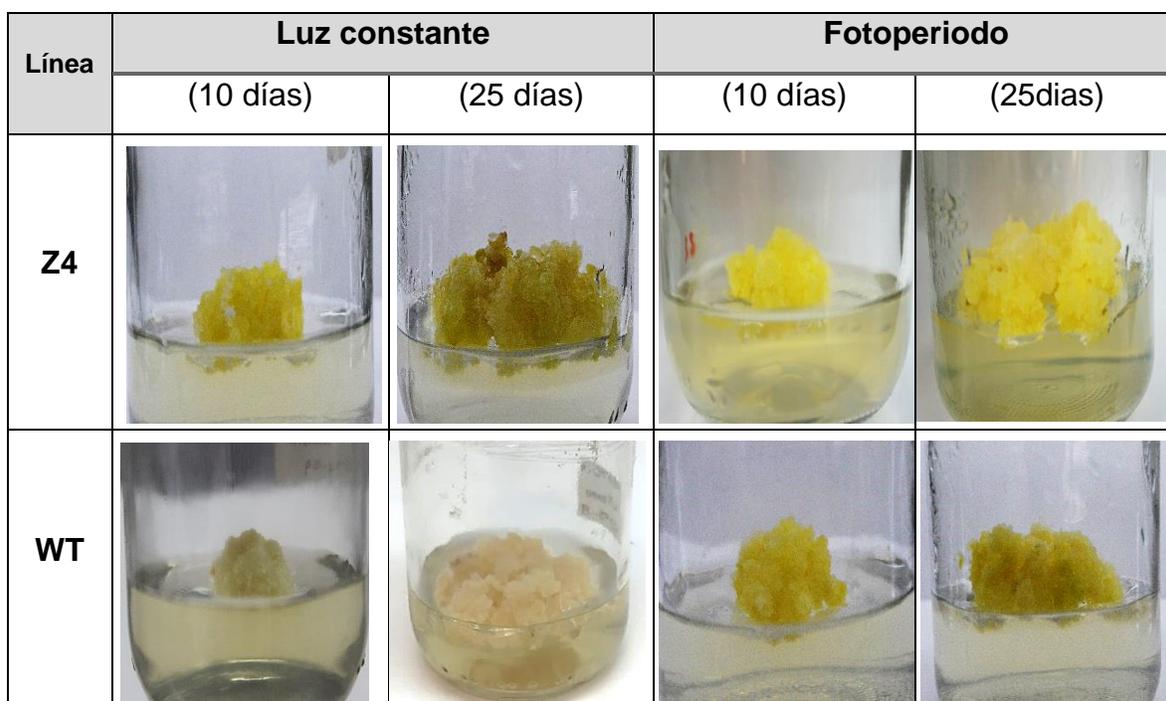


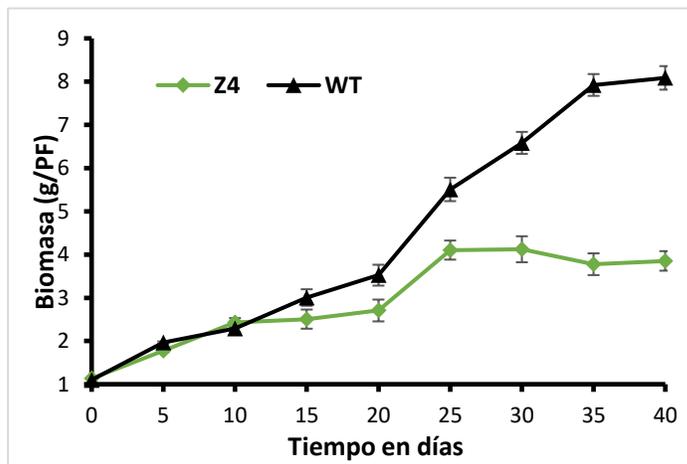
Figura 11. Callos *in vitro* de las líneas Z4 y WT de *Daucus carota* de 10 y 25 días sembrados con medio MS con 2,4 D y CIN (2mg/L) en dos condiciones de crecimiento (luz constante y fotoperiodo).

Condición	Línea Z4		Línea WT	
	Día 10	Día 25	Día 10	Día 25
Fotoperiodo	1.6	3.2	1.8	3.5
Luz constante	1.4	3.6	1.5	3.3

Tabla 5. Valores máximos de biomasa (g/g_{PF}) obtenida a los 10 y 25 días de crecimiento de callos en dos condiciones de crecimiento

9.1.2 Cinética de crecimiento de callos de la línea Z4 y WT de *D. carota*

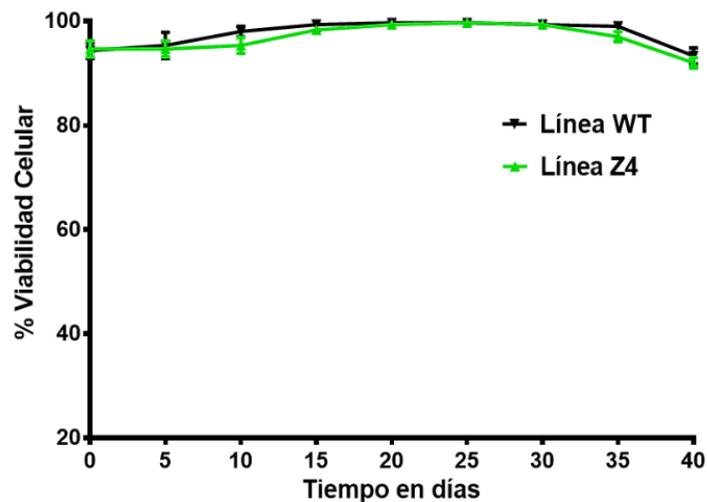
Se desarrolló una cinética de crecimiento de 40 días con los callos de las líneas Z4 y WT en fotoperiodo con tres repeticiones biológicas por cada punto cada cinco días. Cabe resaltar que los datos reportados a continuación solo se expresaron en gramos de biomasa de peso fresco (X_{PF}), puesto que la restante obtenida fue utilizada para análisis posteriores. El comportamiento cinético de las dos líneas mostró una fase *lag* de 20 días aproximadamente, seguida de la fase de crecimiento exponencial a partir del día 20, con incremento de biomasa mayor hasta el día 35 para la línea WT. Se encontró que la mayor cantidad de biomasa de la línea Z4 fue al día 25 con un peso promedio de 4.12g, mientras que para la línea WT el valor máximo de biomasa fue al día 40 con un peso promedio de 8.1g lo que representa un incremento de ocho veces el inóculo inicial (gráfica 1).



Gráfica 1. Curva de crecimiento en peso fresco de cultivo en callos de las líneas Z4 y WT de *Daucus carota*

Esto indica que entre los días 20 y 35 los callos mostraron una fase exponencial en las condiciones físicas establecidas en fotoperiodo (16h luz/8h oscuridad) a 25°C. Estos resultados permitieron realizar adecuadamente, el proceso de obtención de células en suspensión con el propósito de optimizar la cinética de crecimiento. La velocidad específica de crecimiento de los callos para la línea WT fue de $\mu=0.050 \text{ día}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 13.9 días, mientras que para la línea Z4 su velocidad específica de crecimiento fue de $\mu=0.030 \text{ día}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 23 días.

Con respecto a la viabilidad celular durante la cinética de crecimiento en los callos con la línea Z4 se observó que inició con el 96% de células vivas y entre los días 15 y 30 se incrementó al 100% su viabilidad. Para la línea WT se observó una viabilidad similar con un incremento del 100% entre los días 15 y 35 como se puede observar en la gráfica 2.



Gráfica 2. Porcentaje de células viables de callos durante la cinética de crecimiento con las líneas Z4 (en verde) y WT (en negro) de *Daucus carota*

En cuanto a la morfología celular de los cultivos en callos de las líneas Z4 y WT en el microscopio de epifluorescencia se observó la viabilidad celular como se muestran en la figura 12. Se observaron células redondas, alargadas, de superficie

lisa con agregados no morfogénicos pequeños de 0.5-1mm de diámetro (Fig. 12 b y d). Estas características relacionadas con el medio de cultivo han sido descritas y observadas en otras especies vegetales cultivadas *in vitro* (Curtis y Emery, 1993).

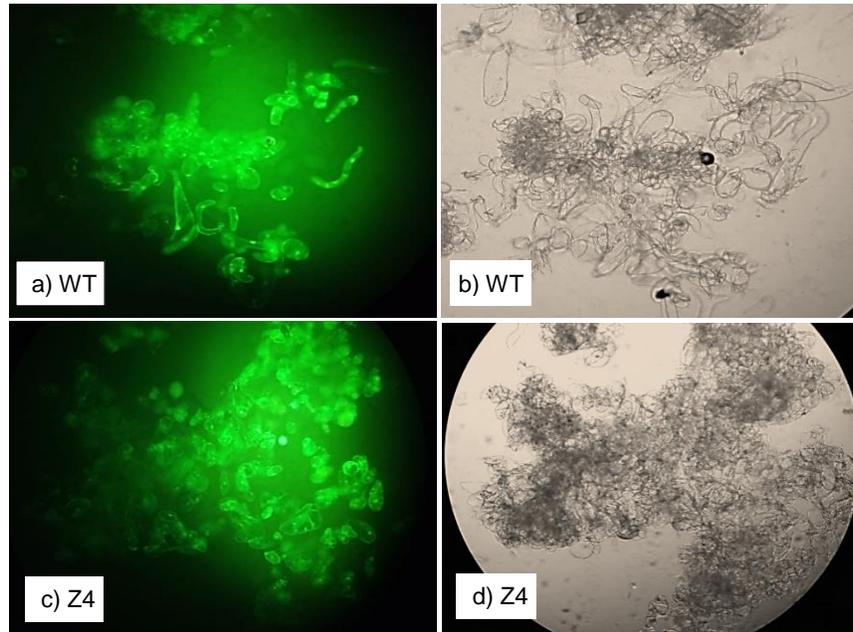
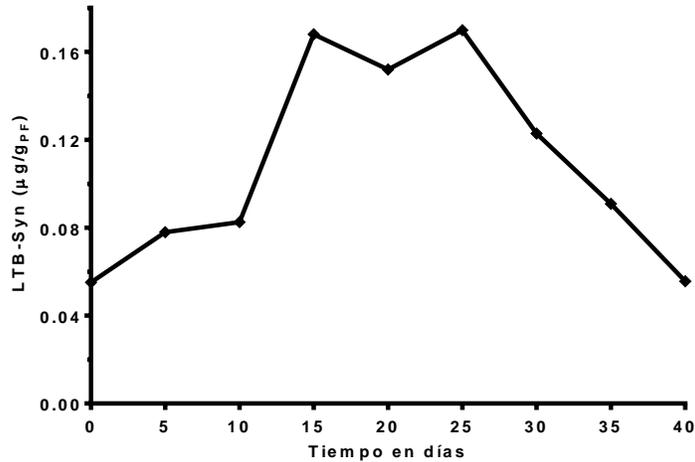


Figura 12. Morfología y viabilidad de callos con la técnica de fluoresceína de la línea Z4 y silvestre (WT) de *Daucus carota*., **a y c** campo oscuro 10X (fluorescencia), **b y d** campo claro 10X.

9.1.3 Cuantificación de LTB-syn en callos de la línea Z4 de *D. carota*

Un parámetro cinético importante de este proyecto fue determinar por la técnica de ELISA, cuánta proteína de interés se producía en callos de la línea transgénica Z4 de *D. carota*. En la gráfica 3 se puede observar el comportamiento en la producción de la proteína LTB-Syn con respecto al tiempo, donde entre los días 15 y 25 de la cinética se observó la mayor concentración con 0.167 μ g/gPF y 0.169 μ g/gPF, respectivamente. Después fue disminuyendo al final de la cinética hasta 0.055 μ g/gPF al día 40.



Gráfica 3. Producción de la proteína LTB-Syn en callos de la línea Z4 de *D. carota* en medio MS sólido

9.2 Establecimiento de células en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml

A partir de subcultivos de callos con 15 días de crecimiento de la línea transgénica Z4 de *D. carota* (Figura 13, a), se inició el establecimiento de cultivos en suspensión en matraces bafleados de 250 ml con 100 ml de medio MS líquido, lo cual permitió la disgregación de los callos y favoreció el crecimiento individual de las células (Figura 13, b y c). Después de 25 días se transfirieron los cultivos con células en suspensión disgregadas a matraces Erlenmeyer de 250 ml para obtener la biomasa requerida en la cinética de crecimiento (Figura 13, d).

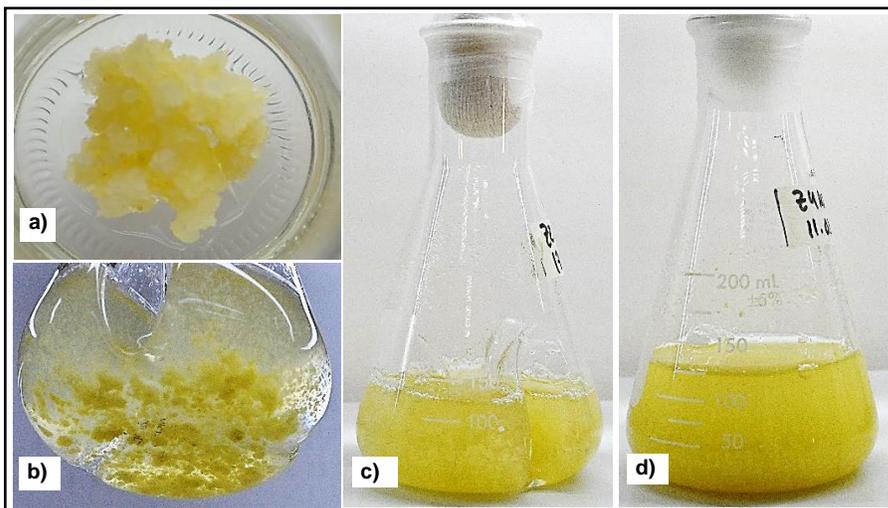


Figura 13. Establecimiento de células en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* en MS líquido; **a)** callo friable de la línea Z4, **b)** cultivo de 3 días, **c)** cultivo de 12 días y **d)** cultivo de 8 semanas.

9.2.1 Caracterización del cultivo en matraces de 250 ml

Se realizaron los estudios cinéticos de la línea transgénica Z4 en matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo MS adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa. En la figura 14 (a) se muestra el aspecto de un matraz recién inoculado al día 3 con 10g de biomasa fresca y después de 45 días de cultivo (Figura 14, b). Por el movimiento orbital de la agitadora, las células tienden a agruparse hacia el centro del matraz y forman agregados de distintos tamaños (0.5mm a >1cm) durante todos los días de cultivo (Figura 14, c). Estas acumulaciones en forma de agregados se conservaron hasta el final del cultivo generando estructuras tridimensionales complejas.

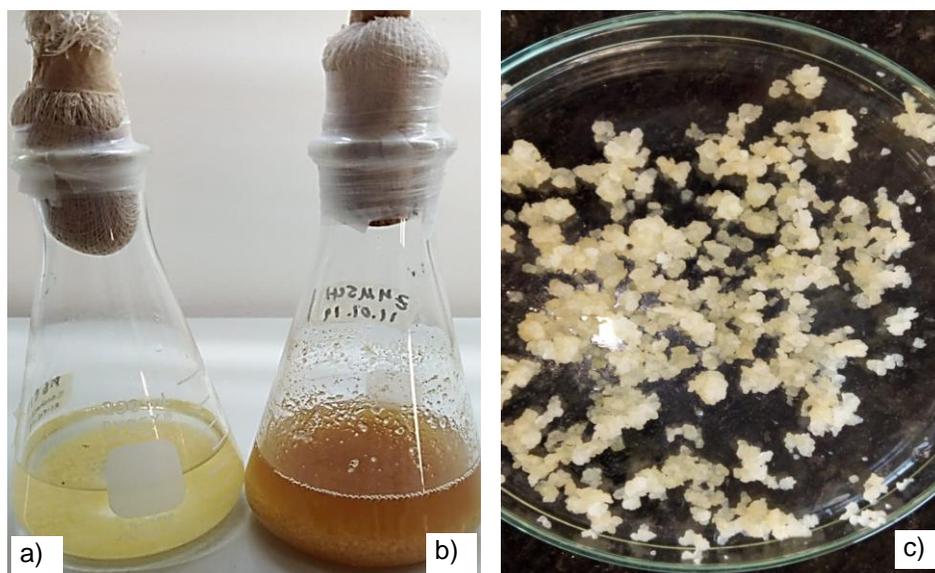
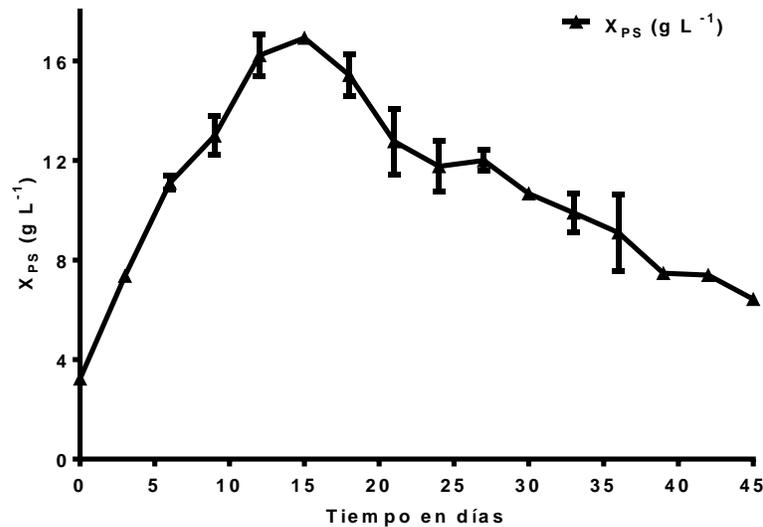


Figura 14. Cultivo de células en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml. **a)** matraz recién inoculado con 10g, **b)** matraz a los 45 días de cultivo y **c)** agregados celulares a los 20 días de cultivo.

9.2.3 Parámetros cinéticos de las células en suspensión en matraz de 250 ml

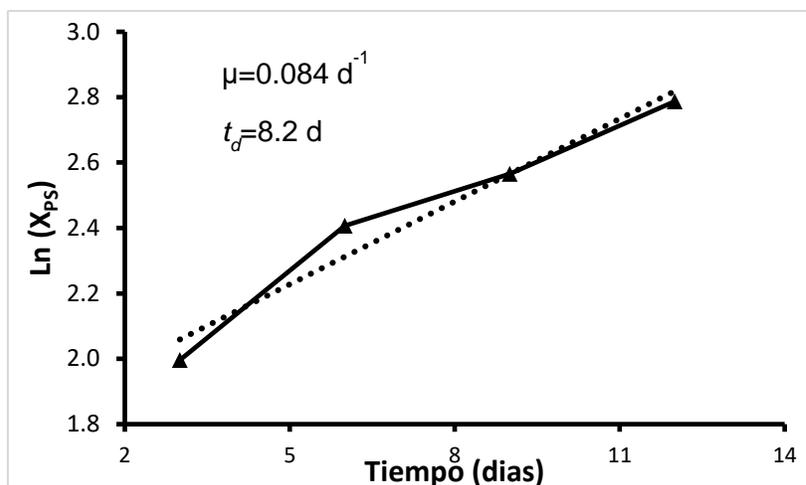
Uno de los objetivos de este proyecto fue establecer un cultivo de células en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* en medio MS como se describió en metodología. Después se inició la cinética de crecimiento en matraces Erlenmeyer

de 250 ml durante 45 días (15 puntos), con un inóculo del 10% y tres replicas por punto cada tres días (una muestra cada 72 horas). La curva de crecimiento no presentó una fase de adaptación (*lag*) quizá debido al origen del inóculo. La cinética mostró una fase de crecimiento exponencial que duró hasta el día 15 del cultivo. El valor máximo de biomasa fue de 16.93 g L⁻¹ PS, lo que representó un incremento de 5.2 veces el tamaño del inóculo inicial (gráfica 4).



Gráfica 4. Curva de crecimiento en peso seco de células en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml

Graficando los logaritmos de las concentraciones de biomasa en peso seco (X_{PS}) contra el tiempo (gráfica 5), se observa que el crecimiento de células en suspensión en matraz agitado de 250 ml siguió un comportamiento de primer orden, con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.084 d⁻¹ y un tiempo de duplicación (t_d) de 8.2 días, duró alrededor de 12 días, después declinó iniciando la fase estacionaria (a partir del día 18) y de muerte (a partir del día 30), como se muestra en la gráfica 4.

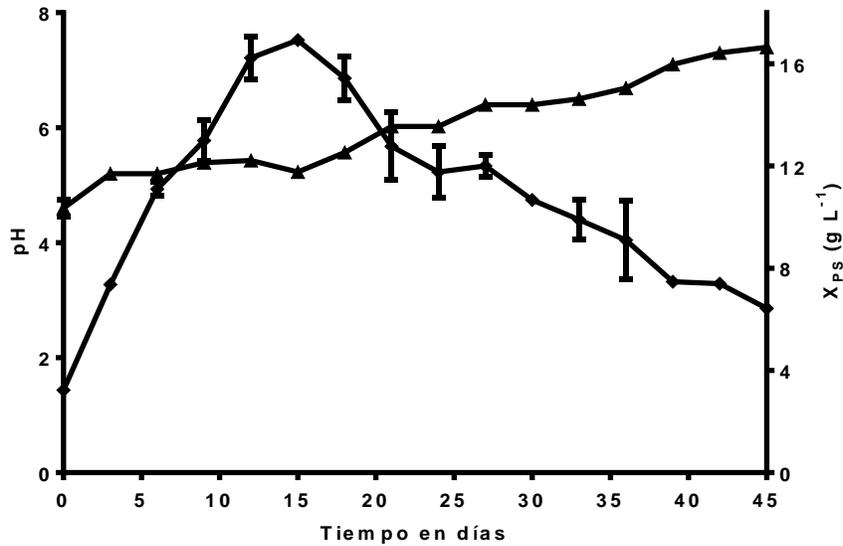


Gráfica 5. Ln [biomasa en peso seco] contra el tiempo; cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml

En los primeros 15 días las células en suspensión flotan en el medio líquido con un movimiento agitado uniforme. Después, entre los días 18 y 40, la biomasa se fue asentando en la base del matraz y cambiando de coloración hasta finalizar la cinética al día 45, esto debido probablemente a la muerte celular y a consecuencia del consumo de nutrientes en el medio de cultivo (Figura 14, b).

9.2.4 Estudio cinético del pH del medio de cultivo en matraz de 250 ml

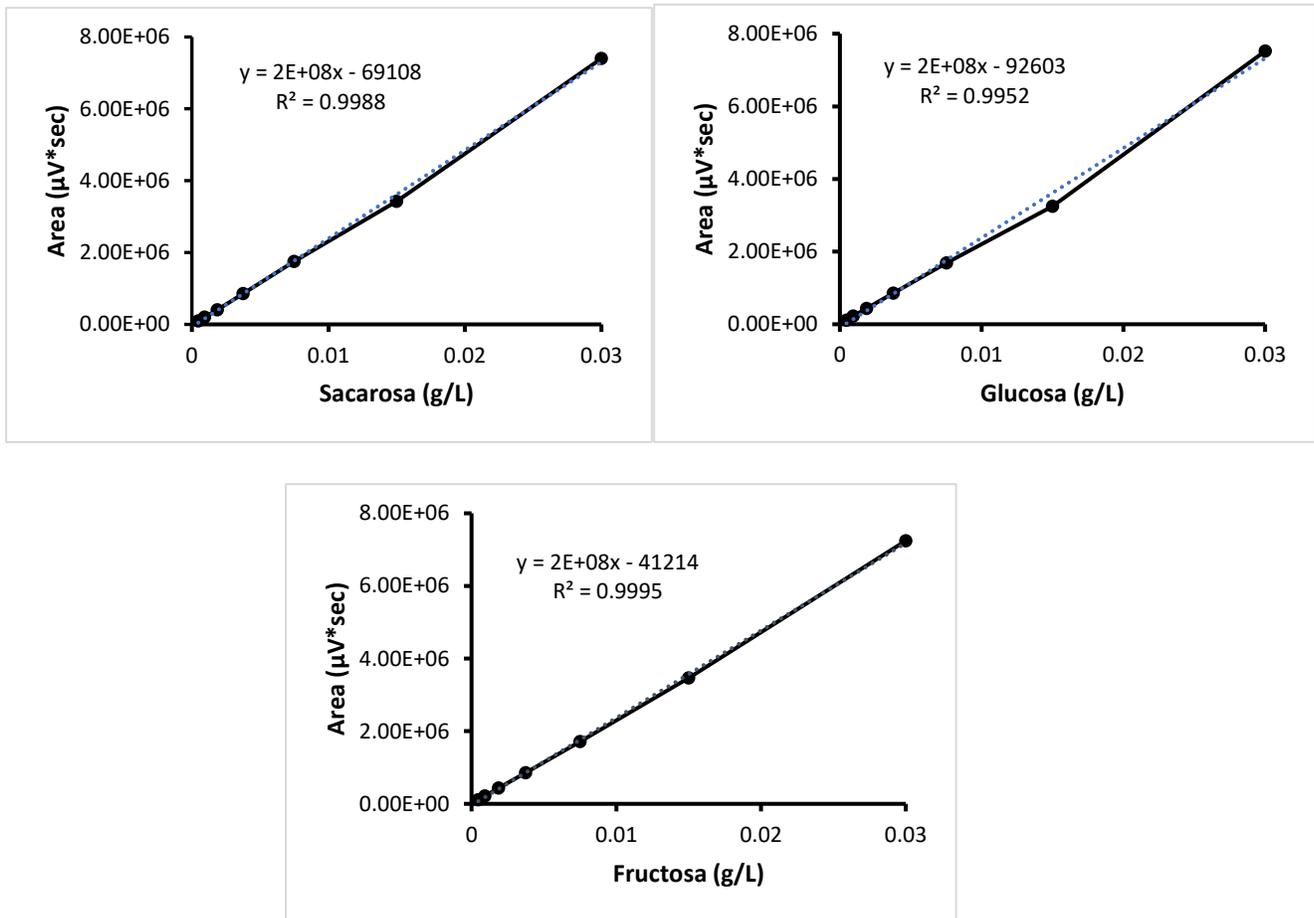
El pH juega un rol muy importante por lo que debe ser monitoreado, ya que su papel fundamental radica en evitar el rompimiento de las funciones de la membrana celular o la alteración del pH del citoplasma celular. En la gráfica 6 se muestran las curvas de la biomasa peso seco (X_{ps}) y pH contra tiempo a la largo del cultivo en matraz agitado. El pH del medio se ajustó a 5.7 antes de autoclavar, pero, durante la fase de corta de adaptación el pH bajó a 4.9, mientras que en la fase de crecimiento exponencial se registraron valores de 5.3 al día 15 del cultivo, probablemente debido al consumo de nitrógeno. Al día 18 la biomasa empezó a descender, después de ese día el pH aumentó para permanecer entre 6.5-7.4 desde el día 20 al día 45. Este incremento podría ser debido al consumo de nitratos durante la fase inicial como fuente de nitrógeno.



Gráfica 6. Curva de crecimiento en peso seco y comportamiento de pH de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml.

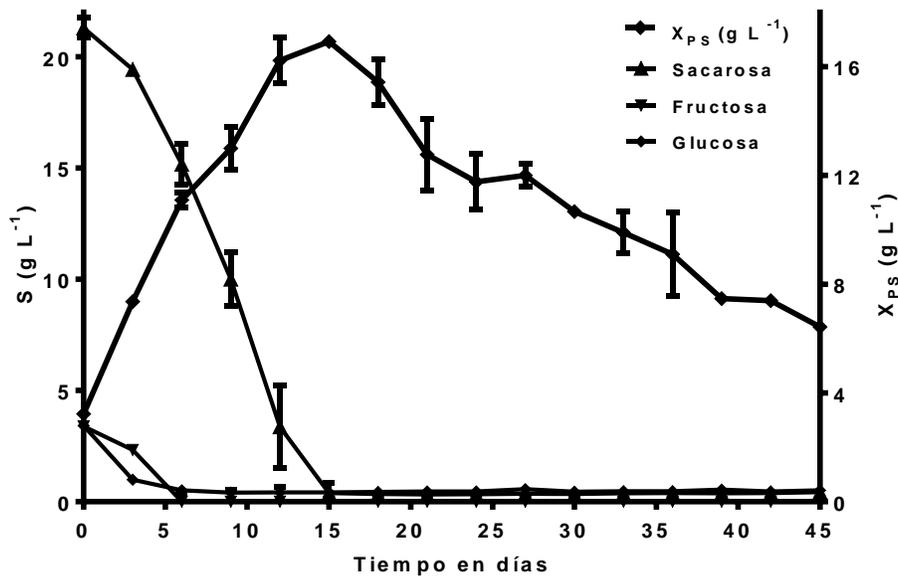
9.2.5 Estudio cinético del consumo de azúcares en matraz de 250 ml

Se realizó el análisis del consumo de azúcares para determinar su comportamiento durante la cinética de crecimiento. Se utilizaron los estándares sacarosa, glucosa y fructosa y se obtuvieron curvas de calibración (Gráfica 7). Se determinó el tiempo de retención (TR) de cada uno de los azúcares analizados, sacarosa (TR: 9.0 min), glucosa (TR: 6.5 min) y fructosa (TR: 5.0 min). Con estos datos se determinó el patrón de consumo de azúcares mediante la cuantificación de sus concentraciones durante los 45 días de crecimiento.



Gráfica 7. Curvas de calibración para azúcares, a) sacarosa, b) glucosa, c) fructosa

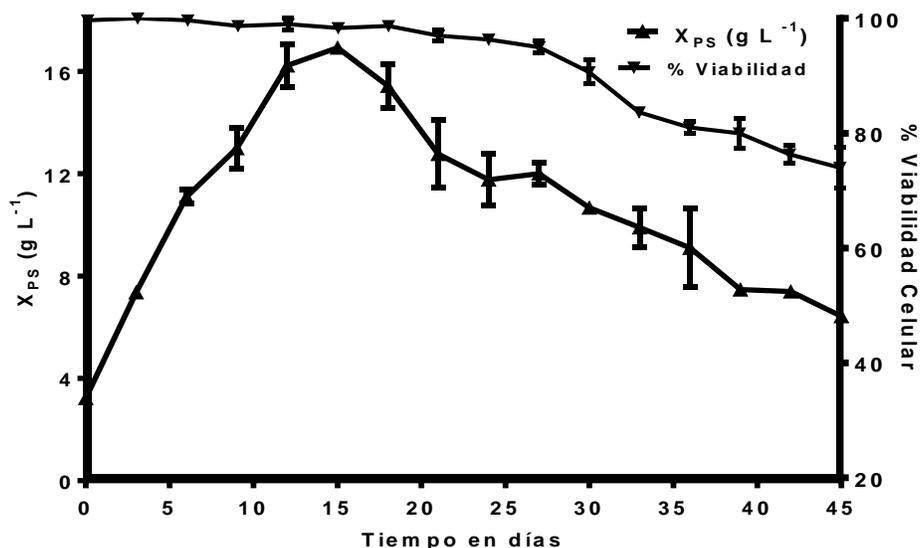
En el cultivo se utilizó como fuente principal de carbono la sacarosa, con una concentración inicial en el medio de cultivo fue de 30 g L^{-1} . El proceso enzimático de hidrolisis se inició desde los primeros días del cultivo y se hidrolizó completamente al día 15 del cultivo, tiempo que corresponde con la máxima producción de biomasa (16.93 g L^{-1} PS). Sin embargo, a pesar de la presencia de fructosa y glucosa estos carbohidratos fueron metabolizados rápidamente durante los primeros 6 días de cultivo (gráfica 8). La acumulación de biomasa seca estuvo estrechamente relacionada con la concentración de carbohidratos en el medio, con el inicio de la reducción de la biomasa seca coincidiendo con la eliminación completa de los carbohidratos totales del medio.



Gráfica 8. Curva de crecimiento en peso seco y consumo de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml.

9.2.6 Viabilidad celular de células en suspensión en matraz de 250 ml

La viabilidad celular es importante para la optimización de los cultivos en suspensión, pues confirma la integridad de las células y corroborara que se mantengan viables durante la cinética de crecimiento. Al visualizar en el microscopio de fluorescencia las células en suspensión de la línea Z4 de *D. carota*, se pudo observar que el cultivo inicio con un 98% de células viables, y a partir del día 10 el 100% de viabilidad que se mantiene hasta el día 25. En el día 28 fue cuando comenzó a decaer hasta un 25% al día 45 (gráfica 9).



Gráfica 9. Curva de crecimiento en peso seco y porcentaje de viabilidad de células en suspensión del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml.

Así mismo, se determinó que las células en suspensión forman agregados pequeños, de 10 a 20 células aproximadamente en la etapa inicial, aunque también fue posible visualizar células redondeadas individuales en suspensión (Figura 15 al día 0). En la fase exponencial, se observaron células redondas y alargadas formando agregados de más de 100 células (Figura 15, día 15). En la etapa de muerte, que se inició a partir del día 30 de cultivo, las células presentaron pérdida de la integridad de la membrana celular, por lo que se muestran deformes (Figura 15, día 45). Esta viabilidad celular descendió a la par que la biomasa (X_{PS}), lo que indica el deceso del cultivo, exactamente al día 40 la fluorescencia disminuyó al 78% (Figura 15, día 42) y finalmente al día 45 se observó solo el 40%, lo que representa la muerte celular (gráfica 9). Con la muerte celular se detienen los procesos biológicos de las células, provocando cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles que les impiden realizar sus funciones vitales. Por esta razón, las células dejan de dividirse y al morir liberan su contenido citoplasmático, lo que coincide con una disminución en el peso fresco y seco del cultivo (Sánchez, 2001).

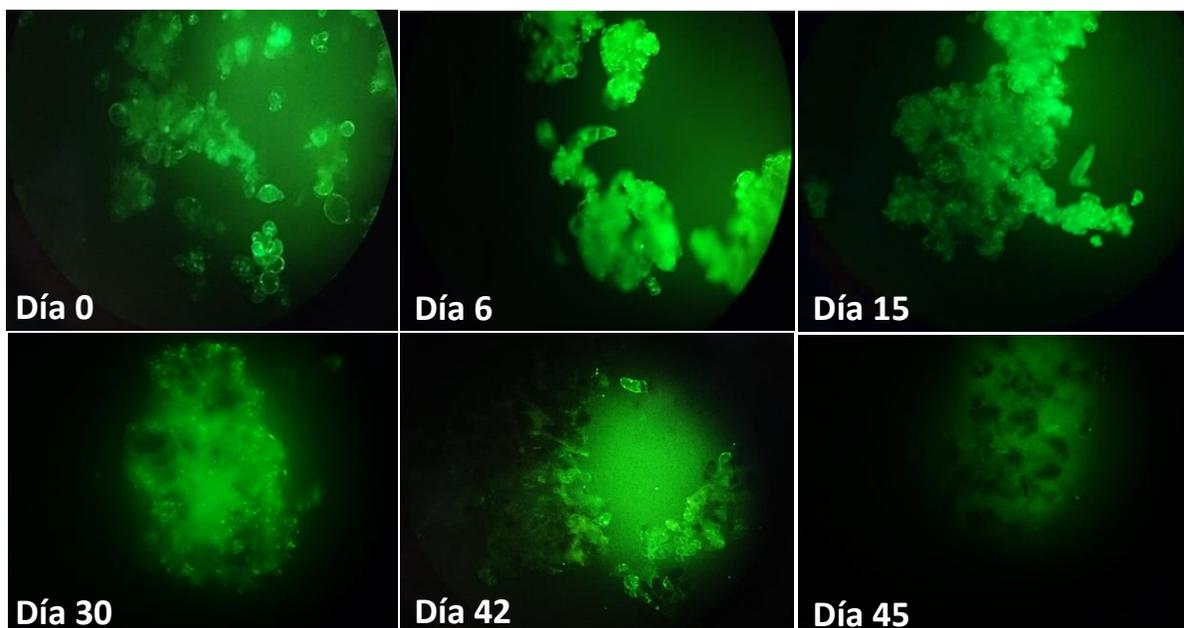
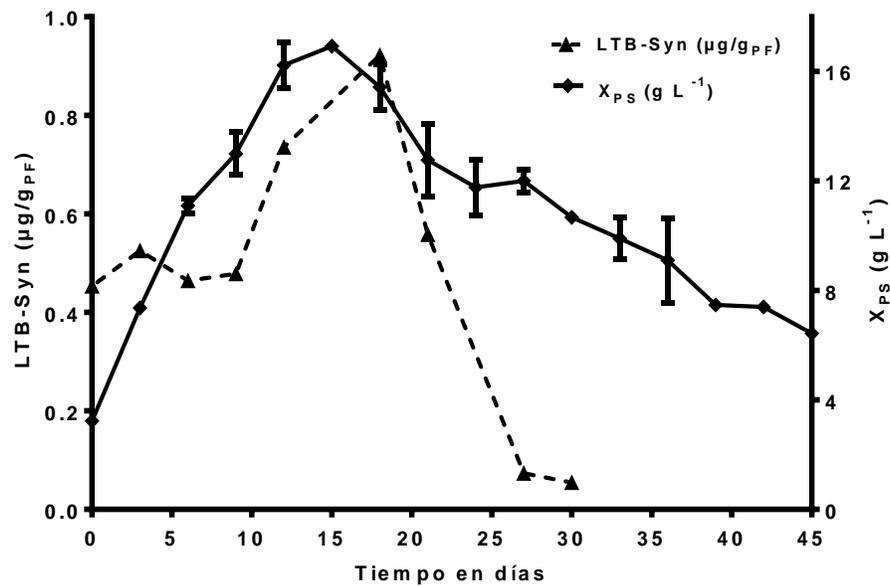


Figura 15. Visualización de células en suspensión con la técnica de fluoresceína de la línea Z4 de *D. carota* en diferentes días de la cinética en matraz agitado de 250 ml (Objetivo 10X).

9.2.7 Cuantificación de proteína LTB-syn en matraz agitado de 250 ml

Uno de los objetivos de este proyecto fue cuantificar la producción de la proteína LTB-Syn de la línea Z4 evaluada con la técnica de ELISA durante la cinética de crecimiento por 45 días en los matraces de 250 ml. En la gráfica 10 se observa que la producción de proteína está relacionada con el crecimiento celular, pues fue incrementado conforme la biomasa aumentaba a partir del día 10 y se obtuvo una máxima producción de proteína (0.922 $\mu\text{g/gPF}$) al día 18 de cultivo, lo cual representa un incremento de 2 veces respecto al día 0 (0.453 $\mu\text{g/gPF}$) y de 5.4 veces respecto a la producción de esta en callos.



Gráfica 10. Curva de crecimiento en peso seco y producción de la proteína LTB-Syn del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml.

9.3 Cultivo de células en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* en biorreactor *air-lift* de 2L

A partir del diseño básico del biorreactor *air-lift* de 2L, se ensayaron dos adecuaciones, en las cuales se buscaron las mejores condiciones para el escalamiento exitoso de los cultivos obtenidos en matraz.

9.3.1 Diseño básico y operación

Diversos autores han reportado con resultados variables, el uso de biorreactores tipo *air-lift* con diseños básicos para el cultivo de células transformadas en suspensión (Ranjbar *et al.*, 2008, Thanh *et al.*, 2014). Antes de realizar cambios en el biorreactor *air-lift* de 2L, se realizó un primer cultivo de 30 días, utilizando un volumen de operación de 1.8L (80% del volumen nominal) con una $X_0 = 180\text{g}$, operado a 1.0vvm, temperatura constante, sin control de pH. Para

su inoculación se utilizó una bomba peristáltica como se indica en materiales y métodos. En principio, el método de inoculación resultó impráctico porque se requería un tiempo considerable (1 a 2h) para realizar la operación ya que las células formaron agregados y esto ocasionaba que se tapara la manguera que alimenta al reactor, con lo cual el riesgo de contaminación fue alto.

9.3.2 Inoculación con tubos de vidrio al biorreactor *air-lift* 2L

En un segundo cultivo en el biorreactor, la estrategia planteada consistió en utilizar un tubo de vidrio de 1.5cm de diámetro, conectado a una entrada de la tapa del biorreactor por una manguera de silicón. La inoculación se realizó a un flujo de aire de 0.5 vvm, mediante descargas de 50g de células en suspensión previamente filtradas en 500 ml de medio de cultivo, con una manguera de longitud adecuada que sirvió de conexión entre la probeta y el biorreactor (figura 16, a).

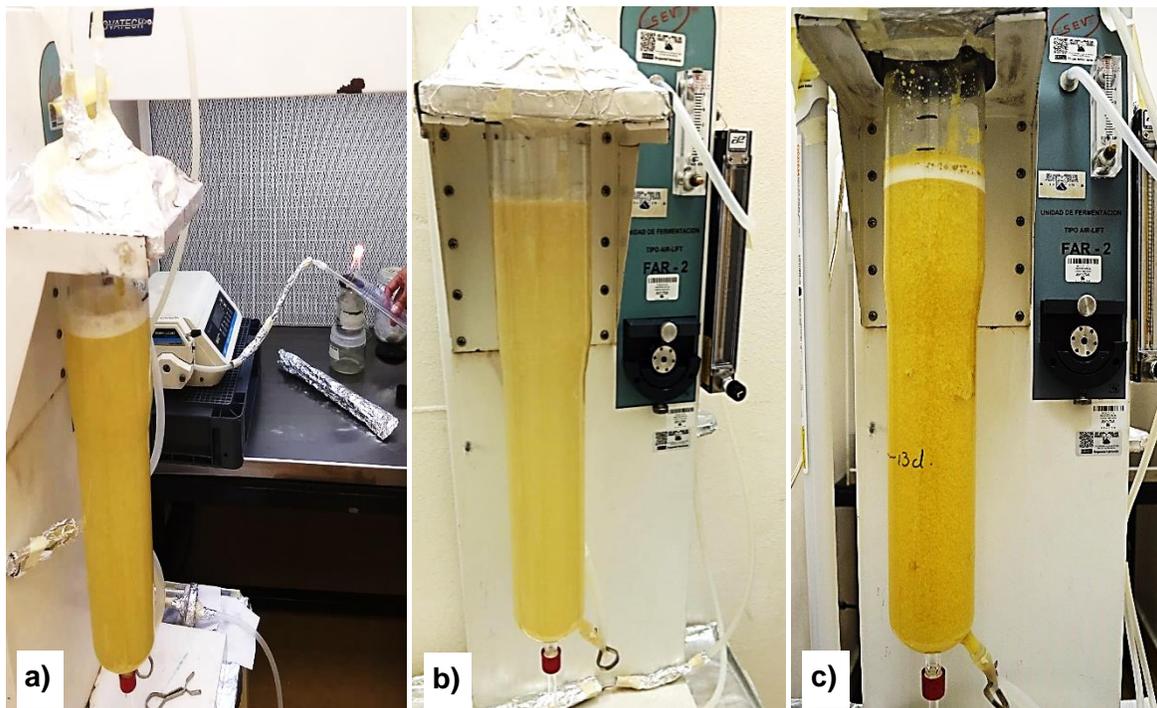
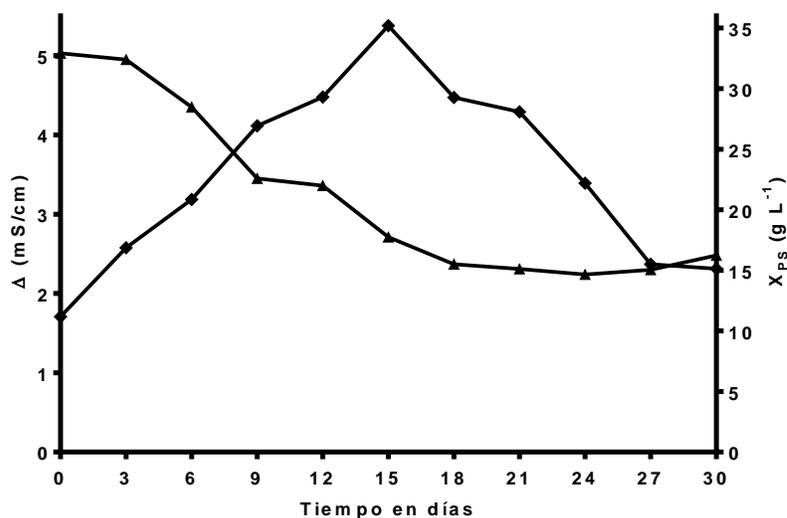


Figura 16. Cultivo de células en suspensión de *D. carota* en el biorreactor *air-lift* de 2L. **a)** inoculación del biorreactor con descargas de 50g de células en suspensión recién filtradas; **b)** biorreactor al día 0 y **c)** biorreactor a los 15 días de cultivo.

Esta metodología de inoculación resultó muy práctica porque no se taponaba la manguera y se podía trabajar muy cerca del mechero mejorando las condiciones de esterilidad, con cortos periodos de inoculación (30min). En la figura 16, se muestra el biorreactor *air-lift* recién inoculado (b) y a los 15 días de cultivo (c).

9.3.3 Estudio cinético de incremento de biomasa medido por conductividad en biorreactor *air-lift* de 2L

La dificultad para registrar la acumulación de biomasa en cultivos vegetales en biorreactores se ha resuelto analizando la relación inversa entre la conductividad y el incremento de la biomasa (Peraza-Luna *et al.*, 2001). Las células en suspensión de *D. carota* tienden a agregarse y tomar una muestra de biomasa es difícil, por lo que se tomó un modelo de información indirecta precisa sobre la concentración de la biomasa en el biorreactor. Este método indirecto consistió en mediciones de conductividad del medio de cultivo (Δ) cada tercer día, como se muestra en la gráfica 11.

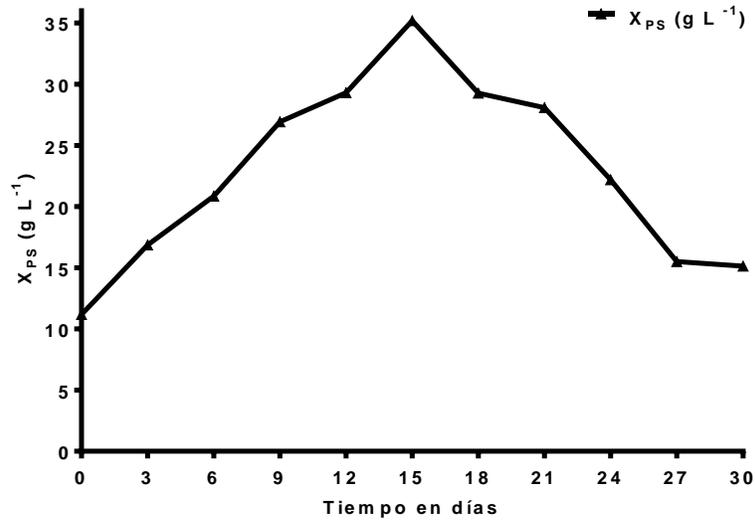


Gráfica 11. Curva de crecimiento en peso seco y conductividad del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en biorreactor *air-lift* de 2L.

La conductividad en el medio de cultivo es generada por la concentración de los iones con capacidad de acarrear electrones. En la gráfica 11 se observa que a medida que la biomasa aumenta, la Δ disminuye siguiendo una tendencia inversa, lo cual resulta del consumo de electrolitos del medio de cultivo que hace que el potencial electrolítico (conductancia) disminuya junto con la Δ . También se observó que durante la fase lineal del cultivo se generó el mayor cambio en la conductividad variando significativamente de 5.0 a 2.7 mS/cm. Mientras que en la fase estacionaria el cambio no es significativo (en promedio de 2.3 a 2.5 mS/cm).

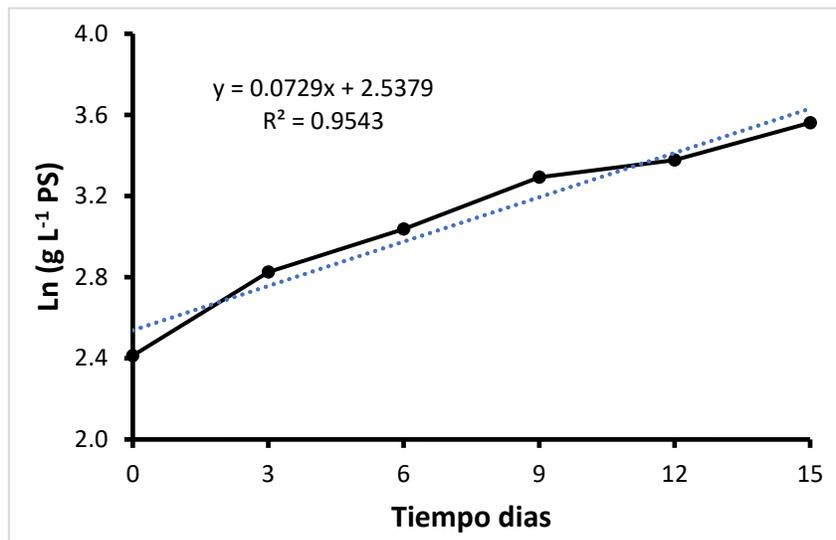
9.3.4 Parámetros cinéticos de la línea Z4 en el biorreactor *air-lift* de 2L

Se graficó la biomasa (X_{PS}) contra el tiempo (gráfica 12), donde se pudo observar que el cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en el biorreactor no presenta una fase de adaptación (*lag*), que puede deberse al estado fisiológico del inóculo pues se encontraba en fase de crecimiento exponencial. En esta fase, las células presentan su capacidad máxima de crecimiento, adaptándose fácilmente a las condiciones que apremia el cambio a un medio de cultivo fresco y rico en nutrientes. El cultivo presentó una fase de crecimiento exponencial de 15 días que fue del día 0 al 15, una fase estacionaria y muerte del día 15 al 30. Al final de la fase exponencial (día 15) se alcanza el mayor punto de producción de biomasa ($35 \text{ g L}^{-1} \text{ PS}$), lo que representó 3.1 veces el tamaño del inóculo inicial. Cabe destacar el PS obtenido es 2.8 veces más que en matraz ($16.93 \text{ g L}^{-1} \text{ PS}$) y se obtuvo en un lapso más corto (15 días) en lugar de 18 días (matraz). Esto puede deberse probablemente a un menor estrés de agitación que genera condiciones más adecuadas para la transferencia de nutrientes y oxígeno disuelto.



Gráfica 12. Curva de crecimiento en peso seco del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en biorreactor *air-lift* de 2L

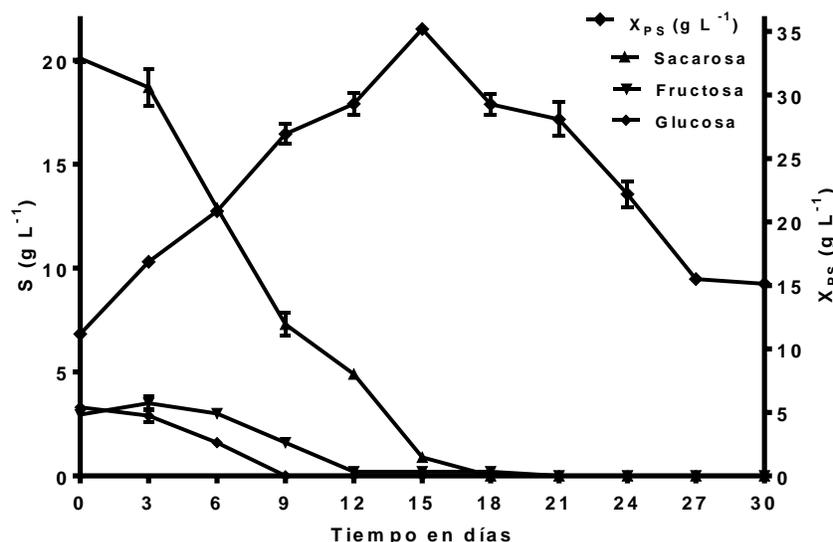
En la gráfica 13 se muestran los datos de la fase de crecimiento exponencial del biorreactor *air-lift* de 2L, los cuales se ajustaron a una línea de tendencia exponencial. Con dichos datos se obtuvo una μ de 0.0729 d^{-1} y un t_d de 9 días.



Gráfica 13. Ln de biomasa [X_{PS}] contra el tiempo de la línea Z4 de *D. carota* en biorreactor *air-lift* de 2L

9.3.5 Estudio cinético del consumo de azúcares en biorreactor *air-lift* de 2L

Se determinó el patrón de consumo de azúcares mediante la cuantificación de las concentraciones de azúcares totales durante 30 días. En la gráfica 14 se muestran las curvas de crecimiento en peso seco y consumo de sacarosa, fructosa y glucosa durante la cinética en biorreactor *air-lift* de 2L. Se observó que la sacarosa fue hidrolizada completamente en el día 18, mientras que el consumo de la glucosa se presentó al día 9, y la fructosa permaneció hasta el día 12 del cultivo.

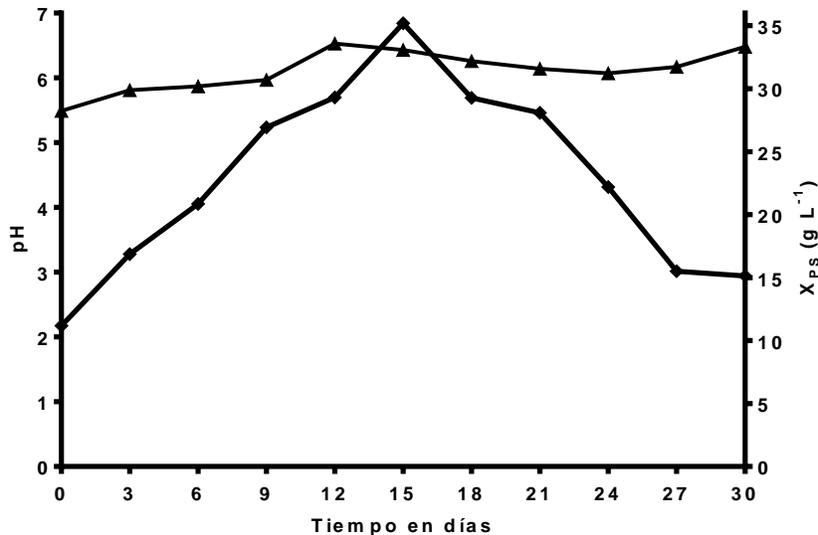


Gráfica 14. Curva de crecimiento en peso seco y consumo de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en biorreactor *air-lift* de 2L.

9.3.6 Estudio cinético del pH del medio de cultivo en biorreactor *air-lift* de 2L

Los tejidos vegetales tienden a acidificar ligeramente el medio de cultivo en las primeras horas. Esto ocurre por la asimilación del amonio que provoca que baje el pH, posteriormente cuando los nitratos son consumidos, el pH se incrementa manteniéndose en un valor cercano al inicial. En la gráfica 15, se muestran los datos

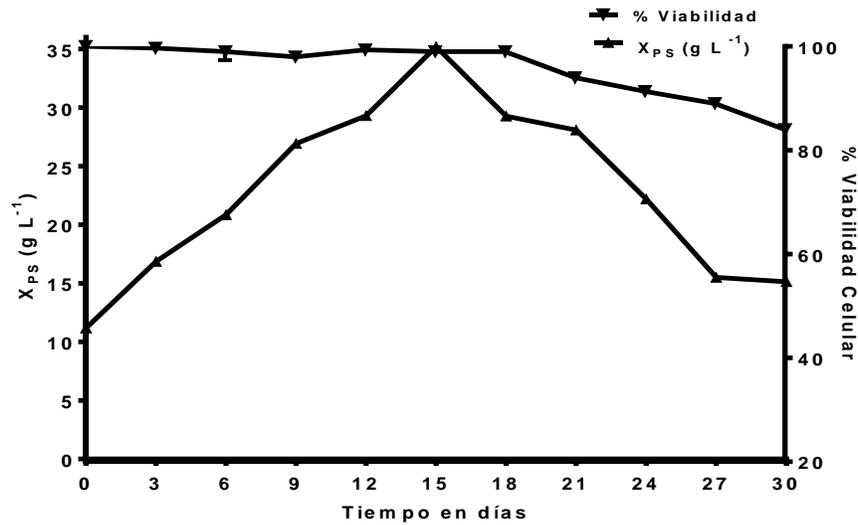
de la X_{PS} en función de las variaciones de pH respecto al tiempo. El pH disminuyó muy poco al inicio del cultivo durante los primeros 10 días (5.5) y fue aumentando conforme los días de cultivo pasaban, para permanecer entre 6.4 y 6.6 desde el día 15 al 30.



Gráfica 15. Curva de crecimiento en peso seco y comportamiento de pH del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en biorreactor *air-lift* de 2L

9.3.7 Viabilidad celular en biorreactor *air-lift* de 2L

En cuanto al análisis microscópico el cultivo presentó una viabilidad celular similar a la que se dio en el cultivo en matraz agitado de 250 ml. El cultivo en biorreactor *air-lift* inició con una viabilidad del 98% la cual subió durante la fase exponencial, para alcanzar su valor máximo al día 18 (100%), cuando comenzó a decaer en un 15% al día 30 (gráfica 16). Sin embargo, no se alcanzaron a observar valores bajos de viabilidad, debido a que el tiempo de cinética fue corto (30 días). En posteriores cinéticas podría plantearse el uso de un cultivo alimentado, para mantener la producción de biomasa durante periodos de tiempo prolongados.



Gráfica 16. Curva de crecimiento en peso seco y porcentaje de viabilidad del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en biorreactor *air-lift* de 2L.

Las células cultivadas en el biorreactor *air-lift* de 2L tienden a formar agregados celulares y presentan una morfología heterogénea al igual que en los cultivos en matraz agitado de 250 ml. Se observaron células alargadas y otras redondas, en su mayoría viables, y brillantes en el microscopio de fluorescencia. Se pudo observar la presencia de células individuales en suspensión (figura 17, día 0), mientras que en la fase exponencial del crecimiento se comenzaron a formar agregados celulares esféricos y alargados, de superficie lisa, cohesivos y con diferenciación celular o tisular (figura 17, día 15). En la fase de muerte que inicio a partir del día 24 las células presentaron pérdida de su integridad membranal, lo cual se reflejó en un decaimiento de la viabilidad coincidiendo con la disminución del peso seco del cultivo (figura 17, día 30).

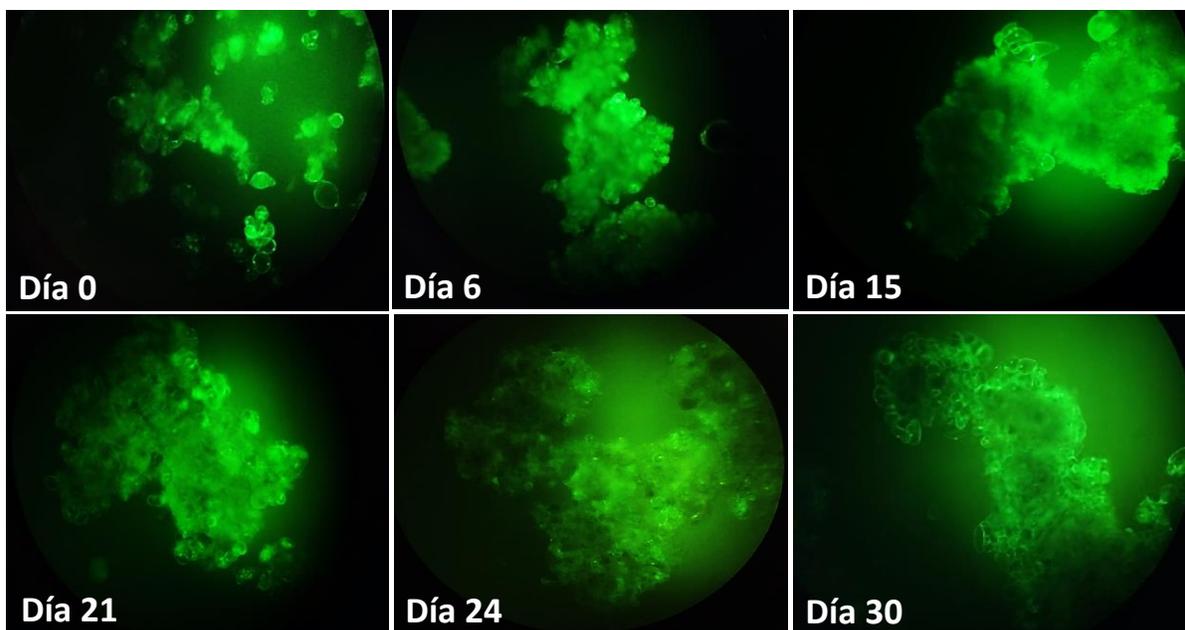
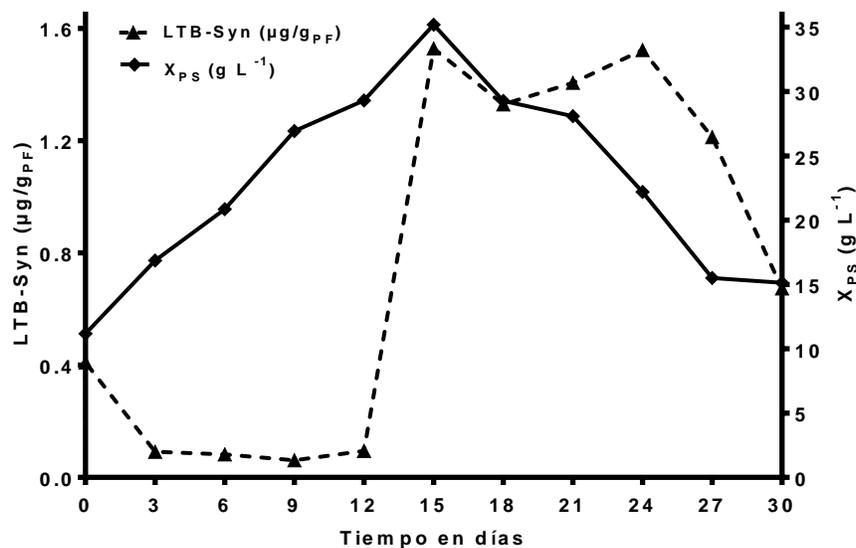


Figura 17. Visualización de células en suspensión con la técnica de fluoresceína de la línea Z4 de *D. carota* en diferentes días de la cinética de crecimiento en biorreactor *air-lift* de 2L (Objetivo 10X).

9.3.8 Cuantificación de proteína LTB-Syn en biorreactor *air-lift* de 2L

En la gráfica 17 se muestra la producción de la proteína LTB-Syn de la línea Z4 de *D. carota* en el biorreactor *air-lift* de 2L evaluada con la técnica de ELISA durante la cinética de 30 días. La curva de producción de la proteína LTB-Syn tuvo una tendencia similar a la observada en matraz agitado de 250 ml. En esta cinética se observó que la proteína LTB-Syn incrementó en la fase de crecimiento exponencial, obteniendo una máxima producción al día 15 de $1.52\mu\text{g/g PF}$, esto se traduce en un incremento de 1.6 veces con relación al matraz agitado de 250 ml ($0.922\mu\text{g/g PF}$) y 8.9 veces con relación al cultivo de callos ($0.53\mu\text{g/g PS}$).



Gráfica 17. Curva de crecimiento en peso seco y producción de proteína LTB-Syn del cultivo de la línea Z4 de *D. carota* en biorreactor *air-lift* de 2L.

En la tabla 6 se muestran los parámetros cinéticos de la línea Z4 de *D. carota* en matraz agitado de 250 ml y biorreactor *air-lift* de 2L, como son índice de crecimiento, rendimiento de producto, rendimiento de biomasa y productividad.

Sistema	Biomasa (g _{PS} L ⁻¹)		μ (d ⁻¹)	Td (días)	IC ^a	Y _{X/S} ^b (gX/gS)	Y _{P/S} ^c (gP/gS)	Productividad (gP/gX d ⁻¹)
Matraz 250ml	X ₀	3.23	0.084	8.2	3.2	0.45	0.02	0.0029
	X _{max}	16.93						
Biorreactor air-lift 2L	X ₀	11.17	0.072	9.5	2.6	0.80	0.04	0.0034
	X _{max}	35.2						

Tabla 6. Parámetros de crecimiento y producción de la línea Z4 de *D. carota* en los cultivos en matraz y biorreactor *air-lift*. Índice de crecimiento^a, Rendimiento de biomasa^b, rendimiento de producto^c.

Analizando los datos de la tabla 6, el cultivo de la línea Z4 en biorreactor *air-lift* de 2L, tuvo un rendimiento de biomasa, un rendimiento de producto y una productividad mayor que el cultivo en matraz agitado de 250 ml. No obstante, en trabajos futuros sería importante realizar variaciones en el formato del proceso para incrementar la

producción de la proteína quimérica LTB-Syn, como puede ser un cultivo alimentado, de tal manera que se incremente la producción de biomasa y por ende la producción de la proteína de interés.

9.3.9 Caracterización de la dispersión del aire en el biorreactor *air-lift* de 2L

La aspersión de aire provee la fuerza motriz para el transporte de materia y energía dentro de un biorreactor hidrodinámico. El biorreactor *air-lift* de vidrio permite la observación cualitativa del fenómeno de dispersión de gas a varias concentraciones de células. En los primeros días de cultivo (entre 1 y 5 días), las burbujas de aire a la entrada no encontraron ninguna obstrucción a su paso por el *draft*, observándose una dinámica en la dispersión de la fase gaseosa, similar a la del biorreactor sin inocular, por lo que al *gas-holdup* total se mantuvo estable.

Esta dinámica no duro mucho, porque al iniciar el crecimiento de las células al interior del *draft*, las dispersiones comenzaron a coalescer y canalizarse (transportarse por espacios libres de crecimiento con caminos tortuosos), y en la segunda etapa del cultivo (entre 5 y 15 días), se observó un aumento en la agregación celular. El patrón que exhibió esta agregación está relacionado al crecimiento del cultivo que se encontraba en la fase exponencial, mientras que en la tercera etapa del cultivo (15-30 días), en la que el incremento de la X_{PS} no fue considerable, comparado con la segunda etapa. En esta última etapa, la coalescencia y canalización de la dispersión del gas, se observó con mayor intensidad, expresándose en la caída del crecimiento hasta el día 27.

9.3.10 Detección de la proteína LTB-Syn por Western blot

La presencia de la proteína quimérica LTB-Syn de la línea Z4 de *D. carota* en los cultivos en suspensión se evaluó mediante el análisis de inmunotransferencia por Western blot a partir de la extracción de proteínas totales de tejido fresco (200mg). Los resultados confirmaron la presencia de la proteína quimérica con el peso molecular esperado de aproximadamente 21kDa en los distintos días de la cinética de crecimiento en matraz y biorreactor (figura 18).

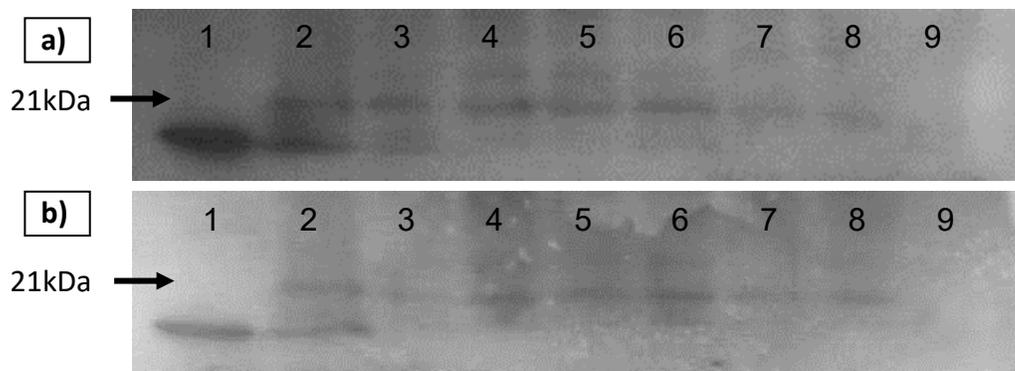


Figura 18. Detección de la proteína LTB-Syn por Western blot en matraz y biorreactor. Los extractos de proteínas solubles totales se resolvieron mediante SDS-PAGE y se sometieron a inmunodetección con suero anti-CT. (1) control negativo anti-CT, (2) control positivo clona Z4, (a) cinética en matraz: (3) día 9, (4) día 12, (5) día 15, (6) día 27, (7) día 42, (8) día 45, (b) cinética en biorreactor: (3) día 9, (4) día 12, (5) día 15, (6) día 21, (7) día 27, (8) día 30 y (9) línea WT en ambos geles.

9.3.11 Detección del transgén de las líneas Z4 y WT de *D. carota*

Después de la extracción del DNA nuclear, se procedió a evaluar si la línea Z4 crecida en matraz y biorreactor seguía siendo transgénica. Esto se realizó mediante la técnica de PCR con cebadores específicos para el transgene *LTB-Syn* esperando la presencia de bandas de 737pb. Se observaron bandas en la cinética de matraz al día 0 (carril 4) y día 21 (carril 7), mientras que de la cinética en biorreactor se

observaron bandas al día 0 (carril 9), día 15 (carril 11) y día 27 (carril 13), la muestra de ADN de la línea WT no mostró amplificación (figura 19).

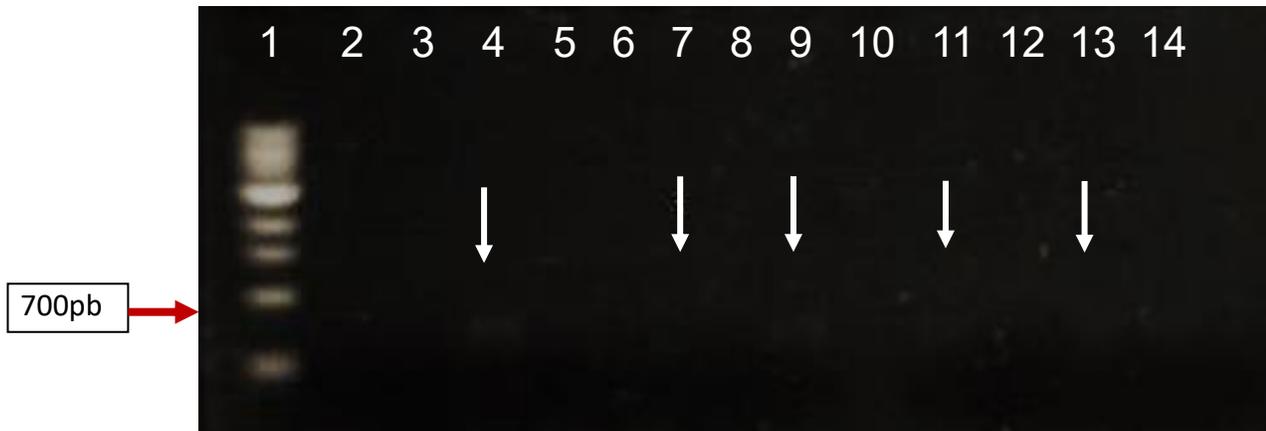


Figura 19. Análisis en gel de agarosa de la amplificación del gen LTB-Syn por PCR de cinética en matraz y biorreactor. **(1)** marcador PM 1kb (invitrogen); **(2)**: control positivo (clona confirmada Z4), **(3)** control negativo reactivos, **(4 a 8)** muestras de matraz, **(9 a 13)** muestras de biorreactor y **(14)** línea WT. Flechas blancas indican amplificación exitosa.

X. DISCUSIÓN

10.1 Establecimiento de callos de la línea Z4 y WT de *Daucus carota*

Para lograr establecer cultivos desdiferenciados de callos friables de *D. carota* transformada genéticamente (línea Z4) y línea silvestre (WT) en se utilizaron los fitorreguladores de crecimiento (2,4-D y cinetina), lo que permitió establecer un cultivo friable capaz de producir la proteína de interés. Se ha reportado la capacidad de generar el desarrollo de células desdiferenciadas utilizando el 2,4-D (Alvarenga *et al.*, 2002). Shiram *et al.* 2008, señalan que a altas concentraciones de auxina o citoquininas se estimula la producción de la desdiferenciación celular generando los cultivos llamados (callo celulares) y que está relacionado al tipo de hormona y concentración utilizada durante su inducción. Así mismo; la presencia de las auxinas en los cultivos de callos podría estar relacionada con la capacidad de estimular la división celular e influir en la regulación del ciclo celular, estimulando notablemente la expresión de ciclinas a nivel transcripcional, por ejemplo, las de tipo D, desencadenando la activación de las quinasas necesarias para la etapa G1 del ciclo celular (Arellano *et al.*, 2008). En la etapa G1, período en el que las células crecen y acumulan nutrientes, se ha reportado que las auxinas y las citocininas inducen la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular (Jurado, 2010). Por otra parte, se ha reportado que el 2,4-D es la auxina más efectiva para la proliferación de callos, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (George, 2008). En estas últimas, las concentraciones de mayor uso de este compuesto se encuentran generalmente en el rango de 1.1 mg/L a los 3.3 mg/L (Machakova *et al.*, 2008). En este trabajo se establecieron los cultivos con 2 mg/L de 2,4-D y cinetina respectivamente.

10.2 Cinética de callos de la línea Z4 y WT de *Daucus carota*

En la cinética de crecimiento celular de *D. carota* se observa una fase *lag* larga de 15 a 20 días para ambas líneas (Z4 y WT). Los cultivos de callos son de crecimiento lento y heterogéneo, debido principalmente a la disponibilidad vectorial

de los nutrientes. Después de la fase de adaptación se inició la fase de crecimiento exponencial, en la que, como era de esperar, se observaron los valores máximos de peso fresco a los 20 días de cultivo (4.2g para la línea Z4 y 5.2g para la línea WT, respectivamente). Esto indicaba que a partir del día 15 se presentó el momento conveniente para subcultivar. Por otro lado, el mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares son callos friables, formados por células indiferenciadas y con baja cohesividad entre ellas; se sabe que, para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos cortos (según la especie de 30-45 días) (Gómez *et al.*, 2006). Esto permite disminuir el tiempo de exposición a reguladores de crecimiento y por tanto a los riesgos de variación somaclonal. Con respecto a la viabilidad celular para ambas líneas, ésta se mantuvo en 100% hasta el día 35.

En cuanto a la concentración de la proteína LTB-Syn, esta fue más alta a partir de los 15 días en la cinética con callos, lo cual tiene relación con el crecimiento exponencial observado en los callos, aunque esta concentración aún se encontraba baja en comparación con lo reportado previamente por Arévalo-Villalobos *et al.*, en 2017. En este contexto se han reportado bajos niveles de expresión de proteínas (en antígenos) en especies de plantas transgénicas (Ceballo *et al.*, 2017). Por lo cual era importante establecer los cultivos en suspensión para mejorar los niveles en biomasa y a la vez la producción de la proteína de interés.

10.3 Establecimiento de células en suspensión de la línea Z4 en matraz agitado de 250ml

Al colocar los callos friables en medio MS líquido se observó una disgregación de entre un 60% a un 85% después de 15 días en agitación orbital a 115rpm en matraces bafleados, con lo cual se logró establecer adecuadamente los cultivos de células en suspensión después de varias resiembras en medio MS fresco. Cabe destacar que este análisis se determinó de manera cualitativa, mediante la observación de los callos y las suspensiones celulares.

10.4 Cinéticas en matraz agitado y biorreactor

En la cinética de crecimiento en matraz agitado a partir de la determinación del peso fresco se observó una fase *lag* corta de tres días. Este comportamiento coincide con lo reportado en la literatura, ya que las células se encontraban en un proceso de adaptación a las nuevas condiciones nutricionales del medio, para luego incrementar la velocidad de división celular durante la fase exponencial (Shigeta *et al.*, 1996). En cuanto a la cinética elaborada a partir de la determinación del peso seco tanto en matraz agitado y biorreactor no se presentó una fase *lag* de adaptación esto puede deberse al estado fisiológico del inóculo pues se encontraba en fase de crecimiento exponencial o por el tamaño del inóculo. Por ejemplo, Lee *et al.* 2007 mostraron que diferentes tamaños de inóculo (20-120 g) tenían una influencia significativa en el perfil de crecimiento de las células de *Gymnema sylvestre*. Posteriormente, se observó un crecimiento exponencial que continúa hasta el día 15 en ambos sistemas (12 días de crecimiento exponencial), similar a lo reportado para esta especie con curvas de crecimiento exponencial de 10 y 15 días (Kanabus *et al.*, 1986). Lo anterior, sugiere fuertemente que la operación en el biorreactor *air-lift* logrado en este trabajo no presenta limitaciones en el proceso de transporte de nutrientes al interior del mismo, por lo que la limitación en el crecimiento, parece estar dada por la limitación de algún nutrimento, y/o por restricciones en el fenómeno de transporte en la interfase gas-líquido ocasionadas por la coalescencia y canalización en la acumulación de agregados celulares grandes, que juegan un papel fundamental en el suministro de O₂ y CO₂ al medio de cultivo. Una diferencia importante obvia entre los matraces de agitación y el biorreactor *air-lift* es la aspersion del aire directo. La fase estacionaria del cultivo fue muy corta o casi inexistente en ambos sistemas, ya que a partir del día 15 de cultivo comenzó a declinar por limitación de nutrientes hasta la fase de muerte, probablemente debido a que, al alcanzar el número máximo de células, se produce una rápida lisis y muerte de las células a consecuencia de la falta de nutrientes en el medio de cultivo (Caballero y Cardona, 2007). En esta fase se observó una

coloración más oscura en las suspensiones celulares y las células mostraron daños a nivel de membrana. La etapa de muerte en las suspensiones celulares se presenta a menudo por la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), como consecuencia del metabolismo celular. Los ROS provocan estrés oxidativo en las células y activan las enzimas oxidasas. En algunos casos, las células liberan fenoles al medio de cultivo y estos provocan un efecto tóxico, que evita la proliferación y si no son retirados del medio causan la muerte celular (Trejo-Tapia *et al.*, 2007).

10.5 Consumo de azúcares en matraz y biorreactor

La sacarosa se utiliza ampliamente como fuente de carbono a concentraciones entre 1 y 5%, según el tipo de material vegetal, es el azúcar más usado en los cultivos vegetales *in vitro*. La nutrición heterotrófica del carbono a partir de sacarosa en el medio implica la hidrólisis del azúcar por la planta (Ricardo y Aprees, 1970), mediante la intervención de invertasas de pared celular y citoplasmáticas que la catalizan a sus unidades monoméricas (glucosa y fructosa) constitutivas (Nickell y Marezki, 1970; Zamski y Wyse, 1985). El perfil de consumo de sacarosa en el cultivo en biorreactor *air-lift* de 2L fue similar al de matraz. El nivel de sacarosa en el medio disminuyó durante la fase logarítmica de crecimiento y casi se agotó del medio al día 15 en matraz y día 18 en biorreactor respectivamente, pero la disminución en el nivel de sacarosa no estuvo acompañada por un aumento de los azúcares reductores en el medio durante todo el período de crecimiento celular. Este resultado sugiere que la sacarosa externa se lleva preferentemente a la superficie celular antes de ser hidrolizada por la invertasa extracelular, debido a la baja actividad de esta enzima. Por lo tanto, el azúcar es probablemente degradado en la pared celular por la invertasa, que tiene la mayor actividad y la afinidad de alta velocidad por la sacarosa, y los productos de degradación finalmente se transportan al citoplasma como hexosas. Esta observación se ha reportado anteriormente en cultivos de células de betabel (Masuda *et al.*; 1988) y células de *Taxus cuspidata* (Furmanowa *et al.*, 2000). En este caso la hidrólisis completa de la sacarosa ocurrió mientras el crecimiento exponencial se daba hasta que las células alcanzaron la

fase estacionaria. Este comportamiento se ha visto en los cultivos de suspensión de *Nicotina tabacum* y *Datura innoxia* (Thorpe, 1973; Meyer *et al.*, 1985). Al igual que las observaciones previas la glucosa se consumió preferentemente sobre la fructosa, como se ha informado para otras células vegetales (Matsushita y Uritani, 1974) y *Daucus carota* (Kanabus *et al.*, 1986). La glucosa se consumió durante el período de crecimiento activo (al día 6 en matraz y al día 9 en biorreactor), el medio estaba esencialmente agotado de glucosa, mientras que la fructosa fue absorbida rápidamente (al día 6 en matraz y al día 12 en biorreactor) y el medio se volvió esencialmente libre de hexosas. El patrón en el consumo de glucosa y fructosa presentó un perfil similar al cultivo en matraz, consumiéndose preferencialmente glucosa sobre fructosa, patrón que se presenta generalmente en el cultivo de células en suspensión (Caspeta, 2004). Sin embargo, la captación preferencial de glucosa en lugar de fructosa aún no se comprende bien y se basa en características como, por ejemplo, la competencia de ambos sustratos para el mismo acarreador. La menor tasa de captación de fructosa observada en comparación con la de la glucosa en células de zanahoria en cultivo líquido es consistente con una mayor afinidad por la glucosa (Maretzki *et al.*, 1974). Además, la mayor afinidad de la hexosa quinasa para la glucosa proporciona una entrada más eficiente en el metabolismo intermedio para la glucosa (Fowler y Clifton, 1975).

10.6 Comportamiento del pH en matraz y biorreactor

Los cambios en el pH del medio tanto en matraz y biorreactor probablemente estén relacionados con la absorción y utilización de las fuentes de nitrógeno del medio por parte de las células. La caída inicial puede deberse a la captación de amonio (Bonga y Ardekas, 1992; Fett-Neto *et al.*, 1994), mientras que la siguiente tendencia hacia la alcalinización probablemente esté asociada con la captación y reducción de nitrato (debido a la formación de equivalentes de OH). Las células parecen haber dependido principalmente del nitrato (la forma más abundante de nitrógeno del medio) como fuente de nitrógeno durante todo el crecimiento (Hahlbrock y Kuhlen, 1972). La fase inicial de la rápida absorción de nitrato puede ser importante para apoyar la síntesis de proteínas para el crecimiento de las

células, así como para la osmorregulación, ya que el nitrato puede almacenarse en la vacuola (Marschner, 1986). La intensificación del oscurecimiento en la fase estacionaria y fase de muertes se debió probablemente a la liberación y oxidación de los compuestos fenólicos producidos por las células.

10.7 Viabilidad y agregados celulares

En las fases *lag* y exponencial de la curva de crecimiento de las suspensiones celulares en matraz agitado y biorreactor, tratadas con DFA y observadas en el microscopio de fluorescencia, se observó la presencia de células fluorescentes vivas, debido a su actividad enzimática interna (esterasas citoplasmáticas) capaces de hidrolizar el DFA para originar fluoresceína (Maestú *et al.*, 2008). En cuanto al análisis morfológico se determinó que las células en suspensión de *Daucus carota* tienden a formar agregados pequeños de 10 a 20 células al inicio del cultivo, también fue posible visualizar células individuales en suspensión, sin embargo, conforme avanzan los días los agregados comienzan a ser más grandes. La formación de agregados celulares es muy característica de las células vegetales en suspensión, lo que probablemente se debe a que las células, al dividirse, no se separan adecuadamente o bien se asocian posteriormente (Arias *et al.*, 2009; Mustafa *et al.*, 2011). La tendencia natural a agregarse está regulada por la cohesividad de la pared celular y permite la comunicación célula-célula, que a la vez puede favorecer el transporte de intermediarios, necesario para la biosíntesis de metabolitos. Los agregados formados durante los cultivos tendieron a sedimentarse más fácilmente que las células libres, lo que dificultó mantenerlos en suspensión, y debido a su adhesión llegaron a obstruir las tuberías en el biorreactor al tomar las muestras. Se sabe que el tamaño de los agregados influye en los procesos de transferencia de masa, ya que las células localizadas en el interior de un agregado de un tamaño relativamente grande no están expuestas de manera similar a los nutrientes, iluminación, O₂ y otros factores microambientales en comparación a las células localizadas en la periferia (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

10.8 Producción de proteína LTB-Syn en matraz y biorreactor

La producción de la proteína LTB-Syn de la línea Z4 de *D. carota* en el biorreactor *air-lift* de 2L presentó una tendencia similar al cultivo establecido en matraz agitado de 250 ml. En estas cinéticas se logró observar que la producción de la proteína LTB-Syn está asociada al crecimiento, ya que incrementó su producción a medida que el cultivo creció. La mayor producción de la proteína LTB-Syn en el biorreactor *air-lift* fue a los 15 días (1.52 $\mu\text{g/gPF}$), mientras que a nivel matraz fue a los 18 días (0.92 $\mu\text{g/gPF}$); esto comparado con otros sistemas de producción en plantas siguen estando bajos. Sin embargo, existe un número muy limitado de biofármacos que utilicen células en suspensión y raíces pilosas de zanahoria (Rosales-Mendoza y Tello-Olea, 2015; Luchakivskaya *et al.*, 2012). Algunos ejemplos son la producción de interferón alfa en el género *Lemna* producen hasta 600mg L⁻¹, mientras que se ha reportado en células de tabaco una producción de anticuerpos de entre 1.6 a 200 mg L⁻¹ (Curtis, 2006). La proteína transgénica insecticida *Bt cry2Aa2* es la mejor producida en células de tabaco hasta la fecha con un 46% de proteína total soluble (DeCosa *et al.*, 2001).

Esta baja producción de la proteína LTB-Syn posiblemente se deba a un aumento de los materiales endotóxicos, metabolitos secundarios y regulación por retroalimentación. Por ejemplo, la producción de α_1 -antitripsina humana alcanzó 247 mg/L en un biorreactor de membrana de 300 ml, pero se redujo a 7.3 mg/L cuando se llevó a biorreactor de 5L (McDonald *et al.*; 2005, Trexler *et al.*; 2002). Uno de los mayores desafíos en la mejora de un biorreactor son el corte reológico e hidrodinámico (Huang y McDonald, 2009), ya que las células vegetales son sensibles al corte debido a su pared celular inflexible constituida por celulosa (Xu *et al.*, 2011). Asimismo, el aumento de agregados celulares hace que las células sean más susceptibles a la cizalladura y puede causar una distribución desigual del oxígeno y otros nutrientes dentro de los agregados más grandes (Kieran *et al.*, 2000). Por otra parte, se han realizado estudios que indican que la pérdida de proteínas involucrada en los cultivos celulares en suspensión puede asociarse con las propiedades de adsorción de la cristalería, lo que indica que el material utilizado

en el biorreactor también puede desempeñar funciones importantes para maximizar el rendimiento de la proteína (Kwon *et al.*, 2012). Por ejemplo, se ha utilizado un biorreactor *air-lift* que utiliza un recipiente de plástico de 5L para producir el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) de ratón en células de arroz (Liu *et al.*, 2012).

El cultivo en biorreactor *air-lift* de 2L presenta hasta el momento un proceso más rentable para la producción de la proteína LTB-Syn que el cultivo en matraz agitado de 250 ml, sin embargo, para incrementar aún más su producción en trabajos futuros podrían realizarse pruebas con algún elicitor (inductor) biótico o abiótico como metiljasmonato, quitosano o extracto de levadura que han sido utilizados para incrementar la producción de metabolitos en suspensiones celulares (Jin *et al.*, 1999, Wink *et al.*, 2008). En este sentido, también sería importante evaluar la adición de diferentes aminoácidos al medio de cultivo que mejoren la producción y acumulación de proteínas, como se ha reportado en los cultivos *Taxus cuspidata*, en donde la adición de fenilalanina ayudó a maximizar la producción de taxol (Ciddi *et al.*, 1995). Así mismo, la adición de isoleucina a una concentración de 2mM provocó un aumento de 3 a 7 veces la producción de una hiperforina en cultivos de *H. perforatum* (Karppinen *et al.*, 2007).

XI. CONCLUSIONES

- Se estableció por primera vez un cultivo de células en suspensión *in vitro* de *Daucus carota* transformado genéticamente con el gen *LTB-Syn* (línea Z4), contra la enfermedad del Parkinson, tanto a nivel de matraz como biorreactor *air-lift*.
- Se confirmó por técnicas moleculares la presencia del gen *LTB-Syn* después de 5 años de haberse realizado su transformación genética y de haber establecido los cultivos en suspensión.
- Se caracterizó cinéticamente el crecimiento celular en medio sólido de callos y cultivos en suspensión de *Daucus carota* a nivel de matraz agitado de 250 ml y biorreactor *air-lift* de 2L de la línea transformada Z4.
- En matraz, la producción en biomasa de la línea Z4 de *Daucus carota*, fue 4.7 veces más respecto a los callos al día 15, tuvo un rendimiento de proteína de (0.02 $\mu\text{gP/gS}$) y una productividad de (0.0029 $\mu\text{P/gX d}^{-1}$).
- En biorreactor *air-lift*, la producción de la biomasa fue de 1.65 veces más que en matraz y 6 veces mayor que en callos. Se obtuvo un rendimiento de proteína de (0.04 $\mu\text{gP/gS}$) y una productividad de (0.0034 $\mu\text{P/gX d}^{-1}$).
- Esta es la primera demostración exitosa sobre la producción de una proteína terapéutica contra la enfermedad de Parkinson, con potencial para aplicaciones farmacéuticas a gran escala.

XI. PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos del cultivo de células en suspensión de la línea transgénica Z4 transformada con el gen *LTB-Syn* de *Daucus carota* en matraz agitado de 250 ml y biorreactor *air-lift* de 2L, se recomienda y espera lo siguiente:

- Que la producción continua de la proteína quimérica LTB-Syn permita diseñar y optimizar las condiciones del biorreactor *air-lift* de 2L y 10L, para aumentar su rendimiento.
- Se recomienda el diseño de experimentos para estudiar el efecto de las fuentes de carbono, índices de transferencia de oxígeno, velocidad de flujo de aire y elicitores para aumentar la producción de la proteína quimérica LTB-Syn.
- Cuando el cultivo en el biorreactor alcance la fase estacionaria de crecimiento, se recomienda hacer cambios parciales y/o totales en el medio de cultivo para restablecer las concentraciones de nutrientes (*feedbatch*); o cambiar la forma de operación a flujo, en la que el medio de cultivo se recircule por un reservorio donde se reestablezcan las concentraciones de nutrientes antes de regresarlo al biorreactor.
- Evaluar la inmunogenicidad de los cultivos de células en suspensión de la línea transformada Z4 de *D. carota* con modelos murinos, así como realizar estudios farmacocinéticos con suero de pacientes diagnosticados con Parkinson.
- Con este trabajo se ha generado conocimiento operacional para la producción de la proteína LTB-Syn de manera continua con buenos rendimientos, por lo que el estudio de factibilidad económica del proceso de producción es indispensable para exhortar a las fuentes de financiamiento a invertir en el desarrollo un formulado oral para su producción industrial.

XV. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarenga S, Alán E. y 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.
- Alves G, Forsaa E.B., Pedersen K.F., Dreetz Gjerstad M, Larsen J.P. (2008) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol.*, 255: 18-32.
- Arellano Y, García E, y Vázquez J. (2008). Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia.*, 42(6), 637-644.
- Arévalo-Villalobos J.I., Rosales-Mendoza S, Govea-Alonso, D.O., Monreal-Escalante E, y Zarazúa S. (2017). LTB-Syn: a recombinant immunogen for the development of plant-made vaccines against synucleinopathies. *Planta*; 245(6):1231-1239.
- Arias M, Aguirre A, Angarita M, Montoya C. y Restrepo J. (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *DYNA.*, 76 (157), 109-121.
- Auluck P.K., Caraveo G, y Lindquist S. (2010). alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 26:211-233.
- Azegami T, Yuki Y. y Kiyono H. (2014) Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *Int Immunol.*, 26:517-528.
- Benabid A.L., Chabardes S, Mitrofanis J, Pollak P (2009) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, 8:67-81.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, y Jackson-Lewis V. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front neuroanat.*, (9), 91.
- Bolisetty S, y Jaimes E. (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Inter J Mol Sci.*, 14(3), 6306-6344.
- Bonga J.M., y Ardekas V.P. (1992). *In vitro* culture of trees. *Forestry sciences*, vol. 38. Kluwer Academic, Dordrecht.

- Büchs J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J.*, 7(2), 91-98.
- Büchs J. y Zoels B. (2001). Evaluation of maximum to specific power consumption ratio in shaking bioreactors. *J Chem Eng.*, 34(5), 647-653.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, y Zoels B. (2000). Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng.*, 68(6), 589-593.
- Buitelaar M.R., y Tramper J. (1992) Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell culture: a literature review. *J Biotechnol.*, 23:111-141.
- Buitelaar R.M., Langenhoff A.M., Heidstra R, y Tramper J. (1991). Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 487-494.
- Caballero C, y Cardona N. (2007). Evaluación del crecimiento celular y consumo de sustrato a partir del establecimiento de suspensiones celulares de *Borojia patinoi*. Tesis de licenciatura. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Callis J, Raasch J, Vierstra R. (1990). Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. Structure, localization, and expression of their promotor in transgenic tobacco. *J. Biol. Chem.*, 265, 12486-12493.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science.*, 127: 471-472.
- Caspeta G.L. (2004). Escalamiento de raíces transformadas de la especie *Galphimia glauca* en un biorreactor *air-lift* modificado (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Ceballo Y, Tiel K, López A, Cabera G, Pérez M, Ramos O, y Hernández A. (2017). High accumulation in tobacco seeds of hemagglutinin antigen from avian (H5N1) influenza. *Transgenic Res.*, 26 775-789.
- Cervantes-Arriaga A, Rodríguez-Violante M, López-Ruiz M, Estrada-Bellmann I, Zuñiga-Ramírez C, Otero-Cerdeira E, Camacho-Ordoñez A, González-Latapi P. Morales-Briceño H. y Martínez-Ramírez D. (2013). Caracterización de la

enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK. *Gaceta Médica de México*.149:497-501.

- Ciddi V, Srinivasan V, Shuler V.M. (1995). Elicitation of *Taxus* cell cultures for production of taxol. *Biotechnol Lett.*, 17:1343-6.
- Chattopadhyay S, Farkya S, Srivastava AK, Bisaria VS (2002) Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng.*, 7:138–149.
- 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.
- Chisti M.Y. (1989). *Airlift* bioreactors. Elsevier Science Publishers LTD.
- Choi W, Zibae S, Jakes R, Serpell L.C, Davletov B, Crowther R.A, y Goedert M. (2004). Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human α -synuclein. *FEBS Lett.*, 576, 363-368.
- Chwieduk C.M. y Curran M.P. (2010). Pramipexol extended release in Parkinson's disease. *CNS Drugs.*, 24(4): 327-36.
- Clayton D.F, y George J.M. (1999). Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.*, 58, 120-129.
- Conrad U, Fiedler U, Artsaenko O, Phillips J. (1998). High-level and stable accumulation of single-chain Fv antibodies in plant storage organs. *J Plant Physiol.*, 252:708-11.
- Curtís WR. (2006). Plant biotechnology: Development and commercialization of transgenic plants as a protein production platform. In: Lee S, editor. *Encyclopedia of chemical processing.*, (4), 2489-2500.
- Curtis W.R., y Emery H. (1993). Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnol Bioeng.*, 42:4, 520-6.
- Curtiss R. y Cardineau G.A. (1997) Oral immunization by transgenic plants. *United States Patent.*, 5,654,184.
- Czerkinsky, C. y Holmgren, J. (2010) Topical immunization strategies. *Mucosal Immunol.*, 3, 545-555.

- Czyz M, Dembczynski R, Marecik R, Wojas-Turek J, Milczarek M, PajtaszPiasecka E, Wietrzyk J. y Pniewski T. (2014). Freeze-drying of plant tissue containing HBV surface antigen for the oral vaccine against hepatitis B. *Biomed. Res. Int.*, 485689.
- Da Cunha, N.B., Vianna G.R, da Almeida Lima, T, y Rech E. (2014). Molecular farming of human cytokines and blood products from plants: Challenges in biosynthesis and detection of plant-produced recombinant proteins. *Biotechnol J.*, 9(1), 39–50.
- Dauer W, y Przedborski S. (2003) Parkinson´s disease: Mechanisms and models. *Neuron.*, 39: 889-909.
- De Dobbeleer C, Cloutier M, Fouilland M, Legros R, Jolicoeur M. (2006). A high-rate perfusion bioreactor for plant cells. *Biotechnol Bioeng.*, 95:1126-37.
- De Lau L.M., y Breteler M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson´s disease. *Lancet Neurol.*, 5(6), 525-535.
- DeCosa B, Moar W, Lee S.B., Miller M, Daniell H. (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol.*, 19:71-74.
- Dellaporta S.L., Wood J, Hicks J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep.*, 1:19-21.
- Deus B. y Zenk, M.H. (1982). Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotechnol Bioeng.*, 24(9), 1965-1974.
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu B.M., Avadhani N.G., y Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem.*, 283(14), 9089-9100.
- Doran P.M. (1995) Bioprocess engineering principles, 1st edn. Academic, London.
- Doran, P.M. (1999). Design of Mixing Systems for Plant Cell Suspensions in Stirred. *Biotechnol. Prog.*, (15). 3:319-335.
- Doran P.M. (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol.*, 11:199-204.

- Egelkrout E, Rajan V. y Howard, J.A. (2012) Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Sci.*, 184, 83-101.
- Eibl R, Eibl D. (2002) Bioreactors for plant cell and tissue cultures. In: Oksman-Caldentey KM, Barz WH (eds) *Plant biotechnology and transgenic plants*. Marcel Dekker, NY, pp 163-199.
- Eibl R, y Eibl D. (2006). Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture. In: Gupta D, Ibaraki Y, editors. *Plant tissue cult eng.*, Dordrecht, Springer. p 203-227.
- Fett-Neto A.G., Wen Yi Zhang, y DiCosmo F. (1994). Kinetics of Taxol Production, Growth, and Nutrient Uptake in Cell Suspensions of *Taxus cuspidate*. *Biotechnol Bioeng.*, 44:205-210.
- Fisher U. y Alfermann A.W. (1995). Cultivation of photoautotrophic plant cell suspensions in the bioreactor: influence of culture conditions. *J Biotechnol.*, 41, 19-28.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (FAOSTAT). Recuperado Noviembre, 2017 de [http:// faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E).
- Fowler, M.W. y Clifton A. (1975). Activities of enzymes of carbohydrate metabolism in cells of *Acer pseudo platanus* L. maintained in continuous (chemostat) culture. *Europ. J. Biochem.*, 43:445-450.
- Furmanowa M, Oledzka H, Sykłowska-Baranek K, Józefowicz J. y Gieracka S. (2000). Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidata* and *Taxus x media* by some elicitors and precursors. *Biotechnol Lett.*, 22:1449-1452.
- George E.F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. En E. F. George M.A. Hall y De Klerk G. (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture.*, 3 ed. The Netherlands: Springer.
- Georgiev M, Pavlov A, Bley T. (2007) Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 74:1175–1185.
- Georgiev M.I., Weber J, Maciuk A. (2009) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 83:809-823.

- Ghochikyan A, Petrushina I, Davtyan H, Hovakimyan A, Saing T, Davtyan A, Cribbs D.H., Agadjanyan M.G. (2014) Immunogenicity of epitope vaccines targeting different B cell antigenic determinants of human α -synuclein: feasibility study. *Neurosci Lett.*, 560:86-91.
- Giri A, y Narasu L.M. (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol Adv.*, 18, 1-22.
- Goedert M. (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.*, 2:492-501.
- Goetz C. (2002) Charcot and Parkinson's disease. In: Parkinson's disease diagnosis and clinical management Factor F, Weiner W(eds.). Demos Medical Publishing, NY, pp 19-26.
- Goldstein D.A., Thomas J.A. (2004) Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM.*, 97:705-716.
- Gómez C, Uribe M, Ríos D. y Sánchez M. (2006). Inducción de callo embriogénico en *Eucaliptus globulus* Labill. *Interciencia.*, 31(10): 734-738.
- Gorr G, y Wagner S. (2008). Humanized glycosylation. In: Modern biopharmaceuticals: production of biopharmaceuticals in a moss bioreactor. Wiley-VCH, Weinheim, pp 919–929.
- Hahlbrock K, y Kuhlen E. (1972). Relationship between growth of parsley and soybean cells in suspension cultures and changes in the conductivity of the culture medium. *Planta.*, 108(3):271-8.
- Hauser R.A. (2010). Early pharmacologic treatment in Parkinson's disease. *Am J Manag Care.*, 16: S100-7.
- Hauser R.A., Panisset, M, Abbruzzese G, Mancione L, Dronamraju N y Kakarieka A. (2009) FIRST-STEP study Group. Double-blind trial of levodopa/carbidopa/entacapone versus levodopa/carbidopa in early Parkinson's disease. *Mov Disord.*, 24(4): 541-50.
- Hauser R.A. (2009). Levodopa: past, present and future. *Eur Neurol.*, 62: 1-8.
- Hellwing S, Drossard J, Twyman R.M., y Fischer R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol.*, 22(11):1425-22.

- Hernández M, Rosas G, Cervantes J, Fragoso G, Rosales-Mendoza S. y Sciutto E. (2014) Transgenic plants: a 5-year update on oral antipathogen vaccine development. *Expert Rev. Vaccines.*, 13, 1523-1536.
- Hilton M.D. (1999). Small-scale liquid fermentations. in: A.L. Demain, J.E. Davies (Eds.), *Manual of Ind. Microb & Biotechnol.*, American Society for Microbiology, Washington, 40-70.
- Hogue R.S., Lee J.M., An G.H. (1990). Production of a foreign protein product with genetically modified plant cells. *Enzyme Microb Tech.*, 12:533-38.
- Huang Z, Elkin Z, Maloney B J, Beuhner N, Arntzen C J, Thanavala Y, Mason H S. (2005). Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Nor-walk viruses. *Vaccine.*, 23:1851-1858.
- Huang T.K. y McDonald K.A. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem Bioeng J.*, 45, 168-184.
- Hurtado H.M. y Merino M.M. (1987). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas.
- Ibañez P, Bonnet A.M., Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, y Brice A (2004). Causal relation between alpha synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet.*, 364:1169-1171.
- Indo H, Yen H, Nakanishi, I, Matsumoto K, Tamura M, y Minamiyama, Y. (2015). A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr.*, 56(1), 1.
- Jain E, y Kumar A (2008). Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnol Adv.*, 26:46-72.
- Jameel E, Umar T, Kumar J, y Hoda N. (2016) Coumarin: a privileged scaffold for the design and development of anti-neurodegenerative agents. *Chem Biol Drug Des.*, 87:21-38.
- Jellinger K.A. (2014). Neuropathology of Parkinson's' disease. In: Thomas M, editor. *Inflammation in Parkinson's Disease: Scientific and Clinical Aspects.* Springer; NY. p. 25-47.

- Jenner E. (1798). An enquiry into the causes and effects of the variola vaccine, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox. Sampson Low, London.
- Jenner E. (1801) The origin of the vaccine's inoculation. Shury, London.
- Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm B.B. y Chen J.F. (2009). Adenosine, adenosine A2A antagonist and Parkinson's disease. *Parkinsonim Rel Disord.*, 15(6): 406-13.
- Jin JH, Shin JH, Kim JH, Chung IS, Lee HJ. (1999). Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture. *Biotechnol Bioprocess Eng.*, 4:300-4.
- Jurado, S. (2010). Estudio de la proteína F-box SKP2A de *Arabidopsis thaliana* en la división celular y en la respuesta a auxina. (Tesis Dr. Biol.). Universidad Complutense de Madrid.
- Kanabus J, Bressan R, Carrita N.C. (1986). Carbon assimilation in carrot cells in liquid culture. *Plant Physiol.*, 82: 362-368.
- Kanokwaree K. y Doran M.P. (1998) Application of membrane tubing aeration and perfluorocarbon to improve oxygen delivery to hairy root cultures. *Biotechnol Prog.*, 14, 479-486.
- Karppinen K, Hokkanen J, Tolonen A, Mattila S, y Hohtola A. (2007). Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry.*, 68:1038-45.
- Kiely A.P., As Y.T., Kara E, Limousin P, Ling H, Lewis P, Proukakis C, Quinn N, Lees AJ, y Hardy J. (2013). Alpha-synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy?. *Acta Neuropathol.*, 125, 753-769.
- Kieran P.M., Malone D.M., y MacLoughlin P.F. (2000). Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 67, 139-177.
- Kim G., Kim J, Rhie S, y Yoon S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp neurobiol.*, 24(4), 325-340.

- Kim Y, Wyslouzil B.E., Weathers P.J. (2002) Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro Cell Dev Biol Plant.*, 38:1-10.
- Kizhner T, Azulay Y, Hainrichson M, Tekoah Y, Arvatz G., Shulman A. (2014). Characterization of a chemically modified plant cell culture expressed human α -Galactosidase-A enzyme for treatment of Fabry disease. *Mol Genet Metab.*, 114(2):259-67.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Voitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, y Riess O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.*, 18, 106-108.
- Kwon J.Y., Lee K.H., Cheon S.H., Ryu H.N., Kim S.J., y Kim D.I. (2012). Adsorptive loss of secreted recombinant proteins in transgenic rice cell suspension cultures. *Plant. Cell Rep.*, 31, 551-560.
- Lang A.E. y Lozano A.M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med.*, 339 (15): 1044-53.
- Langston J.W., Ballard P, Tetrud J. y Irwin I. (1983) Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* 219, 979-980.
- Lansbury PT Jr, y Brice A. (2002). Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Genet Dev.*, 12: 299-6.
- Lee E.J, Mobin M, Hahn E.J, y Paek K.Y. (2007). Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. *J Plant Biol.*, 49:427-431.
- Levine C.B., Fahrbach K.R., Siderowf A.D., (2003). Diagnosis and Treatment of Parkinson's Disease: A Systematic Review of the Literature. Evidence Report/Technology Assessment Number 57. (Prepared by Metaworks, Inc., under Contract No. 290-97-0016) AHRQ Publication No. 03-E040. Rockville, MD: Agency for Health care Research and Quality.
- Li J.Y., Christophersen N.S., Hall V, Soulet D, Brundin P. (2008) Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends Neurosci.*, 31: 146-153.

- Linazaroso, G. (2008). Inicio de la terapia dopaminérgica en la enfermedad del Parkinson: seis buenas razones para no retrasarlo. *Neurología.*, 23(5): 299-305.
- Liu Y.K., Huang L.F., Ho S.L., Liao C.Y., Liu H.Y., Lai Y.H., Yu S.M., y Lu C.A. (2012). Production of mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by gateway technology and transgenic rice cell culture. *Biotechnol Bioeng.*, 109, 1239-1247.
- Lotharius J. Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: Dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature.*, 3:932-942.
- Luchakivskaia IuS, Olevinskaia Z.M., Kishchenko E.M., Spivak N.Ia, y Kuchuk N.V. (2012). Obtaining of hairy-root, callus and suspension carrot culture (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b. *Tsitol Genet.*, 46(1):18-26.
- Lugade A.A., Kalathil S, Heald J.L., y Thanavala Y. (2010) Transgenic plant-based oral vaccines. *Immunol Invest.*, 39:468-482.
- Ma J.K., Drake P.M., y Christou P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet.*, 4:794-805.
- Machakova I, Zazimalova E, y George E.F. (2008). En E. F. George, M. A. Hall y G. De Klerk (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. The Netherlands: Springer.
- Maestú F, Ríos M. y Cabestrero R. (2008). Neuroimagen: Técnicas y procesos cognitivos. Barcelona: Ed. Masson.
- Maier U, Losen M, y Büchs J. (2004). Advances in understanding and modeling the gas liquid mass transfer in shake flasks. *Biochem. Eng. J.*, 17(3): 155-167.
- Marezzi A, Thom M, y Nickell LG. (1974). Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures. In: H. E. Street, ed., *Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press, London. pp. 329-361.
- Maroteaux L, Campanelli J.T., y Scheller R.H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic terminal. *J. Neurosci.*, 8, 2804-2815.

- Marquet-Blouin E, Bouche F.B., Steinmetz A, y Muller C.P. (2003). Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.) derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol.*, 51(4), 459-469.
- Marschner, H. (1986) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Marsden, C. (1983) Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm.*, 19: 121-141.
- Martínez-Corral M. y Kulisevsky J. (2008). Pramipexol y enfermedad de Parkinson, una actualización. *Rev Neurol.*, 46(1): 49-52.
- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, y Schenk D. (2005) Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron.*, 46:857-868
- Masuda H, Takahashi T, y Sugawara S. (1988). Acid and Alkaline Invertases in Suspension Cultures of Sugar Beet Cells. *Plant Physiol.*, 86:312-317.
- Matsushita K, y Uritani I. (1974). Changes in invertase activity of sweet potato in response to wounding, and purification and properties of its invertase. *Plant Physiol.*, 54: 60-66.
- McDonald, K.A., Hong L.M., Trombly D.M., Xie Q, y Jackman A.P. (2005). Production of human alpha-1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor. *Biotechnol Prog.*, 21, 728–734.
- Meyer R, y Wagner K.G. (1985). Nucleotide pools in suspension cultured cells of *Datura innoxia*. I. Changes during growth of the batch culture. *Planta.*, 166:439-445.
- Michaud D, y Yelle S. (2000). Production of useful protease inhibitors in plants. In: Michaud D. editor. Recombinant Protease Inhibitors in Plants. Georgetown (TX). *Landes Bioscience.*, p. 191-202.
- Mihaliak C.A., Webb S, Miller T, Fanton M, Kirk D, Cardineau G. (2005). Development of plant cell produced vaccines for animal health applications. In: Proceedings of the 108th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, Greensboro, NC (pp. 158–163).

- Miller T.J., Fanton M.J., y Webb S.R. (2006). Stable immunoprophylactic and therapeutic compositions derived from transgenic plant cells and methods for production. United States Patent 20060222664.
- Mori F, Tanji K, Yoshimoto M, Takahashi H y Wakabayashi K (2002) Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system. *Brain Res.*, 941, 118-126.
- Murashige T, y Skoog F. (1962). A revised medium for growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15:473-497.
- Mustafa N, De Winter W, Van Iren F, y Verpoorte R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols.*, 6(6), 715-742.
- Nagatsu T, y Sawada M (2009) L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism Relat Disord.*, 15: S3-S8.
- Nakahara T, Yokocki T, Kamisaka Y, y Sosamu S. (1992) Gamma-Ionoliec acid from genus *Mortierella*. Industrial applications of single cell oils. Eds Kyle, D. and Ratledge, C., *Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, Illinois. pp 61-97.
- Nickell LG. y Maretzki A. (1970). The utilization of sugars and starch as carbon sources by sugarcane cell suspension cultures. *Plant Cell Physiol.*, 11:183-185.
- Nuutila A.M., Toivonen L, y Kauppinen V. (1994) Bioreactor studies on hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Comparison of three bioreactor types. *Biotechnol Tech.*, 8: 61-66.
- Odell J.T., Nagy F. y Chua N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature.*, 313. 810-812.
- Organización Mundial de la Salud (WHO). Recuperado en septiembre, 2016 de <http://www.who.int/immunization/diseases/measles/en/index.html>.
- Orozco Sánchez F, Hoyos Sánchez R, y Arias Zabala M.E. (2002) Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. *Rev Fac Nal Agr.*, 55(1):1473-1495.
- Osman R, Al Jamal, K.T., Kan P.L., Awad G, Mortada N, El-Shamy A.E., y Alpar O. (2013). Inhalable DNase I microparticles engineered with biologically active excipients. *Pulm Pharmacol Ther.*, 26(6), 700-709.

- Pahwa R, Factor S.A., Lyons K.E., Ondo W.G., Gronseth G, Bronte-Stewart H, Hallet M, Miyasaki J.M., Stevens J, y Weiner W.J. (2009). Tratamiento de la enfermedad de Parkinson con fluctuaciones motoras y discinesias (una revisión basada en evidencias). Informe del subcomité de estándares de calidad de la American Academy of Neurology. En: ANN Parkinson. Volumen 3: evaluación y tratamiento. Barcelona. *Medical Trends.*, p.15-34.
- Park S, Yi N, Kim Y, Jeong M, Bang S, Do Y, y Kim, J. (2010). Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *J Exp Bot.*, 61 (9):2459-2467.
- Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lyytinen J, Tienari PJ, Poyhonen M, y Paetau A. (2014). Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging.*, 35, 2181-2185.
- Peraza-Luna F, Rodríguez-Mendiola M, Arias-Castro C, Bessiere JM, y Calva-Calva G. (2001) Sotolone production by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* in *airlift* with mesh bioreactors. *J Agric Food Chem.*, 49, 6012-6019.
- Pimenov M.G., y Leonov M.V. (1993) The genera of the Umbelliferae. A Nomenclator, Royal Botanical Gardens, Kew, UK, 156 pp.
- Pinto, B. y Fonseca, J. (2009). Guía técnica para la producción del cultivo de zanahoria. La Habana, Cuba. Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales.
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C, Leroy E, Ide S.E., Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, y Boyer R. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.*, 276, 2045-2047.
- Potenza C, Aleman L, y Sengupta-Gopalan, C. (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol.*, 40 (1):1-22.
- Price K, Farley I, y Hornykiewicz O. (1978) Neurochemistry of Parkinson's disease: relation between striatal and limbic dopamine. *Adv Biochem Psychopharmacol.*, 19: 293-300.

- Protalix. Recuperado, octubre de 2012 de: <http://www.protalix.com/resources/DDW-2014-Poster-TNF.pdf>.
- Proukakis C, Dudzik C.G., Brier T, MacKay D.S., Cooper J.M., Millhauser G.L., Houlden H, y Schapira A.H. (2013). A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology.*, 80, 1062-1064.
- Ranjbar R, Inoue R, Katsuda T, Yamaji H. y Katoh S. (2008). High Efficiency Production of Astaxanthin in an Airlift Photobioreactor. *J Biosci Bioeng.*, (106)2: 204-207.
- Raven N, Rasche S, Kuehn C, Anderlei T, Klöckner W, Schuster F, Henquet M, Bosch D, Büchs J, Fischer R, Schillberg S. (2014). Scaled-up manufacturing of recombinant antibodies produced by plant cells in a 200L orbitally-shaken disposable bioreactor. *Biotechnol Bioeng.*, 112:308-321.
- Ricardo C.P., y Aprees T. (1970). Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry.*, 9: 239-247.
- Rodríguez C.A.V., Fernández T.G., Diogo M.M., Lobato da S.C., y Cabral J.M.S. (2011) Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnol Adv.*, 29:815-829.
- 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, Rubio-Infante N, Zarazúa S, Govea-Alonso DO, Martel-Gallegos G, y Moreno-Fierros L. (2014). Plant-based vaccines for Alzheimer's disease: an overview. *Expert Rev Vaccines.*;13(3):429-41.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, López-Revilla R, Moreno-Fierros L, y Alpuche-Solís A.G. (2008). Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Rep.*, 27:79-84.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra R.E., Moreno-Fierros L, Han Y, Alpuche-Solís AG, y Korban S.S. (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.

- Rosales-Mendoza S, y Tello-Olea M.A. (2015). Carrot Cells: A Pioneering Platform for Biopharmaceuticals Production. *Mol Biotechnol.*, 57(3):219-32.
- Rutherford N.J., y Giasson B.I. (2015). The A53E α -synuclein pathological mutation demonstrates reduced aggregation propensity in vitro and in cell culture. *Neurosci Lett.*, 597, 43-48.
- Sajc L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochem Eng J.*, 4(2):89-99.
- Sánchez L, y Alvarenga S., (2014). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha.*, 105120.
- Savitt, J.M., Dawson, V.L., y Dawson, T.M. (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clinical Invest.*, 116(7),1744.
- Schneeberger A, Mandler M, Mattner F, y Schmidt W. (2010). AFFITOME(R) technology in neurodegenerative diseases: The doubling advantage. *Hum Vaccin.*, 6:64-68.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2016). Consultado en <http://www.sagarpa.gob.mx/>.
- Secretaría de Salud, SSA (2017). Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud. México, D.F.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2017). Consultado 11-07-2017 en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>.
- Sette A, y Rappuoli R. (2010). Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity.*, 33:530-541.
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, y Galili G. (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(5), 579-590.
- Sharp J.M. y Doran P.M. (1990) Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *J Biotechnol.*, 16, 171-186.

- Shigeta J, Sato K. y Mii M. (1996). Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Sci.*, 115, 109-114.
- Shiram V, V Kumar y M Shitole. (2008). Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In vitro Cell Dev Biol-Plant.*, 44:186 DOI: 10.1007/s11627-008-9108-3.
- Singh G, y Curtis W.R. (1994). Reactor design for plant root culture. En: *Biotechnological Applications of Plant Cultures*. Shargool P.D. y Ngo T.T., Eds. ERC Press. pp. 185-206.
- Skovronsky D, Lee V, y Trojanowski J. (2006). Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis.*, 1:51-70.
- Spillantini M, Crowther R.A., Jakes R, Hasegawa M, y Goedert M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci.*, 95: 6469-6473.
- Stocchi F, Tagliati M, y Olanow C.W. (2008). Treatment of levodopa-induced motor complications. *Mov Disord.*, 23 (Suppl 3): S599-612.
- Streatfield S.J., Jilka J.M., Hood EE, Turner D.D., Bailey M.R., Mayor J.M., Woodard S.L., Beifuss K.K., Horn M.E., y Delayne D.E. (2001). Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine.*, 19, 2742-2748.
- Streatfield S.J., Mayor J.M., Barker D.K., Brooks C, Lamphear B.J., Woodard S.L., Beifuss K.K., Vicuna D.V., Massey L.A., Horn M.E., Delaney D.E., Nikolov Z.L., Hood E.E., Jilka J.M., y Howard J.A. (2002). Development of an edible subunit vaccine in corn against enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.*, 38:11-17.
- Tahn N.T., Murthy H.N., y Paek K.Y. (2014). Optimization of ginseng cell culture in airlift bioreactors and developing the large-scale production system. *In Crop Prod.*, 60:343-348.
- Tanaka, H. (2000). Technological problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnol Bioeng.*, 23:1203-1218.

- Tanner C.M., y Aston D.A. (2000). Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Neurology.*, 13: 427-430.
- Tarsy, D. (2005). Pharmacologic treatment of Parkinson's disease. Up to date [Monografía en Internet]. *Walthman Archv. Neurol.*, 61(4):561-6.
- Taya M, Hegglin M, Prenosil J.E., Bourne J.R. (1989). On-line monitoring of cell growth in plant tissue cultures by conductometry. *Enzyme Microb Technol.*, 11, 170-176.
- Terrier B, Courtois D, Hénault N, Cuvier A, Bastin M, Aknin A, Dubreuil J, y Pétiard (2007). Two new disposables for plant cell culture: The wave and undertow bioreactor and the slug bubble bioreactor. *Biotechnol Bioeng.*, 96(5):914-23.
- Thorpe T.A. y Meier D.D. (1973). Sucrose metabolism during tobacco callus growth. *Phytochemistry.*, 12: 493-497.
- Toivonen L, Balsevich J, y Kurz W.G.W. (1989). Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 18, 79-93.
- Tokuhara D, Yuki Y, Nochi T, Kodama T, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nanno M, Nakanishi U, Takaiwa F, Honda T, y Kiyono H. (2010). Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 107, 8794-8799.
- Toyooka K, Okamoto T, y Minamikawa T. (2000). Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol.*, 148:453-63.
- Trejo-Tapia G, y Rodríguez-Monroy M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia.*, 32, 10.
- Trejo-Tapia, G, Sepúlveda-Jiménez G, Trejo-Espino CM, Cerda-García-Rojas, Mayra de la Torre, Rodríguez-Monroy, M. y Ramos-Valdivia A.C. (2007). Hydrodynamic Stress Induces Monoterpenoid Oxindole Alkaloid Accumulation by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. Cell Suspension Cultures via Oxidative Burst. *Biotechnol Bioeng.*, 98:230-238.

- Tremblay R, Wang D, Jevnikar A.M., y Ma S. (2010). Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol Adv.*, 28, 214-221.
- Trexler M.M., McDonald K.A., Jackman A.P. (2002). Bioreactor production of human alpha (1)-antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. *Biotechnol Prog.*, 18, 501-508.
- Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.*, 552(2), 335-344.
- Ugen KE, Lin X, Bai G, Liang Z, Cai J, Li K, Song S, Cao C, y 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; PMID:25714663; <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1012033>.
- United States Department of Agriculture (USDA). Recuperado Noviembre, 2017 de: <http://nutritiondata.self.com/facts/vegetablesand-vegetable-products/2383/2>.
- Uvarova E.A., Belavin P.A., Permyakova N.V., Zagorskaya A.A., Nosareva O.V., Kakimzhanova A.A., y Deineko E.V. (2013). Oral Immunogenicity of plant-made *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10. *Biomed Res Int.*, 316304.
- Uversky V.N., Li J, Souillac P, Millett I.S., Doniach S, Jakes R, y Fink A.L. (2012). Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate inhibition of α -synuclein assembly by β -and γ -synucleins. *J Biol Chem.*, 277(14), 11970-11978.
- Uversky VN, y Fink A.L. (2002). Biophysical properties of human alpha-synuclein and its role in Parkinson's disease. *Rec Res Dev Prot.*, 1, 153-186.
- Veiga F.F., y Gutiérrez D.O. (2009). Tratamiento de la enfermedad del Parkinson inicial en el anciano. Madrid: Sociedad Española de Geriátría y Gerontología, Sociedad Española de Neurología y Elsevier, España. P. 13-26.
- Viridi V, y Depicker A. (2013). Role of plant expression systems in antibody production for passive immunization. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(6–8), 587-593.
- Wandelt C.I., Khan M.R., Craig S, Schroeder H.E., Spencer D, y Higgins T.J. (1992). Vicilin with carboxyl-terminal KDEL is retained in the endoplasmic

reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J.*, 2:181-92.

- Wang S.J., y Zhong J.J. (1996). A novel centrifugal impeller bioreactor. I. Fluid circulation, mixing, and liquid velocity profiles. *Biotechnol Bioeng*; 51:511-519.
- Weathers P.J., Wyslouzil B.E., Wobbe K.K., Kim Y.J., y Yigit E. (1999). The biological response of hairy roots to O₂ levels in bioreactors. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.*, 35:286-289.
- Weiland, P.Y. (1981). Differences in the behavior of bubble columns and *airlift* loop reactors. *Ger Chem Eng.*, 4, 174-181.
- Widholm, J.M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.*, 4:189-94.
- Wilson, P.D.G. (1997). The pilot-scale cultivation of transformed roots. In: Doran PM (ed) *Hairy roots: culture and applications*. Harwood Academic, Amsterdam, pp 179-190.
- Wirth S, Calamante G, Mentaberry A, Bussmann I, Lattanzi M, y Bara I. (2004). Expression of active human epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems. *Mol Breed.*, 13(1):23-35.
- Wink M, Alfermann A.W., Franke R, Wetterauer B, Distl M, y Windhovel J. (2008). Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resour.*, 12:113-23.
- Xu J, Ge X, y Dolan M.C. (2011). Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnol Adv.*, 29, 278-299.
- Yesil-Celiktas O, Gurel A, y Vardar-Sukan, F. (2010). Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. *Transworld Research Network*, 37(661), 2.
- Yusibov V, Streatfield S.J., y Kushnir N. (2011). Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Hum Vaccin.*, 7:313–321.
- Zamski E, y Wyse R.E. (1985). Stereospecificity of glucose carrier in sugar beet suspension cells. *Plant Physiol.*, 78: 291-295.

- Zarranz J.J., Alegre J, Gómez-Esteban J.C., Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodríguez O, y Atares B. (2004). The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.*, 55, 164-173.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 13 Agosto 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor)
Dr. Sergio Rosales Mendoza (Co Tutor)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Edda Sciutto Conde

Tesis: "Producción a nivel de matraz y reactor *air-lift* de células de *Daucus carota* que expresan una vacuna experimental contra la enfermedad de Parkinson".

Alumno que la presenta a revisión: **CHRISTIAN CARREÑO CAMPOS**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA, MARIA LUISA VILLARREAL ORTEGA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 13 Agosto 2014

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor)
Dr. Sergio Rosales Mendoza (Co Tutor)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Edda Sciutto Conde

Tesis: "Producción a nivel de matraz y reactor *air-lift* de células de *Daucus carota* que expresan una vacuna experimental contra la enfermedad de Parkinson".

Alumno que la presenta a revisión: **CHRISTIAN CARREÑO CAMPOS**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 12 Agosto 2014

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor)
Dr. Sergio Rosales Mendoza (Co Tutor)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Edda Sciutto Conde

Tesis: "Producción a nivel de matraz y reactor *air-lift* de células de *Daucus carota* que expresan una vacuna experimental contra la enfermedad de Parkinson".

Alumno que la presenta a revisión: **CHRISTIAN CARREÑO CAMPOS**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA, EDDA SCIUTTO CONDE



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 13 Agosto 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor)
Dr. Sergio Rosales Mendoza (Co Tutor)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Edda Sciutto Conde

Tesis: "Producción a nivel de matraz y reactor *air-lift* de células de *Daucus carota* que expresan una vacuna experimental contra la enfermedad de Parkinson".

Alumno que la presenta a revisión: **CHRISTIAN CARREÑO CAMPOS**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA, ANABEL ORTIZ CALTEMPA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 09 Agosto 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor)
Dr. Sergio Rosales Mendoza (Co Tutor)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Edda Scuitto Conde

Tesis: Producción a nivel de matraz y reactor *air-lift* de células de *Daucus carota* que expresan una vacuna experimental contra la enfermedad de Parkinson.

Alumno que la presenta a revisión: **CHRISTIAN CARREÑO CAMPOS**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. SERGIO ROSALES MENDOZA