



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Establecimiento de un cultivo de células en suspensión
de *Carica papaya* que expresa el péptido protector
contra la cisticercosis KETc7 y evaluación de
su actividad antiparasitaria.**

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:

IBT. Ana Lilia Pérez Ramos

CO-DIRECTORES

TUTOR: Dra. Anabel Ortiz Caltempa

CO-TUTORA: Dra. María Luisa Villareal Ortega

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios por otorgarme, bienestar, salud, paciencia, sabiduría y perseverancia.

Al Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales CEIB, UAEM por aceptarme y formar parte del grupo de investigación.

A mis directoras de tesis, Dra. Anabel Ortiz Caltempa y Dra. María Luisa Villareal Ortega por brindarme su apoyo y confianza, por su gran disposición para la elaboración del presente trabajo. Gracias por creer en mí.

A los Doctores integrantes de mi comité tutorial, Dra. Elizabeth Monreal Escalante, Dr. Alexandre Cardoso Taketa por su orientación y apoyo.

A las Doctoras Edda Sciutto Conde y Dra. Marisela Hernández Gonzáles por su colaboración y asesoría en los ensayos realizados en el Departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A las Doctoras María Eugenia López Arellano, Liliana Aguilar Marcelino, Gloria Sarahi Castañeda Ramírez por la asesoría y colaboración en los ensayos *in vitro* realizados en el Laboratorio de Helmintología en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP.

A los chicos del Laboratorio de Helmintología Itzayana, Marylin, Génesis, Yosi, Iván, Toño, David y al Biol. Gabriel Ramírez Vargas por su ayuda en el laboratorio.

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

A la Técnico Académico Lucero Valladares Cisneros por el apoyo técnico brindado durante en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Olga, Reinier, Eli, Rocío, Uriel, Christian, Itzel, Miguel y Leonel, por sus consejos y apoyo en el laboratorio para la realización del presente trabajo, Así como por brindarme su amistad y gratos momentos.

A mis amigos que me han acompañado en el camino de la ciencia Beto, Nico, Lupita y Erika.

DEDICATORIA

A quienes están siempre conmigo a pesar de la distancia

Mis padres

Por darme las alas y enseñarme a usarlas.

Gracias por su amor y confianza, son mi gran motivación.

Mi mayor tesoro

A mis hermanos Gabriel, Nancy y Miguel por ser parte fundamental en mi
vida

Alice & Sofí

Las niñas más bellas, son mi mayor alegría...

ÍNDICE GENERAL	Página
ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Características de los parásitos y problemática	2
2.1.1 <i>Taenia solium</i>	3
2.1.2 Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	3
2.1.3 Prevalencia de la cisticercosis.....	6
2.2 <i>Haemonchus contortus</i>	7
2.2.1 Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i>	8
2.2.2 Control químico contra helmintos gastrointestinales.....	9
2.2.3 Efectos colaterales del uso de los antihelmínticos: resistencia antihelmíntica	10
2.2.4 Alternativas biológicas para el control de nematodos gastrointestinales.....	11
2.2.5 Aspectos biotecnológicos para la producción de vacunas en plantas transgénicas .	12
2.2.5.1 Producción de vacunas en plantas transgénicas	12
2.2.5.2 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas transgénicas	14
2.2.5.3 Características de las células en suspensión	15

ÍNDICE	Página
2.2.5.4 Cinética de crecimiento celular	15
3. ANTECEDENTES	16
3.1 Adaptación de callos de <i>Carica papaya</i> Línea transgénica C23	16
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVO GENERAL	20
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	20
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
8. MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1 Mantenimiento de callos de <i>Carica papaya</i> línea no transgénica (WT) y línea transgénica 23 (C23).....	22
8.2 Optimización de células en suspensión de <i>Carica papaya</i> línea no transgénica (WT) y línea transgénica (C23)	22
8.3 Identificación del péptido KETc7 en cultivos en suspensión de <i>Carica papaya</i>	22
8.3.1 Electroforesis de proteínas en gel desnaturalizante (SDS-PAGE).....	22
8.3.1.1 Tinción de plata.....	23
8.4 Cinética de callos de <i>C. papaya</i> WT y línea transgénica C23	23
8.5 Cinética de crecimiento de células en suspensión de <i>C. papaya</i> WT y línea transgénica C23	23
8.6 Evaluación del crecimiento celular de <i>C. papaya</i> WT y línea C23	24
8.6.1 Análisis de la biomasa (peso fresco).....	24
8.6.2 Análisis de la biomasa (peso seco).....	24
8.7 Determinación de pH del medio	24
8.8 Viabilidad celular de <i>C. papaya</i> WT y línea C23	25
8.9 Cuantificación de azúcares totales del medio de <i>C. papaya</i> WT y línea C23	25

ÍNDICE

Página

8.10 Cuantificación del péptido KETc7 de <i>C. papaya</i> línea transgénica C23.....	25
8.10.1 Extracción de proteína de cultivos de callos y células en suspensión de <i>Carica papaya</i> línea transgénica C23	25
8.10.2 Cuantificación de proteínas del cultivo de callos y células en suspensión de <i>C. papaya</i> WT y C23 por el método de Lowry	26
8.10.3 Ensayo de Elisa para cuantificar el péptido KETc7.....	26
8.11 Evaluación <i>in vitro</i> de la XPS de la línea transgénica C23 contra larvas L4 del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i>	26
8.11.1 Producción de larvas infectantes de <i>H. contortus</i>	26
8.11.2 Desenvaine de larvas infectantes L3 de <i>H. contortus</i>	27
8.11.3 Mantenimiento de desarrollo larvas infectante L3 en larvas L4 de <i>H. contortus</i>	27
8.11.4 Preparación del antihelmíntico Ivermectina.....	27
8.11.5 Preparación de muestras biomasa WT y línea transgénica C23 de <i>C. papaya</i>	27
8.11.6 Confrontación de la biomasa XPS de la línea transgénica C23 contra larvas L4 del nematodo <i>H. contortus</i>	28
8.12 Análisis estadístico	29
9. RESULTADOS	30
9.1 Mantenimiento y propagación de biomasa de <i>Carica papaya</i>	30
9.1.1 Callos celulares de <i>C. papaya</i> línea WT	30
9.1.2 Callos celulares de <i>C. papaya</i> línea transgénica C23.....	30
9.1.3 Células en suspensión de <i>C. papaya</i> línea WT	31
9.1.4 Células en suspensión de <i>C. papaya</i> línea transgénica C23.....	31
9.2 Corroboración de la expresión del péptido KETc7 en cultivos en suspensión de <i>Carica papaya</i>	32
9.3 Evaluación de crecimiento de callos de <i>C. papaya</i> WT y línea transgénica C23.....	33

ÍNDICE	Página
9.3.1 Viabilidad celular de los callos de <i>C. papaya</i> de las líneas WT y C23	35
9.3.2 Cuantificación del péptido KETc7 por ELISA	36
9.4 Parámetros cinéticos de las células en suspensión de <i>C. papaya</i> WT y C23.....	37
9.4.1 Análisis cinético del pH en el medio de cultivo	39
9.4.2 Viabilidad celular.....	40
9.4.3 Consumo de azúcares en el medio de cultivo	41
9.4.4 Concentración de proteína total	43
9.5 Confrontación de la biomasa de C23 KETc7 contra larvas L ₄ de <i>H. contortus</i>	44
10. DISCUSIÓN	48
10.1 Cinética de crecimiento de callos de <i>C. papaya</i> WT y línea transgénica C23	48
10.2 Cinética de crecimiento de células en suspensión de <i>C. papaya</i> WT y línea transgénica C23	49
10.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad nematocida de XPS de células en suspensión contra larvas L ₄ de <i>Haemonchus contortus</i>	51
11. CONCLUSIONES	53
12. PERSPECTIVAS	54
13. BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	5
Figura 2. Regiones endémicas de <i>Taenia solium</i>	6
Figura 3. Micrografía de microscopia de barrido (5000X) de una larva infectante con vaina de <i>Haemonchus contortus</i>	7
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i>	9
Figura 5. Fases del crecimiento celular.	16
Figura 6. Efecto de los fitorreguladores 2,4-D y cinetina sobre la línea transgénica C23 de <i>Carica papaya</i>	17
Figura 7. Bioensayo de la biomasa de <i>C. papaya</i> C23 contra larvas L ₄ de <i>Haemonchus contortus</i>	28
Figura 8. Crecimiento de callos WT de <i>C. papaya</i>	30
Figura 9. Crecimiento de callos de línea transgénica C23 de <i>C. papaya</i>	30
Figura 10. Cultivo de células en suspensión de la línea WT de <i>C. papaya</i>	31
Figura 11. Cultivo de células en suspensión de la clona transgénica 23 de <i>C. papaya</i>	31
Figura 12. Gel 1.5% TBE 1X.	32
Figura 13. Electroforesis SDS/PAGE1-D.	33
Figura 14. Morfología y viabilidad celular de callos WT y línea transgénica C23 de <i>C. papaya</i> . a,c) Campo claro 10X, b, d) Campo oscuro 10X (Fluorescencia).	34
Figura 15. Viabilidad de células en suspensión de <i>C. papaya</i> línea transgénica C23.....	41

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Página

Gráfica 1. Curvas tiempo-concentración de biomasa cultivo de callos de <i>C. papaya</i>	34
Gráfica 2. Curvas de crecimiento celular y viabilidad celular de callos de <i>C. papaya</i>	35
Gráfica 3. Curvas tiempo-concentración de biomasa y proteína total de callos de <i>C. papaya</i>	36
Gráfica 4. Ensayo de Elisa; extractos de proteína de callos de <i>Carica papaya</i> WT y línea transgénica C23. C23.1 ₍₀₋₃₀₎ , C23.2 ₍₀₋₃₀₎ , C23.3 ₍₀₋₃₀₎).	36
Gráfica 5. Curvas tiempo-concentración de biomasa de <i>C. papaya</i> , cultivo de células en suspensión WT y línea transgénica C23.	38
Gráfica 6. Curvas tiempo-concentración de biomasa y pH de <i>C. papaya</i> WT y línea transgénica C23 al día 42 de la cinética.	40
Gráfica 7. Curvas tiempo-concentración de biomasa y viabilidad de células en suspensión de <i>C. papaya</i> WT y línea C23 al día 42 de la cinética.	41
Gráfica 8. Curvas de calibración para azúcares. a) sacarosa, b) glucosa, c) fructosa.	42
Gráfica 9. Curvas tiempo-concentración de biomasa y consumo de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) de células en suspensión de <i>C. papaya</i> C23.	43
Gráfica 10. Curvas tiempo-concentración de biomasa y producción de proteína total de <i>C. papaya</i> , línea transgénica C23.	43

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Antihelmínticos de amplio y corto espectro para el control de nematodos en rumiantes. Tomado de (Márquez., 2013).....	10
Tabla 2. <i>Carica papaya</i> , fitoconstituyentes. (Tomado de Aravind, 2013).....	11
Tabla 3. Literatura que reporta actividad antiparasitaria de <i>Carica papaya</i>	12
Tabla 4. Crecimiento celular (X_{PS}) de <i>C. papaya</i> línea transgénica C23, promedio y desviación estándar.....	39
Tabla 5. Concentración de proteína total de <i>C. papaya</i> línea transgénica C23, promedio y desviación estándar.....	44
Tabla 6. Porcentajes mortalidad de larvas L4 sin vaina de <i>H. contortus</i> por efectos de la biomasa C23, obtenida a partir de células transgénicas de <i>C. papaya</i>	45
Tabla 7. Fotografías de larvas L4 de <i>H. contortus</i> contra la biomasa de la clona 23 KETC7 de <i>C. papaya</i>	47

ABREVIATURAS

AH	Antihelmíntico
C23	Clona 23 <i>C. papaya</i>
CIN	Cinetina
C ₅₀	Concentración letal 50
C ₉₀	Concentración letal 90
B5	Medio de cultivo Gamborg
g	Gramos
h	Horas
Ivm	Ivermectina
L	Litros
μL	Microlitros
mM	Milimolar
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mn	Nanometros
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS	Peso seco
PF	Peso fresco
PVP	Polivinil pirrolidona
RA	Resistencia antihelmíntica
rpm	Revoluciones por minuto
t _d	Tiempo de duplicación celular
t _R	Tiempo de retención
μ	Velocidad específica de crecimiento (d ⁻¹).
X _{PS}	Concentración de biomasa en peso fresco (g _{PF} L ⁻¹)
X _{PF}	Concentración de biomasa en peso seco (g _{PS} L ⁻¹)
V	Voltios
WT	Línea sin transformar
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

RESUMEN

A partir de callos friables previamente adaptados en condición de oscuridad se establecieron cultivos de células en suspensión de *Carica papaya*: un cultivo silvestre (WT) y un cultivo transgénico C23 que expresa el péptido KETc7 de la vacuna contra la cisticercosis S3Pvac. Ambo cultivos crecieron en medio líquido B5 con los fitorreguladores ácido 2,4-diclorofenoxiacético y cinetina 2 mg L^{-1} . Este estudio se realizó en dos etapas; en la primera se llevó a cabo la determinación de parámetros cinéticos: se estableció la cinética de crecimiento en matraz agitado con 6 % de inóculo por 42 días, se analizó la viabilidad celular, el pH del medio de cultivo, el consumo de azúcares totales, la concentración de proteína total y la cuantificación del péptido KETc7. Se determinó para *C. papaya* WT una velocidad de crecimiento de 0.05 d^{-1} y una biomasa máxima de 10.12 g L^{-1} . La línea transgénica C23 presentó un μ igual a 0.10 d^{-1} y biomasa máxima de 14.36 g L^{-1} . Considerando la capacidad antiparasitaria reportada de algunos componentes de la papaya, se analizó en una segunda etapa la actividad nematicida de los cultivos en suspensión contra el nematodo parásito *H. contortus*, el cual es de importancia en el área pecuaria. Los bioensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pozos. Se utilizó una concentración de 1 mg/mL de la biomasa celular disuelta en PBS pH 7.4, como control negativo se utilizó el medio Hanks, y como control positivo Ivermectina 5 mg/mL . Se colocó un promedio de 100 larvas L₄ sin vaina en cada pozo ($n=6$). Posteriormente se realizaron lecturas a las 72h. El análisis estadístico que se utilizó fue un diseño completamente al azar en el programa SAS V9. La incubación de la biomasa WT con larvas L₄ de *Haemonchus contortus* indujo un porcentaje de mortalidad 17.52 al día 30 de crecimiento, mientras que la biomasa proveniente de la línea transgénica C23 de 44.59 a los 12 días de crecimiento, siendo estos últimos los porcentajes más altos. En este trabajo de tesis se establecieron cultivos de células en suspensión de papaya: uno no modificado y otro expresor del péptido KETc7, y se demostró la actividad nematicida de los mismos. Como perspectivas del presente estudio se propone determinar los valores CL₅₀ y CL₉₀, y continuar con un fraccionamiento biodirigido de la biomasa celular, para purificar y elucidar las moléculas responsables de la actividad nematicida contra parásitos de importancia pecuaria.

ABSTRACT

Using callus growing under darkness condition the establishment of suspension cell cultures of *Carica papaya*: wild type (WT) and the C23 transgenic line that expresses the KETc7 of the vaccine against cysticercosis S3Pvac. Both lines grew in liquid B5 medium added with the phytohormones 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin 2 mg L⁻¹. This study was carried out in two stages; in the first stage of the kinetics parameters was carried out, as well as cell viability, pH of the culture medium, consumption of total sugars, total protein concentration, and quantification of the KETc7 peptide. A maximum growth velocity of 0.05 d⁻¹ and a maximum biomass of 10.12 g L⁻¹ were determined for *C. papaya* WT. The transgenic line C23 showed a μ 0.10 d⁻¹ and a maximum biomass of 14.36 g L⁻¹. The nematicidal activity against the parasite *H. contortus* was analyzed in the second stage, which is important in the livestock area. The bioassays were performed in 96-well microtiter plates. A concentration of 1 mg/mL of the biomass dissolved in PBS pH 7.4, was used the Hanks medium as a negative control, and the positive control Ivermectin 5 mg/ml. An average of 100 larvae without pod were placed in each well (n = 6). Seventy-two hours, readings were made. The SAS V9 program was used for the statistical analysis using a random design. The incubation of the WT biomass with L4 larvae of *Haemonchus contortus* induced a mortality percentage of 17.52 at day 30 of growth, whereas the biomass from the C23 transgenic line presented 44.59% at 12 days of growth, being these percentages highest. In the present work cell suspensions cultures of wild type papaya and KETc7 peptide expressors were established and their nematicidal activity were demonstrated. The perspectives of the present study are to determine the L_{C50} and L_{C90} lethal concentrations and to continue with the bioguided fractionation of cell biomasses in order to purify and elucidate the molecules responsible for the nematicidal activity against parasites of livestock importance.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias son unos de los principales problemas que repercuten en la salud humana, y provocan daños severos en la salud de los animales ocasionando mermas en la producción y reproducción. La cisticercosis es una parasitosis de humanos y cerdos, prevalente en países de desarrollo. En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM se desarrolló una vacuna contra la cisticercosis porcina con el propósito de interrumpir su transmisión. La primera versión de la vacuna, constituida por tres péptidos denominados KETc1, KETc12 y KETc7, fue producida de forma sintética y demostró inducir alto nivel de protección contra cerdos expuestos al desafío natural. Una segunda versión recombinante de la vacuna expresada en fagos filamentosos fue producida y demostró propiedades similares. Ambas versiones son inyectables lo que implica altos costos para su aplicación en cerdos de traspatio. Con el propósito de desarrollar una vacuna oral, los péptidos fueron expresados en callos embriogénicos de papaya (Hernández *et al.*, 2007). En las últimas décadas el área de vacunación ha destacado prototipos de vacunas de administración oral utilizando plantas transgénicas, que son capaces de conferir inmunidad en las mucosas como una primera línea de defensa, así como inmunidad sistémica. Adicionalmente las células vegetales han sido propuestas para encapsular antígenos ya que los protegen del sistema digestivo debido a la presencia de la pared de las células, el sistema de endomembranas y biopolímeros (Chan y Daniell., 2015, Rosales y Salazar., 2014).

Con este enfoque se obtuvieron callos embriogénicos de papaya que expresan los péptidos que integran la vacuna contra la cisticercosis (S3Pvac), que constituyen una plataforma estable para producir una vacuna oral contra la cisticercosis causada por *Taenia solium* o *T. crassiceps*. (Hernández *et al.*, 2007, Fragoso *et al.*, 2017). El desarrollo de esta vía de administración es una prioridad en la vacunología, además evitaría la costosa logística de la vacunación inyectable y no dependientes de una "cadena de frío" para su mantenimiento (Fragoso *et al.*, 2017).

Debido al potencial de utilizar plantas transgénicas para la producción de la vacuna S3Pvac, en este estudio se planteó la optimización de cultivos de células en suspensión a partir de callos transgénicos de *C. papaya* que expresan el péptido KETc7. Adicionalmente

y considerando las propiedades antiparasitarias que han sido reportadas asociadas al látex y semillas de papaya, se evaluó la capacidad antiparasitaria de las líneas de células en suspensión tanto silvestres como transgénicas contra el nematodo gastrointestinal de rumiantes *Haemonchus contortus*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características de los parásitos y problemática

En la actualidad entre las enfermedades de mayor preocupación a nivel mundial se encuentran las parasitarias (FAO, 2014). Los parásitos son organismos que se alimentan de los nutrientes y de componentes de otros organismos, y pueden estar presentes en el ambiente, alimentos y en el agua. Estos varían en tamaño desde organismos microscópicos de una sola célula o gusanos multicelulares, el tamaño fluctúa de 1-2 μm a 12 metros de largo. Sus ciclos de vida son variables, algunos parásitos utilizan un huésped permanente, otros pasan por una serie de etapas de desarrollo utilizando un huésped diferente. Las infecciones por parásitos comúnmente son originadas por protozoarios (unicelulares), ectoparásitos y/o helmintos (Matthews, 2006). A su vez, dentro de los helmintos podemos encontrar la clasificación del grupo de los gusanos planos, (cestodos y trematodos) y el grupo de los gusanos cilíndricos (nematodos), siendo los cestodos y nematodos de mayor importancia en el área de la salud humana y veterinaria (Pérez, 2014, Urribarren *et al.*, 2016).

Entre los cestodos se encuentran la familia *Taeniidae*, entre las que figuran *Taenia asiatica*, *Taenia crassiceps*, *Taenia serialis*, *Taenia saginata* y *Taenia solium* (Tappe *et al.*, 2015). Entre los nematodos gastrointestinales de interés pecuario figuran los géneros *Teladorsagia*, *Ostertagia*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* y *Haemonchus*, los cuales son los de mayor impacto económico, pues están presentes en bovinos y ovinos (Torgerson y Macpherson, 2011). Estos parásitos pueden provocar enfermedades y desencadenar cuadros clínicos graves. Específicamente, la cisticercosis es una parasitosis de humanos y cerdos causada por el metacéstodo de *Taenia solium* en su estadio larvario (cisticerco). En el área pecuaria ocasionan graves pérdidas económicas para el ganado en pastoreo de hasta \$3,579,904,454,2 billones de pesos, debido a que causan el retraso del crecimiento, provocan desnutrición, baja conversión alimenticia y en algunos casos la muerte de los animales más afectados, además

de los gastos derivados de los tratamientos químicos. Esto genera un gran impacto negativo en la salud animal en la mayor parte del mundo principalmente en zonas tropicales y subtropicales en donde adquieren prevalencia y gran relevancia (Köhler, 2001, Liébano *et al.*, 2011, Rodríguez, 2017).

2.1.1 *Taenia solium*

Es un gusano plano con simetría bilateral, pertenece a la clase *Cestoidea*, subclase *Eucestoda*; orden *Cyclophyllidea*; familia *Taeniidae*; género *Taenia*. Se adhiere a la mucosa de la parte proximal del intestino delgado de su hospedero definitivo (el humano), por medio de cuatro ventosas y una doble corona de ganchos, localizados en su cabeza o róstelo; la parte inferior se adelgaza para formar un cuello angosto y un cuerpo constituido por cientos de proglótidos hermafroditas. Los proglótidos unidos entre sí en forma de cadena se denomina estróbilo el cual adquiere grados progresivos de maduración conforme se aleja de la cabeza del parásito. Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados, mientras que los más alejados están totalmente diferenciados y contienen hasta 50,000 huevos. El meta-céstodo la forma larvaria o cisticercos es una vesícula llena de líquido que contiene en su interior un escólex invaginado (Willms *et al.*, 2006).

2.1.2 Ciclo de vida de *Taenia solium*

El ciclo de vida de este parásito involucra dos hospederos (cerdo-humano), específicamente incluye una fase larvaria que afecta ambos como huéspedes intermediarios, y que se completa en el hombre quien es el hospedero definitivo de *T. solium*. El humano elimina los huevos del parásito libres o dentro de los proglótidos grávidos por medio de las heces, los cuales pueden ser ingeridos por los cerdos o accidentalmente por el hombre y la acción de los jugos digestivos permite la liberación de los embriones hexacantos y su adherencia a la mucosa intestinal (Hernández *et al.*, 2007). Posteriormente, penetran la pared intestinal hasta alcanzar los vasos sanguíneos, por los cuales pueden llegar a diversos órganos, tejidos y desarrollarse en cisticercos. Los cisticercos pueden localizarse en el músculo estriado, el sistema ocular, tejido graso subcutáneo, corazón y al nivel del sistema nervioso central figura 1. La invasión al sistema nervioso central (SNC) da lugar a la neurocisticercosis (NC), enfermedad que

constituye la localización más grave de la infección, se considera un problema de salud pública, con un 2.4% de consultas/año debido a síntomas relacionados con la enfermedad (Uribarren *et al.*, 2018). La neurocisticercosis se asocia con una reacción inflamatoria cuya naturaleza e intensidad son variables, ya que depende de la etapa evolutiva en la que se halle el parásito, los signos y síntomas dependen del número, ubicación y la respuesta inmunológica individual (Fleury *et al.*, 2006), entre los síntomas se pueden incluir cefaleas crónicas, ceguera, convulsiones (epilepsia), hidrocefalia, meningitis, demencia y síntomas causados por lesiones que ocupan espacios del sistema nervioso central. Se estima que causa el 30% de todos los casos de epilepsia en los países donde el parásito es endémico (OMS, 2015). En México, se notifica el 11% de las consultas neurológicas y el 25% de las craneotomías (Uribarren *et al.*, 2018).

Cuando el cerdo o el hombre ingiere huevos producidos por la tenia, los huevos se desarrollarán a quistes que en el cerdo puede afectar músculos maseteros, lengua, diafragma, corazón y cerebro. Los humanos son los únicos portadores de la fase adulta del parásito, la tenia se adquiere por comer carne cisticercosa, cruda o mal cocida (figura 1). Los cisticercos llegan al estómago y posteriormente al intestino delgado, en donde los jugos gástricos y biliares promueven que el escólex evagine y se fije en la pared intestinal, donde comienza a desarrollarse hasta alcanzar de 3 a 12 metros de largo (CDC, 2014).

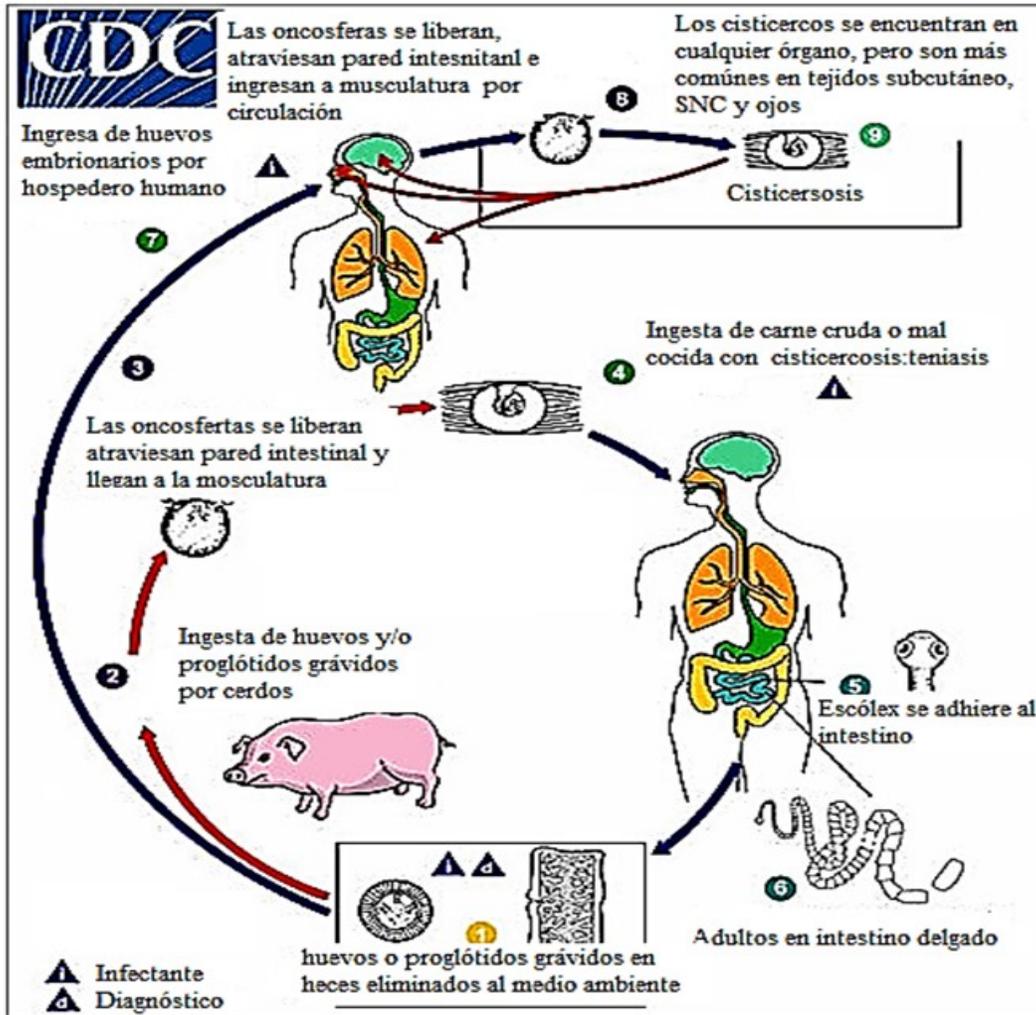


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. 1. Los cerdos y los humanos se infectan al ingerir huevos o proglótidos gravidos. 2 y 7. Los seres humanos se infectan por ingestión de alimentos contaminados o por autoinfección. Una vez que se ingieren los huevos, las oncosferas eclosionan en el intestino. 3 y 8. Invaden la pared intestinal y migran a los músculos estriados, al cerebro, al hígado y otros tejidos, donde se convierten en cisticercos. 9. En los seres humanos, los quistes pueden causar secuelas graves si se localizan en el cerebro, lo que resulta en NC. El ciclo de vida del parásito se completa, resultando en una infección por tenia humana, cuando se ingiere carne de cerdo poco cocinada que contiene cisticercos. 4. Los quistes evaginan y se adhieren al intestino delgado por su escólex. 5. Las tenias adultas se desarrollan, (hasta 2 a 12 m de longitud y producen menos de 1000 proglótidos. 6. Cada una con aproximadamente 50,000 huevos) y residen en el intestino delgado durante años. Tomado de Centro de Control y Prevención de Enfermedades CDC, 2014.

2.1.3 Prevalencia de la cisticercosis

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015), la cisticercosis se ha convertido en un grave problema de salud pública. Su transmisión es muy variable, ya que depende de factores socioeconómicos y culturales, en particular por la convivencia con un portador del gusano adulto. En 2015 el Grupo de Referencia de Epidemiología de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos de la OMS identificó a *T. solium* como una de las principales causas de muertes por enfermedades transmitidas por alimentos, con un total considerable de 2,8 millones de años de vida ajustados por discapacidad. Es una infección endémica localizada en países subdesarrollados de América Latina, Asia y África (figura 2). Se localizan principalmente en las comunidades agrícolas y rurales, donde no se tiene el cuidado de la higiene alimenticia, así como el control del saneamiento ambiental, es decir, fecalismo al aire libre (al ras del suelo), en zonas donde la cría rústica de sus animales (cerdos) es practicada por la población donde los dejan libres y pueden alimentarse con heces humanas. También es frecuente en zonas donde los animales no son sacrificados en mataderos y donde no hay inspección de la carne. La cisticercosis, principalmente afecta la salud animal y la economía, pues se reduce el valor de mercado de los cerdos siendo decomisados y no aptos para el consumo humano (Sciutto *et al.* 2000).

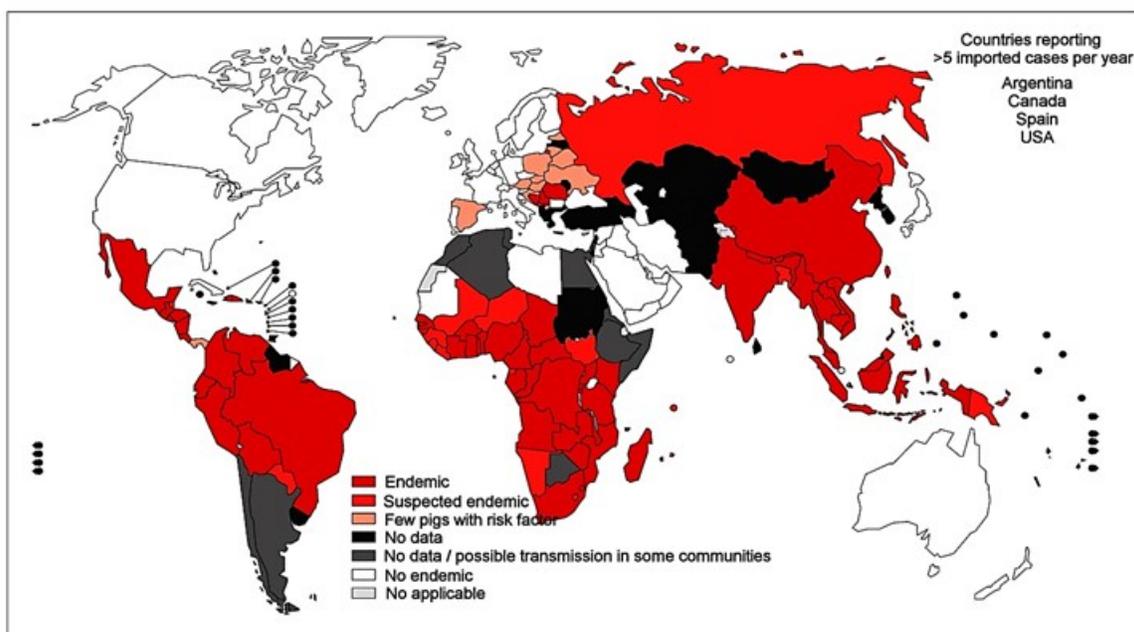


Figura 2. Regiones endémicas de *Taenia solium*. Tomado de World Health Organization (OMS, 2015).

Por otra parte, en este mismo contexto de enfermedades parasitarias, la nematodiasis es una enfermedad multi etiológica ocasionada por varios nematodos gastrointestinales de varias especies y géneros (Soca, *et al.*, 2005). Es un tema de gran preocupación ya que es una de las causas más importantes de la baja productividad y merma económica de los sistemas pecuarios en México. La pérdida anual se estima en \$8, 421, 226, 953 billones de pesos (Rodríguez, *et al.*, 2017). La prevalencia se ve determinada por factores propios de los parásitos y por factores como el medio ambiente, el clima, el manejo animal y la edad de los huéspedes expuestos a praderas contaminadas. Las pérdidas pueden ser directas como la muerte de los animales jóvenes o indirectas que se manifiestan clínicamente por diarreas persistentes, anemia, desnutrición y baja calidad de la carne (Páez, 2018). En la actualidad, la infección por el nematodo parásito de ovinos *Haemonchus contortus* es el problema de salud más importante (Salas *et al.*, 2016).

2.2 *Haemonchus contortus*

El nematodo *Haemonchus contortus* afecta a pequeños rumiantes. Es un nematodo de la clase *Secernentea*, subclase *Trichostrongyloidea*; orden *Strongylida*: familia *Haemonchoidae*; y género *Haemonchus*, posee un cuerpo delgado, cubierto por una vaina, su intestino está cubierto por 16 células intestinales nucleadas. En su extremidad anterior, la larva y la vaina tienen una forma cónica mientras que en el extremo de la parte posterior son más delgadas y finas (figura 3) (Liébano *et al.*, 2011). Además, forma parte de los parásitos hematófagos que afectan a los ovinos provocándoles enfermedades como (anemia, gastritis, diarrea, entre otras) perjudicando el desarrollo y el aumento de mortalidad (Pineda-Alegría *et al.*, 2017).

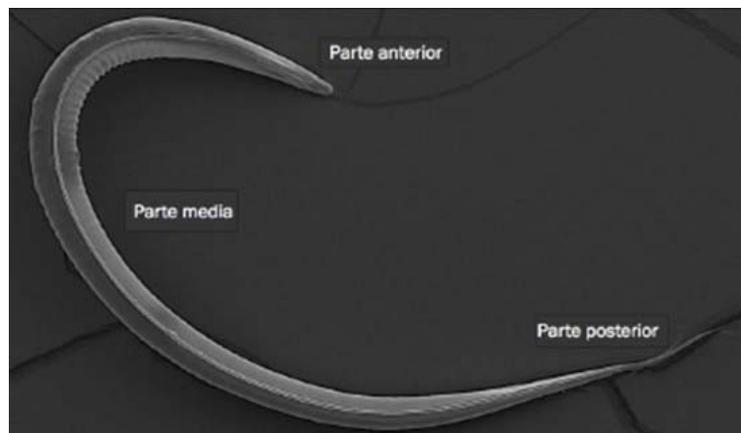


Figura 3. Micrografía de microscopia de barrido (5000X) de una larva infectante con vaina de *Haemonchus contortus*. Proporcionada por la Dra. Liliana Aguilar Marcelino, 2016.

2.2.1 Ciclo de vida de *Haemonchus contortus*

El ciclo biológico de este parásito es directo y la infección de los rumiantes se lleva a cabo mediante la ingestión de larvas infectantes que son ingeridas junto con la pastura y finalmente el parásito habita en el abomaso (cuarto estomago) e intestino delgado (Páez, 2018). Esta fase de desarrollo es considerada como el eslabón más importante en la cadena evolutiva ya que tiene la facultad de adaptarse a diversas condiciones ambientales, su hábitat es el suelo, tallos y hojas de los pastos donde pastorea el ganado (Paddock *et al.*, 2010).

Los huevos del nematodo son expulsados del organismo junto con las heces y de esta manera son depositados sobre el pasto donde encontrarán las condiciones para su desarrollo; en 1-2 días se desarrolla el embrión del parásito dentro del huevo, de donde eclosiona una larva de primer estadio L₁. Posteriormente, después de un breve periodo las larvas sufren una primera muda de su cubierta (vainas), evolucionando en larvas de segundo estadio L₂. Estas larvas se alimentan de elementos contenidos en la materia fecal. Después de 2-3 días las larvas sufren una pérdida más de vainas convirtiéndose en larvas de tercer estadio L₃ (larva infectante) (figura 4). Las condiciones para su desarrollo deben de encontrarse a 28°C y 80% de humedad; a temperaturas más bajas las larvas pueden disminuir la velocidad de desarrollo y pueden sobrevivir largos periodos, gracias a su metabolismo lento y sus reservas energéticas. Estas larvas son muy activas pudiendo ascender por los tallos y migrar hacia las hojas del pasto (Pineda-Alegría *et al.*, 2017). Una vez que las larvas son ingeridas con el pasto penetran la mucosa del abomaso donde sufren dos pérdidas de vainas más, convirtiéndose en larvas L₄ y quinto estadio L₅ (nematodo adulto) que presenta órganos sexuales de hembras y machos (Liébano *et al.*, 2011). Las hembras miden entre 25 y 34mm de longitud, mientras que los machos miden entre 19 a 22mm (Dunn, 1993).

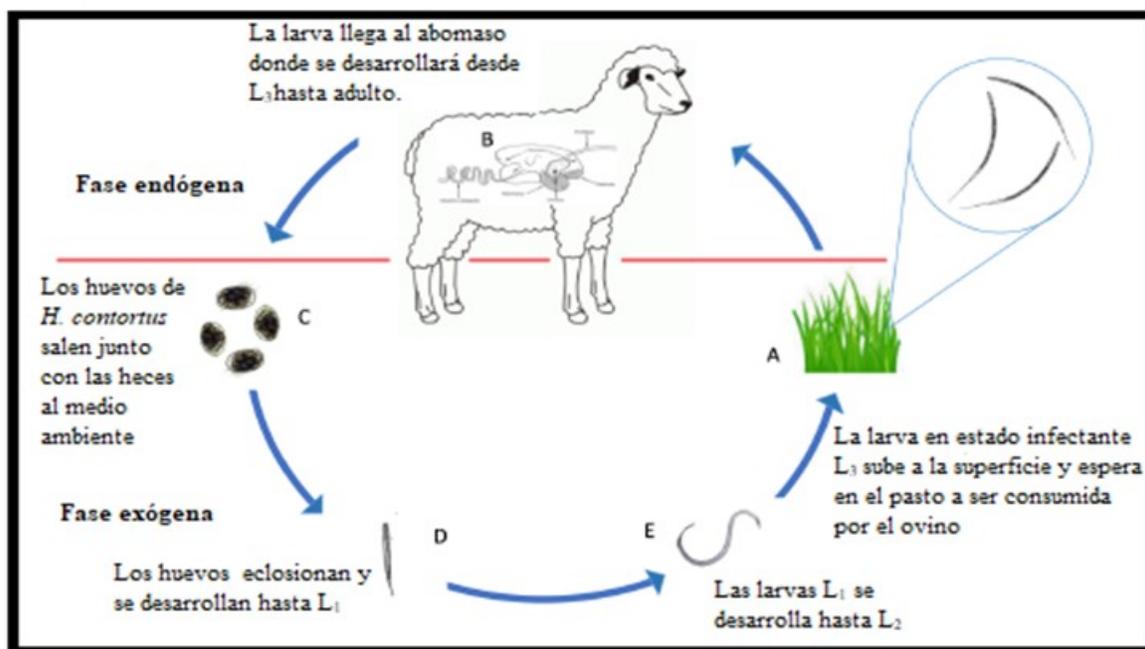


Figura 4. Ciclo de vida de *Haemonchus contortus*. A. El ovino ingiere la larva L₃ que se encuentra en el pasto. B. La larva llega al abomaso del ovino y se adhiere a la mucosa donde se desarrollará. C. Los huevos salen al ambiente junto con las heces del ovino. D. Inicia el estado embrionario del huevo hasta convertirse en L₁. E. Las larvas se desarrollan desde L₁ a L₃ (estado infectante) en 2 o 7 días, subirán hasta la superficie del pasto donde serán ingeridas por el ovino y comenzará un nuevo ciclo. Tomado de (Pineda-Alegría, 2016).

2.2.2 Control químico contra helmintos gastrointestinales

Hasta ahora, el método de control y de mayor aplicación es el uso irracional de medicamentos antihelmínticos (AH), los cuales son sustancias de origen químico y actualmente son el método de prevención de nematodos gastrointestinales en el mundo. En el mercado existen antihelmínticos que pueden administrarse de manera oral, percutánea, intramuscular y subcutánea (López, *et al.*, 2010). Existen una gama de antihelmínticos modernos, con espectro amplio y alto grado de eficacia. Dentro de los productos químicos se pueden distinguir tres grandes grupos, en donde se encuentran clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción en contra de los parásitos, benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (tabla 1) (López *et al.*, 2010, Márquez, 2013). Para que un antihelmíntico sea considerado efectivo debe tener las siguientes características: alta eficacia, ausencia de efectos colaterales y baja o nula toxicidad para el hospedador.

Tabla 1. Antihelmínticos de amplio y corto espectro para el control de nematodos en rumiantes. Tomado de (Márquez., 2013).

Amplio Espectro		
Mecanismo de acción	Principio activo	Familia farmacológica
Fijadores de tubulina	Benzimidazoles Probenzimidazoles	Cambendazol, Oxfendazol Flubendazol, Mebendazol Albendazol, Thiabendazol Fenbendazol, parbendazol Luxabendazol, Triclabendazol Fabentel Thiofanato Netobimin
Bloqueadores ganglionares	Imidazotiazoles Tetrahidropirimidinas	Tetramizol, Levamizol Mofrantel, Pirantel
Potenciadores GABA Doramectina	Avermectinas Milbermicinas	Ivermectina, Abamectina Moxidectin
Corto Espectro		
Desacopladores de la fosforilación oxidativa Antagonistas de acetilcolinesterasa	Salicilanilias Sustitutos Nitrofenilicos Organofosforados	Cloxanida, Oxiclosanida Rafoxanide, Closantel Disofenol Triclorfom, Haloxon Naftalofos, Diclorvos

2.2.3 Efectos colaterales del uso de los antihelmínticos: resistencia antihelmíntica

De una forma tradicional los productores han recurrido al uso exclusivo de sustancias químicas para el control de enfermedades parasitarias. El uso intensivo e indiscriminado de los antihelmínticos (AH) y la administración inadecuada han contribuido al desarrollo de resistencia a estas sustancias, lo que constituye un obstáculo importante para su control (Márquez,

2003). Esta resistencia antihelmíntica (RA) se define como la capacidad que tienen una pequeña población para tolerar cantidades que son tóxicas o letales para otras poblaciones de la misma especie. Se han identificado algunos factores aceleradores del proceso de desarrollo de resistencia, entre ellos factores genéticos, reproductivos y ecológicos de los parásitos, así como factores de orden entrópico, siendo la resistencia una característica heredable (Márquez, 2013). Los antihelmínticos más usados en México son los derivados de bencimidazoles y lactonas macrocíclicas, dentro de estas se encuentran ivermectinas/milbemicinas las que causan mayor daño al ambiente, al suelo, al agua, la biodiversidad y particularmente a los insectos benéficos que están asociados al estiércol, lo cual representa otro problema.

2.2.4 Alternativas biológicas para el control de nematodos gastrointestinales

La resistencia antihelmíntica ha ido en aumento en los últimos años, lo que señala la pertinencia de desarrollar nuevas estrategias para el control de parásitos (Torres *et al.*, 2012). Es por ello que se ha considerado el uso de plantas con propiedades antiparasitarias, éstas han sido una alternativa explorada por diferentes grupos de investigación. Entre las plantas candidatas figuran *Carica papaya*. La papaya además de su alto contenido en vitaminas, contiene enzimas proteolíticas como la papaína y la quimopapaína con propiedades antivirales, antifúngicas y antibacterianas (tabla 2) (Steppek *et al.*, 2004, Aravind *et al.*, 2013).

Tabla 2. *Carica papaya*, fitoconstituyentes. (Tomado de Aravind, 2013).

Fitoconstituyentes		Parte documentada
Enzimas	Papaína Quimopapaína	Fruto inmaduro
Carotenoides	B Caroteno Criptoxantina	Fruto
Monoterpenoides	Linalool 4-terpinol	Fruto
Glucosinolatos	Isotiocionato de bencilo Áceite de papaya	Semillas
Minerales	Ca, Km Mg, Zn, Mn, Fe	Hojas
Flavonoides	Miricetina Kaempferol	Brotos
Alcaloides	Carpaína Vitamina A, B,C, E	Hojas
Carbohidratos	Carpasemina, Glucósido	Látex

Se ha reportado la capacidad antiparasitaria de diferentes componentes de la papaya (tabla 3), dentro de los cuales destacan los extractos de éter de semillas sobre parásitos de peces *Ichthyophthirius multifiliis* (Ekanem *et al.*, 2004). Otros han demostrado actividad anti-helmíntica evaluada mediante la realización de ensayos de viabilidad sobre *Caenorhabditis elegans*. Cabe mencionar que los extractos que han demostrado dicha actividad son aquellos que contienen isotiocionato de bencilo, que ha sido considerando como el responsable de dicha actividad (Kermanshai *et al.*, 2001).

Tabla 3. Literatura que reporta actividad antiparasitaria de *Carica papaya*.

Componente	Parásito	Modelo	Referencias
Látex de papaya	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Ratón	(Satrija <i>et al.</i> , 1995)
Látex crudo de papaya	<i>Trichuris muris</i>	Ratón	(Stepek, <i>et al.</i> , 2006)
Sobrenadante del látex	<i>Hymenolepis diminuta</i>	<i>In vitro</i>	(Okeniyi, 2007)
Semillas	<i>Heterakis gallinarum</i>	Aves	(Tuesta, 2000)
Semillas	<i>Caenorhabditis elegans</i>		(Kermanshai <i>et al.</i> , 2001)
Extracto de éter de semillas	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Peces	(Ekanem <i>et al.</i> , 2004)

2.2.5 Aspectos biotecnológicos para la producción de vacunas en plantas transgénicas

2.2.5.1 Producción de vacunas en plantas transgénicas

Uno de los métodos más prometedores para la producción y entrega de anticuerpos es el uso de plantas transgénicas, estas son capaces de expresar genes de una amplia gama de virus y bacterias. Este concepto de vacunas basadas en plantas fue descrito por primera vez por (Curtis y Cardineau, 1990), implica el uso de células de plantas genéticamente modificadas. Los métodos que se utilizan principalmente para expresar antígenos en plantas son: la integración

genética en el genoma nuclear, tejido específicos en cloroplastos, y virus de ARN, se puede realizar expresión transitoria o de forma constitutiva (Lugade *et al.*, 2010). Las células vegetales tienen la capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales típicos de células eucariotas (Hernández *et al.*, 2007, Qiang Chen *et al.*, 2018). Algunas de las ventajas de vacunas que son expresadas en plantas transgénicas son la producción a bajos costos, producción a gran escala y alta seguridad debido a la falta de replicación de patógenos humanos en plantas (Curtis y Cardineau, 1990). Dado que la mayoría de las plantas son comestibles, estas son seguras para la administración oral, por lo que sirven como biofábricas y como vehículo de entrega (Rosales *et al.*, 2018). Un desafío importante para las vacunas basadas en plantas es la acumulación de suficiente antígeno para que el consumo de una dosis efectiva resulte en una respuesta inmunitaria protectora (Lugade *et al.*, 2010). En los últimos años, se han logrado prototipos de vacunas en hojas comestibles especialmente lechuga (*Lactuca sativa*), desarrollando el procesamiento de hojas o semillas, mediante liofilización para lograr la estabilidad y eficacia del antígeno después de un almacenamiento prolongado a temperatura ambiente. Sin embargo, el material liofilizado debe optimizarse para garantizar la consistencia y potencia como estrategia de expresión. Los métodos de procesamiento son parámetros clave que podrían tener gran impacto en la biodisponibilidad y eficacia (Chan y Daniell, 2015; Hernández *et al.*, 2014;). Además, tienen la capacidad para inducir una respuesta inmune específica y no requieren de personal capacitado para su administración por vía oral (Streatfield *et al.*, 2003). Con vacunas orales se incrementa la probabilidad de adquirir inmunidad contra los agentes infecciosos que entran el cuerpo a través de una superficie mucosa, como los tejidos que recubren la boca, la nariz y el esófago (Gómez *et al.*, 2002, Streatfield, 2006).

Entre algunos ejemplos de proteínas y antígenos de interés en vacunación expresados en plantas transgénicas figura: la proteína heterodimérica (E1E2) del virus de la hepatitis C (VHC) producida en plantas de tabaco (Clarke *et al.*, 2017), la proteína de la cápside del VIH-1, el antígeno p24 expresado en *Arabidopsis thaliana* y *Daucos carota* (zanahoria) (Lindh *et al.*, 2014), las proteínas HPV16-L1 y LTB expresadas en hojas de tabaco para el desarrollo de una vacuna para disminuir las infecciones por HPV16 (Virus del papiloma humano-tipo 16) (Hongli *et al.*, 2013), la expresión del antígeno VP40 del virus del Ébola en

plantas de tabaco (Monreal *et al.*, 2017) y la proteína de fusión del ántrax (CMG2- Fc) en *Nicotiana benthamiana* (Sukenic *et al.*, 2018).

2.2.5.2 Cultivo *in vitro* de plantas transgénicas

El cultivo *in vitro* de células y tejidos es una fuente alternativa para la producción de moléculas de interés a partir de plantas. Diversas estrategias *in vitro* han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar el contenido de metabolitos, e incluyen técnicas destinadas a introducir, multiplicar y regenerar material vegetal en condiciones controladas y asépticas. Esto se logra en un medio de cultivo apropiado con las características fisicoquímicas y la adición de nutrientes y reguladores de crecimiento (fitorreguladores), para generar callos, desarrollar yemas o embriones. Los callos se pueden definir como masas de tejido parenquimatoso indiferenciado en crecimiento activo, que son inducidos por fitorreguladores para mantener el estado indiferenciado en medio de cultivo sólido. Los fitorreguladores son los responsables de la distribución de los compuestos que las células biosintetizan (Dodds y Roberts, 1995). Uno de los principales usos del cultivo de callos es para desarrollar suspensiones celulares. En muchos casos, para obtener suspensiones celulares finas, es adecuado aumentar la friabilidad del tejido por incremento de la concentración de auxinas o disminución de citoquininas en el medio de cultivo. Los callos friables son dispersados en matraces en medio de cultivo líquido, en un ambiente uniforme, eliminando los gradientes de nutrientes y teniendo un control de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto, y garantizando su disponibilidad mediante agitación en agitadores orbitales, con el fin de ayudar a la dispersión de las células, y a su vez promover un crecimiento rápido (Weathers *et al.*, 2010). Las velocidades de agitación oscilan entre 30 y 150 rpm dependiendo de la especie vegetal y el volumen de operación (Dixon *et al.*, 1991).

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. Estos funcionan protegiendo a las proteínas de la degradación y evitando la precipitación (Hellwing y Drossard., 2004).

2.2.5.3 Características de las células en suspensión

Los cultivos de células en suspensión son heterogéneos en las formas celulares, normalmente contienen tanto células libres como agregados celulares. La proporción entre ambos, así como su tamaño, dependen de la especie vegetal, edad del tejido en cultivo, composición del medio y condiciones de crecimiento (Habeych *et al.*, 2003). El tamaño promedio de las células en suspensión oscila entre 25 y 475 μm dependiendo de su morfología. En las suspensiones celulares se distinguen células de morfología diversa, tanto redondeadas como alargadas. En el primer caso, son células meristemáticas indiferenciadas (células no especializadas en ningún tipo celular), con envoltura nuclear definida, núcleo grande que puede ocupar alrededor de las tres cuartas partes del volumen total de la célula. Su forma varía entre isodimétrica cúbica y generalmente no poseen vacuola. En el segundo caso, son células parenquimáticas, probablemente están especializadas para llevar a cabo una función y no pueden transformarse en otro tipo celular, son de mayor tamaño que las meristemáticas, poseen plastidios, una vacuola grande y pared celular delgada o de mediano grosor, que les permite el transporte de nutrientes a corta distancia. Al observar al microscopio, es posible encontrar células meristemáticas durante las primeras etapas de la cinética celular y luego células parenquimáticas en las etapas subsecuentes. La síntesis de sustancias, como metabolitos secundarios es una característica predominante de las células en la fase estacionaria, y al final de la cinética el tamaño de éstas tiende a aumentar debido a la vacuolización y (Roca y Mroginski, *et al.*, 1991).

2.2.5.4 Cinética de crecimiento celular

Para el mantenimiento de una suspensión celular en crecimiento continuo, es necesario identificar el momento apropiado en que los nutrientes del medio de cultivo se agotan. Se realiza un subcultivo en medio fresco o un cambio de determinado volumen del medio de cultivo para continuar en crecimiento continuo. Esto puede ser determinado a partir de una curva de crecimiento celular con respecto al tiempo, que depende a su vez de la cantidad de inóculo utilizado y de la composición del medio de cultivo (Pérez, 2010).

La curva de crecimiento típica de células vegetales en suspensión presenta las siguientes fases que se indican en la (figura 5). I) lag, II) exponencial, III) estacionaria, IV) muerte.

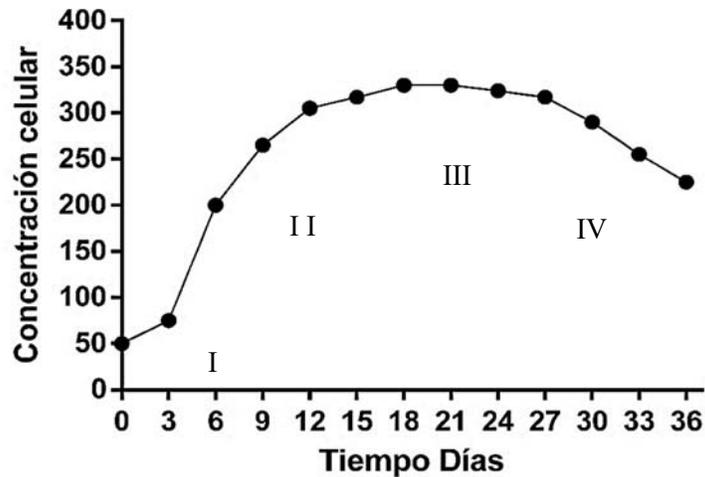


Figura 5. Fases del crecimiento celular. I Lag, II Exponencial, III Estacionaria, IV Muerte (tomado de Pérez, 2010).

3. ANTECEDENTES

En un trabajo previo publicado por Hernández *et al.*, (2007) se realizó la transformación de callos embriogénicos de papaya (*Carica papaya* L.), utilizando tres construcciones genética para la expresión de los péptidos recombinantes, KETc1, KETc12 y KETc7, que constituyen la vacuna contra la cisticercosis S3Pvac. Se obtuvieron clonas transgénicas que contenían los péptidos y fueron evaluadas en experimentos de vacunación en el modelo de cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*. El extracto de las clonas transgénicas que expresan los péptidos KETc1, KETc12 y KETc7 presentaron un 50%, 80 y 63% en el número de ratones totalmente protegidos ante el desafío con *T. crassiceps*. Recientemente se ha notificado la efectividad de esta vacuna administrada oralmente a ratones y cerdos en un intervalo de dosis amplio y formulado con diferentes vehículos (Fragoso *et al.*, 2017). Esta protección va acompañada de un aumento de anticuerpos anti-S3Pvac y la proliferación de linfocitos. Se demostró la eficacia de la vacuna utilizando la plataforma de papaya para la inmunización oral, induciendo inmunidad efectiva contra la cisticercosis murina, y evidenciando su capacidad inmunogénica en cerdos (Fragoso *et al.*, 2017).

3.1 Adaptación de callos de *Carica papaya* Línea transgénica C23

En el trabajo de García (2015) se optimizó el medio nutritivo, para el establecimiento del cultivo de callos de *C. papaya* de la clona 23 que expresa el péptido KETc7. Los medios de

cultivo contenían sales de (Murashige y Skoog, 1962) al 100 % (MS) y Gamborg (B5), 30 g L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbono, vitaminas, myo-inositol, polivinilpirrolidona (PVP) y como agente gelificante se agregó fitagel (SIGMA); el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 . Los callos fueron crecidos en condiciones de luz constante y oscuridad, subcultivados cada 20 días, una vez observando los callos que mejor crecían en este medio se les adicionó fitorreguladores de crecimiento para evitar que se generaran embriones. Las mejores combinaciones fueron ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina a diferentes concentraciones (figura 6), tomada de tesis de licenciatura de García, 2015.

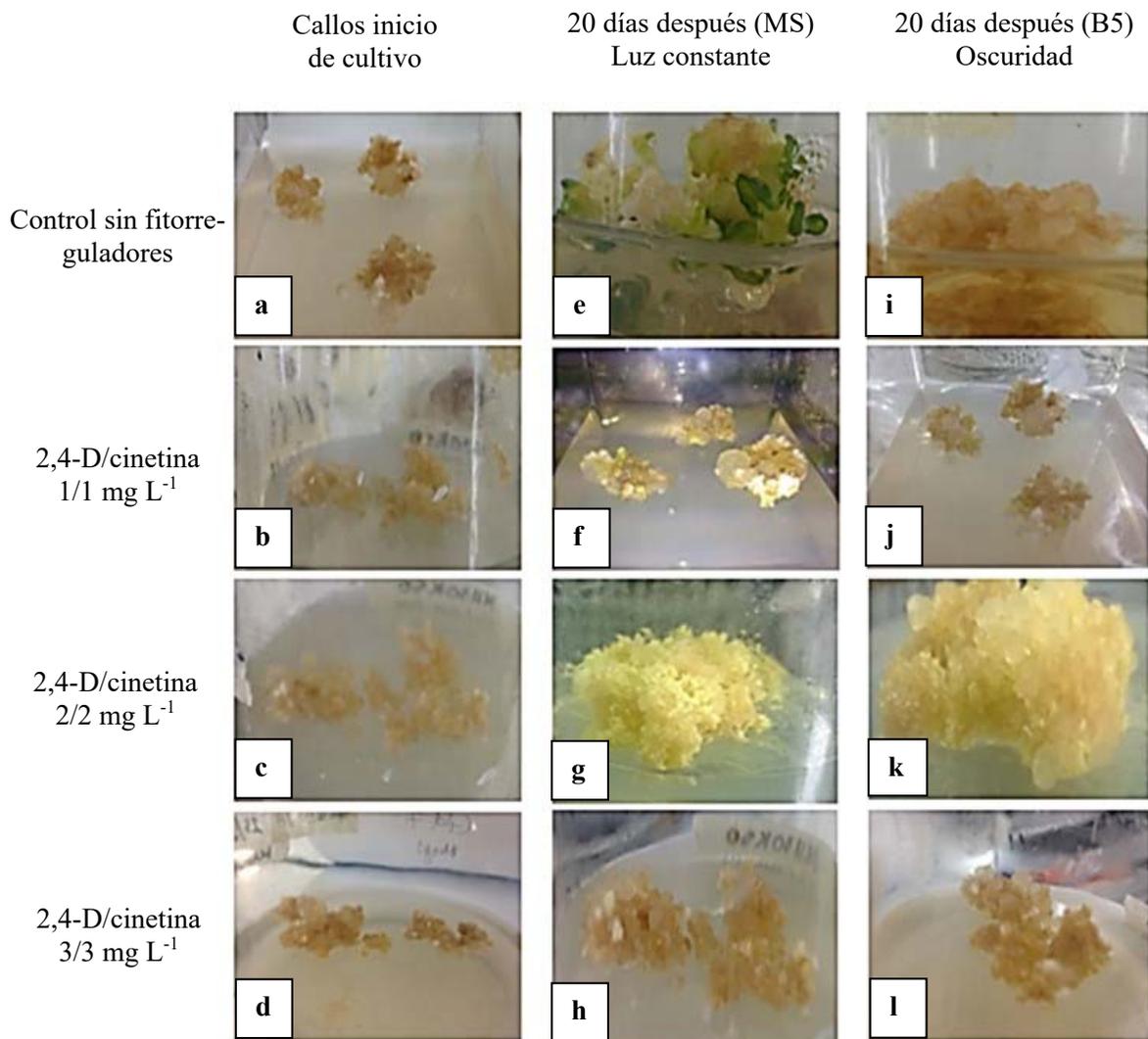


Figura 6. Efecto de los fitorreguladores 2,4-D y cinetina sobre la línea transgénica C23 de *Carica papaya*. Tomado de (García, 2015).

La concentración óptima de fitorreguladores fue de (2,4-D:CIN) 2 mg L⁻¹, se continuó utilizando el medio (B5) en condición de oscuridad para obtener callos friables de *Carica papaya* (figura 6 k). Estos callos fueron subcultivados y colocados en frascos de 250 mL, con un volumen de trabajo de 50 mL de medio de cultivo y suplementado con PVP 3 g L⁻¹, manteniéndose a 25°C en condición de oscuridad.

En el presente proyecto se planteó el establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Carica papaya* cultivo silvestre WT y la línea transgénica C23 que expresa al péptido KETc7. Se analizó el crecimiento en condición de oscuridad, determinando parámetros cinéticos, y se estudió su actividad nematocida contra el nematodo parásito de ovinos *H. contortus*, que representa un nematodo de ovinos de gran importancia socio-económica en diversas partes del mundo, incluyendo México.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las enfermedades parasitarias son uno de los problemas más graves que repercuten en la salud humana y en la productividad en el área pecuaria. Esto se ve reflejado principalmente en países en vías de desarrollo y subdesarrollados, donde se han buscado estrategias de control y prevención; sin embargo, no han tenido el todo éxito que se esperaba. En la última década los productos químicos utilizados para el control de enfermedades parasitarias y el uso indiscriminado de los antihelmínticos han provocado el desarrollo de poblaciones resistentes; en adición, los residuos de estos pueden ser tóxicos para organismos benéficos y bioacumulados en el ecosistema. México es uno de los países con más índice de problemas en salud humana y pecuaria causada por parásitos como metacestodos de *Taenia solium* (cisticercos) que generan enfermedades a nivel del sistema nervioso central, siendo la causa más frecuente de epilepsia esto ocurre también en otros países de América Latina, Asia y África. La cisticercosis se ha convertido en un grave problema de salud pública causante de importante morbilidad y mortalidad de acuerdo con la OMS. Con respecto a la nematodiasis gastrointestinal en el ganado ovino *H. contortus*, causa graves pérdidas económicas por el retraso de crecimiento del animal, desnutrición, baja conversión alimenticia y en algunos casos la muerte de los animales más afectados, generando pérdidas económicas importantes en el área pecuaria en México y en otros países productores de carne de ovino. Ante estos problemas mencionados se genera la necesidad de desarrollar propuestas que permitan prevenir el control de parásitos desde una perspectiva biotecnológica, que sea sostenible y amigable con el ambiente. Por ello, se han propuesto alternativas como el uso de células vegetales con capacidad antiparasitaria como las provenientes de *C. papaya*, que pueden ser administradas de forma oral.

5. HIPÓTESIS

Las células de *Carica papaya* de la línea silvestre (WT) y la línea transgénica (C23) se pueden producir masivamente en cultivos en suspensión y poseen propiedad nematicida.

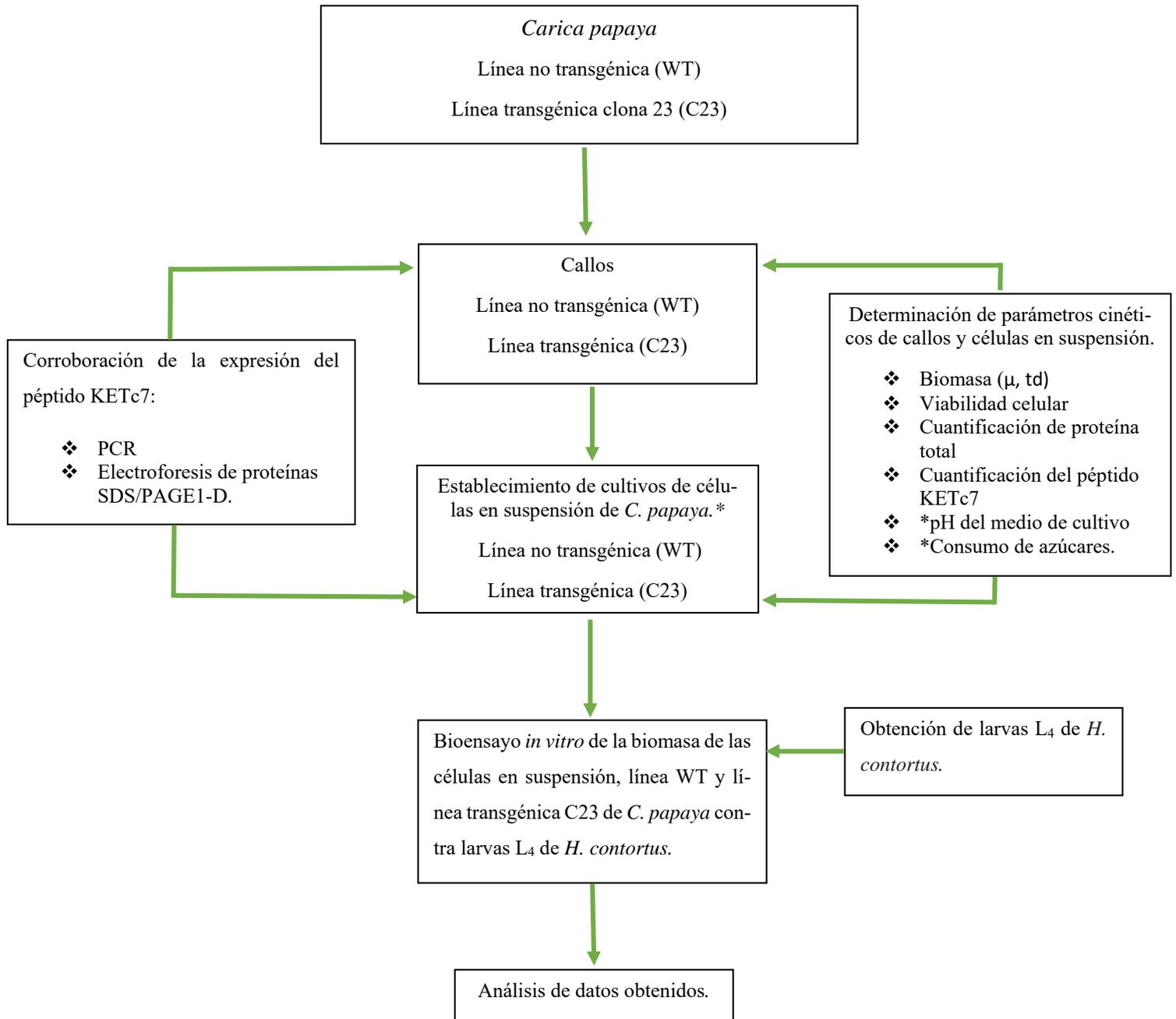
6. OBJETIVO GENERAL

Optimizar el crecimiento de células en suspensión de la línea silvestre (WT), y de la línea transgénica C23 de *Carica papaya* que expresa el péptido KETc7, y evaluar sus propiedades antiparasitarias.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Mantener subcultivos de callos de la línea WT y línea transgénica C23 de *Carica papaya*, para establecer cultivos en suspensión.
- ❖ Optimizar las condiciones de crecimiento de cultivos en suspensión de la línea WT y C23 de *Carica papaya*.
- ❖ Realizar cinéticas de crecimiento y establecer los parámetros óptimos para el crecimiento de la línea WT y línea transgénica C23 de *Carica papaya* y por consiguiente la producción del péptido KETc7.
- ❖ Realizar la identificación y cuantificación del péptido KETc7 por ensayo de ELISA.
- ❖ Evaluar el cultivo de células en suspensión que expresan el péptido KETc7 contra larvas L4 del nematodo parásito de ovinos *Haemonchus. contortus* bajo condiciones *in vitro*.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Mantenimiento de callos de *Carica papaya* línea no transgénica (WT) y línea transgénica 23 (C23)

El crecimiento celular de *C. papaya* clona transgénica 23 (KETc7) en sólido (callos) fue establecido por García, (2015) en medio de cultivo B5 más fitorreguladores, por lo que se continuó trabajando bajo las mismas condiciones. Un subcultivo de callo de la línea no transgénica de *Carica papaya* (WT) y de la clona transgénica C23, se sembró en frascos de vidrio de 250 mL, con un volumen de trabajo de 50 mL de medio B5, 3 g L⁻¹ de PVP, 30 g L⁻¹ de sacarosa, fitorreguladores 2,4-D, cinetina 2 mg L⁻¹, 2.8 g L⁻¹ de fitagel y 1 g de biomasa. Una vez sembrados los cultivos se colocaron a 25°C en condición de oscuridad.

8.2 Establecimiento y optimización de células en suspensión de *Carica papaya* línea no transgénica (WT) y línea transgénica (C23)

Las suspensiones celulares se obtuvieron a partir de un subcultivo de callos friables de *C. papaya* WT y de la clona transgénica C23, los cuales se transfirieron a matraces con baffles laterales; cada uno con un volumen de trabajo de 100 mL de medio B5, 3 g L⁻¹ de PVP, 30 g L⁻¹ de sacarosa a un pH 5.7, fitorreguladores 2-4, D, cinetina 2 mg L⁻¹ y 3 g de biomasa. Los matraces se mantuvieron a una velocidad de agitación de 100 rpm, durante 20 días. Se colocaron 3 matraces bafleados para WT de *C. papaya* y 3 matraces para la línea transgénica C23 en condición de oscuridad sembradas cada 15 días, para continuar con la propagación y aumento de biomasa.

8.3 Identificación del péptido KETc7 en cultivos en suspensión de *Carica papaya*

8.3.1 Electroforesis de proteínas en gel desnaturizante (SDS-PAGE)

La expresión del péptido se confirmó por electroforesis desnaturizante en concentración 12-5% poliacrilamida. La corrida electroforética se llevó a cabo a 50-75 V durante 90 min. Una vez terminada la electroforesis el gel fue transferido a una solución de Coomassie (25%

isopropanol, 10% ácido acético y 0.2 de azul de coomassie R-250) durante 30 min. Posteriormente se retiró el coomassie y se agregó una solución desteñidora (10% ácido acético, 30 % Metanol, y 60% H₂O grado mili-Q).

8.3.1.1 Tinción de plata

Partiendo de la solución desteñidora, se retiró y se agregó etanol al 20% por 20 min. Se realizó un lavado con H₂O grado mili-Q y se agregó tiosulfito de sodio 0.2 g L⁻¹. Se realizó nuevamente un lavado y se dejó en una solución de nitrato plata 2 g L⁻¹. Posteriormente el gel fue revelado con una solución de (carbonato de sodio 30 g L⁻¹, formaldehído 1.4 mL L⁻¹ y tiosulfito de sodio 10mg L⁻¹. Finalmente, el gel fue leído en fotodocumentador.

8.4 Cinética de crecimiento de callos de *C. papaya* WT y línea transgénica C23

Para la cinética de crecimiento de *C. papaya* WT y línea transgénica C23 en callo, se utilizaron frascos de vidrio con un volumen de trabajo de 50 mL de medio B5 con suplementado con fitorreguladores 2,4-D:CIN, 2 mg L⁻¹ respectivamente y 0.5 g de biomasa inicial. Se mantuvieron a una temperatura constante de 25°C en condición de oscuridad, durante 30 días, se realizaron tres repeticiones para la clona transgénica 23 y una repetición WT de *C. papaya* para cada punto (cada 5 días).

8.5 Cinética de crecimiento de células en suspensión de *C. papaya* WT y línea transgénica C23

Para la cinética de crecimiento de células en suspensión de *C. papaya* WT y línea transgénica C23, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL de medio B5 suplementado con fitorreguladores 2,4-D:CIN 2mg L⁻¹, 6 % de inóculo. Se mantuvieron a una temperatura constante a 25°C y velocidad de agitación de 100 rpm, en condiciones de oscuridad durante 42 días. Se realizaron tres repeticiones de la clona transgénica. Cada tercer día se tomaron muestras y una repetición para WT de *C. papaya* debido a que su crecimiento es más lento que un cultivo transformado genéticamente. Se tomaron muestras cada 6 días.

8.6 Evaluación del crecimiento celular de *C. papaya* WT y línea C23

8.6.1 Análisis de la biomasa (peso fresco)

Para determinar el peso fresco (PF) en callos, la biomasa se retiró del medio de cultivo y se colocó en una charola de plástico llevado previamente a peso constante y posteriormente se pesó. Para las células en suspensión se filtró la biomasa de cada matraz y se pesó en una balanza analítica, se tomaron 2 g de biomasa por cada punto para ser procesado, el resto de biomasa se congeló y almacenó a -70°C para su posterior análisis.

8.6.2 Análisis de la biomasa (peso seco)

La biomasa congelada se liofilizó por 72 h por cada muestra, hasta llegar a peso constante y se pesó en una balanza analítica. Con los datos obtenidos se calculó la media y desviación estándar, se realizaron las gráficas correspondientes a las cinéticas de crecimiento peso fresco (PF) y peso seco (PF) en función del tiempo. A partir de éstas se calculó la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) de las células mediante 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

8.7 Determinación de pH del medio

Para determinar el pH del medio de cultivo de ambas líneas celulares durante la cinética, se utilizó el potenciómetro Orion modelo 4110A.

8.8 Viabilidad celular de *C. papaya* WT y línea C23

Se determinó de manera indirecta a través de la integridad de la membrana, utilizando la técnica de Diacetato de fluoresceína (DAF) (Wildholm, 1972). Para preparar la solución, se pesaron 5 mg de DAF y se disolvieron en 1 mL de acetona, almacenándose a 4°C. Una alícuota de 0.1 mL del stock se adiciono a 5 mL de agua desionizada. Posteriormente, se tomaron 500 µL de esta última dilución y se mezcló con una muestra de callo o en 500 µL para suspensión celular, se dejó reposar por 1 min, después se tomaron 50 µL y se colocó en un portaobjetos para ser observada al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E 400, Super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF).

8.9 Cuantificación de azúcares totales del medio de *C. papaya* WT y línea C23

Para la cuantificación de azúcares totales de *C. papaya* WT y línea transgénica C23 se determinaron las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa en el medio de cultivo. Se realizaron curvas de calibración de los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) para determinar la concentración utilizando High Performance Liquid Chromatography (HPLC) con el equipo (Waters 7117 plus Autosampler). Se utilizó una columna amino UG80, tamaño 5 µm (4.6 mm x 150 mm). Las condiciones fueron: fase móvil (80:20), acetonitrilo: agua grado HPLC y un flujo de operación de 1mL/min a 25°C.

8.10 Cuantificación del péptido KETc7 de *C. papaya* línea transgénica C23

8.10.1 Extracción de proteína de cultivos de callos y células en suspensión de *Carica papaya* línea transgénica C23

Para la extracción del péptido KETc7 de cultivos de *C. papaya* de callo y células en suspensión de la línea transgénica C23, se utilizó el buffer de extracción (Franklin Scott *et al.*, 2002): 750 mM Tris HCl, 15 % Sacarosa, 100 mM β-mercaptoetanol, 1 mM fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF). A la muestra previamente congelada se le añadieron 500 µL de buffer de extracción frío por cada 50 mg aprox. La muestra se maceró en un mortero (frío) mezclando con el buffer. Al terminar se pasó a tubos de 1.5 mL, se agitó durante unos minutos, se centrifugó por 20 min a 8000 rpm a 4°C, se colecto el sobrenadante y se almaceno a -70°C.

8.10.2 Cuantificación de proteínas del cultivo de callos y células en suspensión de *C. papaya* WT y C23 por el método de Lowry

Para la cuantificación de proteína total de los extractos obtenidos de los cultivos de callos y células en suspensión de *C. papaya*, se realizó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

8.10.3 Ensayo de Elisa para cuantificar el péptido KETc7

Se realizaron ensayos de Elisa, se utilizaron los extractos de *C. papaya* WT y línea transgénica C23 por triplicado (C23.1₍₀₋₃₀₎), (C23.2₍₀₋₃₀₎), (C23.3₍₀₋₃₀₎), la concentración utilizada de los extractos fue 1 µg/pozo de proteína total. Se utilizaron dos sueros el normal de ratón y el suero obtenido de la inmunización en ratones (suero policlonal). Se utilizó la proteína recombinante como control positivo a una concentración de 500 ng. Para realizar este ensayo, primero se realizó la sensibilización con los extractos en buffer de carbonatos pH 9.6, durante toda la noche a 4°C, al día siguiente se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.3 %. Se bloqueó con PBS-BSA 1 % Tween 0.3 % 200 µL por pozo por 1 hora a 37°C, se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.3 %. Se agregó el suero de ratón y anti KETc7 una dilución 1:150 en PBS-BSA 1 % Tween 0.3 %, 100 µL por pozo por 1 hora a 37°C, se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.3 % y se agregó el anticuerpo conjugado: Zymax Goat anti-IgG (H+L) de ratón-HPR (peroxidasa) una dilución 1:5000 en PBS-BSA 1 % Tween 0.3 %, 100 µL por pozo por 1 hora a 37°C, se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.3 %. Se agregó el sustrato TBM 100 µL por pozo a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 0.2 M 100 µL por pozo y se realizó lectura a 450 nm.

8.11 Evaluación *in vitro* de la X_{PS} de la línea transgénica C23 contra larvas L₄ del nematodo parásito *Haemonchus contortus*

8.11.1 Producción de larvas infectantes de *H. contortus*

Para obtener larvas infectantes (L₃) de *H. contortus*, se seleccionó un ovino libre de parásitos. El ovino fue infectado vía oral con 350 larvas (L₃) por Kg de peso, fue mantenido bajo condiciones controladas de alojamiento y alimentación en el Laboratorio de Helminología CE-NID-SAIT, INIFAP. A los 21 días después de la infección se recolectaron las heces en donde

están almacenados los huevos con ayuda de una palangana, y se prepararon medios de cultivo con condiciones adecuadas para la obtención de larvas infectantes. A los 7 días de incubación se recuperaron las larvas por la técnica de embudo Baermann (Casillas, *et al.*, 2008).

8.11.2 Desenvaine de larvas infectantes L₃ de *H. contortus*

Para desenvainar las larvas (L₃) se utilizó hipoclorito de sodio comercial al 6 %; se prepararon 10 mL a 0.187 % donde las larvas fueron resuspendidas por 9 min. Después se realizaron 4 lavados con agua destilada y se centrifugó durante 1 min a 2500 rpm entre cada lavado para eliminar el hipoclorito de sodio. Una vez lavadas las larvas, se recuperó el pellet formado en tubos Falcón de 15 mL.

8.11.3 Mantenimiento de desarrollo larvas infectante L₃ en larvas L₄ de *H. contortus*

Después de recuperar las larvas L₃ se continuó con el desarrollo *in vitro*, se mantuvieron en incubadora bajo condiciones controladas a 37 °C en solución salina de Hanks, adicionando con 8 µL de eritrocitos con 5 % de CO₂, aireación y cambio de medio cada tres días hasta obtener el estadio L₄.

8.11.4 Preparación de antihelmíntico Ivermectina

La ivermectina grado analítico (18898-1G. MKBZ1802V) fue obtenida de SIGMA-ALDRICH (México). Se preparó una solución stock de ivermectina a una concentración de 10 mg/mL en una solución de tritón 100x y etanol grado analítico al 2.0 % y 98 %, respectivamente. De esa solución se dejó evaporar el etanol, quedando disuelto en su totalidad el fármaco, se agregó agua destilada para ajustar el volumen, quedando a la concentración deseada (Reyes, *et al.*, 2017).

8.11.5 Preparación de biomasa de la línea WT y línea transgénica C23 *C. papaya*

Se utilizaron las muestras obtenidas en la cinética de crecimiento y previamente liofilizadas, se pesó de cada muestra 1mg y se disolvió en 1 mL de PBS pH 7.4. Posteriormente se centrifugo a 3500 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se almaceno a -20°C.

8.11.6 Confrontación de la biomasa X_{PS} de la línea transgénica C23 contra larvas L₄ del nematodo *H. contortus*

Para la evaluación de la actividad nematocida de la biomasa de la línea transgénica C23 contra larvas L₄ de *H. contortus*, se analizaron 4 muestras de WT (0, 12, 30, 42 días de crecimiento) de *C. papaya* y 15 muestras de biomasa C23 (0,3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42 días de crecimiento). Se utilizaron placas de microdilución de 96 pozos (figura 7). Se preparó cada muestra a una concentración de 1 (mg/mL) diluida en PBS pH 7.4. Se colocó un promedio de 100 larvas L₄ en 20 μ L y 80 μ L de cada muestra en un volumen final de 100 μ L por pozo. Se utilizó como control muestras WT de *C. papaya*, PBS pH 7.4 y medio Hanks; como control positivo ivermectina grado analítico a una concentración de (5 mg/mL). Se realizaron 6 pseudoréplicas para cada tratamiento (muestra), las placas se cubrieron y se incubaron por 72 h a una temperatura de 37 \pm 1°C. Posteriormente se realizó la lectura, se analizó la viabilidad de las larvas con un microscopio Digital/Digi 2, 15000 Labomell (10X) para determinar el porcentaje de mortalidad.



Figura 7. Bioensayo de la biomasa de *C. papaya* C23 contra larvas L₄ de *Haemonchus contortus*.

8.12 Análisis estadístico

Para realizar la estadística descriptiva de los datos obtenidos y los subsecuentes análisis se utilizó el programa SAS V9.

Para el estudio de la cinética de crecimiento y cuantificación de proteína total de la línea transgénica C23 se realizaron 3 repeticiones de cada muestra, el análisis estadístico que se llevó a cabo fue un diseño completamente al azar. Adicionalmente se realizó la prueba complementaria de Tukey con un nivel de significancia de 0.5 para comprobar diferencias significativas entre los días de cultivo.

Para determinar el porcentaje de mortalidad en el bioensayo de confrontación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad de larvas infectantes} = \frac{X \text{ testigo} - X \text{ tratado}}{X \text{ testigo}} \times 100$$

Para analizar los datos obtenidos en porcentaje de mortalidad se les realizó transformación angular (arco-seno), la cual se utiliza para valores expresados en porcentajes o proporciones. Para transformar los datos se obtiene el arco seno (inverso del seno) de la raíz de la proporción (*ar cos eno p*), siendo p el valor proporcional de los datos originales (los porcentajes deben dividirse entre 100).

Para larvas de *H. contortus*:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Tratamiento}_i + \text{Concentración}_j + \text{Nematodo} + \text{Error}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable respuesta % de mortalidad.

μ = Media general.

Tratamiento_i = Efecto del tratamiento (Biomasa liofilizada de *C. papaya*) WT o C23

Error = Error modelo

Adicionalmente, también se realizó la prueba complementaria de Tukey con un nivel de significancia de 0.5 para comprobar diferencias significativas entre los días de cultivo de la biomasa.

9. RESULTADOS

9.1 Mantenimiento y propagación de biomasa de *Carica papaya*

9.1.1 Callos celulares de *C. papaya* línea WT

Para mantener vivos los cultivos celulares éstos fueron subcultivados en medio (B5+2,4-D:CIN) 2mg L^{-1} como se indicó en la metodología. Después de haber realizado 2 resiembras, se obtuvieron callos de color beige, textura blanda y consistencia friable (figura 8 d), con esas características los cultivos estaban listos para iniciar las suspensiones celulares.

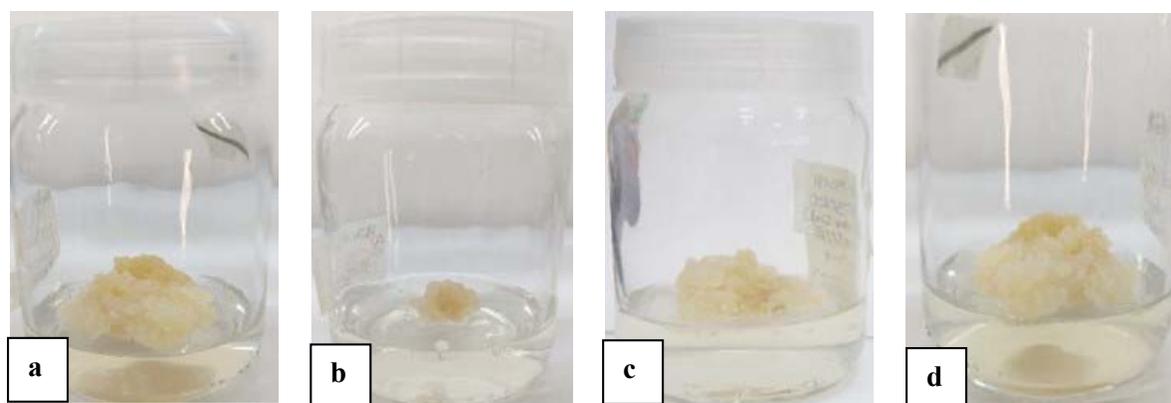


Figura 8. Crecimiento de callos WT de *C. papaya*. a) inoculo, b) día 1, c) día 16, d) día 20.

9.1.2 Callos celulares de *C. papaya* línea transgénica C23

Los cultivos de callos de la línea transgénica C23 fueron propagados y después de 2 subcultivos se obtuvieron callos de consistencia friable para el establecimiento de suspensiones celulares (figura 9 d).

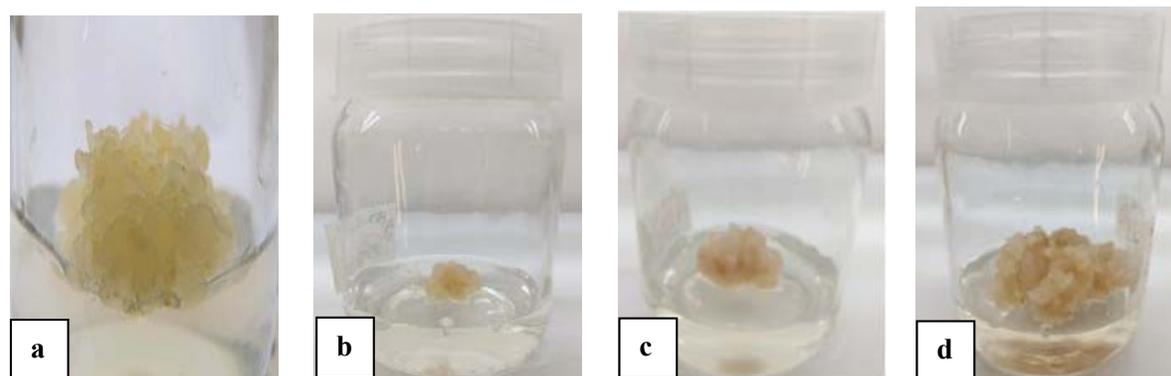


Figura 9. Crecimiento de callos de línea transgénica C23 de *C. papaya*. a) inoculo, b) día 1, c) día 16, d) día 20.

9.1.3 Células en suspensión de *C. papaya* línea WT

Para establecer los cultivos en suspensión, se inició con la disgregación de callos en medio líquido (B5+2,4-D:CIN) 2 mg L^{-1} utilizando matraces con baffles laterales (figura 10 bf), los cuales permiten la disgregación de callos y favorecen el crecimiento individual de las células. Al cabo de 30 días se transfirieron los cultivos a matraces Erlenmeyer puesto que se tenía alta disgregación (figura 10 d).

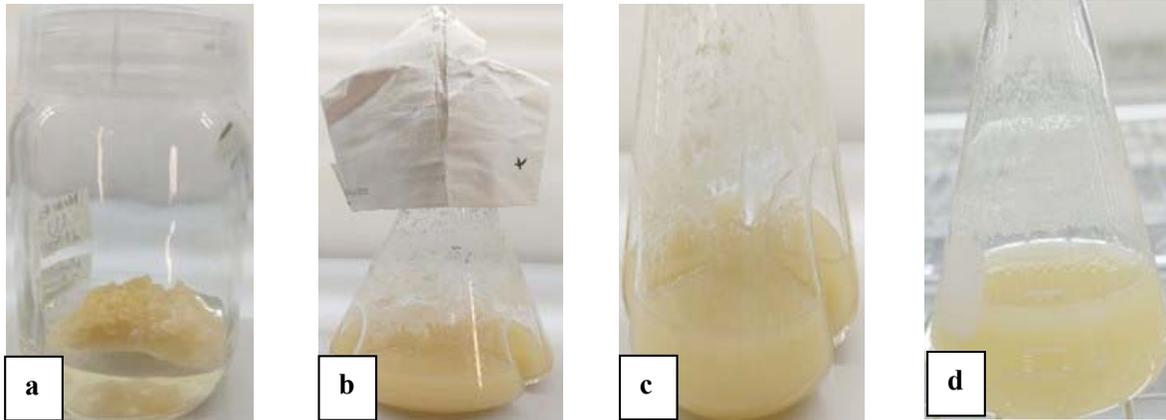


Figura 10. Cultivo de células en suspensión de la línea WT de *C. papaya*. **a)** inoculo, **b)** cultivo 12 días, **c)** cultivo 30 días, **d)** cultivo homogéneo 8 semanas.

9.1.4 Células en suspensión de *C. papaya* línea transgénica C23

Para establecer los cultivos en suspensión se realizó el proceso de disgregación de callos en medio líquido (figura 11 b, c), después de 20 días los cultivos se transfirieron a matraces Erlenmeyer. La alta friabilidad que presentaron los callos (figura 11 a) garantiza una suspensión celular altamente fina y disgregada, favoreciendo así el crecimiento individual de las células (figura 11 d).

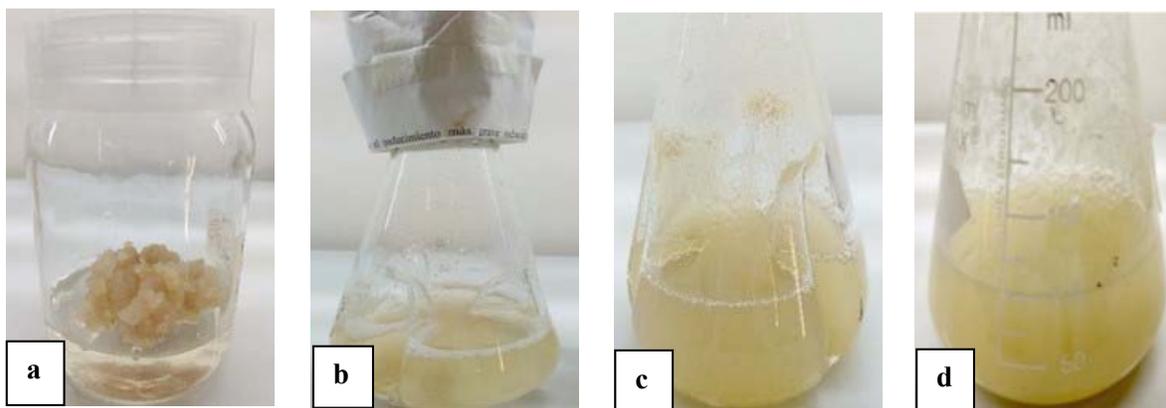


Figura 11. Cultivo de células en suspensión de la clona transgénica 23 de *C. papaya*. **a)** inoculo, **b)** cultivo 12 días, **c)** cultivo 20 días, **d)** cultivo homogéneo 8 semanas.

9.2 Corroboración de la expresión del péptido KETc7 en cultivos en suspensión de *Carica papaya*

Una vez establecido el cultivo de células en suspensión de la clona transgénica C23 KETC7 de *C. papaya*, se procedió a corroborar la presencia del transcrito del péptido KETc7. Estos experimentos fueron realizados por la Dra. Marisela Hernández, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Para ello, se realizó un Polimerase Chain Reaction (PCR), En el carril 6 y 7 de la figura 12 se observa el fragmento esperado que corresponde con el fragmento del inserto en el carril 10. De esta manera se corrobora la inserción del inserto KETc7/pUI235 en los cultivos de células en suspensión al tiempo 0 y a los 10 días de crecimiento (figura 12).

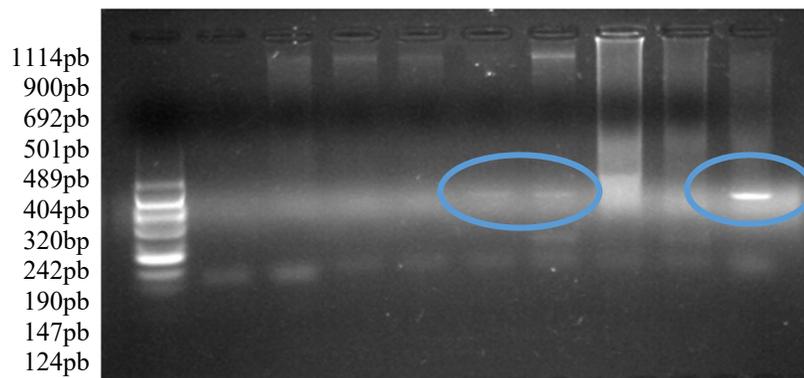


Figura 12. Gel 1.5% TBE 1X. En el carril 1. PM VIII, 2. Primer, 3. Fruto 3186, 4. WT₀ *C. papaya*, 5. WT₁₀ *C. papaya*, 6. C23₀ *C. papaya*, 7. C23₁₀ *C. papaya*, 8. ADN genómico de *T. Crassiceps*, 9. ADN genómico de *T. solium*

La identificación del péptido KETc7 en el cultivo de células en suspensión línea transgénica C23 (0 y 10 días de crecimiento), se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con la muestra desnaturalizada, la cual generó una banda con un peso molecular de 14.5 kDa aproximadamente (figura 13). Esto confirmó la expresión del péptido en los cultivos en suspensión de la línea transgénica C23.

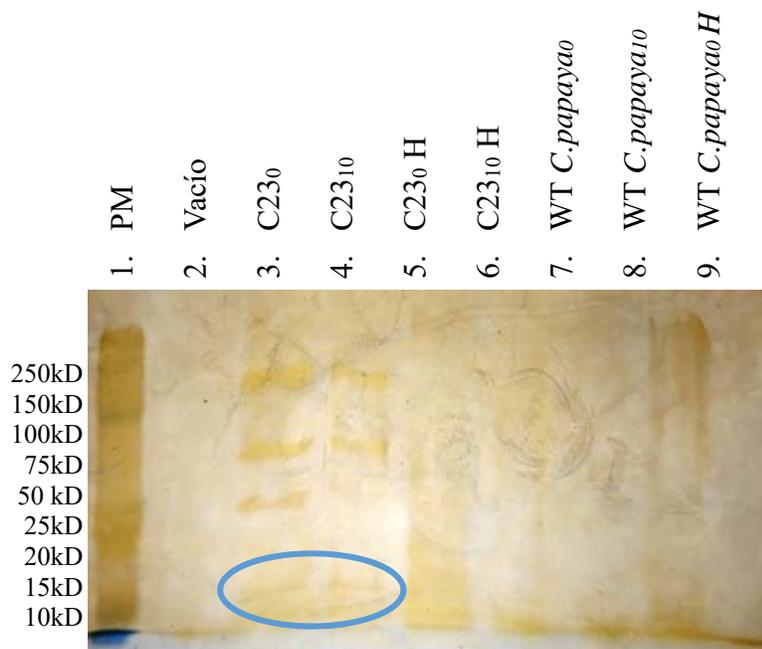
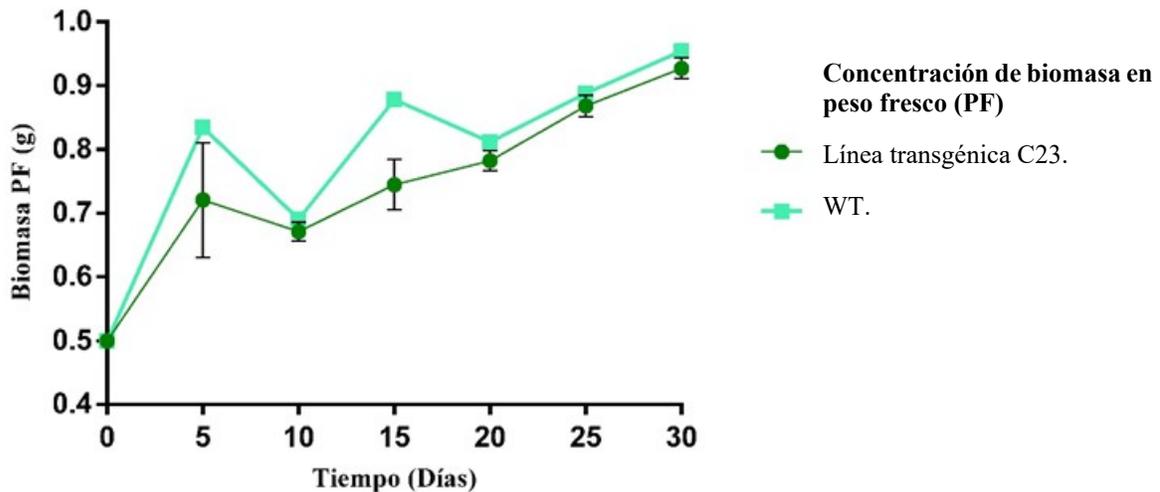


Figura 13. Electroforesis SDS/PAGE1-D. En el carril 1. PM, 2. Vacío, 3. C23₀, 4. C23₁₀, 5. C23₀ H, 6. C23₁₀ H, 7. WT *C. papaya*₀, 8. WT *C. papaya*₁₀, 9. WT *C. papaya*₀ H.

9.3 Evaluación de crecimiento de callos de *C. papaya* WT y línea transgénica C23

Para establecer las condiciones de crecimiento celular y análisis de producción del péptido KETc7, se realizaron cinéticas de crecimiento de callos WT y línea transgénica C23. Cabe resaltar que los datos reportados a continuación solo se expresaron en peso fresco (X_{PF}), puesto que el inóculo inicial fue de 0.5 g y la biomasa obtenida fue utilizada para análisis posteriores. Los resultados de la cinética mostraron que al día 30 del cultivo, la línea WT presentó un crecimiento celular de 0.095 g y la línea transgénica C23 un crecimiento celular de 0.092 g, siendo que la obtención de biomasa podría estar asociado directamente al tamaño del inóculo. El comportamiento cinético de ambas líneas de callos mostró una fase de crecimiento exponencial entre el día 10 al día 30. Debido a que el agregado celular no estuvo en

contacto directo con los nutrientes, se consideró como un crecimiento lento y limitado por el medio de cultivo sólido. Por lo que el tiempo establecido de la cinética no fue suficiente para determinar la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación, pues a este tiempo no se visualizó el inicio de la fase estacionaria la cual era requerida para determinar los parámetros antes mencionados (gráfica 1).



Gráfica 1. Curvas tiempo-concentración de biomasa cultivo de callos de *C. papaya*.

Las características morfológicas de los cultivos celulares de *C. papaya* WT y C23 observadas al microscopio de epifluorescencia mostraron la viabilidad celular como se indica en la (figura 14 b, d). Principalmente se observaron células con morfología alargada en forma de cadena. Esta ha sido descrita por Curtis y Emery., 1993 relacionado con las características del medio de cultivo para al menos 10 especies vegetales cultivadas *in vitro*.

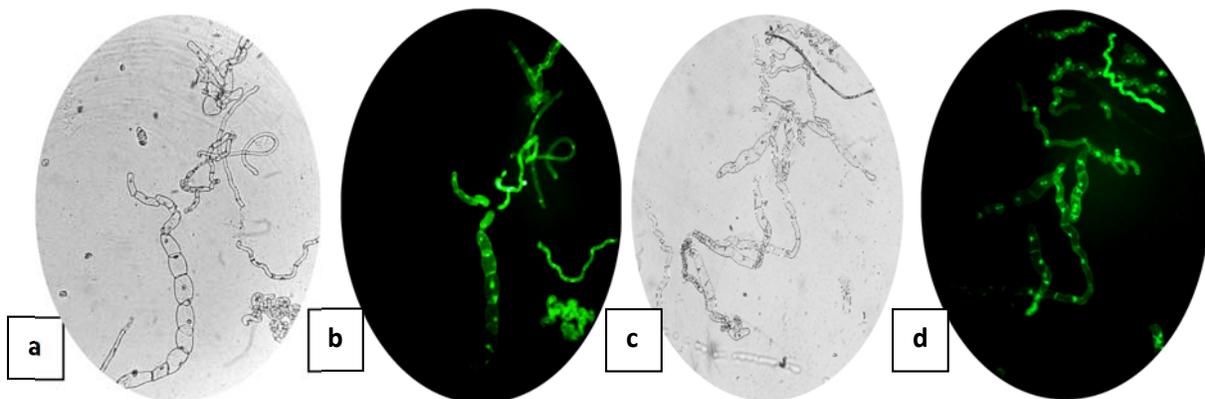
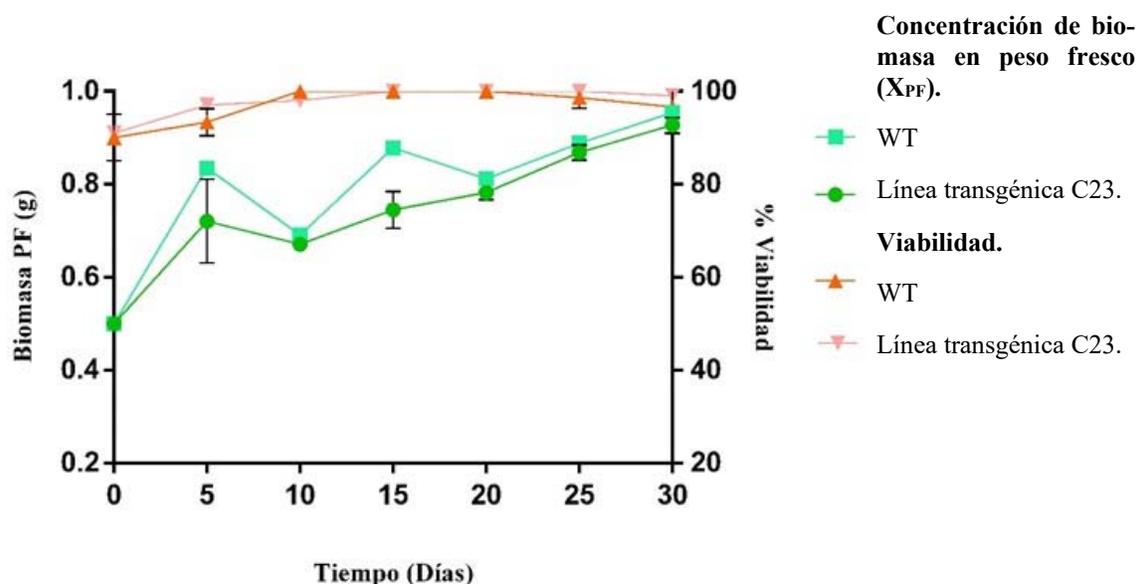


Figura 14. Morfología y viabilidad celular de callos WT y línea transgénica C23 de *C. papaya*. a, c) Campo claro 10X, b, d) Campo oscuro 10X (Fluorescencia).

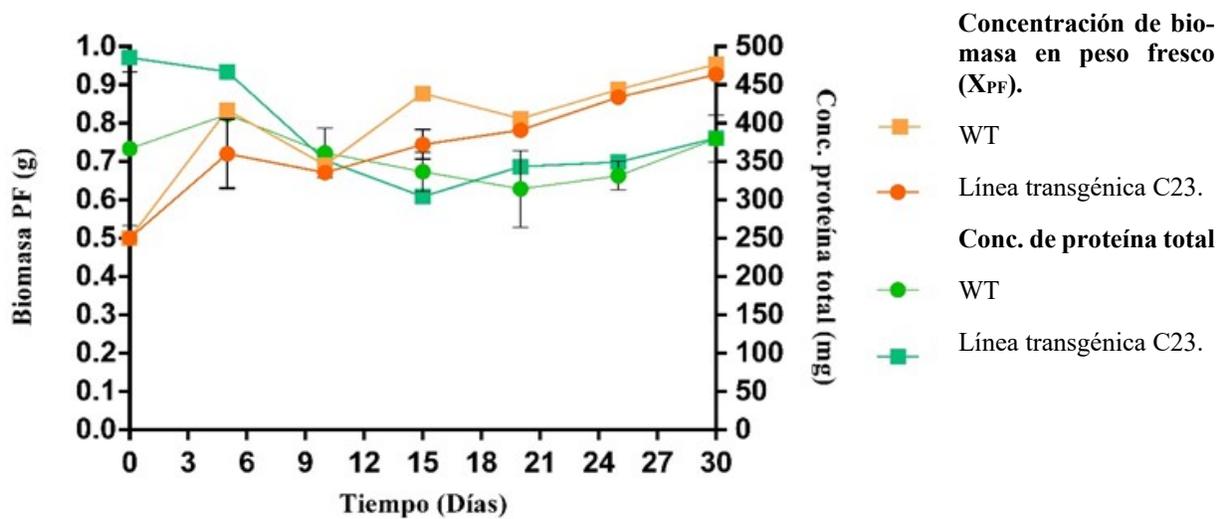
9.3.1 Viabilidad celular de los callos de *C. papaya* de las líneas WT y C23

La viabilidad celular desde el inicio de la cinética se mantuvo arriba del 85% alcanzando al día 10, el 100%, tiempo que corresponde con el inicio de la fase exponencial para ambas líneas celulares de *C. papaya*. Esta viabilidad se mantuvo hasta el día 30 (gráfica 2).



Gráfica 2. Curvas de crecimiento celular y viabilidad celular de callos de *C. papaya*.

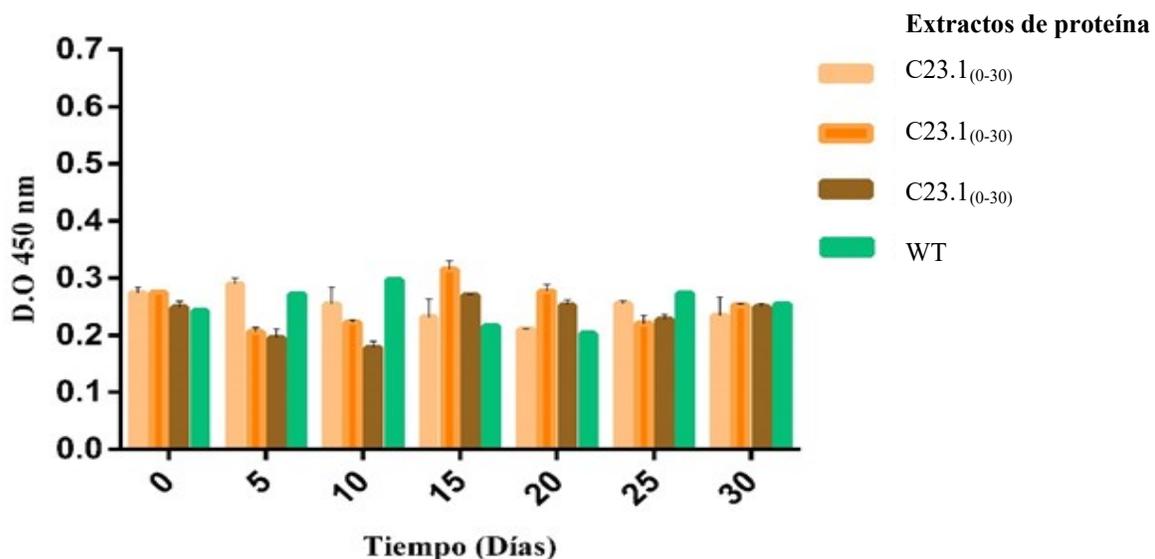
Uno de los parámetros cinéticos más importantes de este proyecto fue determinar la concentración de proteína producida por las líneas celulares de *C. papaya*. En la gráfica 3 se puede observar la concentración de proteína con respecto al tiempo, donde al inicio de la cinética la concentración de proteína total para *C. papaya* WT fue de 485.52 mg y al día 30 disminuyó a 380.52 mg y para la clona transgénica C23 al día cero fue de 366.72 mg y al día 30 aumento a 379.58 mg. Esta variación posiblemente se debe a que la cuantificación se realizó a partir de células en peso fresco.



Gráfica 3. Curvas tiempo-concentración de biomasa y proteína total de callos de *C. papaya*.

9.3.2 Cuantificación del péptido KETc7 por ELISA

Para cuantificar el péptido KETc7 en la línea transgénica C23 de *C. papaya* se realizaron ensayos de Elisa. En la gráfica 4 se observa que en el triplicado de todos los tiempos evaluados de la cinética, la densidad óptica fue similar a la densidad de los callos WT de *C. papaya*, por lo que no fue posible cuantificar el péptido KETc7, a pesar de que se utilizaron anticuerpos específicos. Posiblemente la expresión del péptido se encontraba por debajo del límite de detección del ensayo de Elisa.



Gráfica 4. Ensayo de Elisa; extractos de proteína de callos de *Carica papaya* WT y línea transgénica C23. C23.1(0-30), C23.2(0-30), C23.3(0-30).

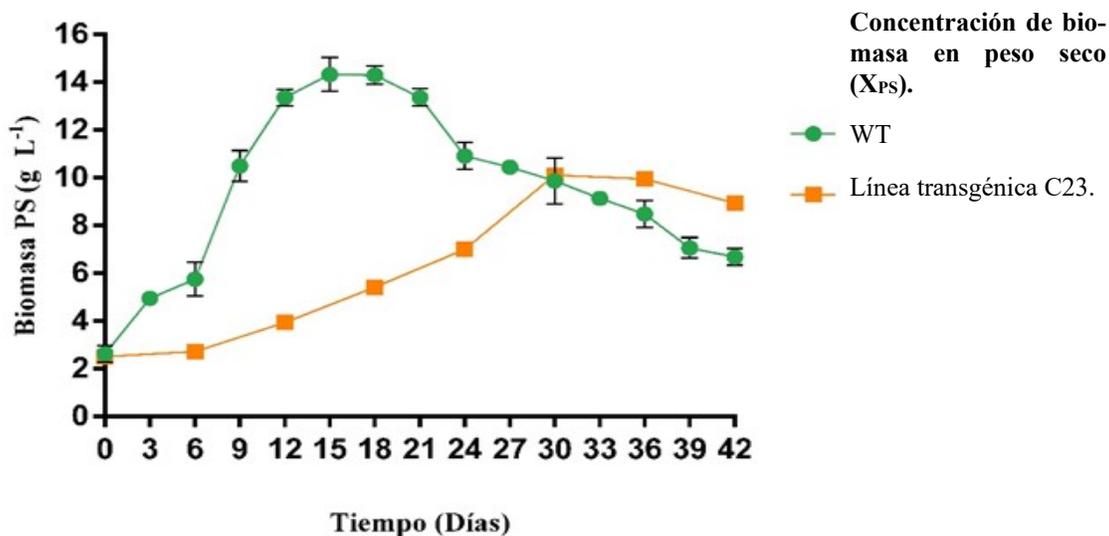
9.4 Parámetros cinéticos de las células en suspensión de *C. papaya* WT y C23

El objetivo principal de este proyecto fue establecer un cultivo transgénico de células en suspensión de *C. papaya* WT y de la línea transgénica C23, en el medio selectivo (B5) antes detallado. Se estableció la cinética de crecimiento por 42 días, donde se analizaron los parámetros cinéticos de velocidad de crecimiento celular, tiempo de duplicación, viabilidad, pH del medio de cultivo, consumo de azúcares totales y concentración de proteína total, así como actividad biológica contra el nematodo parásito de ovinos.

En la gráfica 5 los resultados muestran el crecimiento celular de la línea WT de *C. papaya* en la que se determinó una fase de adaptación hasta el día 6 y posteriormente una fase de crecimiento exponencial que terminó al día 30, seguida de una fase estacionaria por seis días y finalmente a partir del día 36 el deceso del cultivo. El valor máximo de biomasa fue de 10.12 g_{ps} L⁻¹ y se obtuvo al día 30 del cultivo, lo que representó un incremento de 4.1 veces el tamaño del inóculo inicial. El cultivo WT presentó un tiempo de duplicación de 13.01 días y una $\mu=0.05$ d⁻¹.

La línea transgénica C23, al día 6 de su crecimiento presentó la fase de adaptación a las condiciones establecidas (Gráfica 5). Posteriormente, se observó el inicio de la división celular la llamada fase de crecimiento exponencial, la cual terminó al día 15 y continuó la fase estacionaria por tres días. A partir del día 18 empezó el deceso del cultivo debido a que al alcanzar el número máximo de células, se produjo un rápida lisis y la liberación de los componentes al medio de cultivo, que pudieron ser usados para el mantenimiento de las células sobrevivientes (Caballero y Cardina., 2006), Sin embargo, como consecuencia del consumo y limitación de nutrientes en el medio de cultivo, la fase de muerte se dio hasta el día 42. El valor máximo de biomasa fue de 14.36 g_{ps} L⁻¹ y se obtuvo al día 15 del cultivo, lo que representó un incremento de 5.4 veces el tamaño del inóculo inicial. Este cultivo presentó un tiempo de duplicación de 6.9 días y una $\mu=0.10$ d⁻¹.

Cabe destacar que, durante la cinética el crecimiento de las células WT fue más lento en comparación con la línea transgénica C23. Ambos cultivos formaron pequeños agregados y en la fase de muerte las líneas celulares tuvieron una coloración más oscura.



Gráfica 5. Curvas tiempo-concentración de biomasa de *C. papaya*, cultivo de células en suspensión WT y línea transgénica C23.

En la tabla 2 se observan las concentraciones de biomasa de la línea transgénica C23, obtenidos de la cinética de crecimiento con respecto al tiempo. Como se puede observar del día 0 al día 6 hubo cambios significativos, debido al crecimiento y división celular, mientras que para el día 12 al 21 no los hubo, ya que las células iniciaron la fase estacionaria y agotaron la fuente de nutrientes. Del día 2 al 42 nuevamente se presentaron diferencias significativas por la deficiencia de nutrientes provocando la muerte celular.

Tabla 4. Crecimiento celular (X_{PS}) de *C. papaya* línea transgénica C23, promedio y desviación estándar.

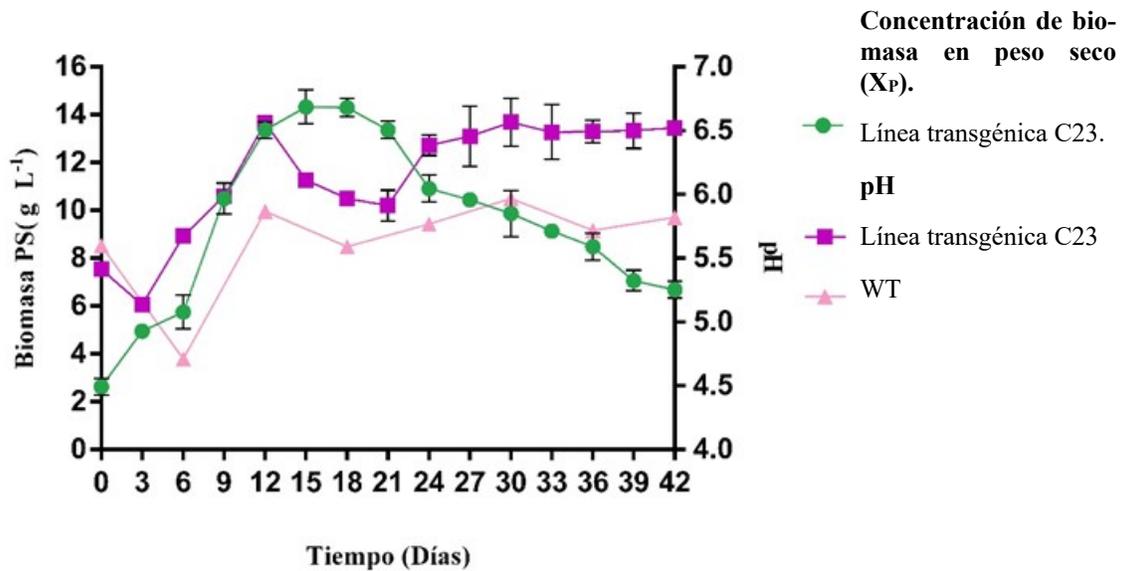
C23 <i>C. papaya</i>-tiempo del cultivo (días)	Promedio $X \pm DE$
C23-0	2.63±0.35 h
C23-3	4.95±0.26 fg
C23-6	5.75±0.70 fg
C23-9	10.50±0.64 bc
C23-12	13.36±0.33 a
C23-15	14.36±0.72 a
C23-18	14.29±0.37 a
C23-21	13.36±0.36 a
C23-24	10.91±0.56 b
C23-27	10.44±0.61 bc
C23-30	9.86±0.97 bc
C23-33	9.14±0.10 bcd
C23-36	8.48±0.56 cde
C23-39	7.0±0.42 def
C23-42	6.6±0.34 ef

Los valores representan la media de tres muestras \pm desviación estándar. Letras iguales en la misma columna indican que los valores no difieren estadísticamente, según prueba de Tukey.

9.4.1 Análisis cinético del pH en el medio de cultivo

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. El medio de cultivo tiende a acidificarse en las primeras horas, conforme progresa el cultivo este descenso es oscilante. Esto se debe porque las células toman el amonio NH_4^+ y expulsan al medio los iones H^+ , por lo tanto, el pH del medio desciende, lo que ralentiza la asimilación NH_4^+ y aumenta la de iones NO_3^- , expulsándose al medio iones OH^- y por tanto aumentando el pH. En la gráfica 6 se muestran las curvas de la biomasa peso seco (X_{PS}) y pH contra tiempo. El pH del medio es ajustado a 5.7 antes de autoclavar, pero descendió durante la esterilización, probablemente debido a las reacciones entre los compuestos del medio al calentarlo. El comportamiento del pH de ambas líneas celulares tiene una tendencia similar. Aunque cabe destacar que el pH de *C. papaya* WT al

día 6 descendió hasta 4.71 en comparación con la línea transgénica cuyo valor fue de 5.75. Posteriormente, el pH aumentó para permanecer entre 5.5-6.5 desde el día 6 al día 42.



Gráfica 6. Curvas tiempo-concentración de biomasa y pH de *C. papaya* WT y línea transgénica C23 al día 42 de la cinética.

9.4.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular es crucial 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. Con respecto a la viabilidad celular para *C. papaya* WT esta fue del 90% al inicio de la cinética y a partir del día 12 el 100% de viabilidad que se mantiene hasta el día 36, posteriormente descendió a valores de 90% al día 42 (gráfica 7). Curtis y Emery, 1993 han reportado que las células presentes en los cultivos en suspensión mostraron principalmente una morfología alargada, aunque también algunas presentaron geometría esférica o isodiamétrica, lo cual se corrobora en nuestro trabajo.

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

Esta viabilidad celular descendió a la par que la biomasa (X_{PS}), lo que indica el deceso del cultivo, exactamente al día 36 la fluorescencia disminuyó al 78% (figura 15c) y finalmente al día 42 se observó solo el 40%, lo que representa la muerte celular (gráfica 7).

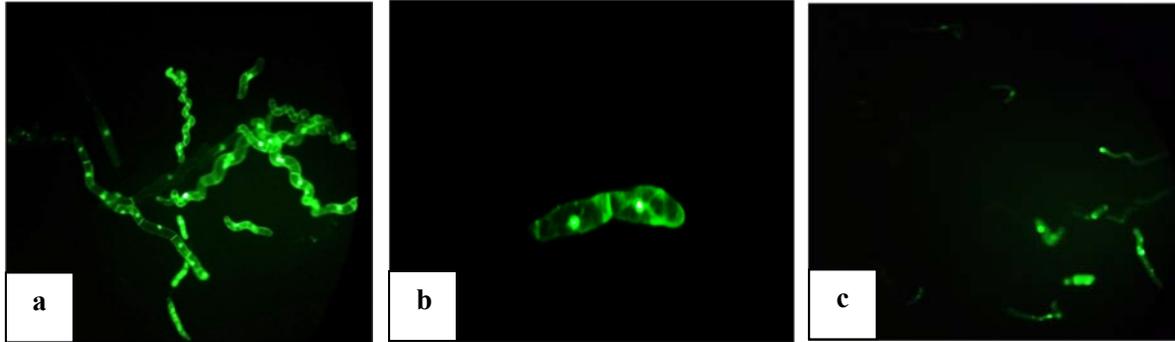
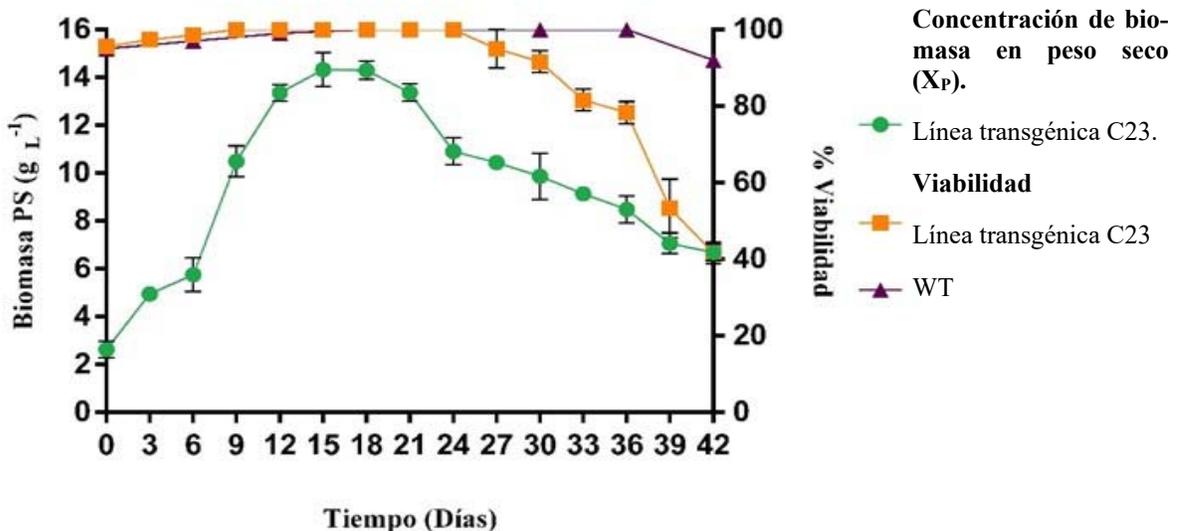


Figura 15. Viabilidad de células en suspensión de *C. papaya* línea transgénica C23 a) día 9, b) células en división día 12. c) día 36.

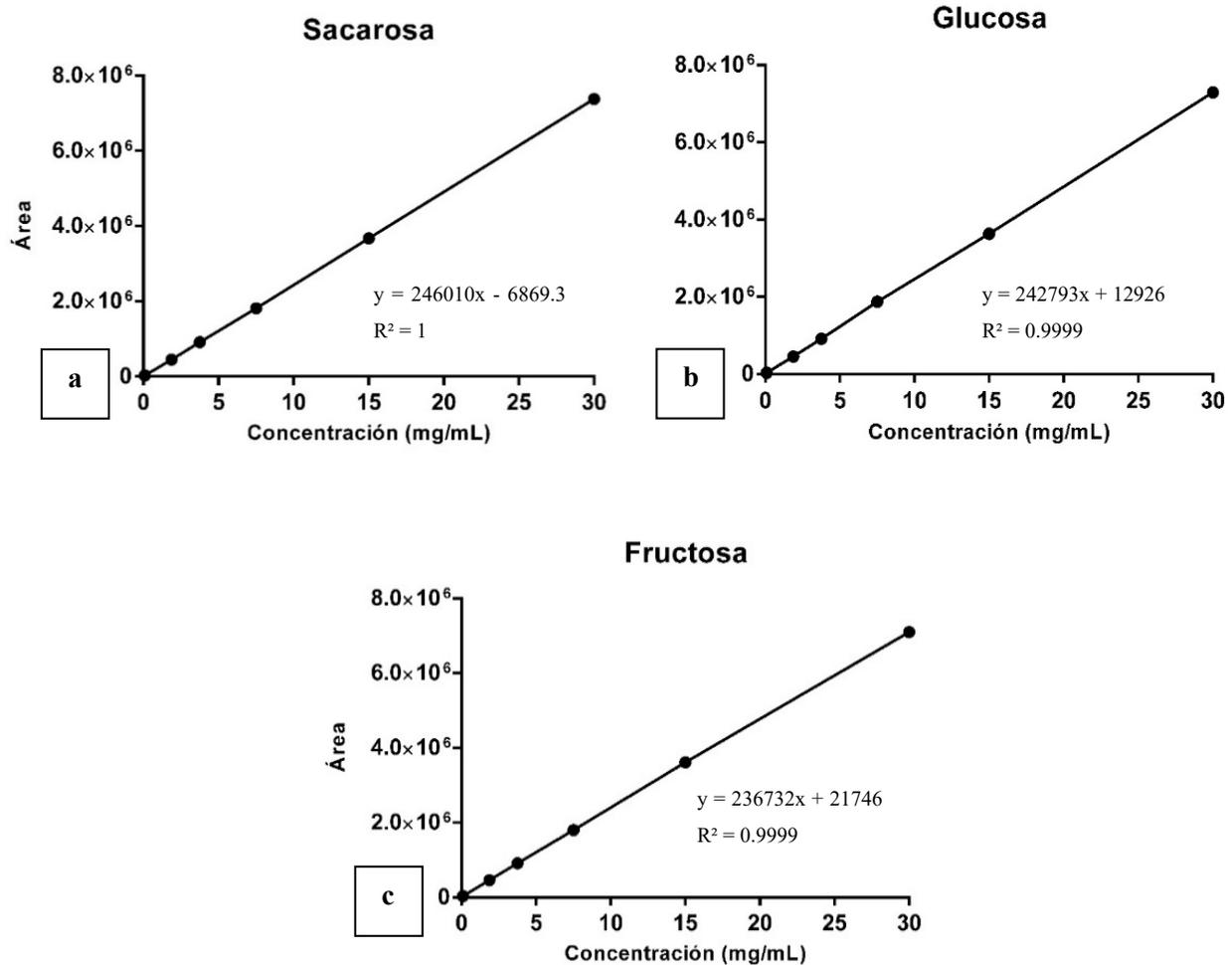


Gráfica 7. Curvas tiempo-concentración de biomasa y viabilidad de células en suspensión de *C. papaya* WT y línea C23 al día 42 de la cinética.

9.4.3 Consumo de azúcares en el medio de cultivo

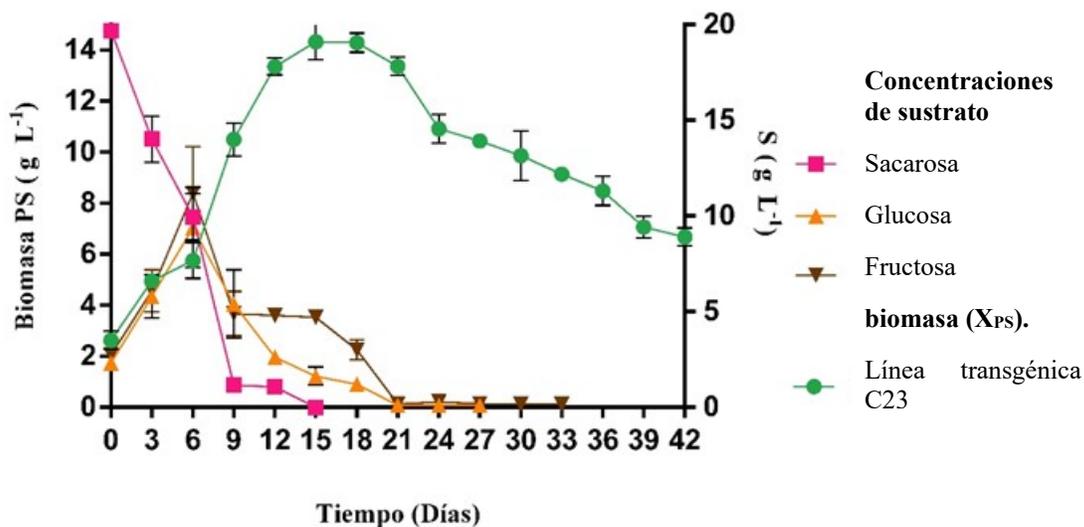
Se realizó el análisis del consumo de azúcares para determinar su comportamiento durante la cinética de crecimiento, se utilizaron los estándares sacarosa, glucosa y fructosa y se obtuvieron curvas de calibración (Gráficas 8 a, b, c).

Se determinó el tiempo de retención (t_R) de cada uno de los azúcares analizados, sacarosa (t_R : 9.4 min), glucosa (t_R : 6.2 min) y fructosa (t_R : 5.0 min).



Gráfica 8. Curvas de calibración para azúcares. a) sacarosa, b) glucosa, c) fructosa.

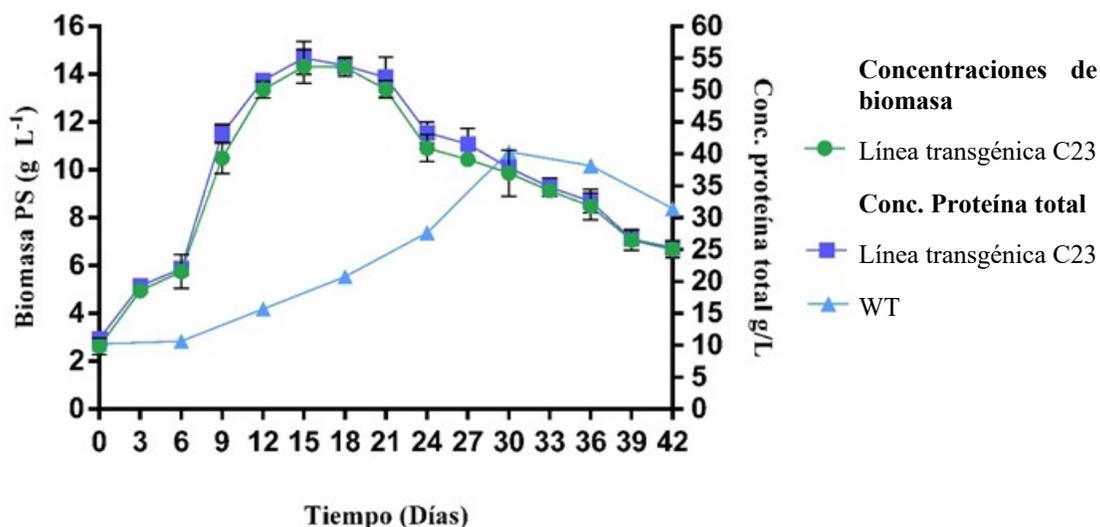
Se determinó el patrón de consumo de azúcares mediante la cuantificación de sus concentraciones durante los 42 días. Las enzimas que se encuentran en la pared celular de las células vegetales (invertasas) son las responsables de hidrolizar la sacarosa del medio de cultivo en glucosa y fructosa. En la gráfica 9 se observa que la sacarosa fue hidrolizada completamente al día 15, tiempo que corresponde con la máxima producción de biomasa (14.36 gps L^{-1}). Posteriormente, se observó el consumo total de la glucosa al día 27 y la fructosa al día 33 tiempo en el cual las células ya se encontraban en fase de muerte.



Gráfica 9. Curvas tiempo-concentración de biomasa y consumo de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) de células en suspensión de *C. papaya* C23.

9.4.4 Concentración de proteína total

Se analizó la concentración de proteína total con respecto al tiempo de la cinética de crecimiento. En la gráfica 10 se observa que la producción de proteína está relacionada con el crecimiento celular, puesto que al día 15 se obtuvo una concentración máxima de biomasa de 14.36 g_{ps} L⁻¹ y al mismo tiempo también se obtuvo la concentración más alta de proteína de 55.06 g L⁻¹ con un rendimiento de 3.85 g L⁻¹.



Gráfica 10. Curvas tiempo-concentración de biomasa y producción de proteína total de *C. papaya*, línea transgénica C23

Sin embargo, a pesar de los intentos realizados para la cuantificación del péptido KETc7 en la cinética de callos, los anticuerpos fueron limitantes para intentar cuantificar el péptido en la cinética de células en suspensión.

En la tabla 5 se observan las concentraciones de proteína total de *C. papaya* línea transgénica C23, obtenidos en la cinética de crecimiento con respecto al tiempo. Como se puede observar del día 0 al día 6 hubo cambios significativos, pues el cultivo se encontró en crecimiento activo, mientras que para el día 12 al 21 no los hubo, pues la biomasa celular se mantuvo en la fase estacionaria. En los días 24 al 42 nuevamente se presentaron diferencias significativas pues las células se encontraban en la muerte celular.

Tabla 5. Concentración de proteína total de *C. papaya* línea transgénica C23, promedio y desviación estándar

C23 <i>C. papaya</i>-tiempo del cultivo (días)	Promedio X±DE
C23-0	11.06±0.35 l
C23-3	19.31±0.26 jk
C23-6	22.04±0.70 hijk
C23-9	43.19±0.64 b
C23-12	51.75±0.33 a
C23-15	55.06±0.72 a
C23-18	53.88±0.37 a
C23-21	52.04±0.36 a
C23-24	53.35±0.56 b
C23-27	41.58±0.61 b
C23-30	37.90±0.97 bcde
C23-33	34.81±0.10 cde
C23-36	32.59±0.56 def
C23-39	26.57±0.42 fghi
C23-42	25.33±0.34 ghij

Los valores representan la media de tres muestras ± desviación estándar. Letras iguales en la misma columna indican que los valores no difieren estadísticamente, según prueba de Tukey.

9.5 Confrontación de la biomasa de C23 KETc7 contra larvas L4 de *H. contortus*

Debido al potencial de utilizar células transgénicas para la producción de la vacuna S3Pvac, en este trabajo se planteó la evaluación de la biomasa de células en suspensión que expresan

el péptido KETc7 contra *H. contortus* nematodo parásito de ovinos. A continuación, se muestran los resultados del bioensayo de la confrontación de la biomasa de *C. papaya* WT y línea transgénica C23 contra larvas L₄ de *H. contortus* a las 72h post confrontación (tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes mortalidad de larvas L₄ sin vaina de *H. contortus* por efectos de la biomasa C23, obtenida a partir de células transgénicas de *C. papaya*.

Tratamiento Concentración 1mg/mL	Promedio X±DE	% de Mortalidad de larvas <i>H. contortus</i> (72 h)
Controles		
PBS	9.34±9.48	15.82 ^{dc}
HANKS	0.93±0.92	4.38 ^d
IVM*	55.07±7.28	47.94 ^a
Biomasa-tiempo de cultivo		
WT-0	1.84±3.14	5.06 ^d
WT-12	3.11±4.46	6.71 ^d
WT-30	4.48±6.53	8.20 ^d
WT-42	7.03±5.49	13.70 ^d
C23-0	16.51±18.32	17.52 ^{bcd}
C23-3	41.57±4.73	40.13 ^a
C23-6	47.71±10.31	41.89 ^a
C23-9	40.18±14.03	39.27 ^a
C23-12	49.25±10.03	44.59 ^a
C23-15	43.01±13.62	40.86 ^a
C23-18	37.31±14.17	43.18 ^a
C23-21	46.45±6.11	42.95 ^a
C23-24	47.46±14.35	44.24 ^{ab}
C23-27	40.82±22.58	36.27 ^{ab}
C23-30	33.14±14.10	34.80 ^{abc}
C23-33	23.52±13.31	33.23 ^{abc}
C23-36	32.93±15.32	34.40 ^{abc}
C23-39	34.04±14.32	35.19 ^{abc}
C23-42	34.15±12.58	35.45 ^{ab}

*Concentración de 5mg/mL. Letras iguales en la misma columna indican que los valores no difieren estadísticamente, según prueba de Tukey n=6 (seis pozos); 10 alícuotas por cada pozo.

Se puede observar que la biomasa de *C. papaya* WT a los 42 días de cultivo, provocó un porcentaje de mortalidad de larvas L₄ del 13.70% y en tanto que la línea transgénica C23 a

los 12 días provocó un porcentaje de mortalidad de larvas L₄ de 44.59%, esto a una concentración de 1mg/mL.

En la tabla 7 se muestran las fotografías más relevantes de las alteraciones morfológicas comparadas con el grupo control, larvas L₄ de *H. contortus* contra la biomasa de *C. papaya*, así como los controles utilizados. En el control Hanks y en la biomasa WT a los 12 días no se observó ningún daño como se muestra en la tabla de fotografías 7 a, c. En la fotografía 7 b se muestra la acción de la ivermectina provocando la muerte de las larvas en un promedio de 72 h. En la fotografía d se visualizan los daños encontrados en *H. contortus* después de 72 h de exposición *in vitro* con la biomasa de la línea transgénica C23 a los 12 días de cultivo. Se observó en las larvas L₄ una ligera deshidratación, presentaron daño considerable en la parte media y posterior, así como la desintegración en órganos internos. En algunos casos también se encontraron roturas evidentes en su cutícula, por donde hubo liberación de órganos como se muestra en la fotografía 7 e. Cabe destacar que el estadio evaluado fue el estadio L₄, en el cual ya ha desarrollado su cavidad oral y puede comenzar su papel hematófago dando potencialmente riesgos de anemia los cuales pueden llevar a la muerte del animal. Sin embargo, al ser expuestas contra la biomasa de la línea transgénica C23, se cree que estas larvas L₄ se alimentan de la biomasa generando daños en 72 h de exposición. Estos resultados indican acción directa en los órganos internos y sobre la cutícula de las larvas de *H. contortus* evaluadas *in vitro*. Estos resultados y a la capacidad nematicida en el estadio L₄ de *H. contortus* subrayan el potencial del uso de células transgénicas de *C. papaya* que expresan el péptido KETc7.

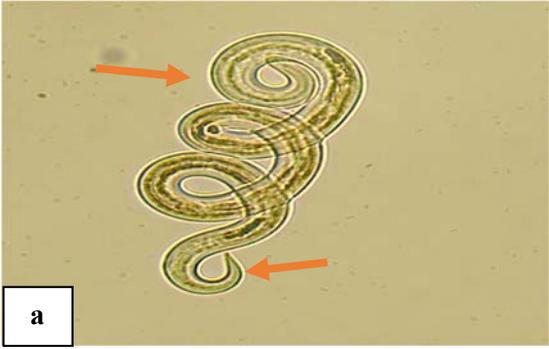
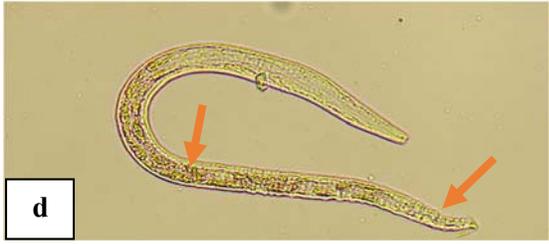
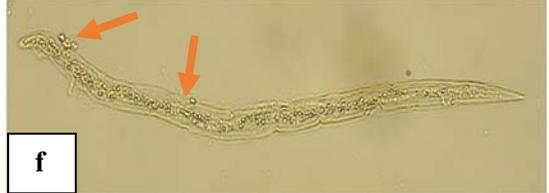
Tratamiento		<i>Haemonchus contortus</i>
Control	Medio Hanks	 <p>a</p>
Control	Ivermectina	 <p>b</p>
Biomasa	WT <i>C. papaya</i> (12 días)	 <p>c</p>
Biomasa	C23 (KETc7) (12 días)	 <p>d</p>  <p>f</p>

Tabla 7. Fotografías de larvas L₄ de *H. contortus* contra la biomasa de la clona 23 KETC7 de *C. papaya*. 47

10. DISCUSIÓN

Es importante mencionar que el presente estudio se derivó de un trabajo previo, donde se establecieron las condiciones de cultivo *in vitro* para obtener callos de aspecto friable, la línea WT y línea transgénica C23 de *C. papaya*. El principal interés fue establecer cultivos de células en suspensión y su propagación. Para ello se determinaron los parámetros cinéticos a nivel matraz, mediante la realización de cinéticas de crecimiento. Los resultados de este trabajo aportan información valiosa para continuar con el proceso de escalamiento.

10.1 Cinética de crecimiento de callos de *C. papaya* WT y línea transgénica C23

Las células de los callos al inicio de la cinética sufrieron un aumento y decremento de biomasa hasta iniciar con un crecimiento acelerado denominado, crecimiento exponencial, donde ocurre la división celular e incremento de biomasa. Para los callos de la línea transgénica C23, se observó un comportamiento exponencial a partir del día 10 al día 30. No se observó fase estacionaria, debido al tiempo establecido de la cinética. Una cinética de 30 días no fue suficiente para determinar la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación para ambas líneas. La concentración de proteína al inicio de la cinética fue más alta, lo cual podría tener relación con una respuesta celular de estrés osmótico al que se ven sometidas las células en el momento de la resiembra. Con respecto a la viabilidad celular para ambas líneas, ésta se mantuvo en 100% hasta el día 25. Se corroboró la presencia del transcrito y la identificación del péptido KETc7 por electroforesis de proteínas en el cultivo de callos. Aunque la cuantificación del péptido no fue posible, tal vez porque la concentración del péptido se encontraba por debajo del límite de detección del ensayo de Elisa. En este contexto Daniel *et al.*, 2001 ha reportado bajos niveles de expresión de proteínas (antígenos) en diferentes especies de plantas transgénicas, los parámetros cruciales a resolver son la expresión proteica, nivel de acumulación y estabilidad (Desai *et al.*, 2010).

10.2 Cinética de crecimiento de células en suspensión de *C. papaya* WT y línea transgénica C23

En la curva elaborada a partir de la determinación del peso seco de las células en suspensión se observó una fase lag de seis días para ambas líneas celulares. Este comportamiento coincide con lo reportado en la literatura, en la fase lag las células se encuentran en un proceso de adaptación a las condiciones nutricionales del medio (Shigeta *et al.*, 1996). Sin embargo, el tiempo puede variar dependiendo de la especie como es el caso de *Uncaria tomentosa*, donde su fase lag fue de nueve días (Sánchez y Alvarenga., 2014). La determinación del tiempo de la fase lag en ambas líneas fue un dato relevante, ya que puede deberse a que las células provienen de cultivos que fueron mantenidos bajo las mismas condiciones experimentales (medio de cultivo, agitación y condición de oscuridad).

El cultivo de la línea WT presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.05 d⁻¹ y un tiempo de duplicación de 13.01 días. Mientras que la velocidad específica de crecimiento alcanzada por los cultivos de la línea transgénica C23 fue de 0.10 d⁻¹ y el tiempo de duplicación fue de 6.9 días. Esto indica que la multiplicación celular de este cultivo transgénico se lleva a cabo dentro de los parámetros reportados. Por ejemplo, en células en suspensión de papa (*Solanum tuberosum*) utilizada como plataforma para producir proteínas recombinantes, se obtuvieron parámetros de $\mu = 0.12 \text{ d}^{-1}$ y $t_d 5.75$ días (Nova *et al.*, 2017); para células en suspensión de zanahoria (*Daucos carota*), se obtuvieron de $\mu = 0.06 \text{ d}^{-1}$ y $t_d 10$ días (Campos, 2019); y para tabaco (*Nicotiana benthamiana*), se obtuvieron de $\mu = 0.11 \text{ d}^{-1}$ y $t_d 6.1$ días (Sukenic *et al.*, 2018). Estas variaciones se pueden deber a la diferencia del tamaño de inóculo y a la edad de cultivo, como lo reporta Bedoya y Hoyos (2010), donde una mayor biomasa de células iniciales provoca una cinética de crecimiento corta, mientras que una cantidad baja de células iniciales genera una curva de crecimiento más extensa, a consecuencia de una mayor disponibilidad de nutrientes, lo que provoca menor estrés por compuestos limitantes en el medio de cultivo.

Cabe destacar que la velocidad específica de crecimiento de la línea WT fue prácticamente el doble del dato reportado para la línea transgénica C23. Estos resultados son muy contundentes, pues comparado con otros cultivos de células en suspensión de *N. benthamiana* de tipo silvestre (0.26 d⁻¹) (Huang *et al.*, 2009), la velocidad de crecimiento de la línea WT

de *C. papaya* es menor. Esta comparación se determinó en un biorreactor con oxígeno disuelto controlado, (40% de saturación de aire) en comparación con los cultivos en matraz agitado. Estas diferencias podrían dar lugar a diferentes cinéticas de crecimiento.

Con respecto a la velocidad de crecimiento de la línea transgénica C23, puede depender de las características de la molécula que se expresa, especie utilizada y la adaptación del mismo, como en el caso de las células en suspensión de zanahoria (*Daucos carota*), la cual expresan la proteína quimérica LTB-Syn con interés de vacunación, su velocidad de crecimiento fue de $\mu = 0.06 \text{ d}^{-1}$ (Campos, 2019), y comparado con los resultados de este proyecto $\mu = 13.01 \text{ d}^{-1}$, la línea transgénica C23 tiene un crecimiento más acelerado.

La línea WT al día 30 alcanzó la concentración máxima de biomasa de 10.12 g L^{-1} correspondiendo a un rendimiento de 0.328 g L^{-1} y a los 42 días una concentración de biomasa final de 8.94 g L^{-1} . Al día 15 la línea transgénica C23 de *C. papaya* alcanzó una concentración máxima de biomasa de 14.361 g L^{-1} correspondiendo a un rendimiento de 0.391 g L^{-1} . Cabe resaltar que el descenso de esta línea fue más acelerado ya que a los 42 días de cultivo se obtuvo una concentración de biomasa final de 6.687 g L^{-1} . Se ha observado que en la fase de muerte los agregados celulares pierden tamaño atribuyendo esta disgregación a la activación de las enzimas que degradan los polisacáridos presentes en la pared celular (Jiménez, 2003, Rodríguez, 2007).

Estos datos son importantes a tener en cuenta ya que, con base a las cinéticas de crecimiento para ambas líneas, es necesario realizar los subcultivos a la mitad de la fase exponencial, para garantizar que las células se encuentran en crecimiento activo.

El monitoreo del pH es importante puesto que el crecimiento óptimo de las células vegetales en suspensión se encuentra entre un pH de 5.0-6.5, el cual puede cambiar durante el curso del cultivo ya que generalmente no se controla. El cambio brusco de alcalinidad o acidificación puede afectar la disponibilidad de los nutrientes para el crecimiento celular. Esto genera alteración en los procesos metabólicos, así como, afectando la acumulación de metabolitos secundarios; por consiguiente permite el crecimiento de otros microorganismos generando contaminación del cultivo celular. Con respecto al comportamiento del pH en la cinética de crecimiento de las líneas celulares WT y C23 de *C. papaya*, el pH de la línea WT disminuyó

0.8 unidades durante los primeros 6 días, mientras que la línea transgénica C23 solo 0.2 unidades al día 3, posteriormente el pH aumento y al día 42 la línea WT se mantuvo en 5.8 y la línea transgénica C23 en 6.5, esta variación entre ambas líneas podría repercutir en la acumulación de metabolitos como se mencionó anteriormente.

Para la optimización de los cultivos en suspensión, la viabilidad celular confirma la integridad de las células en el medio. Se determinó que las células en suspensión forman pequeños agregados, aunque también fue posible visualizar células individuales. La formación de estos pequeños agregados 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). En la etapa de muerte de las células en suspensión se evidenció que el cultivo pierde viabilidad, ya que de manera cualitativa se determinó la disminución de células fluorescentes. En esta misma fase, las células pueden presentar daños en la membrana celular que provoca plasmólisis, es decir, una pérdida de la turgencia. Este comportamiento ha sido evidenciado en otros cultivos lo cual es propio de esta fase de la cinética de crecimiento de las células, reflejándose en la disminución del peso seco del cultivo (Sánchez y Alvarenga., 2014).

Los resultados de la cuantificación de azúcares en la cinética de *C. papaya* indicaron que la sacarosa fue hidrolizada completamente en el día 15. Posteriormente se observó el aumento de la concentración de glucosa a 7.0 g L^{-1} al día 6, y la concentración de fructosa a valores de 8.3 g L^{-1} al día 6. Se dio el consumo preferencial por la glucosa hasta el día 27 y una vez agotada las células consumieron la fructosa al día 33. Este patrón de consumo de azúcares también fue reportado por (Caspeta, 2004). Con respecto al rendimiento biomasa/sustrato éste fue de (Yx/s) de 0.22 g para la línea transgénica C23, y Yx/s) de 0.29 g para la línea WT.

10.3 Evaluación *in vitro* de la actividad nematicida de X_{PS} de células en suspensión contra larvas L₄ de *Haemonchus contortus*

Actualmente el uso y abuso excesivo de antihelmínticos para el control de los nematodos parásitos de ovinos ha desencadenado la resistencia hacia éstos. En particular se ha notificado que las lactonas macrocíclicas (avermectinas, milbemicinas y espinosinas) presentan toxicidad y efectos adversos sobre los escarabajos estercoleros *Carabaeus viettei* y *Scarabaeus*

laticollis de ambiente ganadero bajo sistemas de pastoreo (Páez, 2018). Por lo tanto, se han propuesto alternativas biotecnológicas como el uso de células vegetales como método de control de nematodos gastrointestinales. En este aspecto *C. papaya* ha sido de gran interés por sus propiedades farmacológicas y terapéuticas, entre las más interesantes para este trabajo son su actividad antiamebica y antihelmíntica, asociada a su alto contenido de enzimas proteolíticas como la papaína, quimopapaína, caricaína y glicil endopéptidasa (Luoga *et al.*, 2015, Turuj *et al.*, 2015). Hasta ahora se ha identificado a isotiocionato de bencilo como el agente antihelmíntico predominante o exclusivo en extractos de semillas de papaya (Kermanshai *et al.*, 2001). La actividad nematicida demostrada por la biomasa de *C. papaya* línea transgénica C23 contra larvas L₄ del nematodo parásito de ovinos *H. contortus* indican acción directa sobre órganos internos y su cutícula posiblemente por la hidrólisis de enlaces peptídicos particulares en proteínas de los mismos, y en el caso de la cutícula conducen a la pérdida de la integridad cuticular. Resulta de interés los valores similares de efectividad que presenta la biomasa de la línea transgénica (1 mg/mL) en un cultivo a los 12 días y la ivermectina (5mg/m) 47.94% de mortalidad versus 44.59% valores que no difieren estadísticamente, mientras que la biomasa WT en un cultivo a los 12 días, solo presentó 6.71% de mortalidad. Si bien las propiedades nematicidas de la papaya se habían reportado, su actividad se había localizado en látex y semillas, siendo este es el primer reporte de actividad nematicida de células en suspensión transformadas de papaya. La mayor actividad de la línea transgénica C23 respecto a las WT es factible a que se deba a un cambio en la composición de las células como consecuencia de la inserción del gen que codifica para KETc7, posibilidad que se deberá evaluar utilizando HPLC y/o proteómica, independientemente del mecanismo al que se deba el efecto nematicida de la línea transgénica C23. Estos estudios establecen las bases necesarias para evaluar el potencial de la misma *in vivo* en miras de desarrollar un antiparasitario de origen natural.

11. CONCLUSIONES

- ❖ Se estableció por primera vez un cultivo *in vitro* de células en suspensión de *C. papaya* línea no transformada WT y línea transgénica C23.
- ❖ Se caracterizó el comportamiento cinético para callos de *C. papaya* y cultivos de células en suspensión a nivel de matraz para la línea no transformada WT y línea transgénica C23.
- ❖ La producción de biomasa de *C. papaya* a nivel de matraz en la línea WT fue de 10.12 gps L⁻¹ al día 30, 4.0 veces más al tamaño del inóculo inicial, mientras que la biomasa de la línea transgénica C23 fue de 14.36 gps L⁻¹ al día 15, 5.4 veces más que al inóculo inicial.
- ❖ Por primera vez se reporta la actividad nematocida de la biomasa de la línea transgénica C23 de papaya que expresa el péptido KETc7 contra el nematodo parásito de ovinos (larvas L4) *Haemonchus contortus* con interés biotecnológico y pecuario.

12. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto se enmarcan las siguientes perspectivas.

- ❖ Establecer la metodología por citometría de flujo para cuantificar el péptido KETc7.
- ❖ Determinar CL_{50} y CL_{90} en la evaluación de la biomasa de la clona transgénica C23 contra larvas L₄ de *H. contortus*.
- ❖ Realizar un estudio biodirigido, empleando técnicas analíticas como HPLC, resonancia magnética nuclear y/o proteómica para identificar moléculas que acompañan esta actividad nematicida contra parásitos de importancia pecuaria.
- ❖ Realizar la formulación de un antiparasitario de gran espectro con la biomasa activa de *C. papaya*, línea transgénica C23.
- ❖ Realizar escalamiento en biorreactor *airlift* de 2L.

13. BIBLIOGRAFÍA

Aravind, G., Debjit, B., Duraivel, S., Haris, G. (2013). Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 8: 7-15.

Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C. Restrepo, J., (2009). Engineering aspects of the *in vitro* plant cell culture for the production of secondary metabolites. *DYNA*, 157: 109-121.

Amarante, A., (2011). Why is it important to correctly identify *Haemonchus*. *Parasitología Veterinaria*. 5:263-268.

Bedoya, J, C., Hoyos, R, A., (2010). Efecto de la relación agitación-aireación sobre el crecimiento celular y la producción de azadiractina en cultivos de *Azadirachta indica* A. juss. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 63: 5293-5305.

Caballero, C., Cardina, N., (2006). Evaluación del crecimiento celular y consumo de sustrato a partir del establecimiento de suspensiones celulares de *Borojoa patinoi* *cuatrec*. Tesis de licenciatura. Universidad EAFIT, Medellín.

Casillas, J., Mendoza, P., López, M., Liébano, E., (2008). Evaluation of Multinutritional Pellets Containing *Duddingtonia flagrans* Chlamyospore for the Control of Ovine Haemonchosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1141: 161-163.

Caspeta, L., (2004). Producción de saponinas antifúngicas en biorreactores tipo airlift, a partir de cultivos de raíces transformadas de *Solanun chrysotricum*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

Centros para el control y la prevención de Enfermedades. (2014). *Parasitos-Teniasis*. Obtenido de Centros para el control y la prevención de Enfermedades: <https://www.cdc.gov>.

Chan, H, T., Daniell, H., (2015). Plant- made oral vaccines against human infectious diseases-Are we there yet?. *Plant Biotechnology Journal*, 13: 1056–1070.

Campos, C., (2019). Cultivos celulares de *Daucos carota* productores de la proteína quimérica LTB-Syn, relevante en la enfermedad del Parkinson y su escalamiento a biorreactores *airlift*. Tesis de Maestría en proceso, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca. Morelos.

Curtiss, R.I., Cardineau, C.A., (1990). Oral immunization by transgenic plants. *World Plant Application*, 90:107–111.

Curtis, W. R., & Emery, H., (1993). Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnology and Bioengineering*, 42:4, 520-6.

Clarke, J. L., Paruch, L., Dobrica, M. O., Caras, I. Tucureanu, C., Onu, A., Ciulean, S., Stavaru, C., Eerde, A., Wang, Y., Steen, H., Haugslie, S., Petrareanu, C., Lazar, C., Popescu, C. I., Bock, R., Dubuisson J., Branza-Nichita, N., (2017). Lettuce-produced hepatitis C virus E1E2 heterodimer triggers immune responses in mice and antibody production after oral vaccination. *Plant Biotechnology Journal*, 1611-1621.

Dixon, R.A., Gonzales R. A., (1994). A. Plant Cell Culture: A practical approach. Second Edition. Oxford. New York. Oxford University Press.

Dodds, J. H., Roberts, L. W., (1995). Experiments in Plant Tissue Culture (3rd ed), Cambridge University Press, Cambridge. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 1056-1070.

Dunn, A. M., (1993). Helminthología Veterinaria (Segunda ed.). México, D. F.: El Manual Moderno S. A. de C. V. 1.47.

Ekanem, A. P., Obiekezie, A., Kloas, W., Knopf, K., (2004). Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*. 92: 361-366

Fragoso, G., Hernández, M., Cervantes Torres, J., Ramírez Aquino, R., Chapula, H., Villalobos, N., Segura-Velázquez, R., Figueroa A., Flores, I., Jiménez, H., Adalid, L., Rosas, G., Gálvez, L., Pezzat, E., Monreal- Escalante, E., Rosales-Mendoza, S., G. Vázquez, L., Sciutto, E., (2017). Transgenic papaya: useful platform for oral vaccines. *Planta*, 245:1037-1048.

Franklin, S., Ngo, B., Efuot, E., and Stephen, P., (2002). Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal*, 6: 733-744.

Fleury, A., (2006). Cisticercosis en el ser humano. En C. L. Aluja, *Cisticercosis Guía para profesionales de la salud* (págs. 41-52). México DF: IEPSA. Obtenido de Cisticercosis: guía para profesionales de la salud.

García, M. D., (2015). Establecimiento del crecimiento celular de *Carica papaya* L. modificada genéticamente. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca, Morelos.

Gómez M. A., (2002). La producción de vacunas y otros compuestos farmacéuticos en plantas transgénicas. *Revista de la Sociedad Química de México*. vol. 46 No.3.

Habeych, D., (2003). Evaluación de elicitores químicos sobre la producción de indolalcaloides en células en suspensión de *Catharanthus roseus*. Medellín. Tesis (Maestría en Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia. 158 pp.

Hernández, M., Cabrera-Ponce JL., Fragoso G., López-Casillas F., Guevara-García A., Rosas G., León-Ramírez C., Juárez P., Sánchez-García G, Cervantes J, Acero G, Toledo A, Cruz C, Bojalil R, Herrera-Estrella L, Sciutto E., (2007). A new highly effective antycisticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine*, 25:4252–4260.

Hernández, M., Rosas, G., Cervantes, J., Fragoso, G., Rosales-Mendoza, S., Sciutto, E., (2014). Transgenic plants: a 5 year update on oral antipathogen vaccine development. *Expert Review of Vaccine*, 1-14.

Hellwing, S., Drossard, J., (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*, 22: 1415–1422.

Hongli, L., Xukui, L., Ting, L., Wensheng L. Lusheng, S., (2014). Transgenic tobacco expressed HPV16-L1 and LT-B combined immunization induces strong mucosal and systemic responses in mice. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9: 83-89.

Huang, T. K., Plesha, M. A., Falk, B. W., Dandekar, A. M., McDonald, K. A., (2009). Bio-reactor strategies for improving production yield and functionality of a recombinant human protein in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 102:508-520.

Jiménez. C., (2005). Aplicación de la geometría fractal a agregados celulares de *Beta vulgaris* L. crecidos en suspensión (matraces y biorreactor tipo tanque agitado. Tesis de maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos IPN. México

Kermanshai, R., McCarry, B.E., Rosenfeld, J., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A., Sorger, G.J., (2001). Benzyl isothiocyanate is a chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*. 3:427-435.

Köhler. P., (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*. 31: 336-345

Liébano, E., (2011). *Manual de Diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes*. Jiutepec, Morelos, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

Lindh, I., Bråve, A., Hallengård, D., Hadad, R., Kalbina, I., Strid, Å., Andersson, S., (2014). Oral delivery of plant-derived HIV-1 p24 antigen in low doses shows a superior priming effect in mice compared to high doses. *Vaccine*. 32: 2288-2293.

López, M. E., Mendoza, P., Marcelino, L., Liébano, E., (2010). Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos en rumiantes. Folleto técnico No.8. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Morelos, México. 1.38

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). The folin phenol protein quantification method of protein. *Journal Biological Chemistry*, 193:265-275.

Lugade, A. A., Kalathil, S., Heald, J. L., Thanavala, Y. (2010). Transgenic plant-based oral vaccines. *Immunological Investigations*, 39: 468-482.

Luoga, W., Mansur, F., Buttle, D. J., Duce, I. R., Garnett, M. C., Lowe, A., Behnke, J. M., (2015). The relative anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases on intestinal nematodes. *Journal of Helminthology*. 89:165-174.

Márquez, D., (13 de 2 de 2013). *Engormix*. Obtenido de Ganaderia: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/resistencia-antihelminticos-origen-desarrollo-t29960.htm>.

Márquez, D., (2003) Resistencia a los antihelmínticos origen, desarrollo y control. *Corpoica*. 1: 55-71 si

Matthews, J, B., (2006) veterinary parasite immunology (special issue). *Parasite Immunology*. 28:271-273.

Monreal, E., Ramos, A. A, Salazar, J. A., Hernández, B., Angulo, C., Rosales, S., (2017). Expression of the Vp40 antigen from the *zaire ebolavirus* in tobacco plants. *Planta*, 246:123-132.

Murashige, T., and Skoog, F., (1962). A revised medium for growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15:473-497.

Nova, C, J., Muñoz, J.M, Serrano, L, F., Zabala, M, E., Arango, R, E., (2017). Expression of recombinant Cry 1Ac protein in potato plant cell suspension culture: Establishment of culture and optimization of biomass and protein production by nitrogen supply. *DYNA*, Volumen 84, Número 201, p. 34-41.

OMS (2015). Teniasis y cisticercosis, Organización mundial de la salud.

Okeniyi, J, A., Ogunlesi, T A., Oyelami, O. A., Adeyemi, L, A., (2007). Effectiveness of dried *Carica papaya* seeds againts human intestinal parasitosis: A pilot study. *Journal of Medicinal Food*. 10:194-196.

Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. (1 de Julio de 2014). *Identifican los diez principales parásitos transmitidos por los alimentos*. Obtenido de <http://www.fao.org/news/story/es/item/237578/icode/>.

Paddock, R., (2011). *Indiana animal disease diagnostic laboratory*. Obtenido de Purdue University: <https://www.addl.purdue.edu/Newsletters/2011/Fall/Haemonchus.aspx>

Páez, S. Y., (2017), “Actividad nematicida de extractos de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus* y *Moringa oleífera* contra nematodos de importancia agropecuaria” (Tesis de licenciatura). Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Jiutepec, Morelos.

Pérez, J. A., (2010), Evaluación de la producción de fotoquímicos a partir de cultivos de células en suspensión de *Nerium olander*. (Tesis de maestría en Ciencias). Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

Pérez, L. G., Osorio, D., Lamothe, M, R. (2014). Biodiversidad de nematoda parásitos de vertebrados en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 171-176.

Pineda, J. A., (2016). Evaluación *in vitro* de una fracción metanólica del hongo *Pleurotus djamor* (0123) contra huevos y larvas (L₃) del nematodo parásito *Haemonchus contortus*. (Tesis de licenciatura). Jiutepec. Morelos.

Pineda, J. A., Sánchez, J, E., Gonzales, M., Zamilpa, A., López, M, E., Cuevas, E, J., Mendoza, P., Aguilar, L., (2017). The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*. 8:1184-1192.

Qiang Chen, M. D., (2018). Plant-Made Vaccines. En A. R. Jiang, *Molecular Pharming* (págs. 231-273). Arizona State: Wiley Blackwell.

Rodríguez, R., Grisi, L., Pérez de León, A., Silva, H., Torres-Acosta., (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 8 61-74.

Roca, W. M., Mroginski, L. A., (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 969 pp.

Rodriguez, K., (2007).” Análisis de los polisacáridos y la textura de la pared celular en cultivo en suspensión de *Beta vulgaris* L”. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec. Morelos.

Rosales, S., Salazar J.A., (2014). Immunological aspects of using plant cells as delivery vehicles for oral vaccines. *Expert Reviews Vaccines*. 13:737-749.

Rosales, S., Nieto, R., (2018). Green therapeutic biocapsules: Using plant cells to oral deliver biopharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*, 14:17.

Salas, R., Velásquez, R., Herrera, L, V., Ríos, L., Polanco, D., (2016). Prevalencia de nematodos gastrointestinales en sistemas de producción ovina y caprina bajo confinamiento, semiconfinamiento y pastoreo en municipios de Antioquia, Colombia. *Revista de investigaciones Veterinarias del Peru*. 27:344-355.

Sánchez, L. Alvarenga, S., (2014). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd) D. C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*, 105-120.

Satrija, F., Nansen, P., Murtini, s., He, S., (1995). Anthelmintic activity of papaya latex against *Heligmosomoides polygorus* infections in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 3:161-164.

Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclette, J. P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L, Larralde, C., (2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infections*, 2:1875-1890.

Shigeta, J., Sato, K., Mii, M., (1996). Effects of initial cells density, pH and dissolved oxygen on biorreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science*. 115: 109-114.

Steppek, G., Behnke, J. M., Buttle, D. J., Duce, L. R., (2004). Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends Parasitology*, 20:322-327.

Steppek, G., Lowe, A, E., Buttle, D, J., Duce, I, R., Behnke, J, M., (2006). *In vitro* and *in vivo* anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. *Parasitology*. 132:681-689.

Streatfield, J. and Howard, J., (2003). Plant-based vaccines. *International Journal Parasitology*, 33:479-493.

Streatfield, J., (2006). Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methodos*. 38: 150-157.

Soca, M., Roque, E., Soca, M., (2005). Epizootiology of gastrointestinal nematodes in young bovines. *Pastos y Forraje*. 28: 175-185.

Sukenik, S. C., Karuppanan, K., Li, Q., Lebrilla, C., Nandi, S., McDonald, K., (2018). Transient recombinant protein production in glycoengineered *Nicotiana benthamiana* cell suspension culture. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 1205.

Tappe, D., Berkholz, J., Mahlke, U., Lobeck, H., Nagel, T., Haeupler, A., Muntau, B., Racz, P., Poppert, S., (2015). Molecular identification of zoonotic tissue-invasive tapeworm larvae other than *Taenia solium* in suspected human cysticercosis cases. *Journal of Clinical Microbiology*. 54: 172-174.

Torgerson, P. R., Macpherson, C. N., (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology*. 182: 79-95.

Torres, J., (2012). Métodos alternativos para el control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes: Estado del arte. En O. A. Castelán, *Avances de investigación en producción animal en Iberoamericana* (págs. 393-405). Mérida, Yucatán, México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Tuesta, Y., (1999). Efecto parasitario de la semilla de papaya (*Carica papaya L.*) en aves de corral (*Gallus gallus*) Tingo María. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú.

Turuj, V., Yash, P., (2015). A review on medicinal properties of *Carica papaya*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5: 1-6.

Uribarren, T., (6 de Febrero de 2018). *Cisticercosis*. Obtenido de Departamento de microbiología y parasitología recursos en parasitología: <http://www.facmed.unam.mx>.

Uribarren, T., (3 de noviembre de 2016). *Generalidades de cestodos*. Obtenido de Departameto de microbiologia y parasitologia recursos en parasitologia: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cestodos.html>.

Weathers, P., Towler, M., Xu, J., (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology Biotechnology*, 85:1339–1351.

Widholm, J. M., (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain technology*, 4:189-94.

Willms, K., V.P., (2006). Biología del parásito. En C. L. Aluja, *Cisticercosis : guía para profesionales de la salud* (págs. 19-38). México DF.: IEPSA.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 08 ABRIL 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor principal)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Marisela Hernández González
Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Tesis: Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Carica papaya* que expresa el péptido protector contra cisticercosis KETc7 y evaluación de su actividad antiparasitaria .

Alumno que la presenta a revisión: **ANA LILIA PEREZ RAMOS**

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 05 ABRIL 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor principal)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Marisela Hernández González
Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Tesis: Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Carica papaya* que expresa el péptido protector contra cisticercosis KETc7 y evaluación de su actividad antiparasitaria.

Alumno que la presenta a revisión: **ANA LILIA PEREZ RAMOS**

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. MARISELA HERNANDEZ GONZALEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 04 Abril 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor principal)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Marisela Hernández González
Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Tesis: Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Carica papaya* que expresa el péptido protector contra cisticercosis KETc7 y evaluación de su actividad antiparasitaria.

Alumno que la presenta a revisión: **ANA LILIA PEREZ RAMOS**

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 04 ABRIL 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor principal)
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Marisela Hernández González
Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Tesis: Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Carica papaya* que expresa el péptido protector contra cisticercosis KETc7 y evaluación de su actividad antiparasitaria .

Alumno que la presenta a revisión: **ANA LILIA PEREZ RAMOS**

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 03 ABRIL 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Tutor principal)

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dra. Marisela Hernández González

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Tesis: Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Carica papaya* que expresa el péptido protector contra cisticercosis KETc7 y evaluación de su actividad antiparasitaria .

Alumno que la presenta a revisión: **ANA LILIA PEREZ RAMOS**

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 LYDIA SCIUTTO CONDE