



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias Biológicas

Doctorado en Ciencias Naturales

“Escalamiento del proceso de producción de la proteína antigénica
LTB-Syn empleando suspensiones celulares de *Daucus carota* y
evaluación de su inmunogenicidad”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A:

M. en B. Christian Carreño Campos

Director: Dra. Anabel Ortiz Caltempa

Codirector: Dr. Sergio Rosales Mendoza

Cuernavaca, Morelos; mayo 2024



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca de manutención (No. 858164) otorgada durante el doctorado.

A la Dra. Anabel Ortiz Caltempa y al Dr. Sergio Rosales Mendoza por dirigir este trabajo.

Al comité sinodal: Dra. Elba Villegas V; Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa; Dra. Edda Sciutto Conde; Dra. Verónica Rodríguez López y Dra. María E. Jiménez Cataño por sus valiosas observaciones y aportes al proyecto.

A la Dra. María Luisa Villarreal quien hizo importantes aportes durante todas las evaluaciones de los exámenes de permanencia, predoctoral y de grado.

Al Dr. Omar González Ortega, Dra. Dania Govea Alonso, Mtra. Andrea Romero Maldonado, Mtra. Erika Chi Ahumada por su apoyo técnico y colaboración durante este proyecto.

ÍNDICE

	Páginas
Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	iv
Abstract	v
I) Introducción.....	1
1.1 Sinucleinopatías.....	1
1.2 Tipos de sinucleínas.....	1
1.3 Funciones de α -syn.....	3
1.4 Agregación anormal de α -syn.....	4
1.5 Enfermedad de Parkinson.....	4
1.6 Tratamientos contra enfermedad de Parkinson.....	6
1.6.1 Tratamiento farmacológico.....	6
1.6.2 Tratamiento inmunológico.....	7
1.6.3 Otros tratamientos.....	8
1.7 Cultivos vegetales para la producción de proteínas recombinantes.....	8
1.8 Estrategias de optimización en cultivos vegetales.....	10
1.9 <i>Daucus carota</i> como plataforma de producción de biofármacos.....	11
2.0 Vacunas basadas en plantas.....	13
2.1 Inmunidad a nivel de mucosas.....	16
2.2 Mecanismo de acción en vacunas orales.....	17
2.3 Vacunas contra sinucleinopatías.....	18
III) Biorreactores y su aplicación.....	18
3.1 Cultivos vegetales en biorreactores.....	19
3.1.1 Biorreactor en columna de burbujeo.....	19
3.1.2 Biorreactor airlift.....	19
3.2 Diseño de biorreactores.....	20
3.2.1 Demanda de oxígeno.....	20
3.2.2 Agitación y mezclado.....	21
3.2.3 Aireación y transferencia de oxígeno (k_La).....	22
3.2.4 Criterios de escalamiento.....	24
3.3 Producción de proteínas en biorreactores.....	25
IV) Antecedentes directos.....	28
4.1 Importancia de la vacuna cLTB-Syn.....	28
4.2 Justificación.....	29
4.3 Hipótesis.....	29
4.4 Objetivo general.....	29
4.5 Objetivos específicos.....	30
4.6 Estrategia experimental.....	30
V) Metodología.....	31
5.1 Material vegetal de <i>D. carota</i>	31
5.2 Condiciones de cultivos y establecimiento de células en suspensión de la línea Z4.....	31

5.3 Efecto de la fuente de nitrógeno adicional en los cultivos de callos de <i>D. carota</i> línea Z4 ...	31
5.4 Diseños factoriales y de optimización en cultivos de suspensión	32
5.5 Análisis de superficie de respuesta	34
5.6 Cinética de crecimiento con medio MSR optimizado a nivel de matraz	34
5.7 Cinética de crecimiento con medio MSR optimizado a nivel de biorreactor	34
5.8 Determinación de k_{La} y OTR	35
5.9 Métodos analíticos y moleculares	37
5.9.1 Peso fresco y peso seco	37
5.9.2 Conductividad y pH del medio	37
5.9.3 Consumo de azúcares totales	37
5.9.4 Tasa de crecimiento específica (μ) y rendimiento celular	38
5.9.5 Viabilidad celular	38
5.9.6 Detección del transgén LTB-syn por PCR	38
5.9.7 Cuantificación y detección de LTB-Syn por ELISA y Dot-blot	39
5.9.8 Ensayos de inmunogenicidad en ratones	39
5.9.9 Determinación de anticuerpos	40
VI) Resultados	41
6.1 Efecto de la fuente de nitrógeno adicional en cultivo de callos de <i>D. carota</i>	41
6.2 Establecimiento de los cultivos en suspensión de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4	43
6.3 Fase de cribado con el diseño Plackett-Burman	44
6.4 Fase de optimización con el diseño Box-Behnken	48
6.5 Análisis del modelo superficie de respuesta (MSR)	50
6.6 Validación del modelo	54
6.7 Cinética de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en matraz	54
6.7.1 Estudio cinético de pH del medio de cultivo en matraz	55
6.7.2 Estudio cinético del consumo de azúcares en matraz	56
6.7.3 Estudio cinético de la viabilidad celular en matraz	56
6.7.4 Producción de la proteína LTB-syn en matraz	57
6.7.5 Análisis comparativo de los parámetros cinéticos en cultivo de matraz	58
6.7.6 Detección del transgén LTB-syn expresado en <i>D. carota</i> por PCR	58
6.7.7 Presencia de la proteína LTB-Syn por Western-blot y Dot-blot	59
6.8 Cinética de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en biorreactor a 0.5 vvm	60
6.8.1 Estudio cinético de pH y conductividad en biorreactor	61
6.8.2 Estudio cinético del consumo de azúcares en biorreactor	62
6.8.3 Estudio cinético de la viabilidad celular en biorreactor	63
6.8.4 Producción de la proteína LTB-syn en biorreactor	63
6.9. Cinética de crecimiento de la línea MSRZ4 de <i>D. carota</i> en biorreactor airlift a 1.5 vvm ...	64
6.9.1 Estudio cinético de pH y conductividad en biorreactor	65
6.9.2 Estudio cinético del consumo de azúcares en biorreactor	65
6.9.3 Estudio cinético de la viabilidad celular en biorreactor	66
6.9.4 Producción de la proteína LTB-syn en biorreactor	67
6.9.5 Detección del transgén LTB-syn por PCR en biorreactor a 0.5 y 1.5 vvm	67
6.9.6 Presencia de la proteína LTB-Syn por Dot-blot en biorreactor a 0.5 y 1.5 vvm	68
6.9.7 Inmunogenicidad de vacuna cLTB-Syn de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4	69
VII) Discusión	72

7.1 Efecto de la fuente de nitrógeno adicional en cultivo de callos	72
7.2 Fase de cribado por Plackett-Burman	73
7.3 Fase de optimización del medio de cultivo por MSR.....	74
7.4 Validación del modelo predictivo	75
7.5 Análisis de los parámetros cinéticos de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en matraz.....	75
7.6 Análisis de los parámetros cinéticos de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en biorreactor.....	78
7.7 Inmunogenicidad de la vacuna cLTB-Syn en ratones	81
VIII) Conclusiones	83
IX) Perspectivas	83
X) Referencias	84

Apéndice 1 : Expresión y purificación la proteína recombinante rLTB-Syn en cultivos de *Escherichia coli*

1.0 Introducción.....	97
1.1 Sistema de expresión bacteriana.....	97
1.2 Vector de expresión pET	97
1.3 Cepa de expresión <i>E. coli</i> DE3.....	98
1.4 Purificación de proteínas recombinantes	99
1.5 Objetivo general	99
1.6 Objetivos específicos.....	99
1.7 Metodología.....	100
1.7.1 Vector pET15b y cepa <i>E. coli</i> (Rosetta D3).....	100
1.7.2 Células competentes (método cloruro de calcio).....	101
1.7.3 Transformación de <i>E. coli</i> (choque térmico).....	101
1.7.4 Medio de cultivo bacteriano.....	101
1.7.5 Ensayos de expresión en 10 y 200ml.....	101
1.7.6 Obtención de extractos proteicos.....	102
1.7.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con Coomassie	102
1.7.8 Purificación de la proteína rLTB-Syn por IMAC	102
1.7.9 Purificación de la proteína rLTB-Syn por IEX.....	103
1.7.10 Detección de la proteína rLTB-Syn por Western blot.....	103
1.7.11 Densitometría.....	103
1.8 Resultados	104
1.8.1 Transformación y expresión de rLTB-Syn en <i>E. coli</i>	104
1.8.2 Purificación de la proteína rLTB-Syn por IMAC	106
1.8.3 Purificación de la proteína rLTB-Syn por intercambio iónico (IEX)	107
1.8.4 Detección de rLTB-Syn por Western blot	108
1.9 Discusión.....	109
1.10 Conclusión.....	110
1.11 Referencias	111

Apéndice 2 : Reconocimiento de α -sinucleína en biopsias de piel con sueros anti-syn

2.0 Introducción.....	112
2.1 Objetivo general	112
2.2 Material biológico	112
2.3 Metodología.....	112
2.3.1 Prueba inmunohistoquímica (IHC) en biopsias de piel	112

2.4 Resultados	113
2.4.1 Biopsias de nevus compuestos	113
2.4.2 Biopsias de piel con Parkinson.....	114
2.5 Discusión.....	116
2.6 Conclusión	117
2.7 Referencias	118

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de proteínas de importancia medica producidas en cultivos vegetales	10
Tabla 2. Prototipos de vacunas recombinantes producidos en tejidos de zanahoria	12
Tabla 3. Ejemplo de antígenos producidos en plantas con inmunogenicidad/inmunoprotección	15
Tabla 4. Criterios de escalamiento usados en biorreactores	25
Tabla 5. Ejemplos de proteínas recombinantes producidas en sistemas de biorreactores.....	26
Tabla 6. Nivel de concentración de nitrógeno adicional en cultivos de callos de <i>D. carota</i>	31
Tabla 7. Diseño experimental de la fuente adicional de nitrógeno en cultivos de callos de <i>D. carota</i>	32
Tabla 8. Factores evaluados con el diseño Plackett-Burman y codificación de los factores.....	33
Tabla 9. Arreglo aleatorio del diseño Plackett-Burman para la fase de cribado	33
Tabla 10. Factores analizados en el diseño compuesto central (CCD) con efecto positivo y codificación de los niveles evaluados	33
Tabla 11. Diseño Box-Behnken en función factores importantes para la optimización de <i>D. carota</i>	34
Tabla 12. Características dimensionales del biorreactor airlift de 2 L	35
Tabla 13. Matriz de diseño factorial Plackett-Burman y resultado de producción de biomasa de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4.....	44
Tabla 14. Tratamientos con mayor producción de biomasa de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4	45
Tabla 15. Matriz de diseño factorial fraccionado Plackett-Burman y resultados de producción de la proteína LTB-syn de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4.....	46
Tabla 16. Tratamientos con mayor producción de la proteína LTB-Syn de <i>D. carota</i> en la línea MSRZ4 ..	46
Tabla 17. Resumen del ANOVA para los factores evaluados en la etapa de cribado mediante el diseño Plackett-Burman	48
Tabla 18. Matriz del diseño Box-Behnken para la fase de optimización y resultados de biomasa experimental y estimada.....	49
Tabla 19. Resumen del ANOVA de los factores evaluados en la etapa de optimización mediante el diseño Box-Behnken	50
Tabla 20. Condiciones óptimas estimadas por <i>Statgraphics</i> para maximizar la producción de biomasa de <i>D. carota</i> que expresan la proteína LTB-Syn	53
Tabla 21. Comparación en la producción experimental de biomasa del medio MSR con respecto al estimado y a los medios B5 y MS estándar	54
Tabla 22. Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 con los medios MSR respecto al MS estándar a nivel de matraz	58

Índice de figuras

Figura 1. Comparación de secuencias de α -sinucleína, β -sinucleína y γ -sinucleína humanas	2
Figura 2. La patología de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson.....	5
Figura 3. Esquema del método dinámico (<i>gassing-out</i>).....	36
Figura 4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de callos de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4	41
Figura 5. Morfología de los cultivos de callos de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en medios MS y B5 adicionados con urea y glutamato.....	42
Figura 6. Cultivos de células en suspensión de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en matraz	43
Figura 7. Producción de biomasa obtenidos en base al diseño Plackett-Burman.....	44
Figura 8. Producción de la proteína LTB-syn en base al diseño Plackett-Burman.....	45
Figura 9. Cuadro de Pareto estandarizado en base al diseño Plackett-Burman.....	47
Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta y de contorno para los efectos entre tamaño de inóculo y la urea en la producción de biomasa de <i>D. carota</i>	51
Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta y de contorno para los efectos entre tamaño de inóculo y el pH en la producción de biomasa de <i>D. carota</i>	52
Figura 12. Gráfico de superficie de respuesta y de contorno para los efectos entre la urea y el pH en la producción de biomasa de <i>D. carota</i>	52
Figura 13. Gráfico de deseabilidad máxima en función de la producción de biomasa de <i>D. carota</i>	53
Figura 14. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en matraz	55
Figura 15. Curva de crecimiento y variación de pH de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en matraz	55
Figura 16. Curva de crecimiento y consumo de azúcares de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en matraz	56
Figura 17. Curva de crecimiento y % de viabilidad de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en matraz	57
Figura 18. Curva de crecimiento y producción de proteína LTB-Syn de <i>D. carota</i> en matraz	57
Figura 19. Detección del transgén <i>LTB-Syn</i> por PCR de <i>D. carota</i> de línea MSRZ4 en matraz	59
Figura 20. Detección de la expresión de la proteína LTB-Syn de <i>D. carota</i> por Western-blot.....	59
Figura 21. Presencia de la proteína LTB-Syn de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 por Dot-blot	60
Figura 22. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en biorreactor airlift a 0.5 vvm.....	61
Figura 23. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 respecto a variación de pH y conductividad del medio en biorreactor airlift a 0.5 vvm	62
Figura 24. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 y consumo de azúcares en biorreactor airlift a 0.5 vvm	62
Figura 25. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 respecto a % de viabilidad celular en biorreactor airlift a 0.5 vvm	63
Figura 26. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 respecto a la producción de proteína LTB-Syn en biorreactor airlift a 0.5 vvm.....	64
Figura 27. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 en biorreactor airlift a 1.5 vvm.....	64

Figura 28. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 respecto a variación de pH y conductividad del medio en biorreactor airlift a 1.5 vvm	65
Figura 29. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 respecto al consumo de azúcares en biorreactor airlift a 1.5 vvm	66
Figura 30. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 respecto al porcentaje de viabilidad celular en biorreactor airlift a 1.5 vvm	66
Figura 31. Curva de crecimiento de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 y producción de proteína LTB-Syn en biorreactor airlift a 1.5 vvm	67
Figura 32. Detección del transgén LTB-Syn de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 por PCR en biorreactores...	68
Figura 33. Presencia de la proteína LTB-Syn de <i>D. carota</i> de la línea MSRZ4 por Dot-blot en biorreactores	69
Figura 34. Evaluación de la respuesta sistémica de la vacuna cLTB-Syn en ratones BALB/c	70
Figura 35. Evaluación de la respuesta en mucosas de la vacuna cLTB-Syn en ratones BALB/c	71

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Rosetta (DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> , para expresión de proteínas
Cin	Cinetina
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos
IEX	Cromatografía de intercambio iónico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
g	Gramos
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
Kbp	Kilopares de bases
k _L a	Coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno
L	Litro
B5	Medio de cultivo Gamborg
MS	Medio de cultivo Murashige-Skoog
MT	Millones de toneladas
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mbar	Milibar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
bp	Pares de bases
PS	Peso fresco
PF	Peso seco
PTS	Proteína total soluble
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
s.c.	Subcutáneo
v.o.	Vía oral
vvm	Volumen de aire por volumen de líquido por minuto

Resumen

Las sinucleinopatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por la agregación de inclusiones ricas en alfa sinucleína (α -Syn) en el SNC, provocando patologías como Parkinson (EP), la atrofia multisistémica (AMS) y la demencia con cuerpos de Lewy (CL). En 2019, la OMS estimó una prevalencia de más de 8,5 millones de personas con EP, esto la convierte en la segunda enfermedad neurodegenerativa más importante del mundo. Los tratamientos actuales solo mejoran los síntomas motores de forma transitoria, además son poco accesibles y asequibles, principalmente en los países de ingresos medios y bajos. En este proyecto se propuso la producción de una vacuna terapéutica contra las sinucleinopatías, a partir de la obtención de biomasa de zanahoria productora de la proteína LTB-Syn, además de evaluar su inmunogenicidad por vía oral en ratones. Se estudió el efecto del crecimiento de callos de zanahoria con dos fuentes de nitrógeno (urea y glutamato) en los medios B5 y MS, posteriormente se utilizó el modelo *in silico* de Plackett-Burman con el fin de determinar qué factores nutritivos y físicos eran los más influyentes en la producción de biomasa y proteína LTB-Syn. Se empleó el análisis de superficie de respuesta (MSR), después se validó el modelo experimentalmente y se obtuvieron los parámetros cinéticos de crecimiento a nivel de matraz y biorreactor airlift. La biomasa de la línea MSRZ4 obtenida fue administrada por vía oral (G3) a ratones BALB/c, se usó una inmunización combinada s.c./v.o. (G1), una vía s.c. con péptidos sintéticos como control positivo (G2), y una v.o. con biomasa no transformada como control negativo (G4). Se obtuvieron respuestas significativas de anticuerpos en mucosas como a nivel sistémico en los ratones de G2 y G3 respecto al grupo G4. Estos resultados demuestran que la administración por vía oral de la vacuna LTB-Syn expresada en zanahoria induce una respuesta significativa y de igual magnitud que una vía solo s.c. y constituyen una potencial vacuna candidata comestible.

Así mismo, se logró expresar y purificar la proteína rLTB-Syn en *E. coli* con el fin de contar con un control positivo en los futuros ensayos inmunológicos con refuerzos orales con biomasa de zanahoria. En resumen, estas estrategias biotecnológicas representarían el desarrollo de inmunoterapias nuevas, efectivas y asequibles contra el Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas, especialmente en países con recursos limitados.

Abstract

Synucleinopathies are a group of neurodegenerative diseases, characterized by the manifestation of protein bodies rich in alpha synuclein (α -Syn) in the CNS, causing pathologies such as Parkinson's disease (PD), multiple system atrophy (MSA), and dementia with Lewy bodies (LB). In 2019, the WHO estimated a prevalence of more than 8.5 million people with PD, making it the second most important neurodegenerative disease in the world. Current treatments only temporarily improve motor symptoms; furthermore, they are poorly accessible and affordable, mainly in low- and middle-income countries. In this project, the production of a therapeutic vaccine against synucleinopathies was proposed, from obtaining carrot biomass that express the LTB-Syn protein, in addition to evaluating its immunogenicity after oral administration to mice. First, the effect on carrot callus growth was studied with two additional nitrogen sources (urea and glutamate) in the B5 and MS media; subsequently, the Plackett-Burman model was used in order to determine which nutritional and physical factors were the most influential on biomass and LTB-Syn protein production. Furthermore, to obtain the optimal conditions of the culture medium, the response surface methodology (RSM) was used. After validating the model experimentally, the kinetic growth parameters were obtained at the shake flask and airlift bioreactor scales. The carrot biomass MSRZ4 obtained was administered orally (G3) to BALB/c mice, combined s.c. plus p.o. immunization was used (G1), the s.c. with peptides as a positive control (G2), and the p.o. with non-transformed biomass as a negative control (G4). Significant mucosal and systemic antibody responses were obtained in G2 and G3 mice compared to those in the G4 group. These findings demonstrate that oral administration of the LTB-Syn protein expressed in carrots constitutes a potential edible vaccine.

Furthermore, it was possible to express and purify the rLTB-Syn protein in *E. coli* in order to have a positive control in future immunological tests with oral boosting with carrot biomass. These alternative strategies would represent the development of new, effective, and affordable immunotherapies against Parkinson's and other neurodegenerative diseases, especially in countries with limited resources.

I) Introducción

1.1 Sinucleinopatías

Las sinucleinopatías son un subconjunto de trastornos neurodegenerativos que tienen en común una lesión patológica compuesta por agregados fibrilares de la proteína α -sinucleína (α -Syn) en poblaciones selectivas de neuronas y glía (Palma y Kaufmann, 2018), dando como resultado patologías como el Parkinson, atrofia multisistémica y demencia con cuerpos de Lewy (Martí *et al.*, 2003). La identificación de varias mutaciones puntuales en el gen de α -Syn (SNCA) la ha implicado fuertemente en la patogénesis del Parkinson y otras sinucleinopatías. Entre las mutaciones puntuales, se encuentran las sustituciones de A53T (Polymeropoulos *et al.*, 1997), A30P (Kruger *et al.*, 1998) y E46K (Zarranz *et al.*, 2004). Aunque la causa y las condiciones fisiopatológicas de estos trastornos son diversos, clínicamente se caracterizan por una disminución crónica progresiva de la función motora, cognitiva, conductual y autónoma (Savitt *et al.*, 2006).

1.2 Tipos de sinucleínas

Las sinucleínas son proteínas que se expresan de forma abundante en el cerebro de humanos (Galvin *et al.*, 2001). La familia de sinucleínas se compone de tres miembros: α -, β - y γ -sinucleína (Goedert, 2001). Las sinucleínas varían de 127 a 140 aminoácidos de longitud, y sus secuencias son de 55 a 62% idénticas. Las sinucleínas se caracterizan por la presencia de repeticiones imperfectas en el extremo amino-terminal de 11 aminoácidos que contienen la secuencia consenso de KTKEGV y están separadas por 5 a 8 aminoácidos (Figura 1). La región repetida es seguida por un dominio hidrofóbico y una región carboxilo-terminal cargada negativamente; el dominio hidrofóbico incluye el péptido NAC, que es crítico para la formación de fibrillas (Jellinger, 2003). En cuanto a la estructura de estas sinucleínas, la β -sinucleína, carece de 11 residuos hidrofóbicos centrales en comparación con sus homólogos y exhibe las propiedades de una espiral aleatoria, mientras que las α -sinucleínas y γ -sinucleínas son ligeramente más compactas y estructuradas (Uversky *et al.*, 2002). La γ -sinucleína, a diferencia de sus homólogos, forma oligómeros solubles en concentraciones relativamente bajas.

Mediante inmunohistoquímica, se ha observado que las α - y β -sinucleínas se concentran en las terminales nerviosas, muy cerca de las vesículas sinápticas. Por el contrario, la γ -sinucleína parece estar presente en todas las células nerviosas (Clayton y George, 1999a). Estudios experimentales han demostrado que la α -sinucleína puede unirse a las membranas lipídicas a través de sus repeticiones amino terminales, lo que indica que podría ser una proteína de unión

a lípidos (Jo *et al.*, 2000). Se ha demostrado que tanto la α - y β -sinucleína inhiben selectivamente la fosfolipasa D2 (Jenco *et al.*, 1998). Esta isoforma de fosfolipasa D se localiza en la membrana plasmática, donde podría estar involucrada en la regulación citoesquelética y la endocitosis inducidas por señales. Por tanto, es posible que las α - y β -sinucleínas regulen los procesos de transporte vesicular.



Figura 1. Comparación de secuencias de α -sinucleína, β -sinucleína y γ -sinucleína humanas. Las identidades conservadas de aminoácidos entre las secuencias están marcadas en color azul. Se indican en color rojo las mutaciones de α -Syn presentes en la enfermedad de Parkinson (A30P y A53T). La mitad del extremo amino-terminal de las sinucleínas están destacadas por repeticiones de 11 aminoácidos consenso de KTKEGV (tomado de Goedert, 2001).

El gen de α -Syn (SNCA) se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4 en humanos (4q β 1. γ -q β). La estructura intrón/exón de los genes de la α -Syn humana y de ratón está altamente conservada (Touchman *et al.*, 2001) y las secuencias de la proteína de la α -sinucleína humana y murina son idénticas en un 95.3% (Lavedan, 1998). Las secuencias de aminoácidos de la α -Syn de ratón y humana difieren en siete posiciones. El gen de α -Syn humana codifica una proteína de 140 aminoácidos, caracterizada por repeticiones imperfectas (KTKEGV) distribuidas en mayor parte en el extremo amino terminal del polipéptido, una región media hidrofóbica (región NAC) y una región carboxilo-terminal ácida (Eliezer *et al.*, 2001). El gen de la β -sinucleína humana (SNCB) se encuentra asociado al cromosoma 5q35 (Spillantini *et al.*, 1995), mientras que el gen de la β -sinucleína de ratón (SnCb) se localiza en el cromosoma 13 (Sopher *et al.*, 2001). Al igual

que el gen de la β -sinucleína humana, *Sncb* consta de seis exones separados por cinco intrones. La β -sinucleína está compuesta de 134 aminoácidos en humanos (Jakes *et al.*, 1994) y 133 aminoácidos en ratones. La β -sinucleína de ratón comparte un 97,8% de identidad con la proteína humana (Lavedan, 1998). El gen de la γ -sinucleína humana (SNCG) se encuentra en el cromosoma 10q23 (Lavedan *et al.*, 1998b), mientras que el gen de la γ -sinucleína de ratón (*Sncg*) se encuentra en el cromosoma 14 (Alimova-Kost *et al.*, 1999). El gen de la γ -sinucleína humana está compuesto por cinco exones que codifican una proteína de 127 aminoácidos, mientras que el gen de la γ -sinucleína de ratón codifica una proteína de 123 aminoácidos. La γ -sinucleína humana es 87,7% idéntica a las proteínas de ratón (Lavedan, 1998).

1.3 Funciones de α -Syn

La α -Syn humana es una proteína expresada en el cerebro, específicamente se encuentra en estructuras como neocórtex, hipocampo, bulbo olfatorio, tálamo, cuerpo estriado y cerebelo (Mori *et al.*, 2002). La función de α -Syn no está clara; se ha propuesto participar en el transporte sináptico de vesículas y como un regulador negativo dependiente de la actividad de la liberación de dopamina. Sin embargo, hay evidencias que indican que la α -Syn puede desempeñar un papel importante en la plasticidad neuronal, el aprendizaje, el desarrollo, la adhesión celular, la fosforilación y la diferenciación celular (Clayton y George; 1998). La α -Syn también se asocia con membranas lipídicas (McLaurin *et al.*, 2000) y colocaliza con sinaptofisina y SNAP-25, lo que puede respaldar la asociación a vesículas sinápticas (Withers *et al.*, 1997). Además, un estudio *in vitro* demostró que la α -Syn inhibía la fosfolipasa D y promovía el estrés oxidativo (Giasson *et al.*, 2000). Asimismo, se ha sugerido que la α -Syn puede actuar como un regulador en la vía de la MAP quinasa, al formar un complejo con el factor de transcripción Elk-1 (Iwata *et al.*, 2001).

Al mismo tiempo, la α -Syn también se ha detectado en células del sistema periférico, por ejemplo, el corazón, el páncreas, los músculos esqueléticos, los megacariocitos, las plaquetas, los linfocitos y los monocitos (Hashimoto *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2000). Una expresión tan extendida de α -Syn en células no neuronales sugiere que su función no sólo es exclusiva del cerebro y de las enfermedades neurodegenerativas, sino que también puede estar asociada con enfermedades no neurológicas. Los estudios futuros sobre la función de la α -Syn pueden ayudar a comprender las funciones fisiológicas de esta proteína y su patogénesis en varios trastornos neurológicos.

1.4 Agregación anormal de α -Syn

La α -Syn se ha relacionado en diversos trastornos neurodegenerativos al participar en depósitos anormales de proteínas. Actualmente, se ha aceptado ampliamente que la α -Syn se agrega anormalmente en fibrillas insolubles y forma estructuras patológicas, como los cuerpos de Lewy (CL); que es un evento patogénico principal en los trastornos neurodegenerativos relacionados con la α -Syn. Sin embargo, los mecanismos de agregación anormal de α -Syn en cerebros con enfermedades neurodegenerativas no están claros. Algunos estudios indicaron que las reacciones de estrés oxidativo podrían contribuir a una agregación anormal de α -Syn (Giasson *et al.*, 2000). Cuando la α -Syn recombinante se incubó con citocromo c o peróxido de hidrógeno, la α -Syn se agregó concomitantemente (Hashimoto *et al.*, 1999). En altas concentraciones, la α -Syn normal puede autoagregarse en solución para formar fibrillas similares a CL y conjuntos esféricos discretos, además este proceso se acelera en formas mutadas de α -Syn (Conway *et al.*, 1998). Varios productos químicos agrícolas (pesticidas) como la rotenona y el paraquat, cuando se administran sistémicamente en murinos, pueden inducir un cambio conformacional en la α -Syn y así acelerar la velocidad de formación de fibrillas de α -Syn *in vitro*, estas son características específicas de la EP (Betarbet *et al.*, 2002).

No es concluyente que la agregación de α -Syn sea la causa principal en el proceso patogénico en los trastornos neurodegenerativos relacionados con la α -Syn. Recientemente se ha demostrado que su presencia en el núcleo celular es importante para modular la reparación del ADN, por lo que su agregación en las sinucleinopatías estaría implicando una pérdida de su función protectora del genoma (Pinho *et al.*, 2019). Esta información podría ser muy útil en el futuro para desarrollar moléculas interactivas con la α -Syn, que eventualmente proporcionen opciones terapéuticas preventivas contra diversos trastornos relacionados con la α -Syn, particularmente para la EP. Se necesitan más estudios para aclarar qué tipos de factores inician precisamente la agregación y cómo prevenirla o disminuirla.

1.5 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común después del Alzheimer, afecta de 1-2% de la población general mayor de 65 años y fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 (Alves *et al.*, 2008). Clínicamente la EP se caracteriza por bradicinesia, rigidez, temblor, postura inestable y dificultad para caminar; así como por varios síntomas no motores (estreñimiento, sudoración, trastorno del sueño, depresión). Los síntomas comienzan cuando las concentraciones de dopamina caen por debajo del 60-80% en

el estriado contralateral. Neuropatológicamente, los pacientes con EP en etapa tardía presentan pérdida de la mayoría de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) con una disminución de la dopamina a nivel estriatal (Marsden, 1982). Otra característica fundamental de EP es la formación de agregados intraneuronales de α -Syn con inclusiones citoplásmicas redondas y eosinófilas en forma de cuerpos de Lewy (CL) y neuritas de Lewy (NL) (Figura 2) (Lewy, 1912). Sin embargo, la presencia de CL no se limita solo a la región del cerebro, también se encuentran en el núcleo motor del nervio vago, el hipotálamo, el locus coeruleus, la corteza cerebral, el bulbo olfatorio y el sistema nervioso autónomo (Forno, 1996). Por lo tanto, una acumulación anormal de α -Syn en los cuerpos celulares del SNpc es un sello distintivo de la EP (Lotharius y Brundin 2002). Se ha demostrado que los agregados de α -Syn se esparcen entre las células que conforman el parénquima cerebral de una manera parecida a los priones (prion-like), por lo que la invasión sucesiva de áreas cerebrales con estos agregados tóxicos se asocia significativamente con el progreso de la enfermedad (Woerman *et al.*, 2015).

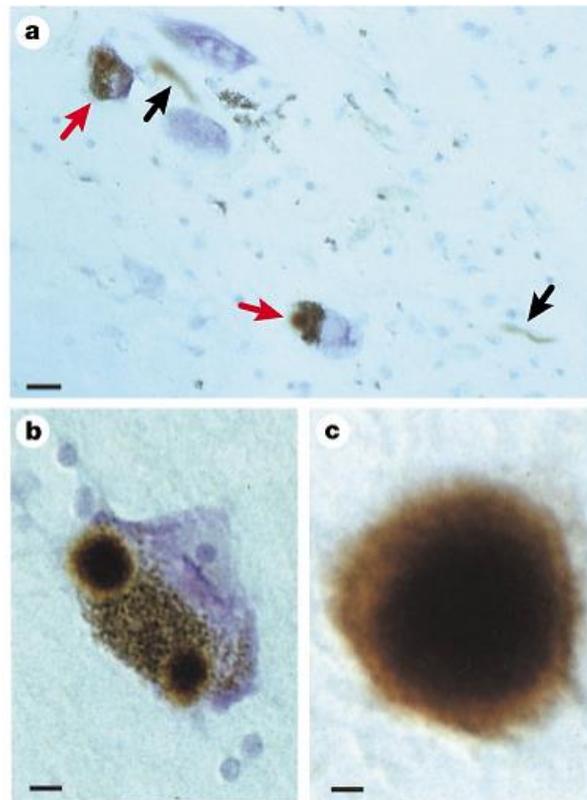


Figura 2. La patología de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson. Los cuerpos de Lewy (CL) y las neuritas de Lewy (NL) en la sustancia negra del cerebro se muestran por microscopía óptica marcadas por anticuerpos específicos a α -sinucleína. (a) Dos células nerviosas pigmentadas, cada una contiene un CL positivo para α -sinucleína (flechas rojas) y dos NL también inmunopositivas (flechas negras). (b) Célula

nerviosa pigmentada con dos CL positivos para α -sinucleína. (c) CL extracelular positivo para α -sinucleína (tomado de Goedert, 2001).

Durante las últimas dos décadas, el estrés oxidativo ha recibido mucha atención como mecanismo patogénico, porque el metabolismo oxidativo de la dopamina es una fuente potencial de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Olanow y Tatton, 1999). Los estudios post mortem de cerebros con pacientes de EP han indicado firmemente que la sustancia negra se encuentra en un estado de estrés oxidativo. Se ha reportado que existe un aumento de hierro, una disminución de glutatión y daño oxidativo a los lípidos, las proteínas y el ADN. Además, se ha detectado disfunción mitocondrial (30 al 40 % en pacientes con EP) en la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones, lo que lleva a una mayor producción de ROS particularmente radicales superóxido (Mizuno *et al.*, 1989). Así mismo, hallazgos importantes relacionados con la fisiopatología de α -Syn, en la producción de ROS, neuroinflamación y posterior muerte neuronal (Sánchez-Guajardo *et al.*, 2013), han permitido el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos y específicamente el campo de la inmunoterapia ha mostrado resultados prometedores.

1.6 Tratamientos contra enfermedad de Parkinson

Hasta la fecha, la EP sigue siendo una enfermedad incurable. Los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos actualmente disponibles sólo pueden controlar los síntomas y signos de la enfermedad, minimizando los efectos adversos (Katzung, 2001). Las terapias disponibles tienen como objetivo mejorar la capacidad funcional del paciente durante el mayor tiempo posible; sin embargo no modifican la progresión del proceso neurodegenerativo.

1.6.1 Tratamiento farmacológico

Los medicamentos utilizados para tratar la EP aumentan los niveles de dopamina (DA) en el cerebro. La mayoría de los pacientes que comienzan el tratamiento sólo con un agonista del receptor DA eventualmente necesitarán agregar levodopa al cabo de unos años (Silver y Ruggieri, 1998). Para minimizar los efectos secundarios, inicialmente se utilizan dosis muy bajas y se aumentan gradualmente (Mercuri y Bernardi, 2005). La levodopa es el tratamiento sintomático más eficaz que existe para reducir los síntomas motores de la EP y el mejor tolerado (Hauser *et al.*, 2009). Se absorbe en el duodeno proximal por un sistema de transporte de aminoácidos neutros. La levodopa, produce fluctuaciones en las respuestas motoras de 30% al 50% aproximadamente en los pacientes expuestos a la terapia durante 5 o más años. Los pacientes de edad avanzada pueden ser particularmente sensibles a levodopa, lo que puede provocar síntomas de confusión, alucinaciones, hipotensión ortostática y fatiga. Además de la levodopa, los medicamentos que se prescriben actualmente para el tratamiento de la EP incluyen agonistas

dopaminérgicos, selegilina, amantadina, inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (ICOMT) o inhibidores de la monoaminoxidasa-B (IMAO-B), que aumentan la vida media de la dopamina así como su concentración en el cerebro, y anticolinérgicos (biperideno, prociclidina, trihexifenidilo), que son moderadamente eficaces en el control de los temblores.

1.6.2 Tratamiento inmunológico

Un enfoque prometedor para reducir la α -Syn extracelular que ya ha entrado en la etapa de ensayos clínicos es la inmunoterapia. Se están desarrollando inmunoterapias tanto activas (estimulación del sistema inmunológico) como pasivas (administración directa de anticuerpos). Múltiples estudios preclínicos han establecido que los anticuerpos contra α -Syn pueden disminuir la agregación de α -Syn en ratones que sobreexpresan α -Syn y prevenir déficits de comportamiento (Brundin *et al.*, 2017). Es de suponer que estos anticuerpos se dirigen a la α -Syn extracelular disminuyendo la diseminación de agregados entre células, ya que se les impide entrar en las células (George y Brundin, 2017).

El primer candidato terapéutico contra la EP fue PRX002 desarrollado por Prothena. PRX002 es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado dirigido a epítomos del extremo carboxilo de la α -Syn. Se derivó del anticuerpo monoclonal murino 9E4, que demostró reducir la acumulación de α -Syn y afectar el deterioro del comportamiento en modelos animales transgénicos de sinucleinopatía (Games *et al.*, 2013). Otro anticuerpo monoclonal anti- α -Syn en desarrollo es el BIIB054. A diferencia de PRX002, BIIB054 es un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humanizado dirigido a un epítomo del extremo amino de la α -Syn. BIIB054 se aisló originalmente a partir de líneas de células B derivadas de individuos neurológicamente sanos en los laboratorios de la empresa de biotecnología suiza Neurimmune. BIIB054 es altamente selectivo para formas agregadas en secciones de tejido de EP, presumiblemente patológicas de α -Syn, pero no en cerebros sanos. Este anticuerpo previno la reducción del transportador de dopamina inducida por la inyección de fibrillas de α -Syn preformadas en cerebros de ratones (Weihofen *et al.*, 2017). El anticuerpo monoclonal MEDI1341 fue desarrollado mediante una colaboración entre AstraZeneca y Takeda. MEDI1341 entró en la fase 1 de pruebas con voluntarios sanos en octubre de 2017 (identificador de ClinicalTrials.gov NCT03272165). El anticuerpo monoclonal llamado BAN0805 desarrollado en colaboración entre Bioarctic y Abbvie fue dirigido a oligómeros y protofibrillas de α -Syn. En la actualidad, no hay información disponible públicamente sobre el estado de desarrollo de este anticuerpo (BioArctic, 2024).

La única inmunoterapia activa que ha avanzado al ámbito clínico es AFFITOPE PD03A, una vacuna producida sintéticamente que contiene un péptido que imita la α -Syn para provocar una respuesta de anticuerpos anti α -Syn. La compañía Affiris AG finalizó recientemente un ensayo de fase 1 aleatorizado, donde se evaluó la seguridad y tolerabilidad de la administración subcutánea de AFFITOPE PD03A a pacientes con EP temprana (identificador de ClinicalTrials.gov NCT02267434). Las dosis fueron bien toleradas y no se produjeron reacciones o eventos adversos graves relacionados con el medicamento (AFFiRiS, 2024).

Un desafío importante que ha surgido sobre la inmunoterapia contra la EP ya sea activa o pasiva, es si los anticuerpos tendrán suficiente capacidad de llegar al cerebro para lograr un efectivo tratamiento. Hasta la fecha, ninguno de los programas de inmunoterapia ha informado de un efecto sobre los niveles de α -Syn en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

1.6.3 Otros tratamientos

En cuanto a los tratamientos futuros, destaca la búsqueda de formulaciones de liberación sostenida, profármacos o parches de liberación transdérmica de levodopa, que prolonguen su biodisponibilidad (Hauser, 2009). Entre los fármacos más prometedores que exploran otros mecanismos de acción destacan los antagonistas de los receptores de la adenosina A2A, como istradefilina, que podrían tener un efecto neuroprotector (Jenner *et al.*, 2009). El trasplante de neuronas productoras de dopamina, para reemplazar las degeneradas durante la patogénesis de la EP era un enfoque de tratamiento prometedor. Esta implantación de células mesencefálicas fetales favorece la liberación más fisiológica de dopamina, sin embargo, la mejoría fue sólo transitoria, y el estudio postmortem de cerebros mostró que las neuronas implantadas habían sido invadidas por los agregados de α -Syn (Lindvall y Hagell, 2001).

1.7 Cultivos vegetales para la producción de proteínas recombinantes

La implementación de cultivos vegetales requiere de la integración de un conjunto de parámetros y variables que deben tener en cuenta desde características propias de las células a cultivar, las condiciones y composiciones óptimas de los cultivos y las variables físicas que pueden afectar el adecuado desarrollo de éstos y, finalmente, su productividad (Schillberg *et al.*, 2019). Los cultivos de células vegetales en suspensión se usan ampliamente como una herramienta conveniente para estudiar una amplia gama de fenómenos. El cultivo de células en suspensión se inicia a partir de la transferencia de una masa desorganizada de células (callos), preferentemente de textura friable a un matraz con medio líquido, el cual se mantiene en agitación constante. Las suspensiones celulares finas están constituidas principalmente por células meristemáticas

indiferenciadas, más débiles e inestables en comparación con su estado en el ambiente natural, pero con respecto a los cultivos de células diferenciadas (raíces y brotes) presentan las ventajas de poder ser cultivadas a mayores densidades celulares y a mayores velocidades de crecimiento. Las tasas de crecimiento de los cultivos microbianos varían de 0.1 h^{-1} a 1 h^{-1} , mientras que la tasa de crecimiento de las células en vegetales en suspensión varía de 0.019 h^{-1} a 0.028 h^{-1} (Drapeau *et al.*, 1986).

El uso de cultivos de células vegetales como un sistema para la producción de proteínas recombinantes es ventajoso comparado con los sistemas convencionales de cultivo de células de mamíferos o bacterias (Doran, 2000); debido a la seguridad intrínseca (son libres de virus y patógenos animales, y pueden cultivarse sin usar materiales derivados de animales), además tienen una alta reproducibilidad por lotes, permiten un control preciso sobre el proceso de crecimiento, menores costos de producción y capital, y un patrón de glucosilación similar al de los humanos, que a menudo es esencial para ensayos terapéuticos (Gomord *et al.*, 2010). La producción de proteínas recombinantes en cultivos vegetales se logró por primera vez hace 30 años, cuando surgió la transformación genética (Sijmons *et al.*, 1990). Desde entonces varias plataformas han surgido como candidatos para una tecnología de producción estandarizada que incluye cultivos en suspensión celular derivados del tabaco (*Nicotiana tabacum*), arroz (*Oryza sativa*) y zanahoria (*Daucus carota*), que son los principales candidatos en la actualidad. La transformación de células de zanahoria se ha logrado por el cultivo conjunto con *Agrobacterium tumefaciens*, por bombardeo de partículas o por electroporación de protoplastos (Rosales-Mendoza y Tello-Olea 2015). Otros cultivos en suspensión de plantas utilizados para la producción de proteínas recombinantes incluyen el arroz (Huang *et al.*, 2002), la soya (Smith *et al.*, 2002) y el tomate (Kwon *et al.*, 2003). Dichas líneas celulares se han estudiado debido a sus beneficios anticipados que incluyen un crecimiento más rápido, niveles de expresión más altos, entre otras. Es así como los sistemas de cultivo de células vegetales pueden ser el medio más favorable para producir proteínas recombinantes complejas de alta demanda y pureza (Aviezer *et al.*, 2009).

Las plantas se han utilizado para producir diferentes proteínas con aplicaciones médicas directas o indirectas, incluyen a las proteínas de la leche β -caseína y la lisozima, que podrían usarse para mejorar la salud infantil (Chong *et al.*, 1997) y los polímeros de proteínas que podrían usarse en cirugía y reemplazo de tejidos (Guda *et al.*, 2000). De igual forma, se ha demostrado que el colágeno humano se puede producir en plantas de tabaco transgénicas y que la proteína se procesa espontáneamente y se ensambla en su conformación triple helicoidal típica (Merle *et al.*,

2002). Una seda de araña sintética también se ha expresado en plantas de tabaco y papa a partir de los genes endógenos de proteínas de seda de la araña *Nephila clavipes*, que se sintetizaron en el laboratorio y fueron transformadas por *Agrobacterium* (Scheller *et al.*, 2001). Actualmente, dos compañías biotecnológicas: Protalix BioTherapeutics (<http://www.protalix.com>) y Dow AgroSciences (<http://www.dowagro.com/>) se han centrado en el desarrollo y la comercialización de proteínas farmacéuticas expresadas por cultivos vegetales patentados, denominados ProCellEx™ y Concert™ Plant-Cell-Produced System, respectivamente. El éxito comercial de estas compañías definirá sin duda una nueva era en la industria biofarmacéutica, que promete brindar una oportunidad de crecimiento para los productos basados en plantas. Algunos de los sistemas para la fabricación de proteínas de importancia médica se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de proteínas de importancia médica producidas en cultivos vegetales

Proteína recombinante	Planta	Localización	Rendimientos	Referencia
Albúmina humana	Tabaco BY-2	Apoplasto	0.25µg/L	Sijmons <i>et al.</i> , 1990
Eritropoyetina humana	Tabaco BY-2	Secretada	1 pg/L	Matsumoto <i>et al.</i> , 1995
Anticuerpo monoclonal mAb	Tabaco NT-1	Secretada	1µg /L	LaCount <i>et al.</i> , 1997
Interleucina 4	Tabaco NT-1	Secretada	180µg /L	Magnuson <i>et al.</i> , 1998
Factor estimulante de crecimiento humano (hGM-CSF)	Tabaco NT-1	Secretada	250µg /L	James <i>et al.</i> , 2000
Antígeno de superficie (HBAg)	Soya	Intracelular	22mg /L	Smith <i>et al.</i> , 2002
Factor estimulante de crecimiento humano (hGM-CSF)	Tomate	Secretada	45µg /L	Kwon <i>et al.</i> , 2003

1.8 Estrategias de optimización en cultivos vegetales

La producción de proteínas recombinantes expresadas en tejidos vegetales presenta rendimientos relativamente bajos (0.01–0.2 g/L) respecto a las células de mamíferos (1–3 g/L) y otros sistemas eucariontes (0.5–5 g/L) (Doran, 2000). Debido a que el rendimiento y la concentración del producto ejercen una gran influencia en la economía del proceso, mejorar la productividad de proteínas recombinantes es crucial para el éxito comercial del sistema de producción basado en plantas. Para resolver estas limitantes, en los últimos años se han logrado

de forma sistemática por varias estrategias que incluyen la selección de líneas con alto rendimiento, la optimización de medios de cultivo y la ingeniería de procesos (p. ej., diseño de biorreactor y condiciones de operación).

La estrategia de optimización con medio de cultivo se ha reportado que cuando se adiciona nitrógeno extra al medio MS (Murashige y Skoog) mejora la productividad de las células BY-2 hasta 150 veces en la fase estacionaria, obteniendo en última instancia rendimientos de anticuerpos monoclonales recombinantes hasta de 20 veces (Holland *et al.*, 2010). Debido a que la fuente de nitrógeno es fundamental en el metabolismo de las células vegetales por estar directamente conectado a la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, el control del suministro de nitrógeno adicional (como urea o algún aminoácido) parece ser la clave para la producción eficiente de proteínas en cultivos vegetales en suspensión (Vasilev *et al.*, 2013). Recientemente se han implementado diseños estadísticos experimentales en los cultivos vegetales (Plackett y Burman, 1946), en donde se pueden variar los componentes del medio de cultivo de manera simultánea, así como otras condiciones externas como el pH, la luz, la temperatura y niveles de oxígeno disuelto (Vasilev *et al.*, 2013). Por lo que la optimización del medio de cultivo y el control del proceso son herramientas prometedoras para evitar la degradación de proteínas recombinantes al final del cultivo.

1.9 *Daucus carota* como plataforma productora de biofármacos

El desarrollo de la biología molecular tuvo sus inicios a finales de la década de 1980, y desde entonces se han elaborado una gran cantidad de productos basados en plantas, estos incluyen vacunas, anticuerpos, citocinas y enzimas (Viridi y Depicker 2013; Da Cunha *et al.*, 2014). En el caso de la zanahoria *Daucus carota* (*D. carota*), el estado del arte comprende más de diez prototipos de vacunas que se resumen en la Tabla 2. Entre las proteínas terapéuticas se destacan la producción de la enzima glucocerebrosidasa recombinante (prGCD), utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, convirtiendo a *D. carota* como la primera especie vegetal aprobada para consumo humano (Shaaltiel *et al.*, 2007). Otras enzimas producidas en *D. carota* con potencial incluyen: una acetilcolinesterasa recombinante humana (PRX-105) para varias indicaciones terapéuticas y profilácticas, α -galactosidasa-A recombinante (PRX-102) para el tratamiento de la enfermedad de Fabry y un anti-TNF (PRX-106) para el tratamiento de la artritis reumatoide, la cuales se encuentran en desarrollo preclínico y clínico por la compañía Protalix Biotherapeutics. Este avance proyecta un futuro alentador para el campo biofarmacéutico de origen vegetal, ya que reflejan el interés de la industria por la plataforma y se espera que la

experiencia adquirida durante el proceso de aprobación del primer producto impulse la introducción al mercado de otros productos biofarmacéuticos basados en zanahoria.

Dado que la zanahoria se consume ampliamente en todo el mundo en su forma cruda (se estima en 35.5 MT), la convierte en una fuente atractiva de biomasa para el suministro de vacunas orales con un procesamiento mínimo de bajo costo para su purificación; por ejemplo, a través de la liofilización, lo que permitiría tener un formulado en polvo encapsulado a partir de células en suspensión. Dicho producto permanecería estable a temperatura ambiente, podría enriquecerse a concentraciones más altas, lo cual garantizaría una dosificación precisa y podría mezclarse con adyuvantes. Además, una vez que se desarrollan las líneas celulares transformadas, los sistemas de zanahoria ofrecen tiempos de producción cortos a nivel de biorreactores, que al mismo tiempo constituyen un proceso compatible con las buenas prácticas de manufactura (GMP). Por lo tanto, la zanahoria es una plataforma conveniente para la producción de biofármacos debido a la experiencia adquirida en términos de producción a nivel industrial y, además, por la evaluación adicional de los prototipos en ensayos clínicos; así como el uso de nuevas estrategias de producción y al establecimiento de condiciones adecuadas que cumplan con las regulaciones que rigen los productos biofarmacéuticos para consumo humano.

Tabla 2. Prototipos de vacunas recombinantes experimentales producidos en tejidos de zanahoria

Prototipo de vacuna	Proteína recombinante	Nivel de expresión	Características funcionales	Referencias
Virus del sarampión	La glicoproteína hemaglutinina (H)	2-20% de proteína específica en la fracción de membranal	La respuesta inmune en ratones reveló que los sueros de animales reforzados 2 ó 3 veces con extractos de zanahoria tenían una reactividad positiva.	Marquet-Blouin <i>et al.</i> , 2003
Virus de la hepatitis B	Antígeno de superficie HBsAg	42 ng/g PF	La inclusión de preS2 junto al antígeno principal HBsAg conduce a una propiedad de mejora de la inmunogenicidad del antígeno	Deineko <i>et al.</i> , 2009
Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)	Proteína de cápside p24	62 ng/g PF	La antigenicidad de la proteína p24 se evidenció por ELISA cuando los extractos se incubaron previamente con sueros de pacientes VIH positivos	Lindh <i>et al.</i> , 2009

Peste bubónica y neumónica por <i>Yersinia pestis</i>	Proteína de fusión F1-V	32 ng/g peso fresco (0.3 % PTS)	La inmunogenicidad de F1-V en ratones Balb/c por vía s.c., indujo niveles significativos de anticuerpos séricos anti-F/V IgG.	Rosales-Mendoza <i>et al.</i> , 2011
Transmisión sexual por <i>Chlamydia trachomatis</i>	Proteína quimérica MOMP	>3 % PTS	No se informó ninguna caracterización funcional de la quimera MOMP	Kalbina <i>et al.</i> , 2011
Tuberculosis (TB)	Antígenos ESAT6 y CFP10	0.056% PTS para rESAT6, 0.024% PTS para rCFP10	La inmunogenicidad se evaluó en ratones después de v.o., provocando con éxito respuestas inmunitarias mediadas por células y humorales	Uvarova <i>et al.</i> , 2013
Vacuna contra la difteria, tétanos y tosferina (DTP)	Casete recombinante DTP (DT/TetC/PTX S1)	0.2mg para DT, 0.3mg para TetC y PTX S1	A concentraciones de 5 µg por dosis, se indujeron altos niveles de IgG específicas de antígeno en suero de ratón	Guiso <i>et al.</i> , 2009
Cólera por <i>E. coli</i>	Antígeno LTB	23 µg/g PS	Ratones inmunizados con LTB que expresan anticuerpos sistémicos e intestinales específicos de LTB inducidos por vía oral y presentaron inmunidad contra la exposición a CT oral.	Rosales-Mendoza <i>et al.</i> , 2007
Gastritis crónica por <i>H. pylori</i>	ureasa B (UreB)	>25 µg/g PF	Los ratones inmunizados por v.o. provocaron respuestas humorales a nivel sistémico en combinación con CTB como adyuvante.	Zhang <i>et al.</i> , 2010
Poliovirus	Proteína VP1 y VP2	0.31-16.85 µg/g PF	Los ratones inmunizados por v.o. se detectaron niveles elevados de IgG específica y IgA-S en las heces	Bolaños-Martínez <i>et al.</i> , 2022

PTS: proteína total soluble; PF: peso fresco; PS: peso seco, CT: citotóxica, s.c. vía subcutáneo, v.o. vía oral

2.0 Vacunas basadas en plantas

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) los sistemas basados en plantas se consideran ideales para la producción de vacunas seguras, económicas y fáciles de administrar (por vía oral), ya que son ampliamente accesibles para su distribución y capaces de almacenarse sin refrigeración (Mitchell *et al.*, 1993). Las vacunas fueron las primeras proteínas recombinantes que se generaron utilizando plantas transgénicas (Mason *et al.*, 1992). Dentro de las

características únicas de las vacunas producidas por plantas es que sirven como un “biorreactor” de producción y como vehículo de entrega en las vacunas orales (Tiwari *et al.*, 2009). Actualmente, se han producido numerosas vacunas basadas en plantas transgénicas, entre las que se encuentran la proteína de la superficie de la envoltura de la hepatitis B, la proteína de la cápside del virus Norwalk, la subunidad B de la toxina enterotoxigénica termolábil de *E. coli* para la inmunización humana y el gen VP1 del virus de la fiebre aftosa (Daniell *et al.*, 2001). En un sentido conceptual, las vacunas orales basadas en plantas son ideales porque el proceso de fabricación es simple y de bajo costo; no se necesitan dispositivos médicos adicionales para la inyección; la inmunogenicidad y las actividades biológicas del antígeno se conservan debido su bioencapsulación, ya que la pared celular representa una barrera contra las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal, ayudando a tener una biodisponibilidad adecuada (Know *et al.*, 2013; Rosales-Mendoza y Nieto-Gómez, 2018). Las paredes externas de las células vegetales están constituidas mayormente por celulosa, hemicelulosa y pectina; la cuales juegan un papel fundamental en la bioaccesibilidad (liberación) del antígeno de interés y sólo se produce tras la acción de enzimas bacterianas producidas por la microflora intestinal, ya que no puede ser degradada por las enzimas digestivas humanas (Bacteroidetes y Firmicutes). Sin embargo, la microflora intestinal produce enzimas digestivas que metabolizan dichos polímeros, principalmente en el intestino grueso en donde se liberan los antígenos recombinantes de forma gradual logrando así, activar el sistema inmune (Martens *et al.*, 2011; Mudgil y Barak, 2013).

Otro aspecto que se ha vuelto importante en las inmunoterapias orales es el uso de adyuvantes, cuya función es activar las células dendríticas (DC) y las células presentadoras de antígenos (CPA) en el sitio donde se libera el antígeno (Lambrecht *et al.*, 2002). La subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) ha demostrado ser un eficiente presentador de antígenos a nivel de submucosas, así como en la activación de respuestas humorales hacia epítomos fusionados genéticamente (Lawson *et al.*, 2011). Los primeros ensayos de vacunas orales obtenidas en plantas fueron con ratones inmunizados contra la enterotoxina termolábil (LTB) y la toxina colérica de *E. coli* (Rosales-Mendoza *et al.*, 2008). Los ensayos clínicos con la vacuna LTB mostraron que el consumo de tubérculos de papa cruda que contenían 0.3-10 mg de LTB produjo altos títulos de anticuerpos a nivel mucosas y sistémicos. De las vacunas producidas en plantas con más datos clínicos que se tienen contra patógenos humanos son de la enterotoxina de *E. coli* (ETEC) (Rosales-Mendoza *et al.*, 2008) y de los virus Norwalk, Influenza, Rabia y Hepatitis B (Yusibov *et al.*, 2011). Algunos otros antígenos producidos en plantas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplo de antígenos producidos en plantas con inmunogenicidad o inmunoprotección

Antígeno	Planta	Nivel de expresión	Evaluación funcional	Referencia
Subunidad B (LTB) de la enterotoxina de <i>E. coli</i>	Soja	2.4% PST	Inmunogénico y protector frente a reto.	Moravec <i>et al.</i> , 2007.
Subunidad B (CTB) de la toxina del Cólera de <i>E. coli</i>	Tomate	0.081% PST	Inmunogénica vía oral en ratones.	Jiang <i>et al.</i> , 2007; Nochi <i>et al.</i> , 2007
	Arroz	2.1% PST		
Rotavirus humano de grupo A	Alfalfa	0.06-0.28% PST	Inmunogénica y protectora con síntomas menos severos.	Dong <i>et al.</i> , 2005
Rotavirus (VP7)	Papa	0.3-0.4% PST	Inmunogénica vía oral neutralizante contra el rotavirus.	Li <i>et al.</i> , 2006
Proteína de cápside del virus Norwalk (NVCP)	Tomate	8% PST	Generó respuesta inmune sistémica y de mucosa en ratones.	Zhang <i>et al.</i> , 2006
	Papa	0.4% PST		
Proteína S SARS-CoV (S1)	Tomate y tabaco	0.1% PST	Inmunogénica en ratones por vía oral.	Pogrebnyak <i>et al.</i> , 2005
Toxina del Tétanos (TetC)	Tabaco	7-10% PST	Generó respuesta inmune sistémica y sobrevivieron al reto con la toxina.	Tregoning <i>et al.</i> , 2003
Parvovirus canino	Tabaco	22.6% PST	Suero de conejo neutralizado en un ensayo <i>in vitro</i> .	Molina <i>et al.</i> , 2004

PST: proteína total soluble

Los anticuerpos y las vacunas son las dos clases principales de proteínas terapéuticas de origen vegetal que se encuentran en desarrollo comercial. Planet Biotechnology tomó la delantera en el desarrollo y comercialización de planticueros producidos en tabaco; los que se prueban en ensayos clínicos incluyen CaroRX (para caries dental), DoxoRX (para terapia contra el cáncer), RhinoRX (como profiláctico de rinovirus) y ICAM1 (para resfriado común) (Obembe *et al.*, 2011). Las vacunas con subunidades de antígenos producidas en plantas han recibido la mayor atención en la comunidad agrícola molecular. En 2006, Dow AgroSciences recibió la primera aprobación regulatoria del mundo por parte del USDA para una vacuna basada en células de tabaco contra

el virus de la enfermedad de Newcastle, que sirvió como un hito para la producción de vacunas terapéuticas basadas en plantas. La compañía Medicago está desarrollando vacunas contra la influenza estacional y la influenza aviar H5N1 mediante una tecnología de expresión transitoria no revelada que utiliza alfalfa. Las pruebas preclínicas en hurones mostraron protección contra el virus. Así mismo, la compañía proyecta que podrá producir antígenos para pruebas de vacunas un mes después de la identificación de la secuencia genética de una cepa pandémica (www.medicago.com). Los desafíos de desarrollar vacunas orales radican en la dificultad de estandarización de dosis y la baja eficacia de la ruta oral para la inmunización. Sin embargo, los costos de producción más bajos de estas tecnologías pueden ser esenciales para llevar estos productos a muchas partes del mundo (Paul y Ma, 2011).

2.1 Inmunidad a nivel de mucosas

Entender la estructura y función del sistema inmunológico de las mucosas es esencial para el diseño adecuado de vacunas; sin embargo, ha sido menos estudiado que el sistema inmunológico periférico. El sistema inmunológico de la mucosa posee características singulares y cada compartimento mucoso opera diferente tras la inmunización con la misma vacuna. Curiosamente, la inmunización en las mucosas puede inducir una respuesta humoral tanto en el compartimento sistémico como en el mucoso, proporcionando así una amplia protección en términos de compartimentos anatómicos (Gallichan *et al.*, 2001). El proceso de inmunidad a nivel de mucosas inicia una vez que los antígenos pasan a través del ambiente gástrico y llegan al intestino delgado, en donde son capturados por las células M del epitelio asociado al folículo (FAE) para la inducción de respuestas inmunes sistémicas y de mucosas (Czerkinsky y Holmgren, 2010). Existe evidencia sólida de que la combinación de la inmunización parenteral y mucosal podría conducir a una inmunoprotección óptima. Algunos autores están explorando regímenes de refuerzo que comprenden una dosis parenteral con un refuerzo posterior por vía mucosa como enfoques óptimos de vacunación (Pniewski *et al.*, 2018).

Entre las vías de inmunización de mucosas (p. ej., nasal, oral o sublingual), la vía oral ofrece ventajas esenciales, ya que la vacuna se administra fácilmente (lo que aumenta el cumplimiento del paciente y facilita la inmunización masiva), se simplifica la producción de la vacuna (no se requiere alta pureza en la formulación), se puede facilitar el almacenamiento (especialmente para formulaciones secas), y se evitan los riesgos que conlleva el uso de agujas (lesiones e infecciones). Todas estas ventajas suponen importantes ahorros en las campañas de vacunación. La inmunización nasal es muy eficaz para inducir protección a niveles sistémicos y en compartimentos mucosos, como el tracto genital y las vías respiratorias (Czerzinsky y Holmgren, 2012), y es uno de los sitios más atractivos para la vacunación de mucosas, debido a que el

antígeno no está expuesto a los ácidos gástricos ni a las enzimas digestivas, por lo que la dosis de antígeno es más bajas. Sin embargo, el aclaramiento nasal es uno de los desafíos para abordar la biodisponibilidad adecuada, especialmente en las formulaciones basadas en gotas nasales (Illum, 2006). Otras limitaciones de las vacunas nasales incluyen la posibilidad de transportar componentes de la vacuna al sistema nervioso central, lo que se ha asociado con efectos adversos como la inducción de respuestas inflamatorias en el SNC.

2.2 Mecanismo de acción de las vacunas orales

Los tejidos vegetales que expresan el antígeno de interés se procesan y estabilizan mediante métodos como la liofilización para crear una biomasa que se formula fácilmente como vacuna oral. Después de la administración oral, el antígeno debe llegar a la superficie de mucosas de los tejidos linfoides asociados al intestino (MALT); posteriormente el antígeno es transportado a través del epitelio por las células microplásticas (células M), que forman parte del de los folículos de MALT. Tras la captación del antígeno, las células presentadoras de antígeno (CPA) procesan y presentan el antígeno a través de receptores de reconocimiento de patrones (receptores tipo Toll) a través de los complejos de histocompatibilidad (MHC-I o MHC-II) a los linfocitos ubicados en la placa de Peyer o en el ganglio linfático mesentérico. Esto desencadena la activación y diferenciación de los linfocitos T específicos, generando mediadores de la inmunidad humoral y celular (Abusleme y Moutsopoulos, 2017). Entre los factores que definen el tipo y magnitud de la respuesta inmune inducida se encuentran la naturaleza del antígeno, los adyuvantes coadministrados con el antígeno y la dosis.

El objetivo de contar con vacunas orales para una inmunización masiva y barata es un desafío debido a la dilución y degradación del antígeno, que conduce a una biodisponibilidad deficiente, así como a la naturaleza tolerogénica del sistema inmunológico oral. Por lo tanto, la liberación de productos biofarmacéuticos no depende únicamente de la degradación enzimática de la pared celular. La rotura física debe considerarse especialmente en el caso de formulaciones elaboradas con material pulverizado y liofilizado, que altera la integridad de la pared celular. Sorprendentemente, no se han realizado estudios detallados sobre cómo el procesamiento de biomasa vegetal modifica la eficiencia de liberación biofarmacéutica. La liofilización de tejidos vegetales es una alternativa atractiva para la obtención de formulaciones orales de biofarmacéuticos, ya que este procedimiento permite la concentración del biofármaco, así como su almacenamiento a largo plazo. Hasta ahora la optimización del proceso de liofilización para garantizar la estabilidad del antígeno se ha hecho al evaluar el perfil de temperatura de almacenamiento a 20°C durante 20 h para el secado primario y 22°C durante 2 h para el secado

secundario. Además, el uso de sacarosa, la tasa de congelación y la humedad residual postproceso han permitido una estabilización eficaz de antígenos (Czyz *et al.*, 2014). Se necesitan estudios que evalúen estos aspectos para caracterizar y optimizar las formulaciones orales a base de plantas destinadas a administrar biofarmacéuticos por vía oral.

2.3 Vacunas contra sinucleinopatías

El desarrollo de vacunas y estrategias inmunoterapéuticas se ha centrado en dos de las enfermedades neurodegenerativas más comunes, la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), que se caracterizan por la demencia progresiva y trastornos del sistema motor (Ugen *et al.*, 2015). Al presente, se han desarrollado algunas vacunas en plantas contra la enfermedad de Alzheimer con un potencial favorable a partir de los resultados de modelos de ratones transgénicos (Rosales-Mendoza *et al.*, 2014). Sin embargo, en cuanto al desarrollo de vacunas contra las sinucleinopatías aún es muy limitante.

La evidencia experimental por métodos inmunológicos utilizando un enfoque de inmunoterapia activa mostró que los ratones inmunizados con α -syn desarrollaron anticuerpos con una afinidad alta hacia α -syn (Masliah *et al.*, 2005). Estos animales mostraron una acumulación disminuida de agregados α -syn en las células neuronales, que se asoció con una neurodegeneración reducida y una función mejorada. Además, en este estudio se identificaron tres epítopes reconocidos por los anticuerpos inducidos (α -Syn₈₅₋₉₉, α -Syn₁₀₉₋₁₂₆, α -Syn₁₂₆₋₁₄₀), que posteriormente se usaron como péptidos sintéticos conjugados con un adyuvante y se probaron en ratones dando como resultado respuestas humorales capaces de reconocer agregados de la proteína α -syn en cerebros de pacientes con EP, sugiriendo una actividad inmunogénica conveniente para la formulación de una vacuna (Ghochikyan *et al.*, 2014).

III) Biorreactores y su aplicación

Un biorreactor es un dispositivo o sistema utilizado para hacer crecer células o tejidos en condiciones ambientales óptimas como pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, nitrógeno, dióxido de carbono y velocidad de agitación, cuidadosamente monitoreadas y controladas. Un biorreactor es por tanto un dispositivo biotecnológico que debe proveer internamente un ambiente controlado que garantice y maximice la producción y el crecimiento de un cultivo vivo. Por consiguiente, el biorreactor debe contener los controles necesarios para que la operación o proceso (bioproceso) se lleve a cabo a bajo costo, con altos rendimientos (productividad) y en el menor tiempo posible.

3.1 Cultivos vegetales en biorreactores

Los cultivos de células vegetales se han utilizado en diferentes biorreactores, como son tanques agitados (STR's) (Doran, 1999), reactores de onda (Eibl y Eibl, 2006), columna de burbujas (Terrier *et al.*, 2007), reactor de columna de burbuja de un solo uso (Shaaltiel *et al.*, 2007), reactores airlift (Wen Su *et al.*, 1996), reactores de membrana (McDonald *et al.*, 2005) y reactores de tambor rotatorio (Tanaka *et al.*, 1983). El diseño y el uso de diferentes tipos de reactores y la ampliación se han desarrollado para la micropropagación y otros sistemas de producción de plantas, incluyendo suspensiones celulares, microalgas, raíces, protonema de musgo, lenteja de agua y otras plantas acuáticas. También se están desarrollando muchos sistemas de producción de plantas que utilizan biorreactores desechables (de un solo uso) para el cultivo de células y tejidos vegetales. Por lo general, emplean bolsas de plástico de varios diseños, como un revestimiento dentro de otro recipiente, además existen los biorreactores de ondas horizontales, y lo de sistema de inmersión temporal (Box-In-Bag; RITA) (Eibl *et al.*, 2010). A continuación, se describen las características principales de los biorreactores neumáticos para cultivos de células vegetales.

3.1.1 Biorreactor en columna de burbujeo

El biorreactor neumático (columna de burbujas y airlift) consta de un recipiente cilíndrico en el que se introduce aire comprimido o una mezcla de gas en el fondo del recipiente a través de un aspersor para airear y mezclar. Las características de bajo costo operativo y de capital, sin piezas mecánicas móviles ni elementos de sellado, y la facilidad de ampliación son ventajosas para cultivos de células vegetales a gran escala. El bajo esfuerzo de corte en los biorreactores neumáticos es deseable para las células vegetales sensibles al cizallamiento (Eibl y Eibl, 2008). Las columnas de burbujas se utilizan a menudo para micropropagaciones organogénicas, sin embargo, no pueden proporcionar una mezcla homogénea y son menos aplicables a cultivos de alta densidad debido a la menor área interfacial gas-líquido resultante de la coalescencia de burbujas en los cultivos viscosos y la falta de ruptura mecánica de las burbujas. El rendimiento de una columna de burbujas se puede mejorar instalando múltiples aspersores en diferentes segmentos para suministrar oxígeno a las zonas de cultivos de raíces peludas de alta densidad celular en la columna (Mishra y Ranjan, 2008).

3.1.2 Biorreactor tipo airlift

El biorreactor airlift o de elevación de aire modificado contienen un tubo interno de aspiración “*draft*” (circuito interno o externo) y exhiben características deseables como: 1) prevenir la coalescencia de burbujas dirigiéndolas en una dirección; 2) mejorar la transferencia de masa de oxígeno aumentando el número de burbujas y el área interfacial gas-líquido para la transferencia

de masa; 3) distribuir el esfuerzo de corte de manera más uniforme y reducir el esfuerzo de corte (Mishra y Ranjan, 2008); y 4) promover el movimiento cíclico del medio y las células, lo que resulta en tiempos de mezclado más cortos (Wang *et al.*, 2002). Sin embargo, para cultivos de alta densidad celular los problemas de una inadecuada transferencia de masa de oxígeno y la mezcla deficiente que conducen a falta de homogeneidad en la biomasa, los nutrientes, el oxígeno y el pH, y la formación de espuma extensa (resultante de polisacáridos, proteínas, ácidos grasos y alta velocidad de gas superficial) siguen siendo factores limitantes en el funcionamiento de estos biorreactores (Tanaka, 2000). Además, la distribución desigual de cultivos celulares de alta densidad celular o tejidos de raíces pilosas en ciertas posiciones y la canalización excesiva de la fase gaseosa debido a la alta tasa de aireación pueden causar aglutinamiento del tejido de la raíz y bloqueo del flujo de líquido.

3.2 Diseño de biorreactores

Los diseños de biorreactores deben proporcionar un entorno que sea capaz de optimizar el crecimiento y la productividad de las células hospedadoras modificadas genéticamente, desde células frágiles y sensibles al estrés de corte (células de mamíferos y algunas plantas) hasta microorganismos robustos (bacterias y levaduras). Las células vegetales exhiben características atractivas para la producción de proteínas recombinantes, sin embargo, sus características biológicas y fisiológicas en cultivos en suspensión pueden limitar su aplicación en la producción a gran escala. Por tanto, las propiedades morfológicas y fisiológicas de las células vegetales y las consideraciones de diseño del biorreactor deben considerarse en conjunto, incluido la velocidad de crecimiento, la absorción de nutrientes, la cinética de producción, la transferencia de oxígeno y calor, y la hidrodinámica de fluidos. Además, deben considerarse que durante el bioproceso se proporcione una mezcla y transferencia de masa adecuada al tiempo que minimizan la intensidad del esfuerzo cortante para la producción de proteínas recombinantes con las células vegetales. A continuación, se analizan importantes consideraciones de diseño de biorreactores para cultivos de células vegetales.

3.2.1 Demanda de oxígeno

El oxígeno es el sustrato gaseoso más importante requerido para el crecimiento celular y el metabolismo aeróbico de las células vegetales en los cultivos *in vitro*. La tasa de absorción de oxígeno (OUR) se puede utilizar como indicador para controlar la fisiología y la demanda de oxígeno de las células vegetales durante el cultivo en un biorreactor. Un valor típico de OUR para las células vegetales es de aproximadamente 5-10 mmol-O₂/(L-h), en comparación con 10-90 mmol-O₂/(L-h) para las células microbianas y 0,05-10 mmol-O₂/(L-h) o 0.02-0.1x10⁻⁹ mmol/(células-h) para células de mamíferos (dependiendo de la densidad celular y el tipo de línea

celular). Aunque la demanda de oxígeno de las células vegetales para el crecimiento celular es relativamente baja debido a su lento metabolismo en comparación con las células microbianas, la productividad volumétrica para un cultivo de células vegetales de alta densidad celular está limitada por la transferencia de masa de oxígeno inadecuada resultante de la alta viscosidad del cultivo celular y concentración de oxígeno disuelto (OD) (Sharp y Doran, 2001). Se ha demostrado que la transferencia de masa de oxígeno inadecuada en un biorreactor inhibe el crecimiento de células de tabaco transgénicas y reduce la producción de anticuerpos recombinantes (Liu y Lee, 1999). Se ha estudiado que un aumento en el suministro de oxígeno en las células de tabaco transformadas mejoraba la tasa de crecimiento específica, la concentración máxima de células, la tasa de consumo de glucosa y fructosa y el rendimiento de producción de proteína GUS en matraces, tanque agitado y biorreactor airlift (Gao y Lee, 1992). Igualmente, la concentración de oxígeno disuelto también es fundamental para mantener el crecimiento y la viabilidad celular. Normalmente, la concentración crítica de oxígeno disuelto para cultivos de células vegetales en un biorreactor ha sido reportado como 1.3-1.6 g O₂/m³, lo que corresponde a un 20% de saturación de aire (Doran, 1993).

En cuanto a las tasas de aireación en el rango de 0.05–0.1 vvm (volumen de gas por volumen de cultivo por minuto) se usan típicamente en un biorreactor de tanque agitado y 0.5–1 vvm se aplican en un biorreactor neumático. Sin embargo, las altas tasas de aireación pueden provocar problemas graves de formación de espuma y efectos de eliminación de gases (CO₂, etileno u otros metabolitos volátiles) que pueden inhibir el crecimiento de las células vegetales (Mirjalili y Linden, 1995), particularmente para biorreactores agitados neumáticamente. Por lo tanto, se ha investigado el diseño de un sistema de aireación para generar tantas burbujas pequeñas como sea posible (para aumentar el área interfacial gas-líquido), lo que mejora la transferencia de masa de oxígeno (Lin *et al.*, 2004). Conjuntamente, la gasificación en el espacio superior, la aireación con aire enriquecido con oxígeno o el aumento de la presión del biorreactor pueden ser una forma conveniente de mantener el control de la concentración de oxígeno disuelto en condiciones de menor tasa de aireación. Por otro lado, aunque un k_La más bajo a menudo da como resultado un crecimiento celular deficiente, un k_La más alto no puede garantizar un buen crecimiento de las células vegetales (Kato *et al.*, 1975, Pareilleux y Vinas, 1983).

3.2.2 Agitación y mezclado

En los biorreactores de tanque agitado, la agitación del caldo de cultivo se lleva a cabo mediante las dos formas siguientes: (1) por el movimiento de dispositivos mecánicos tales como impulsores de tipo turbina o de propelas, (2) por el movimiento ascendente de burbujas de aire. Por lo tanto, la intensidad de agitación depende de la velocidad de movimiento de los impulsores y de la

velocidad de aireación. La agitación puede describirse mediante el tiempo de mezclado, el cual se define como el tiempo que transcurre después de la adición de un trazador para alcanzar un determinado grado de homogeneidad, generalmente del 95%, del líquido contenido en el biorreactor. Un mezclado insuficiente puede causar regiones en las que haya altas concentraciones de inhibidores de crecimiento, deficiencia de oxígeno, gradientes importantes de temperatura y pH, que se pueden reflejar en bajas productividades y bajos rendimientos. Por ello, es importante estudiar el efecto de las variables de operación sobre el grado de mezclado que se pueda alcanzar en el biorreactor.

Los biorreactores airlift, en su interior tienen al menos dos zonas, una de flujo ascendente y otra de flujo descendente. El movimiento del líquido se debe a que en dichas zonas la densidad de la dispersión gas-líquido es diferente, porque hay mayor cantidad de aire en la zona de flujo ascendente que en la de flujo descendente. La diferencia de las fracciones de gas retenido es una medida de la diferencia de densidades entre las dispersiones gas-líquido en dichas zonas, la cual es la fuerza motriz para la circulación del líquido en el biorreactor. Debido al movimiento del líquido, las burbujas de gas en la zona de flujo ascendente subirán más rápido, disminuyendo la fracción de gas retenido y la diferencia de presión hidrostática. En contraste con las condiciones de una columna de burbujas, los biorreactores airlift se caracterizan por tener fracciones de gas retenido menores y por una distribución más uniforme de la fase gaseosa a través de la sección transversal de la zona de flujo ascendente, con un máximo de la fracción de gas retenido local cerca de la pared de la zona de flujo ascendente. En general, la velocidad del líquido en los biorreactores airlift se determina por la velocidad de aireación, la geometría del biorreactor y las propiedades físicas de la fase líquida. El mezclado del líquido es predominantemente producido por la circulación del líquido y en menor grado por la dispersión axial debida al ascenso de las burbujas de aire. El mezclado ocurre en las zonas de deflexión superior e inferior, debido a las diferencias de velocidad que existen. Para una geometría definida, la rapidez del mezclado puede expresarse en términos del tiempo de circulación, el cual se define como el tiempo requerido para que el líquido circule una vez dentro del biorreactor. Por ello, el conocimiento del tiempo de circulación y de los factores que lo afectan es necesario para el diseño, modelado y operación de un biorreactor airlift.

3.2.3 Aireación y transferencia de oxígeno (k_La)

La composición y concentración de ciertos compuestos gaseosos (oxígeno, dióxido de carbono y etileno, entre otros) en el medio de cultivo es determinante en el crecimiento celular (Trung *et al.*, 2006); estas concentraciones dependen de varios factores, como la temperatura, la presión,

el flujo de aireación y la composición de los gases de alimentación. La transferencia de oxígeno es un parámetro importante en los procesos aerobios, donde se requiere transferir a los microorganismos el oxígeno que necesitan para la generación de energía, crecimiento y producción. Es importante considerar que la tasa de transferencia está en función del diseño del reactor, condiciones de operación (aireación y agitación) y de las propiedades reológicas y tensión superficial del medio de cultivo, así como de la concentración de oxígeno en la corriente de aire, la morfología del microorganismo y el área superficial que proveen las burbujas.

La capacidad de transferencia de oxígeno en sistemas agitados se caracteriza por el coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (k_{LA}), en el cual están integrados el efecto de resistencia a la transferencia de masa en la fase líquida (etapa controlante), así como el área disponible para la transferencia de masa (Cents, 2001). Por lo tanto, la capacidad de transferencia es función de las concentraciones de oxígeno, tanto en la fase líquida en equilibrio con la concentración de oxígeno de la fase gaseosa en la interfase, como en el seno del líquido y del coeficiente de transferencia de masa (Doran, 1998). Para cultivos de células vegetales, un valor típico de k_{LA} requerido en una operación de biorreactor está entre 10 y 50 h^{-1} (Curtis y Tuerk, 2006), que es más baja que la de la fermentación microbiana (100-1000 h^{-1}) y ligeramente superior a la del cultivo de células de mamíferos (0,25 a 10 h^{-1}) (Leckie *et al.*, 1991; Yokoi *et al.*, 1993). En el proceso de transferencia de oxígeno se busca que no haya limitaciones para no modificar el metabolismo y la producción, para lo cual se trabaja con los efectos combinados de la velocidad del fluido, la geometría del sistema de transferencia del material y las propiedades del fluido como viscosidad y difusividad.

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) de un biorreactor depende de las condiciones de aireación y de las propiedades físicas del caldo de cultivo. La ecuación que describe VTO es:

$$VTO = k_{LA} (C^* - C)$$

Donde, k_{LA} : coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}, s^{-1}); C^* : Concentración de saturación de oxígeno disuelto (mmol/L); C : Concentración de oxígeno disuelto en fase líquida (mmol/L).

El valor de k_{LA} , desde el seno del líquido hasta las células en cultivo, depende del diseño del biorreactor y de las condiciones de operación del sistema de cultivo: flujo de aire, volumen del líquido, régimen de agitación, etc. En realidad, k_{LA} es el producto de dos parámetros: k_L es el coeficiente de transferencia de oxígeno en la interfaz líquido-gas, mientras que a , representa la razón de área superficial de burbujas con respecto al volumen total de agua. Este coeficiente

depende del grado de coalescencia de las burbujas. Para calcular el k_{La} se utiliza la siguiente ecuación:

$$k_{La} = VTO / C^*$$

Donde C^* se calcula con la ecuación de la ley de Henry y varía con la temperatura y la presión parcial de oxígeno (Sinclair, 1987).

3.2.4 Criterios de escalamiento

El escalado del cultivo de células vegetales presenta tres complicaciones principales: la sensibilidad al estrés de corte, el suministro de oxígeno y la remoción de compuestos volátiles con la aireación (Pan *et al.*, 2000). Varios estudios muestran que dichos parámetros afectan el cultivo de manera especie-específica e inclusive dependiendo de la línea celular que es empleada. En el procedimiento de escalado mediante el cual se trasladan los resultados experimentales de un proceso a escala de laboratorio hacia una industrial, es importante implementar estrategias que permitan disminuir las diferencias entre las dos escalas, como el desarrollo de métodos de agitación que generen un menor estrés de corte, la implementación de sistemas de aireación forzada que suministren el oxígeno necesario y la recirculación de parte del aire exhausto o la inyección de compuestos volátiles en la aireación, para mantener la composición de la fase gaseosa constante (Huang *et al.*, 2002).

Los mejores criterios y más usados para el escalamiento de bioprocesos aerobios es mantener el suministro de potencia volumétrica (P_0/V) y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) (García-Ochoa y Gómez, 2009). El k_{La} es el criterio más usado para los procesos de escalamiento; debido a que, en el caso de las fermentaciones aerobias, el principal problema es la alimentación de oxígeno. Sin embargo, una adecuada alimentación de oxígeno no asegura un buen mezclado (Junker, 2004). De hecho, estos parámetros se deben tratar de seleccionar como base de escalamiento la propiedad de transporte más crítica para el rendimiento del bioproceso; lo cual no es sencillo de determinar, debido a la potencial sensibilidad y las diversas respuestas de las células a cada fenómeno de transporte influenciado por el tamaño del agitador, la velocidad de agitación y aireación (Xia *et al.*, 2016). Otros criterios de escalamiento más utilizados en los bioprocesos de cultivos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Criterios de escalamiento comúnmente empleados en bioprocesos (Orozco y Rodríguez-Monroy, 2015).

- Potencia por unidad de volumen (P_0/V)
 - Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La})
 - Flujo volumétrico del gas (V_G/V)
 - Velocidad en la punta del impulsor (ND)
 - Velocidad de agitación (N)
 - Tiempo de mezclado (T_m)
-

Un problema importante del escalamiento de los bioprocesos son los campos de flujo heterogéneos en los biorreactores de escala industrial y su efecto negativo en la fisiología celular. Los bioprocesos realizados en biorreactores de gran escala siempre presentan problemas de mezclado y transferencia de masa, los cuales no se presentan a escala laboratorio o piloto. El ambiente heterogéneo en los biorreactores de gran escala está catalogado como el principal problema del escalamiento (Xia *et al.*, 2016). Otros aspectos cambiarán inevitablemente durante el escalamiento de laboratorio a industrial. Por ejemplo, (i) incrementa la presión hidrostática en el fondo del biorreactor, (ii) incremento en el tiempo de mezclado, (iii) gradientes de pH y temperatura (Wynn *et al.*, 2016). A pesar de la gran variedad de escalamientos exitosos realizados bajo diferentes términos por diferentes cultivos y proceso de fermentación, aún no existe un solo acercamiento universal que pueda ser aplicado. Parece ser que no existe una estrategia común y universal aplicable. Esto se debe a que los procesos de fermentación realizados en biorreactores son sistemas muy complejos, dado que la célula tiene un mecanismo de control preciso el cual muestra diferentes respuestas a perturbaciones ambientales en diferentes escalas. Esto es hipotético y es la principal causa de varios problemas del escalamiento.

3.3 Producción de proteínas en biorreactores

El cultivo de células en suspensión a nivel de biorreactores es el método más utilizado en los últimos años para producir proteínas recombinantes (Huang y McDonald, 2012). Los biorreactores tienen numerosas ventajas que incluyen menores costos de capital y producción, escalabilidad, seguridad frente a la transmisión de patógenos virales de mamíferos (Kim *et al.*,

1991). Se han aplicado para la producción de numerosas proteínas y están diseñadas para cultivar y recolectar células en ciclos consecutivos mientras se renuevan continuamente los nutrientes y el oxígeno dentro del sistema (Sivakumar *et al.*, 2011). Al usar un biorreactor, es posible que la producción de proteínas recombinantes en las plantas aumente a un nivel similar a los sistemas de expresión de mamíferos (Xu *et al.*, 2011). Los biorreactores de tanque agitado con impulsores y difusor se han utilizado para reducir el esfuerzo cortante, logrando valores de biomasa máximos de 60 a 70% de volumen de células empaquetadas. Las condiciones críticas del cultivo celular, que afectan la productividad y calidad de las proteínas recombinantes, y el crecimiento de la célula huésped, deben optimizarse y controlarse durante el funcionamiento del biorreactor.

Algunos ejemplos recientes para cultivos a gran escala son la fabricación de anticuerpos con células BY-2 de tabaco en biorreactores desechables de 200 L sin pérdida de rendimiento (Raven *et al.*, 2015). En 2010, Protalix desarrolló un biorreactor de tipo burbuja con bolsas de polietileno desechables de alto volumen (75,000 L). Con esta propuesta, Protalix cultiva células de zanahoria como hospedero para producir la alfa taliglucerasa, una enzima utilizada para tratar a pacientes con la enfermedad de Gaucher (<http://www.protalix.com/index.asp>). Posteriormente, en 2012, se convirtió en la primera planta en producir un biofármaco el cual fue aprobado por la FDA para consumo humano (Hollak, 2012). Algunos de los sistemas en biorreactor utilizados para la producción de proteínas recombinantes se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Ejemplos de proteínas recombinantes producidas en sistemas de biorreactores

Planta	Proteína recombinante	Localización del producto	Tipo de biorreactor	Nivel de producción	Referencia
<i>Nicotiana benthamiana</i>	AAT humano	Extracelular	BTS	1µg/L	Huang <i>et al.</i> , 2009
<i>Oryza sativa</i>	AAT humano	Extracelular	Biorreactor de membrana	100–247 mg/L	McDonald <i>et al.</i> , 2005
<i>Hordeum vulgare</i>	rCla1	Retención en RE, intracelular	Biorreactor de onda	2–9 µg/L	Ritala <i>et al.</i> , 2008
<i>Physcomitrella patens</i>	VEGF	Intracelular	Biorreactor en columna	360 mg/g- peso seco	Lucumi y Posten, 2006

RE: retículo endoplásmico; BTS: biorreactor de tanque agitado; AAT: alfa-1-antitripsina; HBsAg: antígeno de superficie de la hepatitis B; rCla1: colágeno humano tipo 1- α ; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

Algunas de las desventajas que presentan los cultivos vegetales en biorreactores son las bajas tasas de crecimiento, la inestabilidad genética y el escaso control que se tiene en la diferenciación celular; estos parámetros están ampliamente relacionados con ciertas condiciones físicas que se presentan al momento de realizar el cultivo en biorreactores a escala industrial, como los esfuerzos de corte y la transferencia de oxígeno, entre otros. Dada la complejidad de estos fenómenos, para poder alcanzar condiciones óptimas de cultivo se requiere de un trabajo interdisciplinario que involucre áreas como biología celular y molecular, fisiología vegetal, ingeniería genética entre otras, para conocer detalladamente la morfología y composición del tejido, las condiciones de flujo y transferencia de masa y calor, la cinética del crecimiento, la formación de producto, la estabilidad genética de las líneas, así como optimizar los procesos de purificación y separación (Sajc *et al.*, 2000). El control y la flexibilidad del tanque agitado, en términos de la facilidad de realizar ajustes independientes a la aireación y al mezclado, lo hacen el reactor más empleado con cultivos celulares, a pesar de sus limitaciones como altos consumos de energía y altos esfuerzos de corte (Huang y McDonald, 2009). Se han realizado amplias discusiones en cuanto al tipo de reactor adecuado para llevar a cabo diferentes procesos con cultivos vegetales (Weathers *et al.*, 2010); sin embargo, la adecuada selección es enteramente dependiente de los requerimientos específicos de cada especie.

IV) Antecedentes directos

4.1 Importancia de la vacuna LTB-Syn (cLTB-Syn)

En el 2017, se desarrolló la expresión de la proteína inmunogénica LTB-Syn dirigida a α -syn a partir de células de tabaco (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2017). LTB-Syn es una quimera que consta de tres epítomos de α -syn (α -Syn₈₅₋₉₉, α -Syn₁₀₉₋₁₂₆, α -Syn₁₂₆₋₁₄₀) unidos a la subunidad B madura de la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), que se ha utilizado ampliamente como portador inmunogénico y ejerce efectos adyuvantes sobre epítomos fusionados genéticamente activando las células dendríticas y células presentadoras de antígeno (Lawson *et al.*, 2001); la secuencia SEKDEL, que sirve para la retención en el retículo endoplásmico (RE), previniendo la degradación de proteínas recombinantes (Ma *et al.*, 2003); y un péptido de almacenamiento vegetativo, que en conjunto con la secuencia SEKDEL proporciona estabilidad a la proteína recombinante. Esta estabilidad puede ser explicada por su localización en RE y ser protegida por la actividad proteolítica encontrada a través de las vías secundarias en los espacios intracelulares y extracelulares. Esta vacuna quimérica LTB-Syn fue capaz de inducir respuestas humorales en ratones después de su administración oral, se comprobó la presencia del transgén mediante PCR y Western-blot (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2017). Posteriormente con el propósito de desarrollar una vacuna de bajo costo, segura y efectiva; y considerando que las plantas son un vehículo idóneo para la administración oral, se logró la transformación estable de LTB-Syn en tejidos de zanahoria obteniendo así la línea transformante Z4 con una expresión de 2.3 μ g LTB-Syn/g en callos los cuales fueron establecidos en medio MYT. Se demostró que el antígeno LTB-Syn era funcional y capaz de inducir respuestas humorales significativas contra sinucleína después de la administración oral en ratones (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió posteriormente establecer por primera vez el cultivo en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* a nivel de matraz y en biorreactor airlift con el fin de producir la vacuna cLTB-Syn contra sinucleinopatías (Carreño-Campos *et al.*, 2022). Sin embargo, los rendimientos alcanzados fueron de 1.5 μ g LTB-Syn/g de peso fresco (en biorreactor airlift), demostrando que la producción de cLTB-Syn era 1.6 veces más respecto al matraz, generando la perspectiva de optimizar el medio de cultivo MS estándar para generar una mayor productividad de biomasa y cLTB-Syn.

4.2 Justificación

Las sinucleinopatías tienen un gran impacto en la salud humana a nivel mundial. La proyección de personas con sinucleinopatías para el 2050 se estima que podría alcanzar una cifra de más de 3.5 millones, por lo que el impacto en el sistema de salud será severo. Estos trastornos incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), demencia por cuerpos de Lewy (DCLw) y atrofia de sistemas múltiples (ASM). Actualmente, la incapacidad de hacer diagnósticos oportunos y la falta de tratamientos efectivos disponibles han convertido a las sinucleinopatías en un grupo de interés. Las vacunas orales de origen vegetal son convenientes por generar formulaciones sin cadena de frío, reduciendo los costos relacionados con el transporte, almacenamiento, y purificación en comparación con las vacunas convencionales. Además, se tiene la ventaja de generar una respuesta inmune a nivel de mucosas desde el tracto intestinal; y dado que las recientes evidencias muestran que la EP inicia en el intestino (inducido por exposición a contaminantes neurotóxicos y variaciones en la microflora); el desarrollo de terapias orales que bloquen la transmisión de α -Syn a nivel local y sistémico adquiere relevancia. Recientemente se ha propuesto el uso de la línea transgénica Z4 de zanahoria productora de la vacuna experimental cLTB-Syn para el tratamiento de sinucleinopatías, obteniendo resultados preliminares que sustentan su aplicación. Por lo anterior, es importante optimizar la producción de la vacuna cLTB-Syn con un procesamiento mínimo, lo cual representaría el primer reporte sobre el desarrollo de un biofármaco contra enfermedades neurodegenerativas de gran impacto, especialmente en países con recursos limitados.

4.3 Hipótesis

La producción de la vacuna cLTB-Syn en cultivos en suspensión de *D. carota* de interés terapéutico contra sinucleinopatías se incrementará con diseños estadísticos experimentales y parámetros de escalamiento.

4.4 Objetivo general

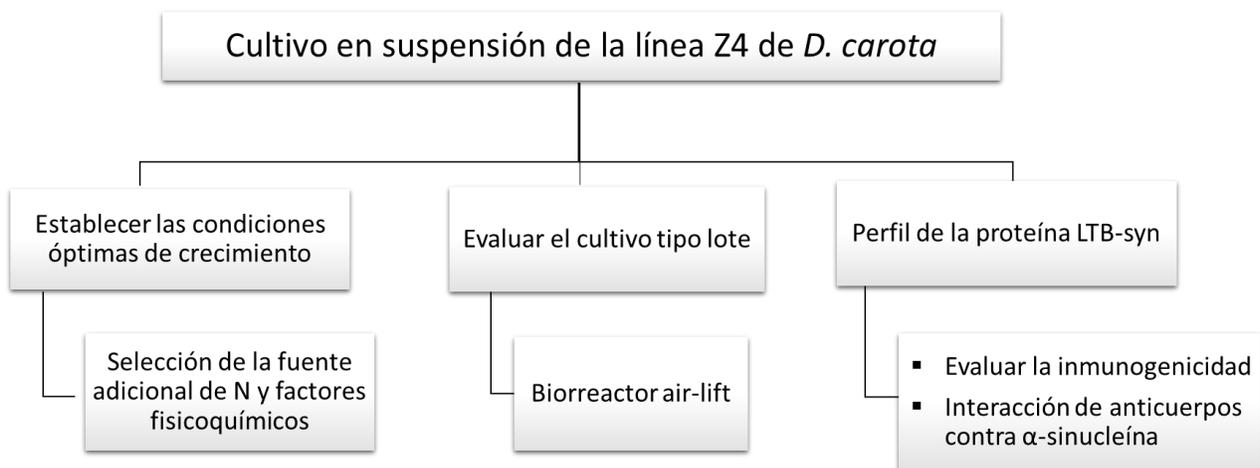
Diseñar y optimizar las condiciones de cultivos en suspensión de la línea Z4 de *D. carota* para incrementar los rendimientos de biomasa y cLTB-Syn; y caracterizar su respuesta inmune contra sinucleinopatías.

4.5 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la concentración de nitrógeno (urea y glutamato), sobre el crecimiento de callos.
- Establecer las condiciones óptimas del medio de cultivo que aumenten los rendimientos de biomasa y cLTB-Syn, mediante diseños factoriales y método de superficie de respuesta (MSR).
- Estimar los parámetros de transferencia de OD (k_{La} en función de vvm) y OTR en biorreactor airlift.
- Caracterizar los parámetros cinéticos de crecimiento de la línea MSRZ4 en cultivos de matraz y biorreactor airlift.
- Detectar el transgén LTB-Syn por PCR y la expresión de la proteína LTB-Syn por ELISA y Dot blot.
- Evaluar la inmunogenicidad de cLTB-Syn en ratones BALB/c por vía oral y subcutánea.

4.6 Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos de esta tesis, la estrategia experimental se dividió en las etapas como a continuación se muestran:



V) Metodología

5.1 Material vegetal de *D. carota*

La línea transgénica Z4 de *D. carota* utilizada en este proyecto se obtuvo mediante la transformación nuclear del gen sintético *LTB-Syn* vía *Agrobacterim tumefaciens* (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2017). Los cultivos de callos de la línea Z4 se propagaron cada tres semanas en medio MS sólido (Murashige y Skoog, 1962) y B5 (Gamborg) suplementados con 30 g/L de sacarosa, 2.5 mg/L de 2,4-D; 2.5 mg/L de Cin, 2.5 g/L de KNO₃ (solo para B5) y 2.5 g/L de phytigel como agente gelificante.

5.2 Condiciones de cultivo y establecimiento de callos y suspensión de *D. carota* línea Z4

El establecimiento de callos se inició partiendo de un inóculo de 1 g ± 0.5 de PF en 20 mL de medio MS y B5 sólido para generar suficiente biomasa. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo (16 h luz/ 8 h oscuridad) a 25°C con subcultivos cada 20 días en medio sólido fresco. Las suspensiones celulares se iniciaron con un inóculo del 10% (v/v) de callos friables en matraces de 250 mL con 100 mL de medio MS y B5 líquido. Los matraces se mantuvieron en agitación orbital a 120 rpm en luz constante (24 μmol/m²/s) y 25°C. Se realizaron subcultivos cada 15 días para generar suficiente biomasa. Los cultivos establecidos en suspensión de *D. carota* fueron nombrados como línea MSRZ4 y se mantuvieron propagados por Carreño-Campos (2020-2024).

5.3 Efecto de la fuente de nitrógeno adicional en cultivos de callos de *D. carota* línea Z4

Para determinar el efecto de la concentración adicional de la fuente de nitrógeno sobre la producción de callos de la línea Z4 de *D. carota*, se realizó el diseño de un solo parámetro mediante el cual se cambió la concentración equimolar de urea y glutamato manteniendo el resto de las sales en los medios MS y B5 estándar (Tabla 6 y 7). Los datos de callos en estas condiciones se colectaron por triplicado cada cinco días para después determinar la producción de biomasa en peso seco.

Tabla 6. Niveles de concentración de nitrógeno adicional en los cultivos de callos de *D. carota* línea Z4

Factores	Nivel de concentración	
	Bajo (-1)	Alto (+1)

Urea	6 mM	17 mM
Glutamato	11 mM	34 mM

Tabla 7. Diseño experimental de la fuente adicional de nitrógeno en cultivos de callos de *D. carota* línea Z4

Tratamiento	Código	Medio de cultivo	nivel de nitrógeno
1	A	MS	Control
	B		urea (-1)
	C		urea (+1)
2	D	MS	glutamato (-1)
	E		glutamato (+1)
3	F	B5	Control
	G		urea (-1)
	H		urea (+1)
4	I	B5	glutamato (-1)
	J		glutamato (+1)

Control: medio de cultivo MS/B5 estándar

5.4 Diseños factoriales y de optimización en cultivos de suspensión

Para el diseño factorial de Plackett-Burman (PB) se evaluaron siete factores esenciales del medio de cultivo, los cuales fueron agrupados en dos niveles (+1 y -1) por catorce corridas experimentales aleatorias, buscando el mayor efecto y significancia sobre la variable respuesta. El diseño y los siete factores independientes de PB se detallan en las Tabla 8 y 9. Para la optimización del medio se utilizó la metodología de superficies de respuesta (MSR) el cual consistió en tres variables independientes con mayor efecto positivo (obtenidas en PB) con el fin de determinar las condiciones óptimas. Los factores analizados en el diseño compuesto central (CCD) con efecto positivo para MSR se detallan en la Tabla 10. Los diseños PB y MSR se generaron con el programa Design-Expert (versión 11).

La etapa experimental con el diseño PB se realizó por triplicado en matraces de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo MS con un inóculo del 10% (v/v) PF de *D. carota* de línea MSRZ4. Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital a 120 rpm y luz constante (24 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) a 25°C por 15 días, tiempo en el cual se obtuvieron los datos para determinar la producción biomasa y proteína LTB-syn. Los resultados estadísticamente significativos se compararon por análisis de varianza (ANOVA) a un nivel del 95% de confianza ($P < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se procesaron con el programa Statgraphics Centurión (versión 18.1.06).

Tabla 8. Factores evaluados con el diseño Plackett-Burman y codificación de los niveles usados de cada factor para producir *D. carota* línea Z4

Nombre del factor	Código	Nivel del factor	
		Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)
F1: Fitorregular (2,4-D y Cin)	A	0 mg/L	2 mg/L
F2: Sacarosa	B	15 g/L	30 g/L
F3: Urea	C	6mM	17mM
F4: Glutamato	D	11mM	34mM
F5: Luz	E	Oscuridad	Fotoperiodo
F6: pH	F	5.0	5.7
F7: inóculo	G	5 g/L	10 g/L

* ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (Cin)

Tabla 9. Arreglo aleatorio del diseño Plackett-Burman en función de siete factores importantes para establecer las condiciones del cultivo de *D. carota* de la línea Z4.

Std	Run	Factor 1 A: sacarosa	Factor 2 B: urea	Factor 3 C: glutamato	Factor 4 D: Luz	Factor 5 E: pH	Factor 6 F: inóculo	Factor 7 G: fitorregulador	Respuesta Biomasa (g/L)
9	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	
8	2	1	1	-1	-1	-1	1	1	
3	3	1	-1	1	1	-1	1	1	
12	4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
6	5	-1	-1	-1	1	-1	1	1	
10	6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	
11	7	1	-1	1	1	1	-1	-1	
2	8	-1	1	1	-1	1	1	1	
1	9	1	1	-1	1	1	1	-1	
5	10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	
7	11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	
4	12	-1	1	-1	1	1	-1	1	
Control	*MS urea	1	1	-1	1	1	1	1	
Control	*B5 urea	-1	1	-1	1	1	1	1	

Tabla 10. Factores analizados en el diseño compuesto central (CCD) con efecto positivo y codificación de los niveles usados

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
Inóculo	5	7.5	10
pH	5	5.35	5.7
Urea	1	2	3

El modelo de optimización MSR consistió en quince corridas aleatorias experimentales realizadas por triplicado en medio de cultivo MS, de los cuales tres representan los puntos centrales de cada factor (CCD) respecto a sus niveles altos (+1) y bajos (-1) como se muestra en la Tabla 11. Los efectos estadísticamente significativos se evaluaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) a

un nivel del 95% de confianza ($P < 0.05$). Los datos obtenidos se analizaron con el software Statgraphics Centurión (versión 18.1.06).

Tabla 11. Diseño experimental en función de tres factores ($k=3$) importantes para la optimización del cultivo de *D. carota* de la línea Z4

		Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1	Response 2
Std	Run	A: inóculo	B: urea	C: pH	Biomasa (g/L)	LTB-Syn (µg/L)
9	1	0	-1	+1		
2	2	+1	0	+1		
14	3	-1	0	-1		
12	4	0	+1	-1		
11	5	-1	0	+1		
3	6	+1	-1	0		
7	7	0	-1	-1		
4	8	+1	+1	0		
5	9	0	+1	+1		
6	10	-1	-1	0		
15	11	+1	0	-1		
1	12	-1	+1	0		
13	13	0	0	0		
10	14	0	0	0		
8	15	0	0	0		

5.5 Análisis de superficie de respuesta

Con los resultados obtenidos de las pruebas experimentales se obtuvieron gráficos de deseabilidad, superficie de respuesta con su respectiva ecuación, gráfico de contornos y la obtención de los puntos óptimos se generaron con el programa Design-Expert (versión 11).

5.6 Cinética de crecimiento con medio MSR optimizado a nivel de matraz

Partiendo del medio MSR optimizado se propagaron las células en suspensión de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraces de 250 mL como se describe en metodología; después de doce subcultivos continuos cada 15 días y con suficiente biomasa se realizó una cinética de crecimiento en matraz con la línea MSRZ4 por triplicado durante 24 días. Los datos se obtuvieron cada tres días para evaluar los parámetros cinéticos de crecimiento (peso fresco y seco, variación de pH, viabilidad celular, consumo de azúcares y producción de proteína).

5.7 Cinética de crecimiento con medio MSR optimizado a nivel de biorreactor

El modo de operación del biorreactor para la cinética de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 fue tipo lote con un inóculo del 10% (v/v), con un volumen de trabajo del 80% y dos flujos de aireación independientes (0.5 vvm y 1.5 vvm). Las características dimensionales del

bioreactor airlift se especifican en la Tabla 12. El bioreactor junto con el medio de cultivo MSR se esterilizó a 121°C y 20 lb/pulg² por 15 minutos. Las condiciones de cultivo fueron en luz constante (lámpara de luz fría a 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), a 25°C por 16 días. El inóculo se obtuvo a partir de cultivos en suspensión crecidos en dos matraces Erlenmeyer de 1000 mL con 500 mL de medio MSR por 15 días en agitación (120 rpm) a 25°C, posteriormente fueron filtradas hasta obtener las células más finas antes de agregarlas al bioreactor. La inoculación se realizó en una cámara de flujo laminar en condiciones asépticas utilizando una bomba peristáltica digital para controlar el llenado y el vaciado del bioreactor. Los datos de muestreo del bioreactor fueron por duplicado para evaluar los parámetros cinéticos de crecimiento (peso fresco y seco, variación de pH, viabilidad celular, conductividad, consumo de azúcares y producción de proteína).

Tabla 12. Características dimensionales del bioreactor airlift de 2 L

Elementos	Air-lift
Volumen total	2 l
Altura del reactor (m)	0.52
Diámetro interno (m)	0.07
Altura del draft (m)	0.275
Diámetro interno draft (m)	0.027
Altura de aireador (m)	0.020
Diámetro del difusor (m)	0.19

5.8 Determinación de k_La y OTR

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) se calculó mediante el método dinámico de oxígeno disuelto o *gassing-out* (Trejo *et al.*, 2007). El método consistió en desplazar la concentración de oxígeno disuelto (OD) contenido empleando nitrógeno gaseoso, posteriormente se reanuda la inyección del flujo de aire hasta la saturación de oxígeno deseado (Figura 3) y se registró el incremento en la concentración de OD cada 5 segundos usando un electrodo de oxígeno disuelto polarográfico con cartucho de membrana reemplazable InPro6800DO (Mettler, Toledo).

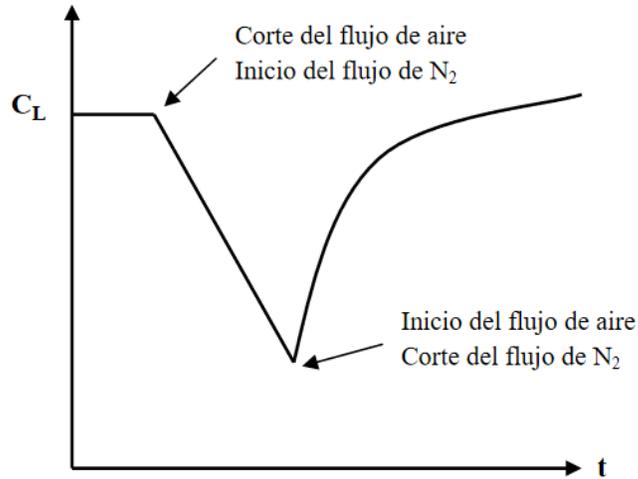


Figura 3. Esquema del método dinámico (*gassing-out*).

El valor de k_{La} se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\ln (C^* - C_L) = \ln (C^* - C^0) - k_{La} \cdot t$$

Donde C^* es la concentración de O_2 disuelto en la solución (mmol/L), C_L es la concentración de O_2 en la fase del líquido (mmol/L), C^0 es la concentración de O_2 al tiempo cero (mmol/L). El valor de k_{La} se obtiene al graficar el logaritmo natural de la diferencia de concentraciones de oxígeno disuelto con respecto al tiempo, donde la pendiente de la recta será el valor estimado del k_{La} (seg^{-1}).

Para la determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$OTR = k_{La} (C_L^* - C)$$

En donde C es la concentración de OD medida en el biorreactor y C_L^* es el valor de 6.98 mg/L (concentración máxima de oxígeno disuelto en agua a 25°C y presión atmosférica).

La demanda bioquímica de oxígeno (OUR) se determinará por el método de modelación del proceso (Santos *et al.*, 2006). La ecuación de OUR es de la siguiente forma:

$$OUR = qO_2 X$$

En donde qO_2 es la demanda bioquímica específica de oxígeno y X es la concentración de biomasa. Todos los gráficos se obtuvieron y analizaron mediante el programa GraphPad Prism (versión 8.0.1).

5.9 Métodos analíticos y moleculares

5.9.1 Cálculo de peso fresco y peso seco

El crecimiento celular durante la cinética en matraz y biorreactor se determinó filtrando la biomasa de cada muestra en una unidad de filtración al vacío y las células retenidas se pesaron en una balanza analítica para registrar el peso fresco (PF). El medio filtrado se almacenó a $-20^{\circ}C$ para los análisis de azúcares y conductividad. El peso seco (PS) se determinó liofilizando (liofilizadora marca LABCONCO FreeZone) las muestras a temperatura de $-50^{\circ}C$ y una presión de vacío de 0.02mbar por 72 h hasta obtener un peso seco constante. Con los datos obtenidos por triplicado se calculó la media y desviación estándar. Los gráficos de cinética de crecimiento de peso fresco (g/L PF) y peso seco (g/L PS) en función del tiempo se realizaron con el programa GraphPad Prism (versión 8.0.1).

5.9.2 Conductividad y pH del medio

La conductividad del medio de cultivo del biorreactor se determinó con un conductímetro marca Orion modelo 105. El conductímetro se calibró previamente con agua destilada. El resultado de cada lectura se reportó en mS/cm. El pH de medio de cultivo de las muestras de matraz y biorreactor se determinó con un potenciómetro marca Beckman, con compensador de temperatura a $25^{\circ}C$.

5.9.3 Consumo de azúcares totales

Para la cuantificación de azúcares totales se realizaron curvas de calibración de sacarosa, fructosa y glucosa para determinar el consumo de carbohidratos presentes en el medio de cultivo de las muestras en matraz y biorreactor. Esta cuantificación se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) de la marca Waters 7117 plus Autosampler. Como fase estacionaria se utilizó una columna amino (NH_2) UG80 de tamaño $5\mu m$ ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$) y como fase móvil $CH_3CN:H_2O$ (acetonitrilo y agua) en una proporción 80:20 y un flujo de operación de 1.0 mL/min a $25^{\circ}C$. Los datos obtenidos se reportarán como gramos de sustrato por litro de medio S (g/L).

5.9.4 Tasa de crecimiento específica y el rendimiento celular

La tasa de crecimiento específica (μ) se calculó por el cambio en la concentración de biomasa por unidad de tiempo / concentración inicial de biomasa (d^{-1}). Todos los valores se tomaron de la fase exponencial de crecimiento.

A partir de la μ se calculó el tiempo de duplicación (td) con la siguiente formula:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}; \text{ donde } \ln 2: \text{ logaritmo natural de 2 y } \mu: \text{ tasa de crecimiento específica}$$

El rendimiento celular ($Y_{X/S}$) se calculó como (biomasa máxima - biomasa inicial) / (sacarosa consumida). El rendimiento de producto ($Y_{P/X}$) se calculó como (gramos de proteína producida) / (biomasa) y la productividad específica (qp) se calculó como (μg de proteína producida) / (biomasa por día).

5.9.5 Viabilidad celular

Para determinar el porcentaje de viabilidad celular de *D. carota* de la línea MSRZ4 en las muestras de cinética en matraz y biorreactor, se utilizaron 0.3 mL de una solución de diacetato de fluoresceína (FDA) en acetona (5 mg/mL). Las muestras se observaron en un microscopio marca Nikon Eclipse E 400 con una lámpara de luz UV a una λ 270 nm. Para realizar la cuantificación de las células se seleccionaron 10 cuadrantes al azar. Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo del porcentaje de viabilidad:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{Células vivas mL}^{-1}}{\text{Células totales mL}^{-1}} \times 100$$

5.9.6 Detección del transgén LTB-Syn por PCR

Para determinar la presencia del transgén LTB-syn de *D. carota* se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación se siguió el protocolo previamente reportado (Carreño-Campos *et al.*, 2022). El ADN genómico se purificó siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.*, (1983), a partir de 10 mg de peso seco de las muestras de matraz y biorreactor.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para detectar el transgén *LTB-Syn*:

Nombre y sentido	Secuencia nucleotídica
LTB-Syn F (directo)	5'-CGCACAATCCCACTATCCTTCGC-3'
LTB-Syn R (reverso)	5'-CAAGACCGGCAACAGGATTCAATC-3'

Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador MultiGene™ Mini Personal (Labnet) con el siguiente protocolo descrito a continuación (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2017):

Gen	Tamaño amplicón (pb)	Ciclos	Condiciones				
			Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
LTB-Syn	737	35	95°C por 3 min	95°C por 30 s	56°C por 30 s	72°C por 60 s	72°C por 5 min

5.9.7 Cuantificación y detección de LTB-Syn por ELISA y Dot-blot

La cantidad de proteína de los extractos solubles se estimó con el ensayo de ELISA gangliósido-dependiente (GM1-ELISA) propuesto por Chikwamba *et al.*, (2002). Para determinar la presencia e integridad de la proteína LTB-Syn de *D. carota* de la línea MSRZ4 se evaluó mediante los análisis de Dot-blot a partir de 10mg de PS de las muestras de matraz, biorreactor y línea no transformada (WT) (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2020).

5.9.8 Ensayos de inmunogenicidad en ratones

El manejo de los ratones se realizó de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud (EE. UU.) y protocolos aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Química/Universidad de San Luis Potosí (CEID2015048). La inmunogenicidad de LTB-Syn expresada en células de zanahoria se evaluó en ratones hembra BALB/c de 12 semanas de edad (peso corporal: 25 ± 3 g). Los ratones experimentales se asignaron aleatoriamente en grupos experimentales (n=5) y recibieron uno de los siguientes esquemas de inmunización: (G1) administración s.c. de péptidos Syn₁₋₃ a los días 0 y 14, seguido de un refuerzo oral con biomasa MSRZ4 el día 28; (G2) administración s.c. de péptidos Syn₁₋₃ a los días 0, 14 y 28; (G3) administración v.o. de biomasa MSRZ4 a los días 0, 14 y 28; (G4) administración v.o. de biomasa de zanahoria no transformada a los días 0, 14 y 28. Las formulaciones se prepararon de la siguiente manera: las dosis de péptidos Syn₁₋₃ se diluyeron en PBS y se emulsionaron con un volumen de adyuvante de Freund completo (CFA) para la inmunización el día 0, mientras que para la inmunización de los días 14 y 28 se utilizó adyuvante de Freund incompleto (IFA). Las formulaciones orales se prepararon con células secas de la línea transgénica MSRZ4 de zanahoria y de la línea no transformada (WT), se resuspendieron 30 mg por dosis en 300 µL de PBS y se administraron por vía intragástrica.

5.9.9 Determinación de anticuerpos

Se obtuvieron muestras de sangre los días 0, 28 y 42, y después de dejar coagular las muestras se centrifugaron a 13.000 xg por 10 minutos. Las muestras de suero se almacenaron a -80 °C hasta la determinación de anticuerpos. Las muestras de heces (100 mg) se resuspendieron en 500 µL de PBS con leche en polvo descremada al 5 % y 1 mM de PMSF (en frío). Las suspensiones de heces se centrifugaron por 15 minutos a 16.000 xg a 4°C. Se realizaron ensayos ELISA para determinar anticuerpos IgG e IgA anti- α -Syn y anti-LTB en muestras de suero y heces, respectivamente. Se recubrieron las placas de ELISA durante la noche a 4°C con 100 ng/pozo de LTB o 50 ng/pozo de péptidos Syn₁₋₃ sintéticos en buffer de carbonatos. Cada ensayo de ELISA se basó en el protocolo reportado anteriormente (Arévalo-Villalobos *et al.*, 2017). Los datos del análisis de anticuerpos del ELISA se presentan como los valores promedios de DO obtenidos por grupo en diferentes días. Las diferencias estadísticas en los niveles de anticuerpos entre los grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 8 (p <0.05).

VI) Resultados

6.1 Efecto de la fuente de nitrógeno adicional en cultivo de callos de *D. carota*

Los máximos rendimientos de biomasa de *D. carota* línea Z4 se obtuvieron con el medio B5 adicionados con urea, en una relación de 25 mM KNO₃:17mM urea, que fue de 0.39 g PS al día 30, mientras que para el medio de MS adicionados con urea en una relación de 20 mM NH₄NO₃:18.8 mM KNO₃ y 17 mM urea fue de 0.31 PS al día 30. Por otro lado, los máximos rendimientos de biomasa alcanzados con el medio B5 adicionado con glutamato (gtm), en una relación de 25 mM KNO₃:34 mM gtm fue de 0.22 g PS al día 30, mientras que para el medio MS adicionado con gtm en una relación de 20 mM NH₄NO₃:18.8 mM KNO₃ y 34 mM gtm fue de 0.27 g PS (Figura 4). El análisis estadístico de Tukey demostró que no había una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias de los medios MS y B5 + gtm en comparación con los medios B5 y MS estándar. En cuanto a la morfología de los callos se observó que todos los callos propagados en los distintos medios de cultivo con MS y B5 + urea y glutamato mostraban una coloración entre verde-crema y friables (Figura 5).

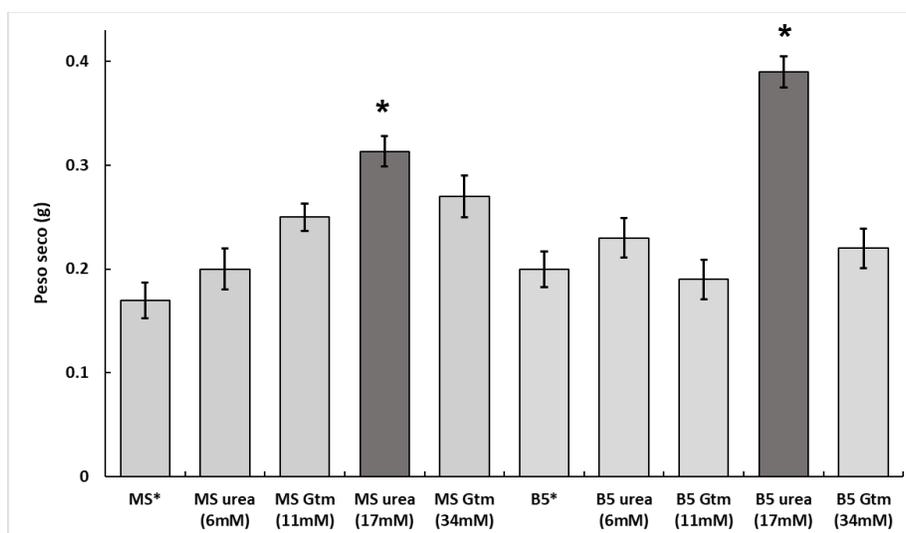


Figura 4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de callos de *D. carota* de la línea MSRZ4. Los cultivos de callos en los diferentes medios de cultivo en MS y B5 con urea y glutamato. Los valores son el promedio de tres replicas con DS. Las diferencias significativas de Tukey ($\alpha=0.05$) se muestran en asterisco (*) respecto a los medio MS y B5 estándar (control).

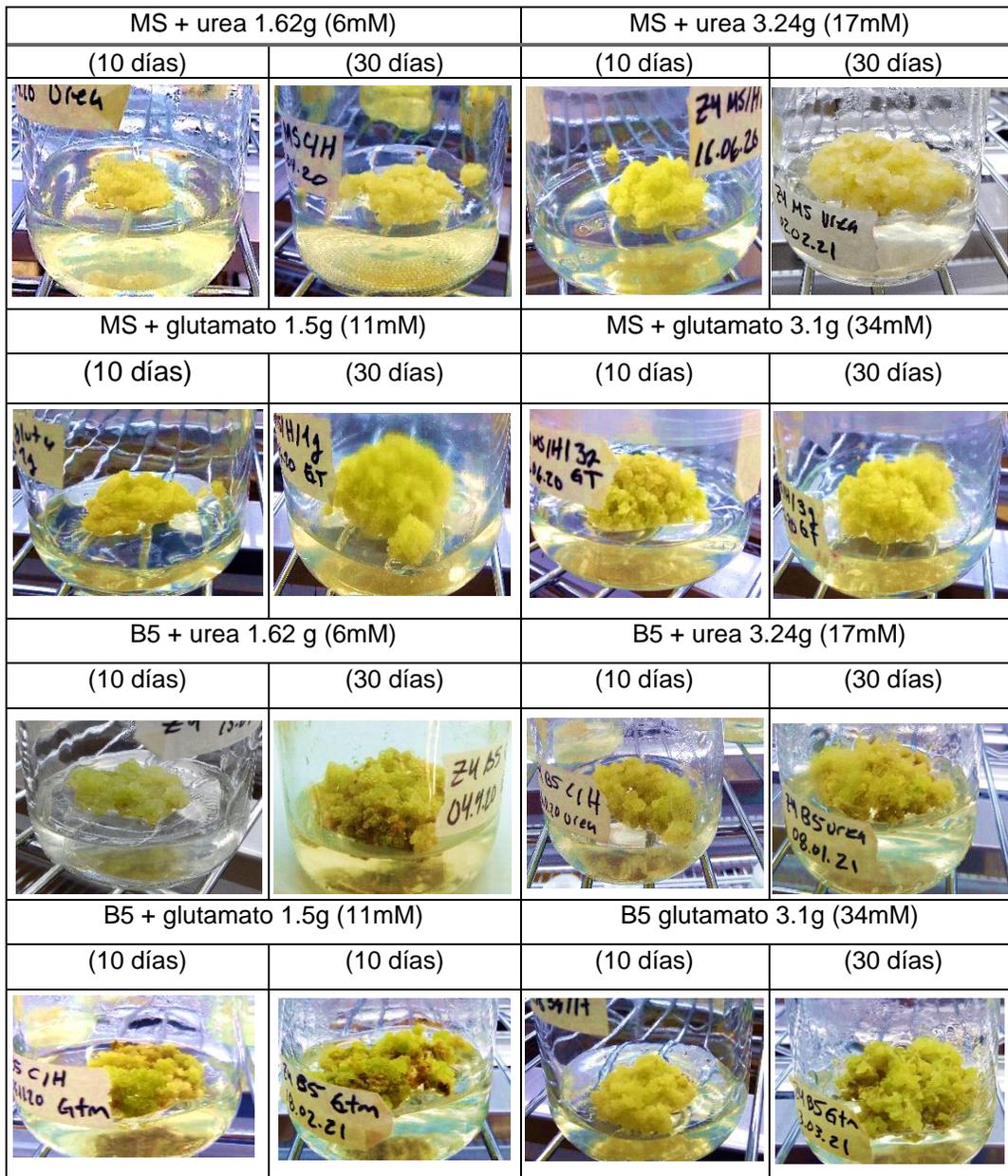


Figura 5. Morfología de los cultivos de callos de *D. carota* de la línea MSRZ4 en medios MS y B5 adicionados con urea y glutamato durante 10 y 30 días de crecimiento.

6.2 Establecimiento de los cultivos en suspensión de *D. carota* de la línea MSRZ4

A partir de los resultados obtenidos en cultivos de callos friables con la adición de urea y glutamato (gtm) se establecieron los cultivos en suspensión de *D. carota* de la línea MSRZ4 bajo las condiciones previamente descritas en la metodología. El establecimiento de cultivos se inició con un inóculo de 5 ± 2 g de callos friables en matraces bafleados de 250 mL con 100 mL de medio, lo cual permitió la disgregación de los callos y favoreció el crecimiento individual de las células. Posteriormente se propago la biomasa haciendo subcultivos cada 15 días con un inóculo del 10% (v/v) de células en suspensión en matraces de 250 mL con 100 mL de medio MS y B5 con urea y glutamato en sus dos concentraciones (Figura 6). De los cultivos establecidos con urea y glutamato se utilizaron para los tratamientos con el diseño experimental Plackett-Burman en la fase de cribado y optimización que se describe más adelante.

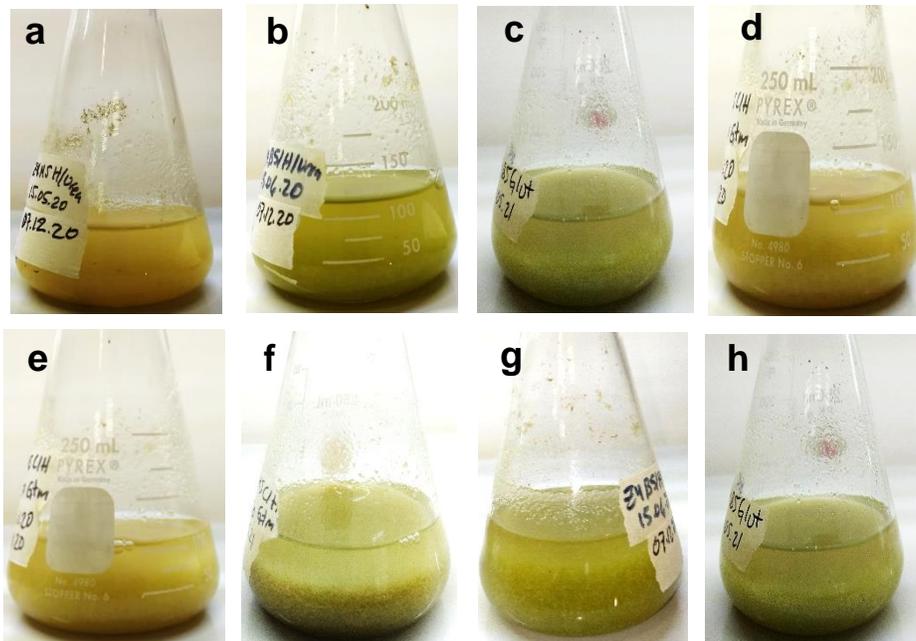


Figura 6. Cultivos de células en suspensión de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz de 250 mL al día 15. (a) MS + urea 6 mM, (b) MS + urea 17 mM; (c) B5 + urea 6 mM, (d) B5 + urea 17 mM, (e) MS + glutamato 11 mM; (f) MS + glutamato 34 mM; (g) B5 + glutamato 11 mM; (h) B5 + glutamato 34 mM.

6.3 Fase de cribado con el diseño Plackett-Burman

De acuerdo con los resultados del diseño de PB, existieron cuatro tratamientos con un mayor incremento en biomasa en los tratamientos 2, 8, 9 y 10 con máximo rendimiento de 18.8, 18.7, 17.6 y 18.9 g/L PF, respectivamente (Figura 7). En cuanto a los tratamientos control (MS y B5 con urea) se alcanzó una biomasa máxima de 16.1 y 16.5 g/L PF, respectivamente (Tabla 13). Los detalles de los tratamientos con mayor productividad de biomasa se resumen en la Tabla 14.

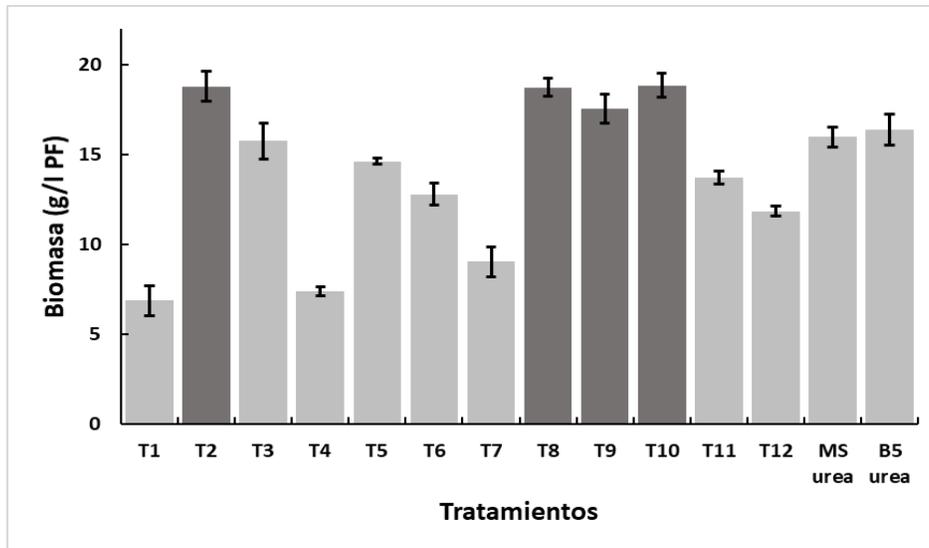


Figura 7. Producción de biomasa obtenidos en base al diseño Plackett-Burman. Los datos se expresan como la media (DS) del experimento realizado por triplicado.

Tabla 13. Matriz de diseño factorial Plackett-Burman y resultado de producción de biomasa de *D. carota* de la línea MSRZ4

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Respuesta 1
Tratamiento	sacarosa	urea	glutamato	luz	pH	inóculo	fitorregulador	Biomasa (g/L PF)
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	6.9±0.81
2	1	1	-1	-1	-1	1	1	18.8±0.82
3	1	-1	1	1	-1	1	1	15.8±0.99
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	7.4±0.26
5	-1	-1	-1	1	-1	1	1	14.6±0.65
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	12.8±0.62
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	9.0±0.82
8	-1	1	1	-1	1	1	1	18.7±0.50
9	1	1	-1	1	1	1	-1	17.6±0.80
10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	18.9±0.68
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	17.1±0.65
12	-1	1	-1	1	1	-1	1	11.9±0.28

*MS urea	1	1	-1	1	1	1	1	16.1±0.55
*B5 urea	-1	1	-1	1	1	1	1	16.5±0.85

Tabla 14. Tratamientos con mayor producción de biomasa de *D. carota* de la línea MSRZ4

Tratamientos	Factores evaluados	Biomasa (g/L PF)
T2	MS + urea + oscuridad + pH 5.0 + 10g inóculo + con fitorreguladores	18.8±0.82
T8	B5 + urea + glutamato + oscuridad + pH 5.7 + 10g inóculo + con fitorreguladores	18.7±0.50
T9	MS + urea + luz continua + pH 5.7 + 10g inóculo + sin fitorreguladores	17.6±0.80
T10	B5 + glutamato + oscuridad + pH 5.7 + 10g inóculo + sin fitorreguladores	18.9±0.68

Los resultados en la producción de proteína LTB-Syn de cada uno de los tratamientos con el diseño de PB muestran que la mayor acumulación de la proteína LTB-Syn se encontraron en los tratamientos: 2 (0.23 ± 0.05 $\mu\text{g/g PF}$), 3 (0.20 ± 0.01 $\mu\text{g/g PF}$) y 9 (0.21 ± 0.01 $\mu\text{g/g PF}$) al día 15 (Figura 8). En cuanto a los tratamientos control (MS y B5 con urea) se alcanzó una máxima producción de LTB-syn de 0.13 y 0.15 g/L PF al día 15, respectivamente (Tabla 15). Los detalles de los tratamientos y sus factores evaluados con mayor producción de la proteína LTB-Syn se resumen en la Tabla 16.

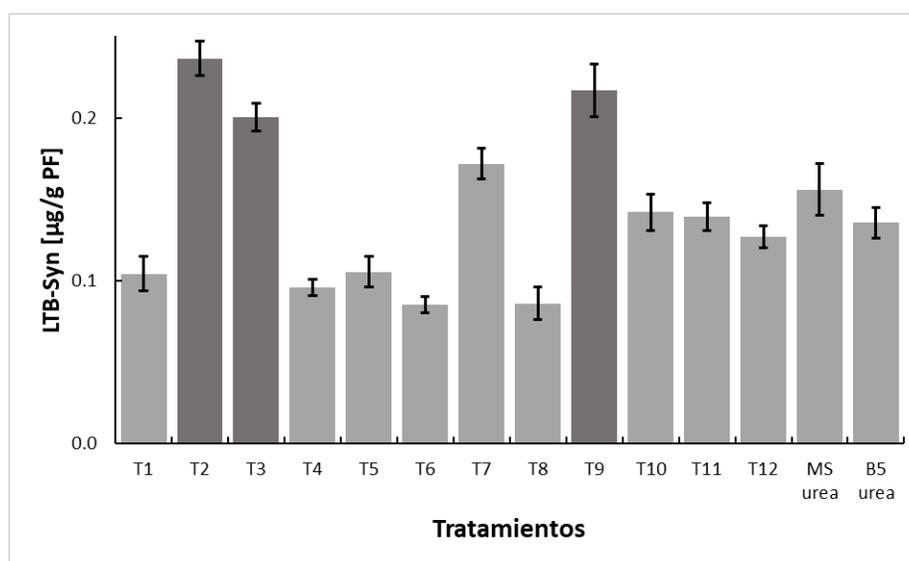


Figura 8. Producción de la proteína LTB-syn en base al diseño Plackett-Burman. Los datos se expresan como la media (DS) del experimento realizado por triplicado.

Tabla 15. Matriz de diseño factorial fraccionado Plackett-Burman y resultados de producción de la proteína LTB-syn de *D. carota* de la línea MSRZ4.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Respuesta 2
Tratamiento	sacarosa	urea	glutamato	luz	pH	inóculo	fitorregulador	Proteína [µg/g PF]
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	0.10±0.01
2	1	1	-1	-1	-1	1	1	0.23±0.05
3	1	-1	1	1	-1	1	1	0.20±0.01
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.11±0.01
5	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0.13±0.01
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0.08±0.02
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	0.17±0.09
8	-1	1	1	-1	1	1	1	0.09±0.07
9	1	1	-1	1	1	1	-1	0.21±0.01
10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0.14±0.05
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0.13±0.09
12	-1	1	-1	1	1	-1	1	0.12±0.08
*MS urea	1	1	-1	1	1	1	1	0.15±0.01
*B5 urea	-1	1	-1	1	1	1	1	0.13±0.03

Tabla 16. Tratamientos con mayor producción de la proteína LTB-Syn de *D. carota* en la línea MSRZ4

Tratamientos	Factores evaluados	Proteína LTB-syn [ug/g PF]
T2	MS + urea + oscuridad + pH 5.0 + 10g inóculo + con fitorreguladores	0.23±0.05
T3	MS + glutamato + luz continua + pH 5 + 10g inóculo + con fitorreguladores	0.20±0.01
T9	MS + urea + luz continua + pH 5.7 + 10g inóculo + sin fitorreguladores	0.21±0.01

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de los resultados experimentales obtenidos y los efectos de cada factor se representaron gráficamente en un cuadro de Pareto, el cual muestra de manera independiente los factores que tienen un efecto positivo sobre la producción de biomasa de *D. carota* de la línea Z4 (Figura 9). En el cuadro de Pareto, el efecto más positivo se muestra en las barras del lado izquierdo y continua hasta el efecto mínimo del lado derecho. La longitud de las barras es proporcional al efecto sobre la variable respuesta, aquellas que cruzan la línea vertical azul presentan significancia a un nivel de confianza del 95 % (Jayasree *et al.*,

2016). Sobre la base de los resultados obtenidos del ANOVA y el cuadro de Pareto, solo cuatro factores: inóculo (F), pH (E), urea (B), sacarosa (A) y fitorreguladores (G) mostraron mayor significancia sobre la variable respuesta y los factores con menor efecto fueron: luz (D), glutamato (C), así como la interacción sacarosa con glutamato (AC), sacarosa con pH (AE), sacarosa con fitorreguladores (AG) y fitorreguladores con urea (AB). La no selección de estos factores restantes sugiere que no hay contribución de significancia ($p > 0.05$) a la variable respuesta en el nivel de confianza del 95 por ciento, seleccionado para el estudio. Por esta razón y sobre la base de los resultados obtenidos, estos componentes no fueron considerados para la búsqueda de una región de máximo valor en la fase de optimización (Palvannan y Sathishkumar, 2010).

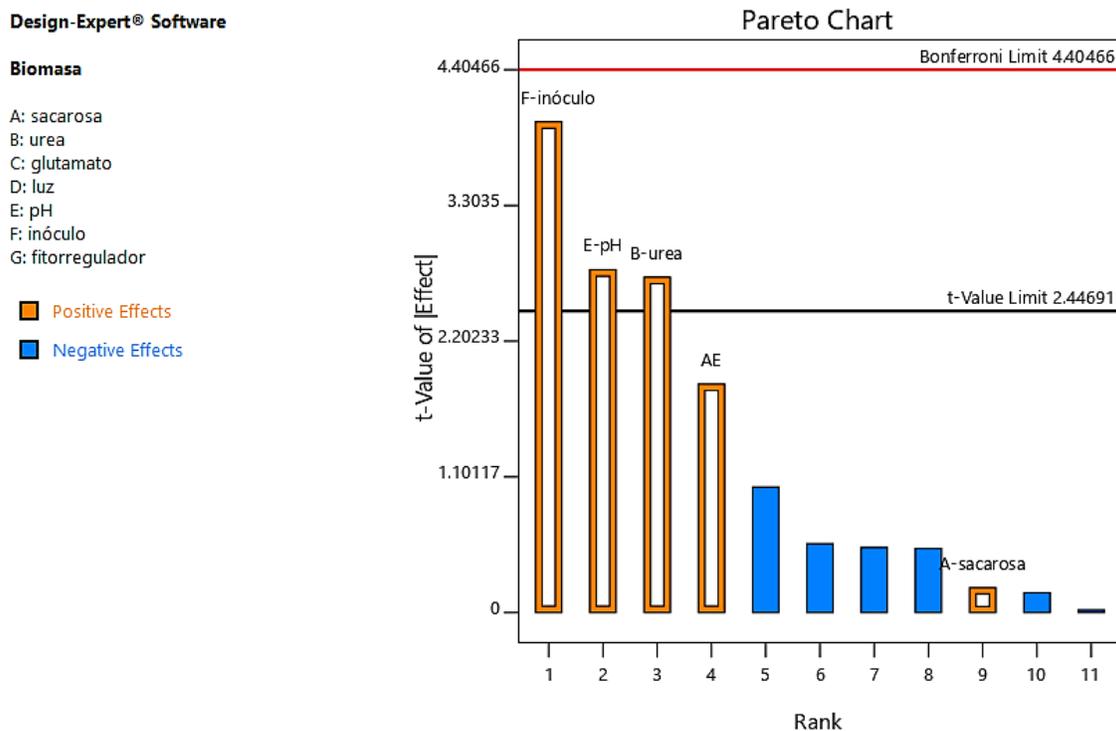


Figura 9. Cuadro de Pareto en base al diseño Plackett-Burman. Se muestra la significancia y el efecto de los factores evaluados (producción de biomasa de *D. carota* que expresan la proteína LTB-Syn), considerando un $\alpha = 0.05$.

El modelo lineal para este diseño establece una relación entre la biomasa (variable dependiente) y los factores (variables independientes): sacarosa (A), urea (B), pH (E), inóculo (F); los cuales se representan en la siguiente ecuación:

$$\text{Biomasa} = 12.500 + 0.011667 \cdot A + 1.69048 \cdot B + 1.61667 \cdot E + 2.47381 \cdot F + 1.22143 \cdot AE$$

Por ello, el análisis de varianza (ANOVA) del modelo lineal para el diseño experimental PB indica que a un nivel de significancia del 97% los factores urea (B), pH (E) e inóculo (F) fueron significativos ($p < 0.05$) a diferencia de los factores sacarosa (A) y la interacción sacarosa:pH (AE) que no mostraron significancia sobre la variable respuesta evaluada.

De acuerdo con el análisis de ANOVA, se observó que la suma de cuadrados del error residual presenta un valor pequeño en relación con la suma de cuadrados del total, lo cual indica la correcta reproducibilidad del punto central evaluado y su correspondencia con el modelo lineal (Tabla 17). Además, el valor F del modelo de 5.75 indica la importancia del modelo utilizado y los valores de $p < 0,05$ muestran que los términos del modelo son significativos para el tamaño del inóculo, el pH y de urea. La diferencia significativa del modelo también fue confirmada por el coeficiente de determinación $R^2 = 0.9875$, lo que indica que el modelo podría explicar el 98% de la variabilidad en la respuesta. El valor $R^2 = 0,9154$ tuvo un alto grado de correlación entre los valores observados y estimados de la variable respuesta al ser cercano al R^2 ajustado de 0.9273.

Tabla 17. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para los factores evaluados en la etapa de cribado mediante el diseño Plackett-Burman.

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Modelo	116.47	5	23.29	5.75	0.0275
A-sacarosa	0.1633	1	0.1633	0.0403	0.8475
B-urea	30.01	1	30.01	7.41	0.0346
E-pH	31.36	1	31.36	7.74	0.0319
F-inóculo	64.26	1	64.26	15.86	0.0073
AE	13.92	1	13.92	3.44	0.1132
Residual	24.31	6	4.05		
Error Total	140.78	11			
R^2	0.9875				
R^2 ajustado	0.9273				
R^2 predicho	0.9154				

6.4 Fase de optimización con el diseño Box-Behnken

Para la fase de optimización del medio de cultivo con la biomasa de *D. carota* de la línea MSRZ4, se empleó el modelo de superficies de respuesta (MSR), en donde se consideró la concentración óptima de tres variables de mayor significancia con el diseño PB: inóculo, urea, y pH. Los otros factores de luz, sacarosa y fitorreguladores fueron mantenidos en sus niveles originales en el medio MS. Los factores fueron evaluados en tres niveles (-1, 0, +1) para los ensayos estimados y experimentales, tal como se observa en la Tabla 18. Las quince corridas experimentales fueron

realizadas en orden aleatorio, con tres puntos centrales para la estimación de la suma de cuadrados del error (Myers *et al.*, 2009).

Tabla 18. Matriz del diseño Box-Behnken para la fase de optimización y resultado de respuesta (biomasa) experimental y estimada

Corrida	F: inóculo	B: urea	E: pH	Biomasa experimental (g/L)	Biomasa estimada (g/L)
1	0	0	0	13.7	11.6
2	0	-1	1	15.2	15.5
3	1	0	1	6.32	7.4
4	-1	0	-1	12.6	10.5
5	0	1	-1	7.41	8.4
6	0	0	0	16.5	18.5
7	-1	0	1	11.4	10.8
8	1	-1	0	17.6	17.3
9	0	0	0	11.3	9.8
10	0	-1	-1	12.2	12.1
11	1	1	0	16.3	14.6
12	0	1	1	9.5	8.5
13	-1	-1	0	10.7	9.8
14	1	0	-1	10.2	9.5
15	-1	1	0	10.5	10.3

Los resultados presentados en la Tabla 18 muestran que la biomasa varió de 7.41 a 17.6 (g/L) respecto a las corridas experimentales empleadas. El modelo cuadrático obtenido para este diseño establece una relación entre la biomasa (variable dependiente) y los factores (variables independientes): inóculo (F), urea (B) y pH (E); los cuales se representan en la siguiente ecuación:

$$\text{Biomasa} = -130.087 + 1.07286 \cdot F + 1.69048 \cdot B + 48.06463 \cdot E + 0.38000 \cdot F \cdot B - 0.628571 \cdot F \cdot E - 2.57143 \cdot B \cdot E + 0.202667 \cdot F^2 + 2.21667 \cdot B^2 - 3.53741 \cdot E^2$$

El análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático obtenido a partir del diseño experimental Box Behnken se observó que los factores inóculo (F) y urea (B) tuvieron efectos significativos ($p < 0.05$) a diferencia del pH (E). Respecto a los términos cuadráticos, inóculo (F^2) y urea (B^2) mostraron efectos significativos ($p < 0.05$) a diferencia del efecto no significativo de pH (E^2); sobre la base de las interacciones entre factores. Sin embargo, ninguna de las interacciones inóculo-urea ($F \cdot B$), inóculo-pH ($F \cdot E$) y urea-pH ($B \cdot E$) mostraron significancia ($p < 0.05$) (Tabla 19).

Tabla 19. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de los factores evaluados en la etapa de optimización con el diseño Box-Behnken.

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	147.51	9	16.39	20.92	0.0019
F-inóculo	114.01	1	114.01	145.54	< 0.0001
B-urea	0.9800	1	0.9800	1.25	0.0314
E-pH	0.1250	1	0.1250	0.1596	0.7060
FB	3.61	1	3.61	4.61	0.0846
FE	1.21	1	1.21	1.54	0.2690
BE	3.24	1	3.24	4.14	0.0976
F ²	5.92	1	5.92	7.56	0.0403
B ²	18.14	1	18.14	23.16	0.0048
E ²	0.6933	1	0.6933	0.8851	0.3900
Residual	3.92	5	0.7833		
Error total	0.1267	2	0.0633		
Total (corr.)	151.43	14			
R ²	0.9741				
R ² ajustada	0.9276				
Lack of fit	3.79	3	1.26	19.95	0.0481

El resultado de ANOVA muestra que la suma de cuadrados del error total presenta un valor pequeño con relación a la suma de cuadrados del total, lo cual indica la correcta reproducibilidad del punto central evaluado (Tabla 19). Además, con respecto al coeficiente de determinación (R^2) se pudo establecer que el 97.4% de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático, mostrando la adecuación del modelo en predecir el efecto del inóculo, urea y pH en la producción de biomasa de *D. carota*. El valor del R^2 ajustado (92.7%) fue cercano al del R^2 , indicando que existe correlación entre los valores estimados y observados en la etapa de optimización (Soni *et al.*, 2010). Se observó que el valor de falta de ajuste (lack of fit) fue de 19.95, lo que sugiere que el modelo era altamente significativo.

6.5 Análisis del modelo superficie de respuesta (MSR)

A partir del modelo cuadrático de la ecuación, se elaboraron los gráficos tridimensionales de superficie de respuesta y los gráficos de contorno bidimensionales respectivos, para representar la relación entre las variables independientes y la variable respuesta (biomasa) a nivel de efectos principales, de interacción y cuadráticos. La identificación de los valores óptimos de cada factor, que generen la maximización de la variable respuesta es el principal objetivo de estos gráficos, en conjunto con los análisis previamente mostrados. La formación de cada gráfico resulta de variar dos factores dentro del rango experimental, mientras el tercero se mantiene en su punto central.

Como se observa en la Figura 10, cuando el nivel central para el pH (5.35), se estima la variable respuesta en función al efecto de la interacción entre el inóculo y la urea. El factor de urea presenta un efecto de tendencia positiva sobre la variable respuesta, pues el incremento de su concentración de 1 g/L a 3 g/L genera un aumento de los valores de biomasa (g/L), por lo que los valores óptimos de urea son los más cercanos a su nivel (+1). Por su parte, respecto al factor tamaño del inóculo, su efecto cuadrático genera un incremento de los valores de biomasa (g/L) cuando se incremente de 5 g/L a 10 g/L.

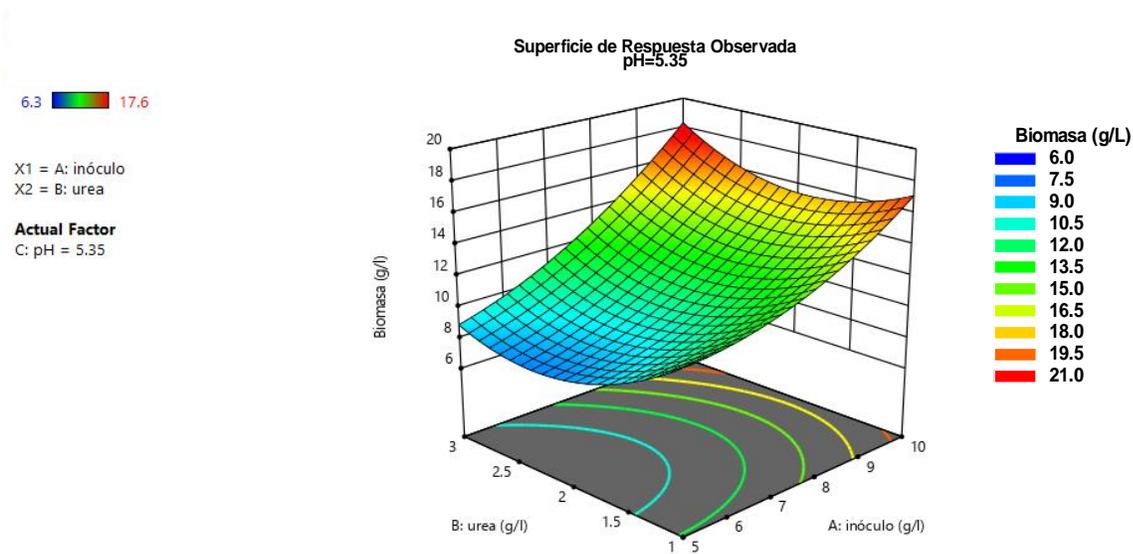


Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta y de contorno para los efectos entre tamaño de inóculo y la urea en la producción de biomasa de *D. carota* que expresan la proteína LTB-Syn.

Por otra parte, la interacción del efecto entre el tamaño de inóculo y pH sobre la variable respuesta, cuando el factor urea se mantiene en su nivel central (Figura 11). Se observó que el tamaño del inóculo presenta un efecto de tendencia positiva similar, pues el incremento de su concentración de 5 g/L a 10 g/L genera un aumento de biomasa (g/L), mientras que, el factor pH al incrementar su concentración de 5.0 a 5.7, genera una disminución de biomasa (g/L), por lo que los valores óptimos de pH se encuentran en el nivel (-1). En la Figura 12, se observa la interacción del efecto entre la urea y el pH, cuando el factor inóculo se mantiene fijado en su nivel central. En este caso, tanto urea como pH al incrementar su concentración de 1 g/L a 3 g/L y 5.0 a 5.7 respectivamente, generan un aumento ligero de los valores de biomasa (g/L), por lo que los valores óptimos de ambos factores se encontrarían en el nivel (+1 y -1).

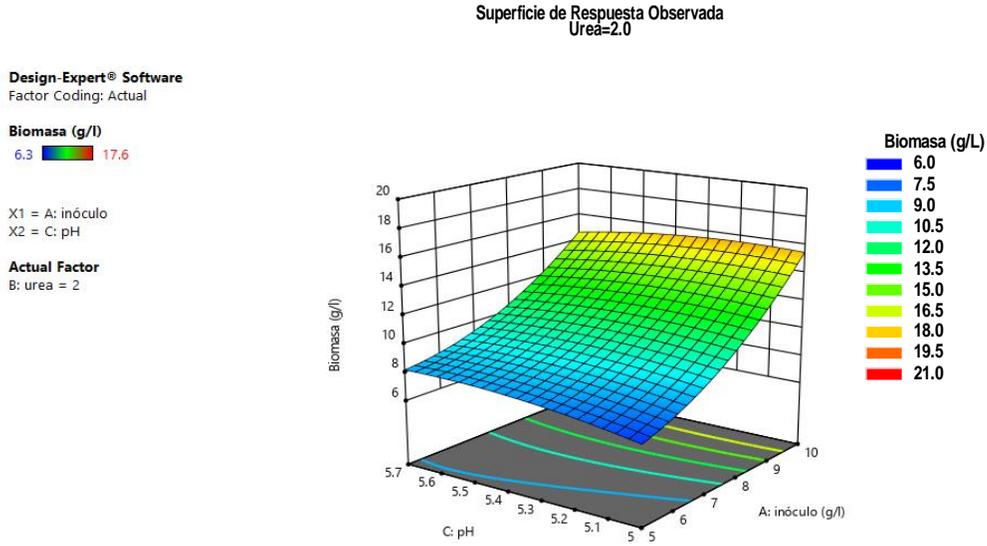


Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta y de contorno para los efectos entre tamaño de inóculo y el pH en la producción de biomasa de *D. carota* que expresan la proteína LTB-Syn.

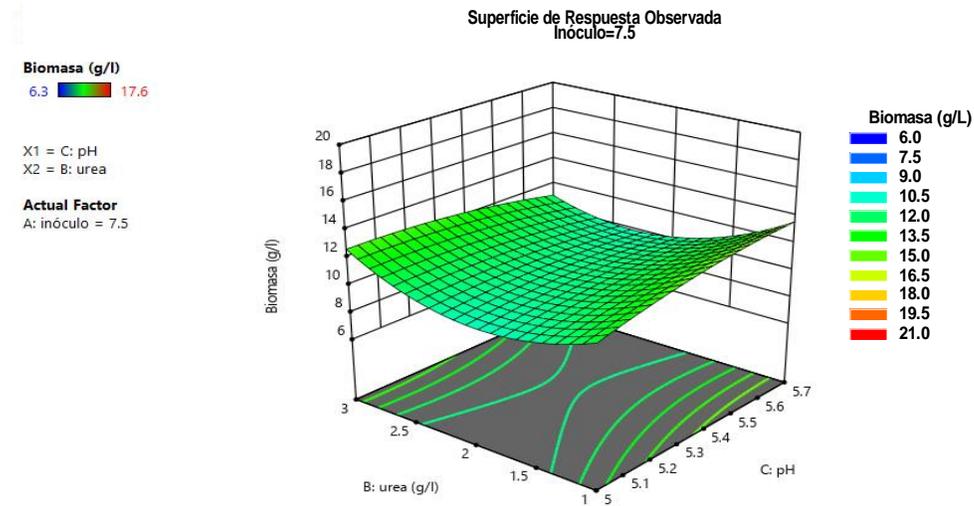


Figura 12. Gráfico de superficie de respuesta y de contorno para los efectos entre la urea y el pH en la producción de biomasa de *D. carota* que expresan la proteína LTB-Syn.

Los gráficos de superficies observados en conjunto con sus respectivos gráficos de contorno presentaron formas elípticas, lo cual indica los efectos simultáneos o de interacción entre los

factores sobre la variable respuesta (Pirzadah *et al.*, 2014). Por otro lado, los gráficos de deseabilidad para la optimización en el modelo MSR se muestran en la Figura 13. La máxima deseabilidad se logró dentro de un rango de tamaño de inóculo de 9.98 g/L y 2.9 g/L de urea. La deseabilidad fue cero por debajo de 5 g/L de inóculo y por debajo de 1.9 g/L de urea.

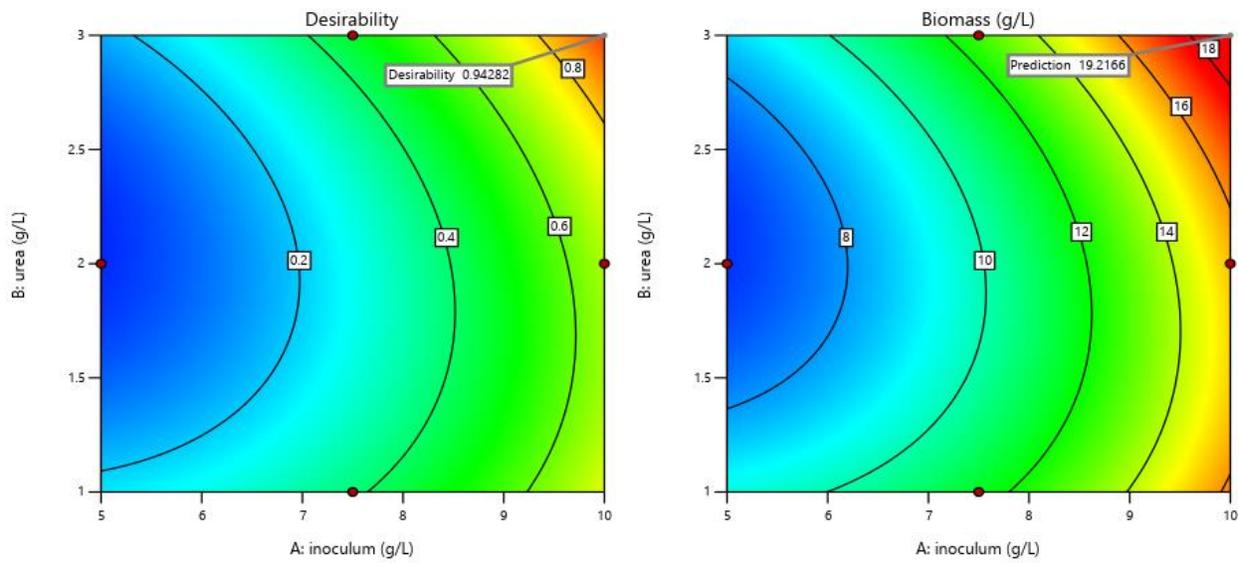


Figura 13. Gráfico deseabilidad máxima en función de la producción de biomasa de *D. carota*. La deseabilidad máxima para el efecto entre la urea y tamaño del inóculo que se puede lograr es 1. La deseabilidad superior a 0.8 está representada por una sección de color rojo del gráfico de contorno. La sección azul oscuro es el área de deseabilidad cero.

Con base en los diferentes gráficos de superficie de respuesta generados, se logró estimar las condiciones óptimas para obtener la máxima producción de biomasa de *D. carota* utilizando los tres factores independientes como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Condiciones óptimas estimadas por *Statgraphics* para maximizar la producción de biomasa de *D. carota* que expresan la proteína LTB-Syn.

Factor	Valor óptimo	Respuesta óptima estimada (biomasa g/L)
Inóculo	9.97 g/L	19.2
Urea	3.2 g/L	
pH	5.0	

6.6 Validación del modelo

Para poder validar el modelo de la respuesta óptima dada por el programa *Statgraphics* se realizaron experimentos adicionales en matraz por triplicado con las condiciones del medio optimizado (el cual se nombró MSR) para comparar la biomasa estimada y experimental. Los detalles de estos experimentos se discuten en la sección de materiales y métodos.

De acuerdo con los resultados de esta etapa, se obtuvo experimentalmente un valor de biomasa menor al estimado por el programa; sin embargo, este fue cercano y mayor al de los tratamiento con medio MS y B5 estándar. Lo observado entre los resultados estimados y experimentales verificará la validez del modelo y la existencia de los puntos óptimos. La comparación de los valores obtenidos experimentales se resume en la Tabla 21.

Tabla 21. Comparación en la producción experimental de biomasa del medio MSR con respecto al estimado y a los medios B5 y MS estándar

Medio de cultivo	Respuesta	Biomasa (g/L PS)	LTB-Syn (µg/g PF)
MS	Estándar	16.1	0.15
B5	Estándar	15.2	0.13
MSR	Óptima estimado	19.2	0.58
MSR	Óptima experimental	18.5	0.62

6.7 Cinética de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz

Una vez validado el modelo, se realizaron los estudios cinéticos en la producción de biomasa de *D. carota* con la línea MSRZ4 en matraz en el medio de cultivo MSR (Figura 14). Se observó una curva de crecimiento con una fase lag de 5 días, después una fase exponencial del día 6 al 15 con una máxima producción de biomasa en de 17.9 g/L al día 15, esto es 1.07 veces a lo obtenido previamente con la misma especie por Carreño-Campos *et al.*, 2022 (16.7 g/L) y Morales, MA. 2021 (16.07 g/L) con un inóculo del 10% en todos los casos. Bajo las condiciones establecidas, se observó un crecimiento exponencial que duró 9 días con un tiempo de duplicación de 6 días ($\mu = 0.12/\text{días}$), después declinó y empezó la fase estacionaria a partir del día 21.

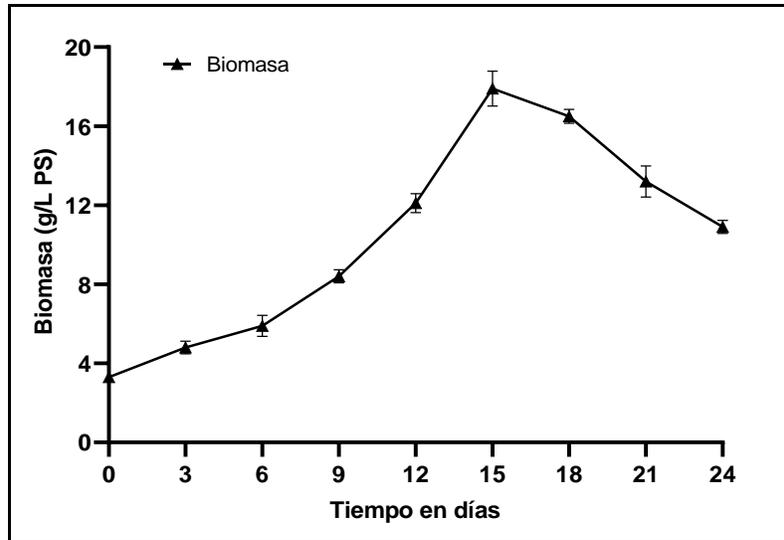


Figura 14. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz de 250 mL durante 24 días de cultivo.

6.7.1 Estudio cinético de pH del medio de cultivo de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz

En la Figura 15, se muestran la curva de biomasa PS y variación de pH del medio respecto al tiempo. El pH disminuyó en 0.9 unidades aproximadamente durante los primeros 6 días, y fue aumentando posteriormente para permanecer entre 5.1 y 5.6 desde el día 9 al 24.

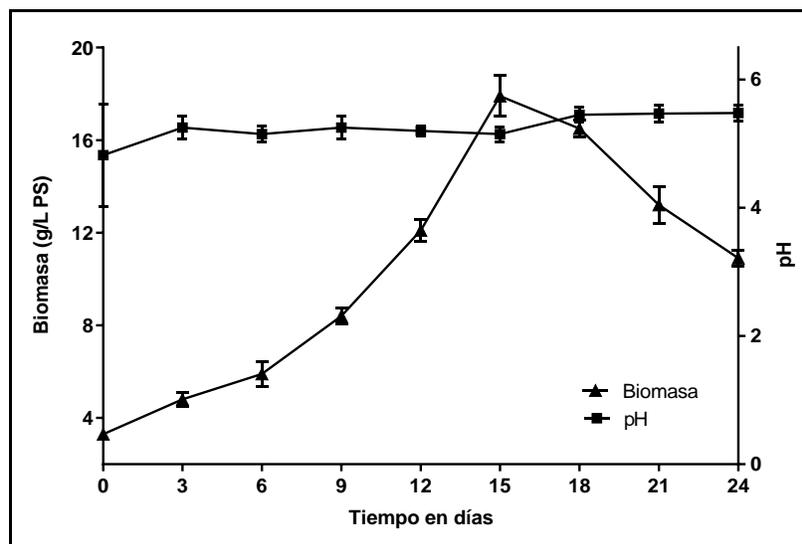


Figura 15. Curva de crecimiento y variación de pH del medio de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz de 250 mL

6.7.2 Estudio cinético del consumo de azúcares de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz

En la Figura 16, se muestran la curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto al consumo de sacarosa, fructosa y glucosa respecto al tiempo. La sacarosa fue hidrolizada completamente en el día 15, mientras que el consumo de la glucosa y la fructosa se metabolizaron rápido durante los primeros 9 días del cultivo.

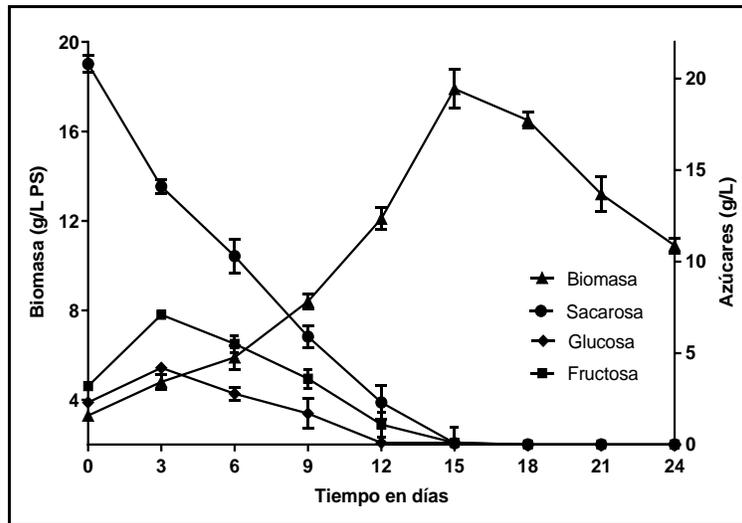


Figura 16. Curva de crecimiento y consumo de azúcares de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz de 250 mL

6.7.3 Estudio cinético de la viabilidad celular de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz

Durante la cinética de crecimiento se monitorio la viabilidad celular por fluorescencia con el DAF. La Figura 17 muestra el % de células vivas respecto al crecimiento celular, donde se pudo observar que el cultivo inicio con un 90% de células viables, y después se mantuvo estable entre 95-99% a los 6 y 15 días. A partir del día 21 bajo ligeramente a 92% y al día 24 se observó que decae hasta un 75%.

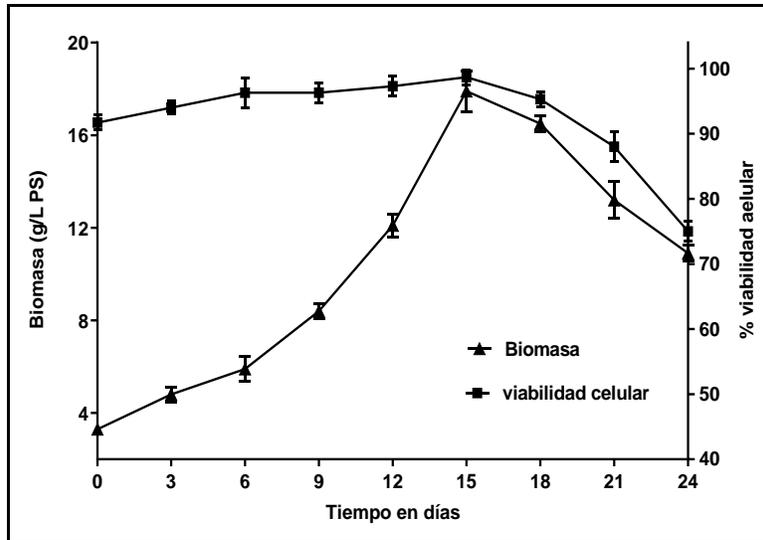


Figura 17. Curva de crecimiento respecto al porcentaje de viabilidad celular de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz de 250 mL

6.7.4 Producción de la proteína LTB-Syn de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz

En la Figura 18, se muestra la producción de la proteína LTB-Syn respecto al incremento de la biomasa. Se observó que a partir del día 6 la producción de la proteína LTB-Syn fue incrementando con una máxima producción de 2.83 μg de LTB-Syn/g PS al día 15, lo cual representa un incremento de 6.1 veces respecto a la producción al día inicial (0.46 $\mu\text{g/g}$ PS). Posteriormente, la expresión de la proteína LTB-Syn se mantuvo entre 2.32 y 2.57 $\mu\text{g/g}$ PS entre los 18 y 24 días, respectivamente.

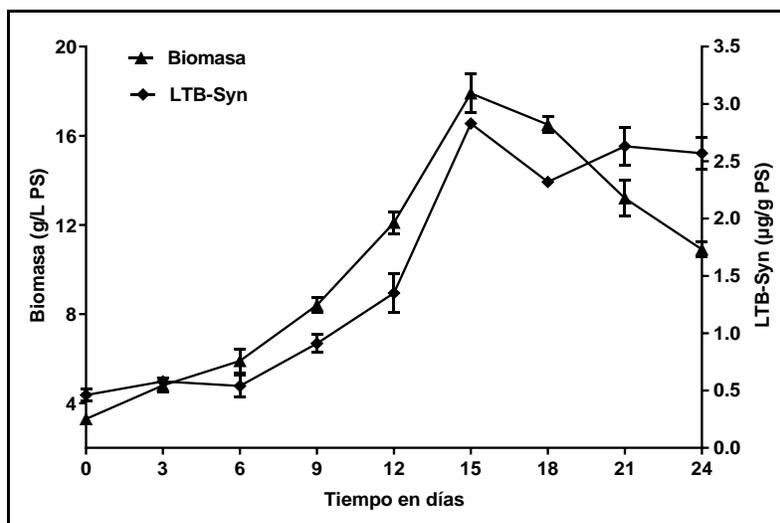


Figura 18. Curva de crecimiento y producción de proteína LTB-Syn de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz de 250 mL

6.7.5 Análisis comparativo de los parámetros cinéticos en cultivo de matraz

La comparación entre los parámetros de crecimiento y rendimientos de los medios de cultivo MS estándar y MSR a nivel de matraz donde creció la línea MSRZ4 de *D. carota*, se resumen en la Tabla 22. El análisis de estos resultados comparativos se muestra en el apartado de discusión.

Tabla 22. Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos de *D. carota* de la línea MSRZ4 con los medios MSR respecto al MS estándar a nivel de matraz.

Parámetro	MS estándar*	MSR optimizado	Incremento
Biomasa (g/L PS)	15.4	17.9	1.16
μ (d ⁻¹)	0.084	0.111	1.37
Td (días)	8.2	6.2	0.75
LTB-Syn (μ g/g PS)	0.92 (18 días)	2.83 (15 días)	4.56
Rendimiento ($Y_{x/s}$)	0.45	0.53	1.17
Rendimiento ($Y_{p/x}$)	0.03	0.16	5.3

* Carreño-Campos *et al.*, 2022

6.7.6 Detección del transgén *LTB-syn* expresado en *D. carota* por PCR

Después de la extracción de DNA y amplificación del transgén *LTB-syn* en *D. carota* por PCR se comprobó la presencia de amplicones con bandas esperadas de aprox. 737pb en las muestras de matraz al inicio y final de la cinética de crecimiento, mientras que la reacción con el ADN de la línea no transformada (WT) no mostró amplificación (Figura 19).

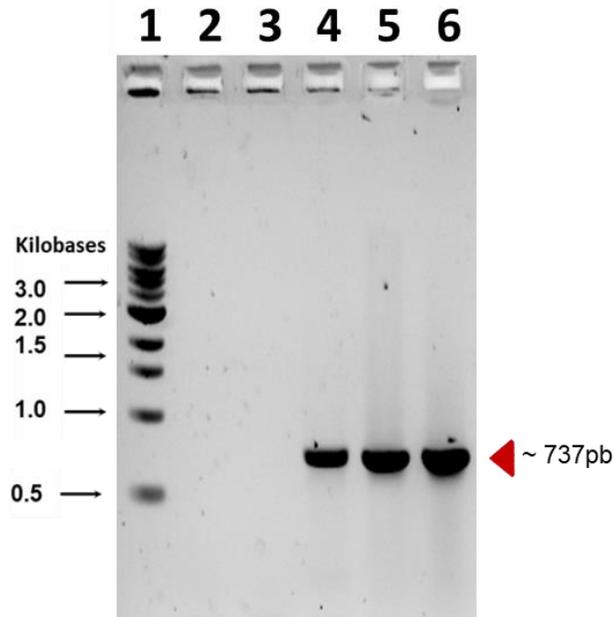


Figura 19. Detección del transgén LTB-Syn por PCR de *D. carota* de línea MSRZ4 en matraz. Carril: (1), marcador de peso molecular (1kb, New England Biolabs); (2), control negativo de reactivos; (3), línea no transformada WT; (4), línea Z4 (+); carriles: 5-6 muestras de cinética al día 0 y 24.

6.7.7 Presencia de la proteína LTB-Syn expresada en *D. carota* por Western blot y Dot blot

La presencia y la integridad de la proteína LTB-Syn expresada en *D. carota* en la línea MSRZ4 se evaluó mediante análisis de inmunotransferencia Western-blot de acuerdo con lo reportado por Arévalo-Villalobos y col., en 2017. Los resultados confirmaron la presencia de la proteína LTB-Syn con el peso molecular esperado de aprox. 21kDa se muestra en la Figura 20.

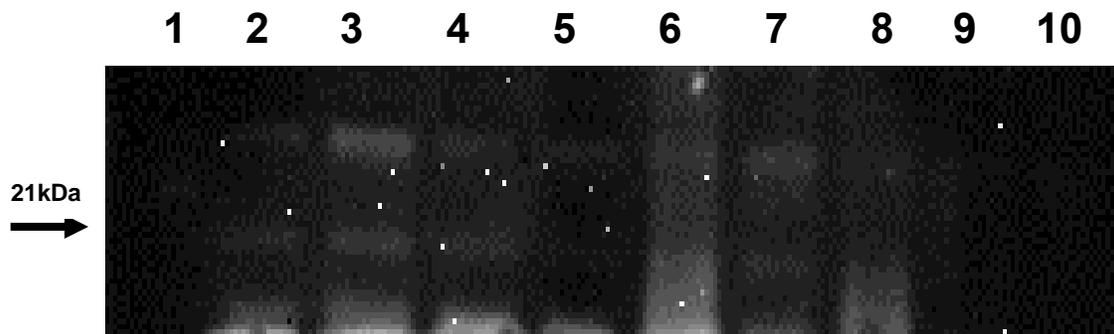


Figura 20. Detección de la proteína LTB-Syn expresada en *D. carota* por Western-blot. Las imágenes muestran la presencia de bandas inmunorreactivas de aprox. 21kDa tras el marcaje

con el suero anti-CTB. Carriles: 1, (MPM 50kDa); 2, línea Z4 (+); 3, (T2); 4, (T5); 5, (T8); 6, (T9); 7, (T10); 8, (T11); 9, (T12); 10, control negativo (WT).

Debido a que las bandas que se obtuvieron en el Western-blot fueron poco visibles y con el fin de demostrar que las bandas de 21kDa correspondían a la proteína de interés, se decidió realizar un ensayo de Dot-blot para la cinética en matraz de *D. carota* de línea MSRZ4. Esto se realizó a partir de extractos de proteína soluble total de los diferentes días la cinética. La Figura 21 muestra una reactividad positiva de todas las muestras de la cinética en matraz de forma similar al control positivo Z4+ y CTB, confirmándose la expresión y presencia de la proteína LTB-Syn, mientras que con la línea no transformada (WT) no se observó reacción.

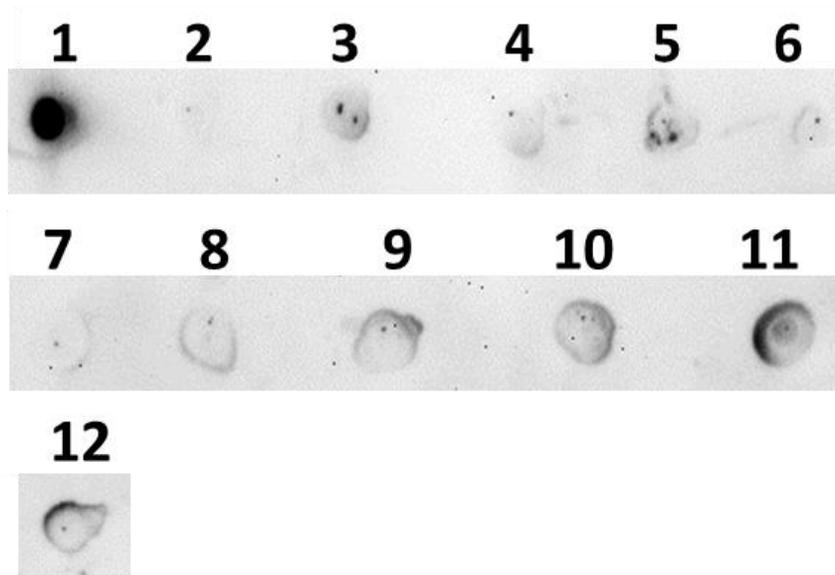


Figura 21. Detección de la proteína LTB-Syn de *D. carota* de línea MSRZ4 por Dot blot. (1) CTB (300 ng/μl); (2) control negativo WT; (3) control positivo Z4(+); (4-12), extractos de proteína total soluble a diferentes días del cultivo cinético en matraz (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 días).

6.8 Cinética de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor a 0.5 vvm

Los resultados obtenidos a nivel de matraz permitieron llevar a la línea celular MSRZ4 de *D. carota* a un proceso de escalamiento en el biorreactor airlift de 2 L. Se realizaron dos repeticiones, en las cuales se corrió una cinética con un flujo de aire de 0.5 vvm y otro con 1.5 vvm. La Figura 22 muestra la curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor con un flujo de aire de 0.5 vvm. Se observó una fase lag de 2 días, seguido de una fase exponencial del día

2 al 8 con una máxima producción de biomasa de 25 g/L PS al día 8, representando un incremento de 2.3 veces el tamaño del inóculo inicial (10.5 g/L PS). Se observó una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.12/días y tiempo de duplicación (t_d) de 5.7 días, que después declinó y empezó la fase de muerte a partir del día 12.

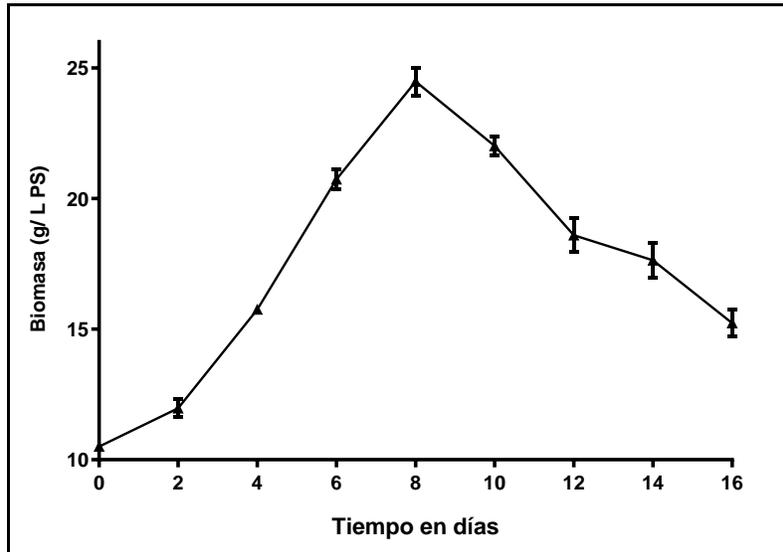


Figura 22. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 en el biorreactor airlift 2 L a 0.5 vvm durante 16 días de cultivo

6.8.1 Estudio cinético de pH y conductividad de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

En la Figura 23, se muestran la curva de biomasa respecto a la variación de pH y conductividad del medio en el biorreactor airlift a 0.5 vvm. El pH disminuyó en los primeros dos días hasta 4.82, y fue aumentando posteriormente para permanecer entre 5.2 y 5.5 desde el día 4 al 16. El método indirecto de medir la conductividad del medio de cultivo (Δ) cada dos días se realizó para conocer los cambios en la concentración de los iones con capacidad de acarrear electrones. En la curva se observa que a medida que la biomasa aumenta, la Δ disminuye siguiendo una tendencia inversa, lo cual resulta del consumo de electrolitos del medio de cultivo que hace que el potencial electrolítico (conductancia) disminuya junto con la Δ . Se observó que durante la fase exponencial el cambio fue más drástico, variando de 9.5 a 4.7 mS/cm, mientras que en la fase de muerte el cambio fue aumentando de 2.5 a 7.2 mS/cm.

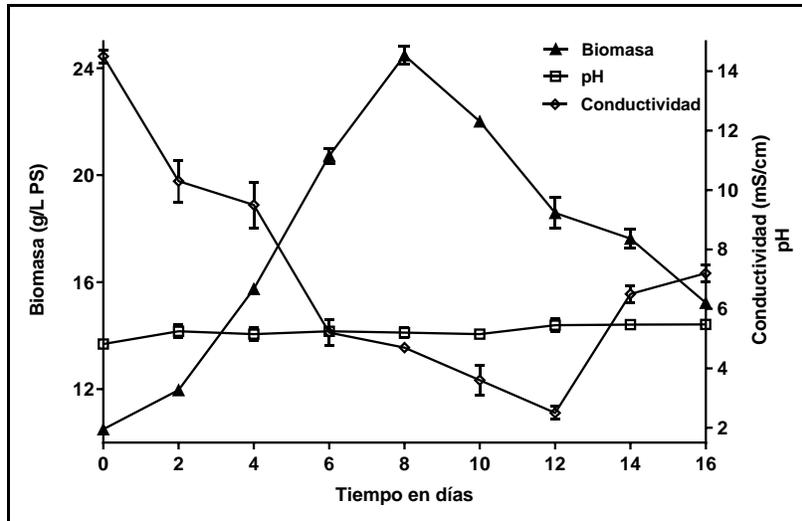


Figura 23. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto a la variación de pH y conductividad del medio en biorreactor airlift a 0.5 vvm

6.8.2 Estudio cinético del consumo de azúcares de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

En la Figura 24, se muestran la curva de biomasa y consumo de sacarosa, fructosa y glucosa respecto al tiempo en biorreactor 0.5 vvm. Se observó que la sacarosa fue hidrolizada completamente en el día 10, mientras que el consumo de la glucosa fue al día 8 y la fructosa se metabolizó lentamente hasta el final del cultivo.

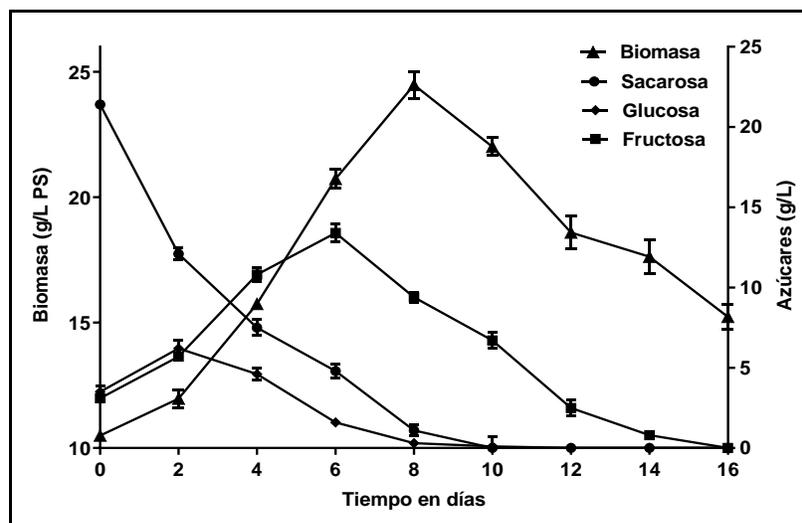


Figura 24. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto al consumo de azúcares en biorreactor airlift a 0.5vvm

6.8.3 Estudio cinético de la viabilidad celular de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

La Figura 25 muestra el porcentaje de células vivas respecto a la biomasa durante la cinética en biorreactor a 0.5 vvm. Se observó que el cultivo inicio con un 98% de células viables, y después se mantuvo estable durante la fase exponencial de 96 y 97% entre los días 4 y 8. A partir del día 12 comenzó a disminuir a 81% y al día 16 se observó que decae un hasta el 61%.

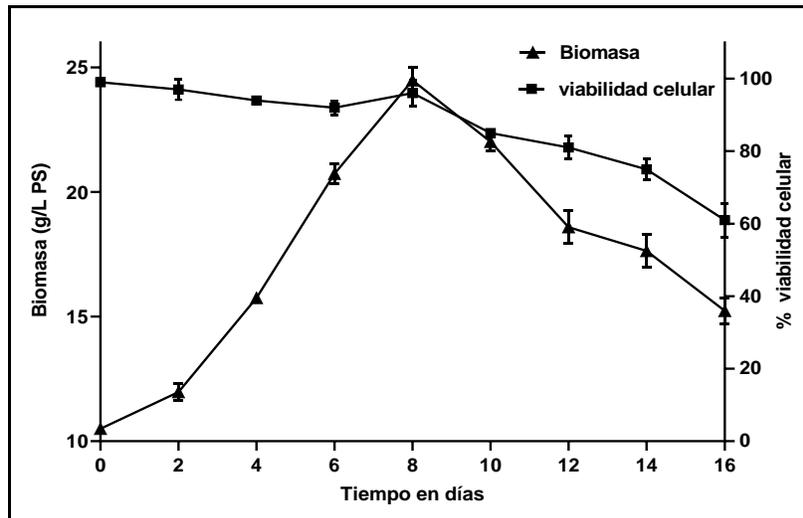


Figura 25. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto al porcentaje de viabilidad celular en biorreactor airlift a 0.5 vvm

6.8.4 Producción de la proteína LTB-Syn de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

En la Figura 26, se muestra la curva de crecimiento respecto a la producción de la proteína LTB-Syn en el biorreactor en 0.5 vvm. Se observó que la expresión de la proteína LTB-Syn inicio su producción del día 2 al 6 (2.17-3.14 $\mu\text{g/g PS}$) y decae al final de la fase de crecimiento exponencial, y posteriormente va incrementando en la fase estacionaria obteniendo una máxima producción de 3.5 $\mu\text{g LTB-Syn/g PS}$ al día 14, esto se traduce en un incremento de 1.23 veces con relación al matraz (2.83 $\mu\text{g/g PS}$) y 1.62 veces con relación al inicio del cultivo (2.17 $\mu\text{g/g PS}$).

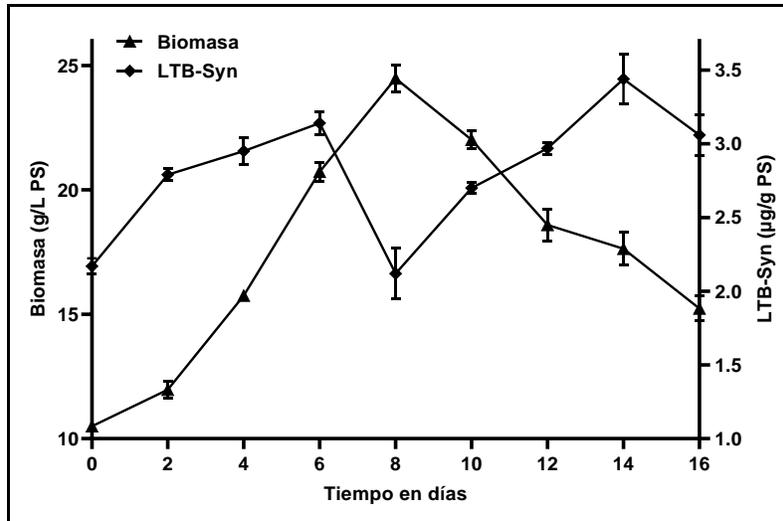


Figura 26. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto a producción de proteína LTB-Syn en biorreactor airlift a 0.5 vvm

6.9 Cinética de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor airlift a 1.5 vvm

La Figura 27, se muestra la curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor airlift con un flujo de aire de 1.5 vvm. Se observó que no existía una fase lag, inmediatamente el cultivo entro en una fase exponencial día 2 al 8 con una máxima producción de biomasa de 37 g/L PS al día 8, representando un incremento de 2.9 veces el tamaño del inóculo inicial (12.7 g/L PS), que después declinó el crecimiento y empezó la fase de estacionaria a partir del día 10. Se observo una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.111/días y tiempo de duplicación (t_d) de 6 días.

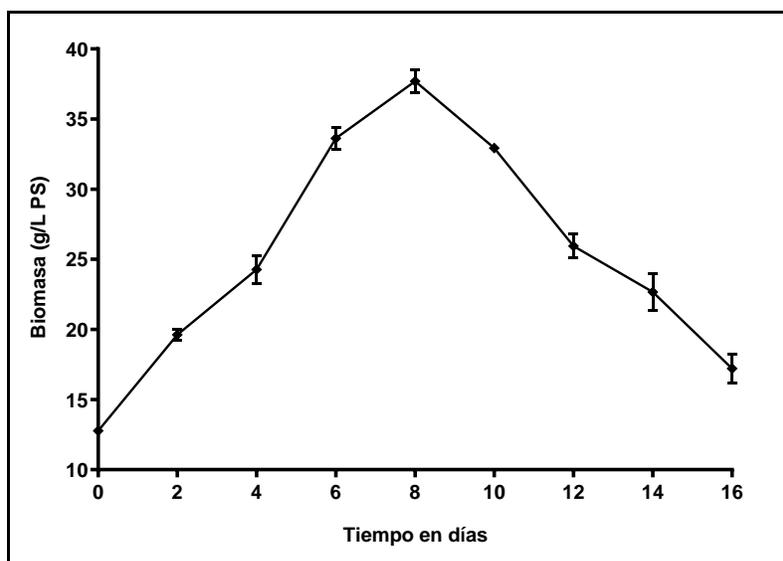


Figura 27. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 en el biorreactor airlift a 1.5 vvm por 16 días de cultivo

6.9.1 Estudio cinético de pH y conductividad de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

En la Figura 28, se muestran la curva de biomasa respecto a la variación de pH y conductividad del medio en el biorreactor a 1.5 vvm. Al inicio del cultivo se observó que el pH disminuyó en los primeros dos días hasta 4.89, y fue aumentando al día 4 para permanecer entre 5.3 y 5.7 desde el día 4 al 14. La conductividad (Δ) se apreció que al inicio del cultivo la Δ era de 12.8 mS/cm y durante la fase exponencial la Δ disminuyó siguiendo una tendencia inversa, se vio el cambio de 9.7 a 4.5 mS/cm, mientras que en la etapa final del cultivo la Δ aumento ligeramente de 6.5 a 7.4 mS/cm.

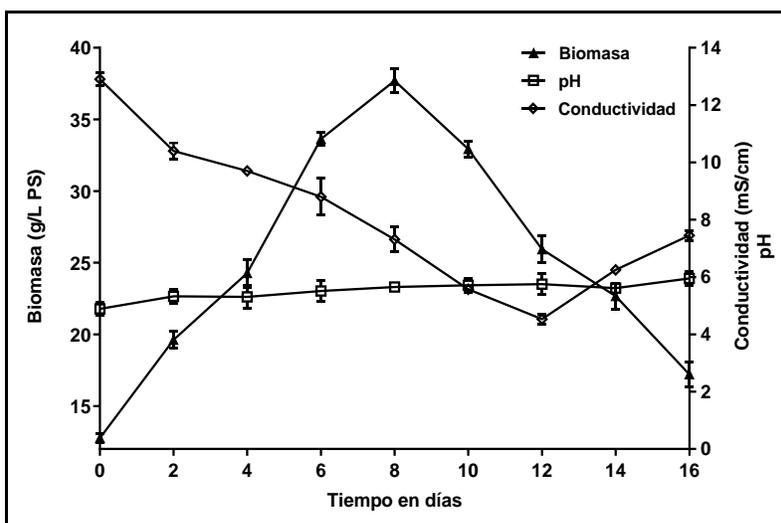


Figura 28. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto a variación de pH y conductividad del medio en biorreactor airlift a 1.5 vvm

6.9.2 Estudio cinético del consumo de azúcares de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

En la Figura 29, se muestran la curva de biomasa PS y consumo de sacarosa, fructosa y glucosa respecto al tiempo en biorreactor 1.5 vvm. La sacarosa fue hidrolizada completamente en el día 10, mientras que el consumo de la glucosa fue al día 10 y la fructosa se metabolizo lentamente hasta el día 14 del cultivo.

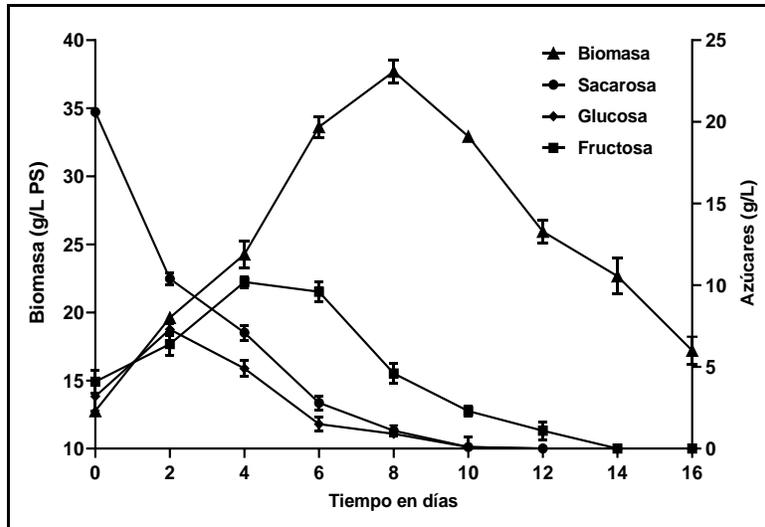


Figura 29. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto al consumo de azúcares en biorreactor airlift a 1.5 vvm

6.9.3 Estudio cinético de la viabilidad celular de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

La Figura 30 muestra el porcentaje de viabilidad respecto a la biomasa en biorreactor a 1.5 vvm. Se observó que el cultivo inició con un 99% de células viables, y después se mantuvo estable durante la fase exponencial de 97% entre los días 4 y 8. A partir del día 10 comenzó a disminuir a 85% y al día 16 se observó que decae hasta un 60% de viabilidad.

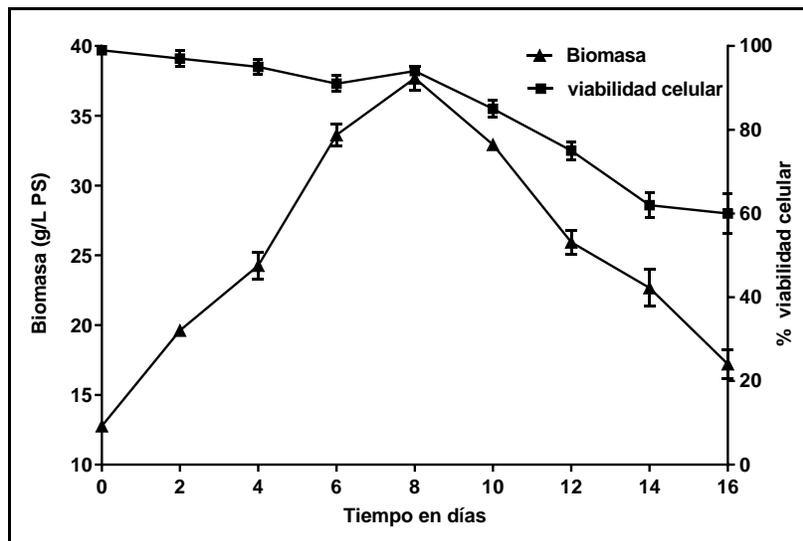


Figura 30. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto al porcentaje de viabilidad celular en biorreactor airlift a 1.5 vvm

6.9.4 Producción de la proteína LTB-Syn de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

En la Figura 31, se muestra la biomasa respecto a la producción de la proteína LTB-Syn en el biorreactor airlift a 1.5 vvm. Se observó que la producción de la proteína LTB-Syn inicia desde el día 2 con 3.37 $\mu\text{g/g}$ PS y decae en la fase de crecimiento exponencial hasta 2.9 $\mu\text{g/g}$ PS, y posteriormente va incrementando en la última etapa del cultivo celular, obteniendo una máxima producción de 4.2 $\mu\text{g/g}$ PS al día 14. Esto se traduce en un incremento de 1.23 veces con relación al biorreactor de 0.5 vvm (2.83 $\mu\text{g/g}$ PS) y 1.55 veces con relación a la producción inicial de la proteína (2.7 $\mu\text{g/g}$ PS) al día 0.

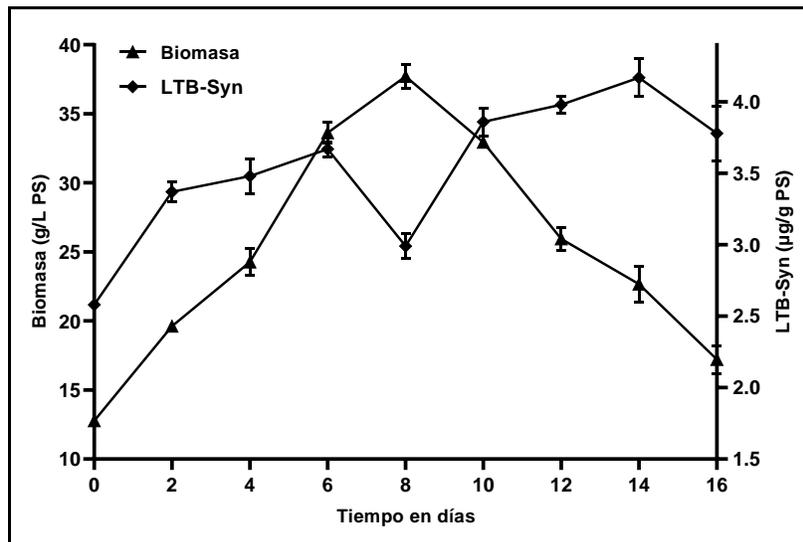


Figura 31. Curva de crecimiento de *D. carota* de la línea MSRZ4 respecto a producción de proteína LTB-Syn en biorreactor airlift a 1.5 vvm

6.9.5 Detección del transgén *LTB-syn* en *D. carota* por PCR en biorreactores a 0.5 y 1.5 vvm

Se extrajo el DNA de las muestras de *D. carota* de línea MSRZ4 durante la cinética de los biorreactores a 0.5 vvm y 1.5 vvm en los días 0 y al día 16 (inicio y final de la cinética), y se comprobó la presencia del transgén *LTB-syn* expresado en *D. carota* esperando amplicones de aproximadamente 737pb por PCR (Figura 32), mientras que el control negativo con el ADN de la línea WT no mostró amplificación (carril 3).

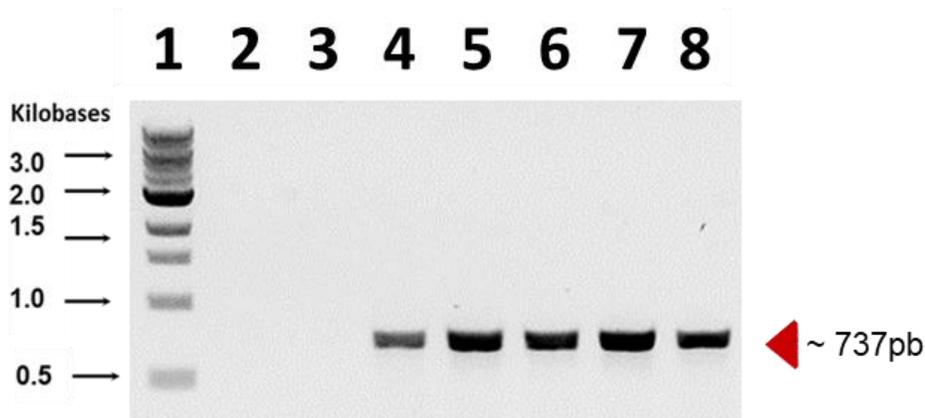
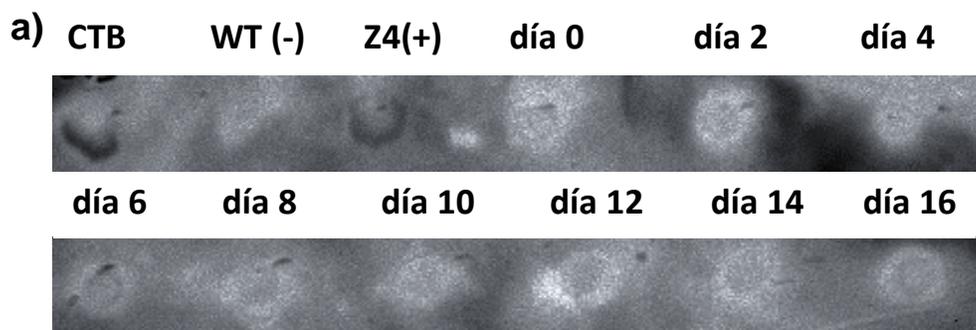


Figura 32. Detección del transgén LTB-Syn por PCR de *D. carota* de línea MSRZ4 en biorreactores. Carril: (1), marcador de ADN (1kb, New England Biolabs); (2), control negativo de reactivos; (3), línea no transformada WT; (4), control positivo Z4 (+); (5-6), muestras de biorreactor a 0.5 vvm al día 0 y 16; (7-8), muestras de biorreactor a 1.5 vvm al día 0 y 16.

6.9.6 Presencia de la proteína LTB-Syn de *D. carota* de la línea MSRZ4 por Dot-blot en biorreactor a 0.5 y 1.5 vvm

La presencia y la integridad de la proteína LTB-Syn expresada en *D. carota* se realizó mediante un Dot-blot de acuerdo con lo descrito previamente en la metodología. Este análisis se realizó a partir de extractos de proteína soluble total de las cinéticas en biorreactor a 0.5 vvm y 1.5 vvm en los diferentes días de crecimiento (día 0 al día 16). Los resultados que confirman la presencia de la proteína LTB-Syn en biorreactor a 0.5 vvm (Figura 33, a) y 1.5 vvm (Figura 33, b) con una reactividad positiva durante toda la cinética de forma similar al control positivo (Z4+), mientras que la línea no transformada (WT) no se observó reacción.



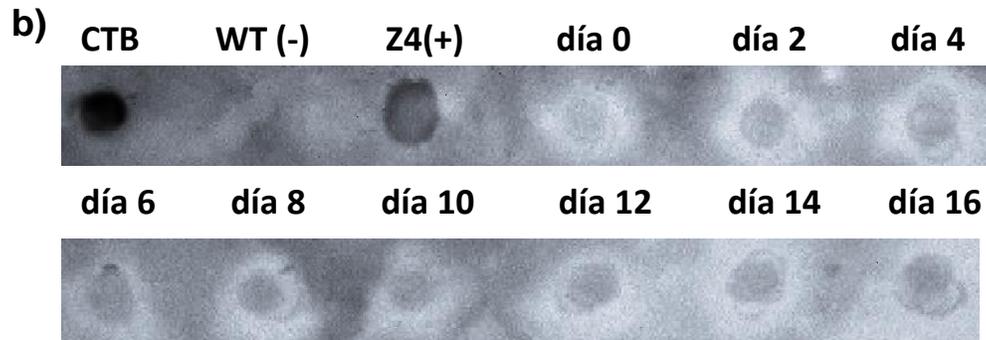


Figura 33. Presencia de la proteína LTB-Syn de la línea MSRZ4 por Dot-blot a partir de extractos de proteínas de biorreactor a 0.5 vvm (a) y 1.5 vvm (b). (CTB) control positivo 100 ng/ μ L; (WT) línea no transformada; (Z4) control positivo Z4(+); detección de la proteína LTB-Syn en los diferentes días de cultivo en biorreactor (día 0 al día 16).

6.9.7 Inmunogenicidad de la vacuna cLTB-Syn de *D. carota* de la línea MSRZ4

La inmunogenicidad de LTB-Syn se comprobó en ratones utilizando biomasa de *D. carota* de la línea celular MSRZ4 producida en el biorreactor de 1.5 vvm debido a su mayor contenido de antígeno durante la cinética de crecimiento. Los esquemas de inmunización fueron por vía oral (v.o) o subcutánea (s.c.) o dos inmunizaciones s.c. seguidas de un refuerzo oral.

Los niveles de anticuerpos de IgG contra los péptidos LTB y Syn revelaron respuestas humorales bajas el día 26, con un aumento notable el día 42 después del último refuerzo (Figura 34, a). La inmunización oral con la línea MSRZ4 (G3) condujo a importantes respuestas de IgG anti-LTB y anti-péptidos Syn, que son similares en magnitud a la respuesta inducida por el esquema s.c. inmunizados con péptidos Syn (Figura 34, b). Un refuerzo oral en ratones inmunizados s.c. con péptidos Syn no mejoró la respuesta sistémica de IgG. Este resultado se observó para las respuestas de IgG sérica e IgA intestinal a los epítomos LTB o Syn.

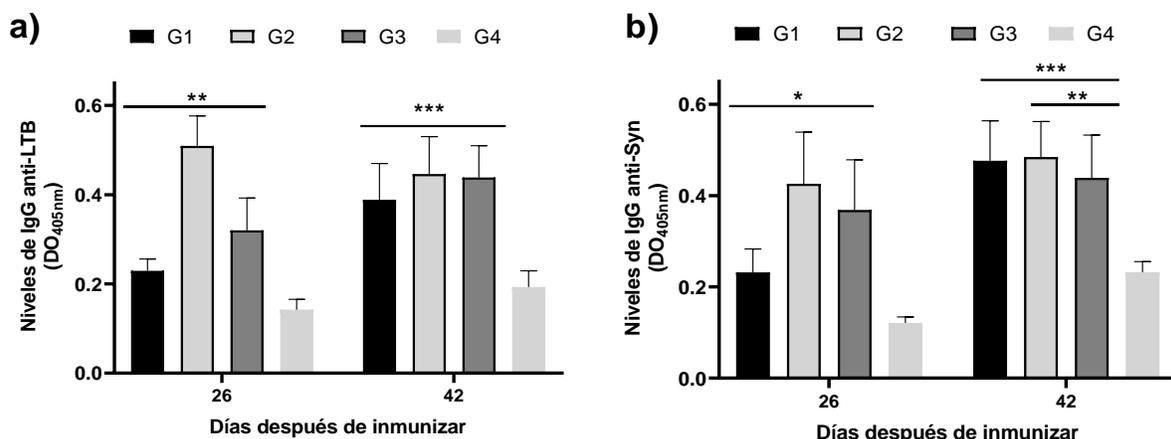


Figura 34. Evaluación de las respuestas humorales sistémicas de la vacuna cLTB-Syn en ratones BALB/c. Los niveles de anticuerpos anti-LTB (a) y anti-Syn (b), se determinaron mediante ELISA utilizando las dianas correspondientes (péptidos sintéticos LTB y Syn1-3). Los datos se expresan como la media y DE derivada de experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos denotan diferencia estadística entre los días respecto al grupo tratado con la línea WT (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

Con respecto a las respuestas humorales a nivel de mucosas, se detectaron niveles significativos de IgA anti-Syn al día 42 en heces de ratones sometidos a inmunización s.c. seguida de refuerzo oral con MSRZ4 (G1), mientras que el grupo inmunizado por vía oral con MSRZ4 (G3) no indujo una respuesta de IgA significativa (Figura 35). Ninguno de los grupos experimentales mostró respuestas significativas de IgG a nivel de la mucosa. En general, estos datos sugieren que el refuerzo oral después de la inmunización sistémica condujo a una mejor respuesta inmune de las mucosas.

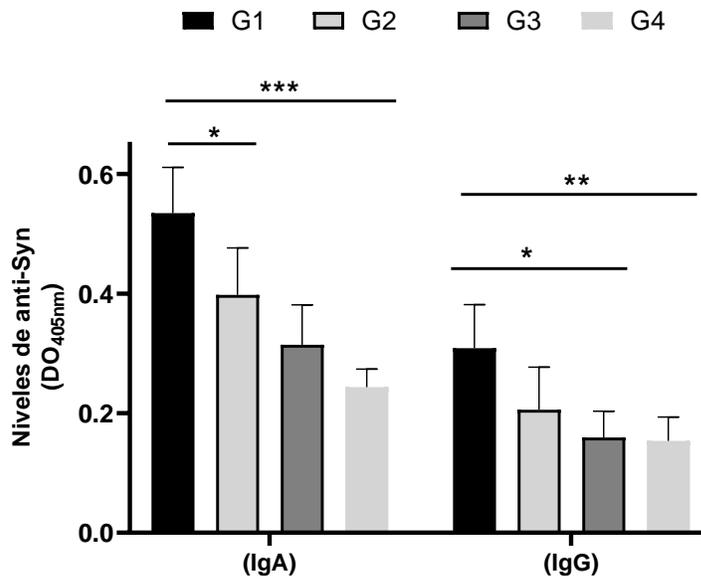


Figura 35. Evaluación de las respuestas humorales en mucosas de la vacuna cLTB-Syn en ratones BALB/c. Los niveles en las heces de anticuerpos inducidos (IgA, IgG), se determinaron mediante ELISA utilizando las dianas correspondientes utilizando los péptidos sintéticos Syn1-3 como blanco. Los datos se expresan como la media y DE derivada de experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos denotan diferencia estadística respecto al grupo tratado con la WT (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

VII) Discusión

7.1 Efecto del nitrógeno adicional en cultivo de callos de *D. carota* de la línea Z4

El nitrógeno juega un papel fundamental en el metabolismo de las células vegetales y está directamente relacionado con la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, por lo que se decidió explorar el efecto de urea y glutamato como fuentes adicionales de nitrógeno sobre los rendimientos de biomasa en los cultivos de callos. Se determinó que la máxima producción de biomasa en peso seco se logró con urea [17 mM] en los medios B5 (0,41 g PS) y MS (0,31 g PS). Esto podría deberse a que la urea proporciona una fuente de nitrógeno fácilmente disponible, lo que implica que es necesaria la formación de un esqueleto carbonado o la reducción del nitrato a amonio. Sin embargo, cuando algunos cultivos se crecen únicamente con urea, hay producción de algunos otros aminoácidos como glutamina y asparagina, los cuales pueden inhibir el crecimiento, debido a que estos aminoácidos limitan una mayor absorción y distribución de nitrógeno en la planta (Gerendás *et al.*, 1998). En contraste, con otros cultivos de células vegetales, incluidos los de trigo (Gamborg, 1970), tabaco (Filner, 1966) y sicomoro (Wilson, 1971) solo crecen con nitrato como única fuente de nitrógeno. Y en otros informes con cultivos de células de soja se reportó que solo crecen con nitrato en presencia de una fuente adicional de nitrógeno, como amonio o glutamina (Gamborg *et al.*, 1968). Heimer reportó que la treonina inhibió la adaptación de las células del tabaco con nitrato, pero que las células que se habían adaptado a la urea no eran inhibidas por la treonina ni por ningún otro aminoácido (Heimer y Filner, 1971).

El uso específico del glutamato (gtm) como fuente de nitrógeno se utilizó por su papel en la asimilación de nitrógeno inorgánico y por incorporar amonio al grupo amino de aminoácidos (Dougall, 1974). Sin embargo, se observó que los rendimientos de biomasa obtenida con los callos suplementados con gtm a 34 mM eran bajos en comparación con los medios con urea. Polacco (1976, 1977) informó que la adición de gtm a 15 mM en las células de soja inhibió completamente su crecimiento. Este fenómeno de inhibición sobre el crecimiento de callos cuando se adiciona nitrógeno orgánico como son los aminoácidos (alanina, asparagina, glicina, metionina, prolina, valina y ácido glutámico) pueden llegar a inhibir la actividad de la enzima nitrato reductasa; por lo tanto, la fuente de nitrógeno tiene particular importancia debido a que influye en el crecimiento y morfogénesis celular en los cultivos *in vitro*.

Los efectos inhibidores de los aminoácidos sobre las células vegetales podrían explicarse mediante al menos dos posibilidades. (a) los aminoácidos inhiben el crecimiento celular por un mecanismo de inhibición enzimática, o (b) el crecimiento y la asimilación de nitratos son inhibidos

como resultado del efecto secundario de los aminoácidos en un tercer sistema. Por lo tanto, parece probable que los aminoácidos orgánicos inhiban otras vías metabólicas y, como consecuencia se inhiba la absorción de nitrato y la enzima nitrato reductasa. Dado que las células que crecen con nitrato o urea se convierten en amonio, se sugiere que el punto de inhibición debe estar en uno o más pasos de asimilación de amonio, lo que conduce a la falta de nitrógeno y la inhibición de la absorción de nitrato y nitrato reductasa.

En este caso los datos confirman que una fuente adicional de nitrógeno no afectó el metabolismo y fue necesaria para una producción estable de biomasa en la línea Z4 de zanahoria. Además, que el gtm en los medios MS y B5 no fue eficiente como fuente de nitrógeno orgánico, teniendo un efecto de inhibición en el crecimiento de los cultivos de callos en comparación con los medios agregados con urea. Por otro lado, se observó una morfología de callos friable con una coloración entre verde-crema en todos los tratamientos. Se ha reportado que cuando existe suficiente nitrógeno se observa una mayor cantidad de clorofila con un color verde intenso, por otra parte, un déficit de nitrógeno se manifiesta por una clorosis o pérdida de clorofila y disminuye el crecimiento celular (Hakeem *et al.*, 2014).

7.2 Fase cribado por diseño Plackett-Burman (PB)

Con base en los resultados, se decidió explorar las condiciones óptimas y los parámetros para los cultivos de la línea celular Z4 de zanahoria con el fin de tener un impacto favorable en los rendimientos de la proteína LTB-Syn, que es una candidata para los tratamientos de las sinucleinopatías. Con el análisis de cribado del diseño factorial PB se logró comparar simultáneamente varios factores a la vez en poco tiempo. De acuerdo con el análisis PB, se generaron cuatro tratamientos con una mayor producción de biomasa que van de 17.8 hasta 18.9 g/L PF y tres tratamientos con una mayor producción de proteína LTB-Syn que van de 0.14 hasta 0.23 µg/g PF, como se describen en las tablas 14 y 16.

Se sabe que la tasa de crecimiento de los cultivos en suspensión de células vegetales depende de múltiples factores, incluida la composición del medio, el pH, la luz, el suministro de oxígeno, la velocidad del agitador, la temperatura, el tiempo de incubación y la densidad del inóculo (Bais *et al.*, 2012). Los medios de cultivo de células vegetales típicos, como el medio Murashige y Skoog (MS) o el medio Schenk y Gamborg (B5), contienen hasta 20 sales inorgánicas diferentes, así como nutrientes orgánicos y fitorreguladores de crecimiento vegetal (Gamborg, 1976). Existen pocos informes que describen el uso de diseños experimentales para optimizar múltiples parámetros físicos. Rasche y colaboradores (2016) investigaron y optimizaron el efecto combinatorio de la temperatura, el tiempo de incubación, la densidad del inóculo y la iluminación

sobre la producción de biomasa en cultivos de suspensión de células de pera. Se ha utilizado un diseño ortogonal experimental similar en células de tabaco para estudiar los parámetros físicos esenciales (efectos de la luz, frecuencia de agitación, tamaño del inóculo, volumen de medio, osmolalidad y la adición de medio acondicionado) que afectan la acumulación de biomasa (Vasilev *et al.*, 2014).

En resumen, estos resultados muestran que el diseño de componentes del medio y factores físicos es tan importante como el desarrollo de líneas celulares y vectores para aumentar la productividad de los procesos de cultivo de células vegetales. Por lo tanto, este enfoque de diseños experimentales proporciona una estrategia simple y eficiente para mejorar el rendimiento de los cultivos de células en suspensión de la línea MSRZ4 de *D. carota*.

7.3 Fase de optimización del medio de cultivo por MSR

El método convencional para la optimización del medio es el enfoque de "un factor a la vez", que varía un solo factor, mientras que los demás permanecen fijos (Wu *et al.*, 2007). Este método es laborioso y requiere mucho tiempo, por lo tanto, a menudo no se recomienda en la optimización (Vaidya *et al.*, 2009). Estas limitaciones en la optimización de un solo factor se pueden superar mediante el uso de métodos experimentales estadísticos como los diseños factoriales y la metodología de superficie de respuesta (MSR). En este trabajo durante la fase de optimización se reporta que para maximizar la producción de biomasa es de 19.2 g/L de la línea MSRZ4 de *D. carota* en medio MSR, las condiciones recomendadas eran significativamente influenciada por un de pH 5.0, con 3.2 g/L de urea y 10 g del inóculo.

Con el uso de MSR se ha logrado mejorar la producción de biomasa y proteína recombinante (M12) hasta 5 veces más en células transgénicas de tabaco BY-2 (Vasilev *et al.*, 2013) y hasta 1.4 veces la producción de β -carotenos en cultivos en suspensión de *D. carota* (Hanchinal *et al.*, 2008). Se han realizado diseños experimentales para optimizar el crecimiento y la productividad de cultivos de células de la palma aceitera para determinar condiciones favorables en términos de fuentes de nitrógeno, tamaño del inóculo y uso de medio acondicionado para mejorar la producción de biomasa (Gorret *et al.*, 2004). También se han utilizado combinaciones de diseño Plackett-Burman y diseños compuestos centrales (CCD) para determinar las concentraciones óptimas de componentes del medio importantes que mejoran la producción de biomasa y azadiractina en cultivos de raíces pilosas y células en suspensión de *Azadirachta indica* (Prakash y Srivastava, 2005; Srivastava y Srivastava, 2012). El nitrógeno tiene una influencia significativa en la productividad, se ha reportado que con un medio de cultivo optimizado con nitrógeno adicional (amonio) se aumentaron los rendimientos de la proteína modelo GFP entre 10 y 20

veces en cultivos en suspensión de tabaco (BY-2) en matraces (Ullisch *et al.*, 2012). Así mismo, se sabe que se pueden lograr aumentos de rendimiento adicionales mediante el uso del medio de cultivo optimizado en un proceso de escalamiento (Holland *et al.*, 2010). Estos efectos de diferentes fuentes de nitrógeno observados en cultivos en matraces agitados podrían transferirse con igual eficacia a la producción en biorreactores airlift y tanque agitado.

7.4 Validación del modelo predictivo

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta etapa, fue posible optimizar los constituyentes del medio de cultivo en suspensión de la línea MSRZ4 de *D. carota*. Se pudo observar que, si bien se obtuvo experimentalmente un valor de biomasa menor al estimado por el programa, este fue cercano y mayor al de cualquier tratamiento realizado inicialmente. Además, se considera adecuado debido al R^2 ajustado que tiene la ecuación de segundo grado en el análisis de superficie de respuesta. Utilizando diseños experimentales de MSR se logró validar el modelo predictivo que fue capaz de mejorar el rendimiento del cultivo MS y B5 con urea, con un incremento de 16g/L a 19 g/L. Este valor de biomasa obtenido experimentalmente es tres veces superior a los anteriores reportados para esta especie (Carreño-Campos *et al.*, 2022), donde solo se utilizó medio MS estándar sin nitrógeno adicional. En cuanto a la producción de la proteína LTB-syn en el cultivo optimizado MSR en tejido seco se pudo observar que se incrementó 2.2 veces respecto al tejido fresco. Con esto se comprobó que la proteína LTB-Syn era estable conservando su integridad y la conformación oligomérica nativa después de la liofilización, ya que este ensayo se basa en la unión específica de LTB pentámero a GM1. Por lo tanto, este es el primer reporte que describe la aplicación de diseños factoriales para optimizar un medio de cultivo usando células en suspensión de zanahoria para mejorar los rendimientos de un biofármaco. Estos resultados son similares a otros trabajos en la producción de proteínas recombinantes en cultivos de células en suspensión en arroz (Torres *et al.*, 1999), soya (Fisher *et al.*, 1999), tomate (Schouten *et al.*, 1996) y tabaco (Xu *et al.*, 2002).

7.5 Análisis de los parámetros cinéticos de *D. carota* de la línea MSRZ4 en matraz

Se realizó durante 24 días los estudios cinéticos en la producción de biomasa y proteína LTB-Syn en matraz con la línea MSRZ4 de *D. carota*. La máxima biomasa en peso seco fue de 17.9 g/L a los 15 días de cultivo, semejante a lo obtenido previamente con la misma especie por Carreño-Campos *et al.*, 2022 (16.9 g/L) y Morales-Aguilar *et al.*, 2023 (16.07 g/L) con un inóculo del 10% en todos los casos. Bajo las condiciones establecidas, se observó un tiempo de duplicación de 6 días ($\mu = 0.12/d$), es decir, dos días menos que en los cultivos en medio MS

estándar (Carreño-Campos *et al.*, 2022). Durante la cinética se observó que después del día 21 la biomasa decae lentamente debido a la cantidad de agua que las células vegetales almacenan, el cual puede ser hasta un 95% y por su heterogeneidad en la población celular, ya que durante el tiempo de cultivo van tomando diferente forma y tamaño, por ejemplo, las células jóvenes son pequeñas esféricas con gran número de vacuolas, mientras que las células viejas son ovaladas, alargadas y poseen una vacuola grande (Taticek *et al.*, 1991). Además, es importante mencionar que durante la cinética se observaron agregados de 2 hasta más de 300 células. Su tamaño varía respecto al método de subcultivo, las condiciones de crecimiento, el tiempo del cultivo, la edad del inóculo y la especie (Lee *et al.*, 2007). En las células jóvenes que se dividen rápidamente, los agregados pueden ser el resultado de algunas células que no se separan después de su división y los agregados de células viejas, normalmente se forman después de la fase exponencial de crecimiento, debido a la secreción de polisacáridos y proteínas, lo que causa que éstas se adhieran unas a otras (Toonen *et al.*, 1994). En los agregados grandes hay poca difusión de nutrientes y una deficiente transferencia de materia, particularmente del oxígeno, además de que causan algunos problemas en el mezclado de las suspensiones, ya que tienden a sedimentar y propician altas viscosidades en el medio de cultivo (Taticek *et al.*, 1991). Entre los factores que están relacionados con la diferenciación y crecimiento celular se encuentran la fuente de nitrógeno, especialmente las sales de amonio o urea, dando lugar a la formación de células esféricas y elongadas (Rashid, 1988).

El consumo de azúcares por las células en suspensión de *D. carota* se observó una preferencia por la glucosa, cuando se agotó, las células usaron a la fructosa como alternativa de fuente de carbono, este comportamiento es similar a lo reportado para otras especies como *Catharanthus roseus* (Kyoko *et al.*, 1989) y *Carica papaya* (Ortiz-Caltempa *et al.*, 2022). Se ha sugerido que la glucosa es preferentemente utilizada para la síntesis de almidón y celulosa, así como para la producción de CO₂ utilizado en la respiración de la célula. La fructosa preferentemente es utilizada para la síntesis de sacarosa, catalizada por la sucrosa sintasa, especialmente en la fase logarítmica de crecimiento (Kyoko *et al.*, 1989). Los resultados indican que el período de resiembra de las suspensiones puede ser de 14 días, antes del consumo total de la glucosa.

En la fase de optimización el modelo MSR estimó que el pH del medio debía ser 5.0, por lo que cuando el medio de cultivo se preparó se estableció un pH de 5.0. Después de su esterilización, el pH disminuyó a 4.6 y con este pH se inocularon los matraces para la cinética a nivel matraz. En estudios previos el pH del medio de cultivo después de la esterilización se ha reportado que existe una variación debido a las altas temperaturas, al tipo de autoclave, la concentración de los nutrientes minerales, la calidad del agua usada en el medio y la duración del proceso de

esterilizado (Skirvin *et al.*, 1986). El cambio de pH observado también está relacionado con la hidrólisis de la sacarosa en el medio, debido a que la disminución del pH acelera la hidrólisis de la sacarosa por la enzima invertasa que se encuentra unida a la pared celular y también es excretada al medio de cultivo (Amino y Tazawa, 1988). Por lo que la rápida hidrólisis de sacarosa observada durante la cinética de crecimiento está relacionada al cambio del pH (5 a 4.6) en los primeros 4 días, ya que en este tiempo se observa la caída de la sacarosa, lo que indica que probablemente la enzima invertasa funciona bajo estas condiciones de pH en la cinética. Este valor de pH al cual trabaja la enzima invertasa coincide con lo reportado para *D. carota* con un valor de 4.7 (Kanabus *et al.*, 1986), para células en suspensiones de arroz es de 4.0 (Amino y Tazawa, 1988), y para suspensiones de *Catharanthus roseus* el pH es de 4.2 (Kyoko *et al.*, 1989). El pH inicial del medio puede influir en la velocidad a la que las células tomen el nitrato y el amonio del medio de cultivo (Neto *et al.*, 1994). Por ejemplo, se sabe que la forma de utilizar la fuente de nitrógeno por las células interviene directamente en el cambio del pH, la cual depende de la concentración total de nitrógeno y de la proporción entre el amonio, (NH_4^+) y el nitrato (NO_3) (Suzuki y Nata, 1982). Cuando hay un intercambio de iones hidroxilo por iones nitrato, el medio tiende a ser más alcalino. Cuando los iones de amonio son absorbidos por la célula, hay un intercambio de protones, y como consecuencia el medio tiende a ser más ácido (Skirvin *et al.*, 1986). Además, en los medios de cultivo cuando se utilizan auxinas, el medio tiende a ser más ácido. Esto puede ser proporcional a la concentración de auxinas, principalmente de 2,4-D (Kurdjian *et al.*, 1982).

Hasta la fecha, la mayoría de los esfuerzos para mejorar producción de proteínas recombinantes en plantas se han centrado en desarrollar mejores promotores, se ha optimizado el uso de codones para su aplicación en plantas, se han identificado y eliminado secuencias de genes que desestabilizan el RNAm y se ha dirigido la proteína de interés a órganos específicos como el retículo endoplásmico (RE) utilizando péptidos señal como KDEL o HDEL (Hellwig *et al.*, 2004). En muchos casos, la acumulación de proteínas recombinantes aumentaba significativamente en uno o dos órdenes de magnitud utilizando esas técnicas. Sin embargo, las concentraciones máximas de proteínas de interés a menudo siguen siendo bajas, aproximadamente <1% PTS (Richter *et al.*, 2000). Los cultivos de células vegetales que expresan proteínas recombinantes tienen requisitos nutricionales y hormonales específicos que hasta ahora no ha habido un esfuerzo sistemático para establecer un medio de cultivo óptimo (Ullisch *et al.*, 2012). Por lo que, en este trabajo se diseñó un modelo estadístico experimental para explorar los componentes más importantes del medio MS en términos de macronutrientes, reguladores de crecimiento, luz y nitrógeno adicional. El objetivo principal fue incrementar la producción de proteína LTB-Syn

optimizando el medio de cultivo con las cantidades y proporciones adecuadas de nutrientes esenciales. Durante el análisis con diseños factoriales se encontró que la adición de urea (17mM) mejora la acumulación de la proteína LTB-Syn respecto al medio MS estándar. Se observó que la producción de la proteína LTB-Syn es continua durante todo el tiempo de cultivo cinético (desde día 6 al 24), obteniéndose un rendimiento ($Y_{P/X}$) máximo de 0.18 $\mu\text{g/g}$ PS a los 15 días. En este caso los rendimientos de proteína LTB-Syn obtenidos, son 6 veces más a los obtenidos anteriormente con el medio MS estándar (Carreño-Campos *et al.*, 2022). Reportes anteriores han considerado la optimización de la producción de anticuerpos utilizando diseños estadísticos, pero han sido en sistemas microbianos (*Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*) o células de mamíferos (ovario de hámster chino) (Parque *et al.*, 2006; David *et al.*, 2011; González-Leal *et al.*, 2011). Otros trabajos también han mejorado la expresión de anticuerpos en cultivos en suspensión de células de tabaco (Vasilev *et al.*, 2013), la expresión transitoria en hojas de tabaco (Buyel y Fisher, 2012) y la expresión estable en raíces pilosas de tabaco (Häkkinen *et al.*, 2014). Por otra parte, con los análisis moleculares se confirmó por PCR que la línea MSRZ4 de zanahoria expresan el gen LTB-Syn al inicio y al final de la cinética en matraz (día 0 y día 24). Así mismo, la presencia de la proteína LTB-Syn en los extractos solubles de la cinética en matraz se corroboró por Dot-blot.

7.6 Análisis de los parámetros cinéticos de *D. carota* de la línea MSRZ4 en biorreactor

Se evaluó experimentalmente durante 16 días el efecto que tienen la transferencia de OD (k_{LA} en función de los vvm) al medio de cultivo MSR sobre el crecimiento celular y producción de la proteína LTB-Syn en un biorreactor airlift de 2L con dos flujos de aireación y un volumen de trabajo de 1.6 L a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y luz constante. El análisis de la cinética mostró que la biomasa en ambos biorreactores no presentaba una fase lag de adaptación, esto puede deberse al estado fisiológico del inóculo pues se encontraba en fase de crecimiento exponencial o por el tamaño del inóculo. Por ejemplo, Lee y colaboradores en 2007 demostraron que diferentes tamaños de inóculo (20-120 g) tenían una influencia significativa en el perfil de crecimiento de las células de *Gymnema sylvestre*. Posteriormente, se observó un crecimiento exponencial que continúa hasta el día 10 en ambos sistemas (9 días de crecimiento exponencial), este comportamiento es similar a lo reportado en otras especies como *Catharanthus roseus* (Kyoko *et al.*, 1989) y *Carica papaya* (Ortiz-Caltempa *et al.*, 2022). La fase estacionaria del cultivo fue muy corta o casi inexistente en ambos casos, ya que a partir del día 10 de cultivo comenzó a declinar por limitación de nutrientes hasta muerte celular, probablemente debido a que, al alcanzar el número máximo de células, se produce una lisis y muerte de las células a consecuencia de la falta de nutrientes en el medio de

cultivo (Caballero y Cardona, 2007). La etapa de muerte en las suspensiones celulares se presenta a menudo por la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), como consecuencia del metabolismo celular. Los ROS provocan estrés oxidativo en las células y activan las enzimas oxidasas. En algunos casos, las células liberan fenoles al medio de cultivo y estos provocan un efecto tóxico, que evita la proliferación y si no son retirados del medio causan la muerte celular (Trejo-Tapia *et al.*, 2007). Esto es una consecuencia de la concentración de biomasa y la morfología celular, lo que provoca cambios en las características del medio de cultivo y afecta las propiedades hidrodinámicas del biorreactor, incluidos los rendimientos de mezcla y transferencia de masa (Sinha *et al.*, 2001).

El comportamiento del pH en el transcurso de las cinéticas en biorreactor no se ve afectado para los niveles de aireación y agitación evaluados, manteniendo un comportamiento similar en ambos casos. Por ejemplo, se sabe que la forma de utilizar la fuente de nitrógeno por las células interviene directamente en el cambio del pH, la cual depende de la concentración total de nitrógeno y de la proporción entre el amonio, (NH_4^+) y el nitrato (NO_3^-) (Neto *et al.*, 1994). La toma de cationes y aniones altera el pH del medio. La reducción del nitrato a amonio es la mayor fuente de iones hidroxilo. Cuando hay un intercambio de iones hidroxilo por iones nitrato, el medio tiende a ser más alcalino. Cuando los iones de amonio son absorbidos por la célula, hay un intercambio de protones, y como consecuencia el medio tiende a ser más ácido (Skirvin *et al.*, 1986). El consumo de carbohidratos en los dos modos de operación del biorreactor se observó un comportamiento muy similar, la sacarosa se hidrolizaba completamente al día 10, junto con el aumento simultáneo de glucosa y fructosa. El patrón en el consumo preferencial de glucosa con respecto a la fructosa es similar a lo ya reportado en biorreactor para esta especie (Carreño-Campos *et al.*, 2022). Durante la fase lag y exponencial en ambos biorreactores se observó la mayor presencia de células fluorescentes vivas (98-99%), debido a su actividad enzimática interna (esterasas citoplasmáticas) capaces de hidrolizar el DFA para originar fluoresceína (Maestú *et al.*, 2008). Sin embargo, también fue posible visualizar la formación de agregados celulares, y conforme avanzan los días los agregados comenzaron a formarse más grandes. La formación de agregados celulares es muy característica de las células vegetales en condiciones de estrés de corte, lo que conlleva a que las células, al dividirse, no se separen adecuadamente o bien se asocian posteriormente (Mustafa *et al.*, 2011).

Los resultados muestran que la biomasa es dependiente del parámetro de transferencia de OD (k_{La} en función de velocidades de aireación), en los ensayos realizados la mayor producción de biomasa se alcanzó con un flujo de 1.5 vvm y un k_{La} de 25.5 h^{-1} . El aumento de la concentración de biomasa debido al incremento en los niveles de aireación, indica que efectivamente al mejorar

las condiciones de oxigenación se incrementa la productividad del cultivo. Estas variaciones significativas muestran la importancia del proceso de mezclado sobre el crecimiento de células de *D. carota* en biorreactores agitados neumáticamente. En cuanto a la producción de proteína con el flujo de aire de 1.5 vvm se observó que la proteína LTB-Syn intracelular entre el día 8 y 16 ($\pm 2 \mu\text{g/g PS}$) fue aumentando su producción en la fase estacionaria y de muerte celular. La razón de estas diferencias no es clara, pero una posible explicación a la caída de producción puede radicar en los cambios en la composición gaseosa del medio por el arrastre de moléculas gaseosas (CO_2 , etileno y compuestos volátiles) a mayores velocidades de aireación, que están implicados en el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios (Jeong *et al.*, 2006). Por otro lado, en los bioprocesos aeróbicos, el oxígeno es un sustrato clave empleado para el crecimiento, el mantenimiento y en otras rutas metabólicas, por lo tanto, el OD durante los días 8 y 10 (fase exponencial) pudo haber sido limitante para la producción de LTB-Syn donde los niveles de síntesis enzimática están comprometidos. Se ha reportado que la aireación es un factor crítico en el escalamiento de los procesos aeróbicos, ya que el crecimiento y la producción pueden verse limitados por la concentración de OD (Amarel *et al.*, 2008). La mayor producción de LTB-Syn obtenida en el cultivo de biorreactor a 1.5 vvm fue de $4.2 \mu\text{g/g PS}$, valor que supera la producción obtenida en matraz ($0.92 \mu\text{g/g PF}$) y biorreactor a 1.0 vvm ($1.5 \mu\text{g/g PS}$) en estudios realizados previamente con esta especie (Carreño-Campos *et al.*, 2022). Conjuntamente, el $Y_{X/S}$ fue 1.75 mayor, el $Y_{P/X}$ fue 0.5 mayor y el q_p fue 1.2 veces en comparación con el matraz. Asimismo, la expresión de LTB-Syn fue mayor desde el día 6 en el biorreactor, lo que representa 9 días menos que los datos obtenidos previamente en matraz de agitación y biorreactor con medio MS estándar. Por lo tanto, se demostró que la expresión de LTB-Syn en biorreactor airlift es conveniente para su producción en un período de tiempo corto y a mayor escala, se puede mejorar aún más, mediante el empleo de estrategias avanzadas de operación, como el cultivo por lotes alimentados, el cultivo de perfusión o el cultivo semicontinuo. Observaciones similares se han reportado para la producción de la miraculina recombinante en cultivos de células de zanahoria utilizando un biorreactor airlift (Park *et al.*, 2020).

Al comparar estos resultados con los disponibles en la literatura en los cuales se han reportado con éxito la producción de proteínas farmacéuticas funcionales en cultivos de suspensión de células de arroz en biorreactor de 2 L, por ejemplo, la producción de $24,6 \text{ mg/L}$ del mGM-CSF fusionado con el péptido señal αAmy3 . Otros ejemplos en células de arroz incluyen la producción de $100\text{-}247 \text{ mg/L}$ de alfa-1-antitripsina recombinante (McDonald *et al.*, 2005), 57 mg/L de la hormona de crecimiento humana (Kim *et al.*, 2008) y $699,79 \text{ ng/g}$ de proteína interferón-gamma intracelular (IFN- γ) (Chen *et al.*, 2004). Con el progreso en la biología molecular y técnicas en los

cultivos de células vegetales se pueden utilizar de manera eficiente para producir grandes cantidades de proteínas terapéuticas a la par de las plataformas bacterianas y de mamíferos a bajo costo.

7.7 Inmunogenicidad de la vacuna cLTB-Syn en ratones

En este trabajo se usaron diferentes esquemas de inmunización en los que se seleccionó la ruta de administración como la variable principal para determinar si la inmunización de mucosas es un enfoque factible para optimizar la respuesta inmune inducida por cLTB-Syn. Se demostró que el refuerzo oral con cLTB-Syn bioencapsulado en células de zanahoria es tan efectivo como el refuerzo s.c. a base de péptidos sintéticos, también funciona como un fuerte adyuvante. Además, el refuerzo oral utilizando cLTB-Syn sin adyuvante indujo un aumento en las respuestas sistémicas (IgG) e intestinales (IgA) en ratones previamente inmunizados por vía s.c. con los péptidos Syn1-3 en comparación con los grupos tratados con células de zanahoria WT. Esto confirmó que la inmunogenicidad oral de cLTB-Syn fue entregado correctamente al tejido linfoide asociado con el intestino (GALT, por sus siglas en inglés) por las células de zanahoria independientemente de la presencia de adyuvantes exógenos. Con base en estos resultados, es posible que los adyuvantes no sean necesarios para que las formulaciones de vacunas orales de plantas inicien una respuesta inmunitaria, mientras que las vacunas inyectables suelen ser necesarias para fortalecer la respuesta inmunitaria. Resultados similares se han reportado con el antígeno HBsAg expresado en cultivos de maíz como candidata a vacuna oral contra el VHB. HBsAg mostró la capacidad de inducir respuestas de IgG en ausencia de adyuvantes, y también respuestas de IgA intestinal detectadas en las heces de ratones (Hayden *et al.*, 2012).

Por otro lado, en este estudio se observaron niveles más altos de IgA en ratones inmunizados por vía s.c. y reforzados por vía oral; lo que sugiere que cLTB-Syn expresado por zanahoria activó el GALT, lo que puede contribuir a lograr un perfil inmunológico óptimo, es decir, protección tanto a nivel sistémico como mucoso. Además, considerando las recientes evidencias sobre que la EP puede surgir en el intestino (debido a que los agregados de α -Syn progresan a través del nervio vago hasta el cerebro de forma similar a un prion) (Lionnet *et al.*, 2018), las vacunas orales dirigidas a bloquear o prevenir la propagación de agregados α -Syn en estos sitios son un enfoque con alto potencial para combatir la EP y otras sinucleinopatías. Hasta ahora, otros enfoques se han centrado en este aspecto, como la modulación de la microbiota intestinal (Yang *et al.*, 2020), el uso de probióticos y prebióticos (Barichella *et al.*, 2016) y, últimamente, el empleo de la infusión de gel intestinal de levodopa-carbidopa (Lubomski *et al.*, 2022). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la parte más costosa en la producción de productos biofarmacéuticos es el procesamiento

posterior “*downstream*” (Wilken y Nikolov, 2012), la presente vacuna cLTB-Syn en forma oral a base de zanahoria con un procesamiento mínimo para su formulación se perfila como una candidata prometedora y accesible, ya que tiene la capacidad de inducir respuestas inmunes tanto sistémicas como en mucosas, para una respuesta integral de protección contra la aparición y tratamiento de sinucleinopatías.

VIII) Conclusiones

- ❖ Se logró obtener un mayor crecimiento celular de callos de *D. carota* (línea Z4) en los medios de cultivo B5 (0.41 g PS) y MS (0.31 g PS) suplementados con 17mM de urea.
- ❖ Se establecieron *in silico* y experimentalmente las condiciones óptimas de crecimiento celular de *D. carota* (línea MSRZ4) en medio de cultivo (MSR) con un inóculo del 10%, urea a 17mM y un pH 5.0,
- ❖ Los cultivos de suspensiones de *D. carota* (línea MSRZ4) se incrementó 4.5 veces más la producción de cLTB-Syn a nivel matraz en 15 días y se logró incrementar hasta 9 veces más la productividad de cLTB-Syn en biorreactor airlift (1.5 vvm) en 6 días.
- ❖ Se demostró la presencia del transgén LTB-Syn por PCR y la expresión de la proteína LTB-Syn por ELISA y Dot-blot, destacando que los sistemas utilizados son eficientes para mantener la producción de cLTB-Syn con interés farmacéutico.
- ❖ Se confirmó que cLTB-Syn es capaz de inducir respuestas inmunes sistémica y de mucosas cuando se administra por vía oral en ratones con la biomasa de línea MSRZ4 de *D. carota*. El potencial de cLTB-Syn en estos sistemas de cultivo puede ser considerada como una vacuna experimental importante.

IX) Perspectivas

- Con las condiciones obtenidas del cultivo se recomienda el escalamiento ascendente a un volumen de 10 L en biorreactor airlift.
- Se recomienda establecer la capacidad *D. carota* en la protección de cLTB-syn en un ambiente de líquido gástrico simulado a diferentes valores de pH y temperatura.
- Se recomienda evaluar a cLTB-Syn en un modelo animal con Parkinson y determinar su seguridad y eficacia contra las sinucleinopatías en ensayos clínicos en humanos.

X) Referencias

- Aanchal N, Akhtar K, Dinesh G, Arun G (2016). Response surface methodology for optimization of microbial cellulase production. *Rom Biotechnol Lett.* 21(5):11832–11841.
- Abusleme L, Moutsopoulos NM (2017). IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Dis* 23(7):854–865.
- AFFiRiS. AFFiRiS announces top line results of first-in-human clinical study using AFFITOPEVR PD03A, confirming immunogenicity and safety profile in Parkinson's disease patients. <http://www.affiris.com/news/affiris-announces-top-line-results-of-first-in-human-clinical-study-using-affitope/>. Revisado en Feb 1, 2024.
- Alimova-Kost MV, Ninkina NN, Imreh S, Gnuchev NV, Adu J, Davies AM, Buchman VL (1999) Genomic structure and chromosomal localization of the mouse *persyn* gene. *Genomics* 56:224–227.
- Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP. (2008). Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 255: 18-32.
- Amino S, Tazawa M. (1988) Uptake and Utilization of Sugar in Cultured Rice Cells. *Plant Cell Physiol*, 29 (3), 483-487.
- Arévalo-Villalobos JI, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S (2020). Using carrot cells as biofactories and oral delivery vehicles of LTB-Syn: A low-cost vaccine candidate against synucleinopathies. *J Biotechnol.* 309, 75–80.
- Arévalo-Villalobos JI, Rosales-Mendoza S, Govea-Alonso DO, Monreal-Escalante E, Zarazúa S (2017). LTB-Syn: a recombinant immunogen for the development of plant-made vaccines against synucleinopathies. *Planta* 245(6):1231–1239.
- Barichella M, Pacchetti C, Bolliri C, Cassani E, Iorio L, Pusani C, Pinelli, G. Privitera, G. Cesari, I. Faierman, SA. Caccialanza, R. Pezzoli, G. Cereda, E. (2016). Probiotics and prebiotic fiber for constipation associated with Parkinson disease: An RCT. *Neurology.* 87(12):1274-1280.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24:308–318.
- BioArctic. BioArctic enters into collaboration with AbbVie for Parkinson's disease research. <https://www.bioarctic.se/en/bioarctic-enters-into-collaboration-with-abbvie-for-parkinsons-disease-research-2815/>. Revisado en Feb 1, 2024.
- Bolaños-Martínez, OC. Govea-Alonso, DO. Fragoso, G. Sciutto E. Rosales-Mendoza, S. (2022). Carrot cells expressing the VP1 and VP2 poliovirus proteins effectively elicited mucosal immunity. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 148, 545–556. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02205-0>
- Briefs AMCT (2013). Experimental design and optimization: Plackett-Burman designs. *Analytical Methods* 5(8):1901–1903.
- Brundin P, Dave KD, Kordower JH. (2017). Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology. *Exp Neurol.* 298 (Pt B): 225-235.

- Buyel JF, Fischer R. (2012). Predictive models for transient protein expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) can optimize process time, yield, and downstream costs. *Biotechnol Bioeng.* 109:2575-2588.
- Carreño-Campos C, Arévalo-Villalobos JI, Villarreal ML, Ortiz-Caltempa A, Rosales-Mendoza S (2022). Establishment of the Carrot-Made LTB-Syn Antigen Cell Line in Shake Flask and Airlift Bioreactor Cultures. *Planta Med.* 88(12):1060-1068.
- Cents, AG. Brillman, DF. Versteeg, GF. (2001). Gas absorption in an agitated gas-liquid-liquid system. *Chem Eng Sci* 56: 1075–1083.
- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002b) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res* 11:479–493
- Chong, DK. Roberts, W. Arakawa, T. Illes, K. Bagi, G. Slattery, CW. Langridge, WH. (1997). Expression of the human milk protein β -casein in transgenic potato plants. *Transgenic Res.* 6, 289–296.
- Clayton, DF. George, JM. (1999a). Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* 58, 120–129.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early onset Parkinson disease. *Nat Med* 4:1318–1320.
- Czerkinsky, C. Holmgren, J. (2012). Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. *Current topics in microbiology and immunology*, 354, 1–18. https://doi.org/10.1007/82_2010_112
- Czyz, M. Dembczyński, R. Marecik, R. Wojas-Turek, J. Milczarek, M. Pajtasz-Piasecka, E. Wietrzyk, J. Pniewski, T. (2014). Freeze-drying of plant tissue containing HBV surface antigen for the oral vaccine against hepatitis B. *BioMed. Res. Int.* 485689
- Daniell, H. Streatfield, SJ. Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines on plants. *Trends Plant Sci* 6: 219–226.
- Deineko EV, Zagorskaya AA, Pozdnyakov SG, Filipenko EA, Permyakova NV, Sidorchuk YV, Uvarova EA, Pozdnyakova LD, Shumny VK, Vlasov VV, Hammond RV, Shchelkunov SN (2009). Comparative analysis of HBV M-antigen production in leaves of individual transgenic carrot plants. *Dokl Biochem Biophys.* 425, 76–79.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19–21.
- Dong, JL. Liang, BG. Jin, YS. Zhang, WJ. Wang, T. (2005). Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 339, 153–163. doi: 10.1016/j.virol.2005.06.004
- Doran PM (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. ACRIBIA, S.A. Cap. 9. pp. 208–212.
- Doran PM. (1999). Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors. *Biotechnol Prog.* 15, 319–335.

- Doran PM. (2000). Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol.* 11, 199–204.
- Dougall DK. (1974). Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 58(3): 639–646.
- Eibl R, Eibl D. (2006). Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture. *Plant Tissue Culture Engineering*, SD Gupta and Y. Ibaraki, eds (Dordrecht: Springer), 203–227.
- Eibl R, Eibl D. (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochem Rev.* 7:593–598.
- Eibl, R. Kaiser, S. Lombriser, R. Eibl, D. (2010). Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:41–49.
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R. Browne, G. (2001). Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* 307, 1061–1073.
- Filner, P. (1966). Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim Biophys Acta.* 118: 299–310.
- Forno, LS. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 259–272.
- Gallichan WS. Woolstencroft RN. Guarasci T. McCluskie MJ. Davis HL. Rosenthal KL. (2001). Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol.* 166:3451–3457.
- Galvin JE, Schuck TM, Lee VM, Trojanowski JQ (2001) Differential expression and distribution of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the developing human substantia nigra. *Exp Neurol* 168:347–355
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50, 151–158.
- Gamborg, OL. (1970). The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 45: 372–375.
- Gamborg, OL. Murashige, T. Thorpe, TA. Vasil, IK. (1976). Plant tissue culture media. *In Vitro* 12, 473–478.
- Games, D. Seubert, P. Rockenstein, E. Patrick, C. Trejo, M. Ubhi, K. Etle, B. Ghassemiam, M. Barbour, R. Schenk, D. Nuber, S. Masliah, E. (2013). Axonopathy in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease is associated with extensive accumulation of C-terminal-truncated alpha-synuclein. *Am J Pathol.* 182(3):940-953.
- García-Ochoa, F, Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv,* 27(2), 153-176.
- George S, Brundin, P. (2017). Solving the conundrum of insoluble protein aggregates. *Lancet Neurol.* 16(4):258-259.
- Gerendás J, Zhu Z, Sattelmacher B. (1998). Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot.* 49(326):1545–1554.

- Giasson, BI. Duda, JE. Murray, IV. Chen, Q. Souza, JM. Hurtig, HI. Ischiropoulos, H. Trojanowski, JQ. Lee, VM. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290(5493), 985-989.
- Goedert, M. (2001). α -Synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2:492–501.
- Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye L (2010). Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol J.* 8, 564–587.
- Gorret N, bin Rosli AK, Oppenheim SF, Willis LB, Lessard PA, Rha CK, Sinskey AJ. (2004) Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *J. Biotech.* 108, 253–263.
- Grabowski GA, Golembo M, Shaaltiel Y. (2014). Tailglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab.* 112, 1–8.
- Guda C, Lee SB, Daniell H. (2000). Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in stable tobacco chloroplasts. *Plant Cell Reps.* 19, 257–262.
- Guiso, N. (2009). *Bordetella pertussis* and *pertussis* vaccines. *Clinical Infectious Diseases*, 49(10), 1565–1569.
- Häkkinen ST, Raven N, Henquet M, Laukkanen ML, Anderlei T, Pitkänen JP, Twyman RM, Bosch D, Oksman-Caldentey KM, Schillberg S, Ritala A. (2014). Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnol Bioeng.* 111:336-346.
- Hanchinal VM, Survase SA, Sawant SK, Annapure US. (2008). Response surface methodology in media optimization for production of β -carotene from *Daucus carota*. *PTOC*, 93(2), 123–132.
- Hashimoto, M. Yoshimoto, M. Sisk, A. Hsu, LJ. Sundsmo, M. Kittel, A. Saitoh, T. Miller, A. Masliah, E. (1997). NACP, a synaptic protein involved in Alzheimer's disease, is differentially regulated during megakaryocyte differentiation, *Biochem Biophys Res Commun.* 237(3):611–616.
- Hauser, RA. (2009). Levodopa: past, present and future. *Eur Neurol.* 62: 1-8.
- Hayden CA, Egelkrout EM, Moscoso AM, Enrique C, Keener TK, Jimenez-Flores R, Wong JC, Howard JA. (2012). Production of highly concentrated, heat-stable hepatitis B surface antigen in maize. *Plant Biotechnol J.* 10(8):979-984.
- Heimer YM, Filner, P. (1971). Regulation of nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. *Biochim Biophys Acta.* 230: 362–372.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol.* 22:1415–1422.
- Hollak, CE. (2012). An evidence-based review of the potential benefits of taliglucerase alfa in the treatment of patients with Gaucher disease. *Core Evid.* 7, 15–20.
- Holland T, Sack M, Rademacher T, Schmale K, Altmann F, Stadlmann J, Fischer R, Hellwig S. (2010). Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. *Biotechnol Bioeng.* 107(2), pp. 278–289.

- Huang J, Wu L, Yalda D, Adkins Y, Kelleher SL, Crane M, Lonnerdal B, Rodriguez RL, Huang N. (2002). Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture. *Transgenic Res.* 11, 229–239.
- Huang TK, McDonald, KA. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem Eng J.* 45:168–84.
- Huang TK, McDonald, KA. (2012). Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnol Adv.* 30, 398–409.
- Illum, L. (2006). Nasal clearance in health and disease. *J Aerosol Med* 19:92–99
- Iwata, S. Miura, I. Kanazawa, M. Sawada, N. Nukina, (2001). alpha-Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1, *J Neurochem.* 77, 239–252.
- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 345:27–32.
- James, EA. Wang, C. Wang, Z. Reeves, R. Shin, JH. Magnuson, NS. Lee, JM. (2000). Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein expression and purification*, 19(1), 131–138. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1232>
- Jellinger, KA. (2003). Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord.* 18 Suppl 6:S2–S12.
- Jenco, JM. Rawlingson, A. Daniels, B. Morris, AJ. (1998). Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by α - and β -synuclein. *Biochemistry* 37, 4901–4909 (1998).
- Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm BB, Chen JF. Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Rel Disord.* 2009; 15(6): 406-13.
- Jiang XL. He ZM. Peng ZQ. Qi Y. Chen Q. Yu SY. (2007). Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Res.* 16, 169–175
- Jo, E. McLaurin, J. Yip, CM. St George-Hyslop, P. Fraser, PE. (2000). alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *J. Biol. Chem.* 275(44):34328-34334.
- Junker BH (2004). Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *J Biosci Bioeng*, 97(6), 347-364.
- Kalbina, I. Wallin, A. Lindh, I. Engström, P. Andersson, S. Strid, K. (2011). A novel chimeric MOMP antigen expressed in *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, and *Daucus carota* as a potential *Chlamydia trachomatis* vaccine candidate. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 194–202.
- Kanabus J., Bresan R. Vcarpita N. (1986). Carbon Assimilation in Carrot Cells in Liquid Culture. *Plant Physiol.* 82, 363 -368.
- Katzung, BG. (2001). Pharmacological management of parkinsonism and other movement disorders. In: *Basic and Clinical Pharmacology*, eighth ed. Lange Medical Books/McGraw Hill Companies, Inc.
- Kim DI, Cho GH, Pedersen H, Chin CA. (1991). hybrid bioreactor for high density cultivation of plant cell suspensions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34, 726–729.

- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106–108.
- Kurdjian A, Mathieu Y, Gun, J. (1982) Evidence for an action of 2,4-dichloro-1,3-bis(4-hydroxyphenyl)acetic acid on the vacuolar pH of *Acer pseudoplatanus* cells in suspension culture. *Plant Sci. Lett.*, 27, 77-86.
- Kwon KC, Verma D, Singh ND, Herzog R, Daniell H. (2013). Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 65(6):782-99
- Kwon TH, Kim YS, Lee JH, Yang, MS. (2003). Production and secretion of biologically active human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic tomato suspension cultures. *Biotechnol Lett.* 25, 1571–1574.
- Kyoko S., Kubota K., Hidroschi, A. (1989) Uptake and Metabolism of sugar by Suspension Cultured *Catharanthus roseus* Cells. *Annals of Botany*, 64,185-194.
- LaCount, W. An, G. Lee, JM. (1997). The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures. *Biotechnology Letters* 19, 93–96. <https://doi.org/10.1023/A:1018383524389>
- Lambrecht BN, Kool M, Willart MAM, Hammad, H. (2002). Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 21:1–7.
- Lavedan C (1998) The synuclein family. *Genome Res* 8:871–880.
- Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, Polymeropoulos MH (1998b) Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. *Hum Genet* 103:106–112.
- Lawson LB, Norton EB, Clements, JD. (2011). Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr Opin Immunol.* 23(3):414–420.
- Lee EJ, Mobin M, Hahn EJ, Paek, KY. (2007). Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestri*. *J Plant Biol.*, 49:427-431.
- Li, JT. Fei, L. Mou, ZR. Wei, J. Tang, Y. He, HY. Wang, L. Wu, YZ. (2006). Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology*, 356(1-2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.045>
- Lindh, I. Wallin, A. Kalbina, I. Sävenstrand, H. Engström, P. Andersson, S. Strid, A. (2009). Production of the p24 capsid protein from HIV-1 subtype C in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* using an endoplasmic reticulum-directing SEK-DEL sequence in protein expression constructs. *Protein Expression and Purification*, 66(1), 46–51.
- Lindvall, O. Hagell, P. (2001). Cell therapy and transplantation in Parkinson's disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 (4), 356–361.
- Lionnet A, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Murayama S, Takao M, Adler CH, Derkinderen P, Beach TG. (2018). Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathol.* 135(1):1-12.

- Lotharius J, Brundin P (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3:932–942
- Lubomski M, Xu X, Holmes AJ, Yang JYH, Sue CM, Davis RL. (2022). The impact of device-assisted therapies on the gut microbiome in Parkinson's disease. *J Neurol.* 269, 780–795.
- Lucumi, A. Posten, C. (2006). Establishment of long-term perfusion cultures of recombinant moss in a pilot tubular photobioreactor. *Process Biochem*; (41)10:2180-2187,
- Ma, JKC. Drake PMW. Christou P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Rev Genet*; 4:794–805.
- Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, HayGlass K, Lee JM. (1998). Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr Purif.* 13(1):45-52. doi:10.1006/prev.1998.0872
- Marquet-Blouin, E. Bouche, FB. Steinmetz, A. Muller, CP. (2003). Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Molecular Biology*, 51(4), 459–469.
- Marsden, C. (1982). Neurotransmitters and CNS disease. Basal ganglia disease. *Lancet* 2:1141-1147.
- Martens EC, Lowe EC, Chiang H, Pudlo NA, Wu M, McNulty NP, Abbott DW, Henrissat B, Gilbert HJ, Bolam DN, Gordon JI. (2011). Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol* 9(12):1001221.
- Martí MJ, Tolosa E, Campdelacreu, J. (2003). Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord* 18 Suppl 6:S21-7.
- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games, D. Schenk, D. (2005) Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron.* 46:857-868
- Mason HS, Lam, DM, Arntzen, CJ. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Aca Sci USA.* 89, (24):11745–11749.
- Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R. (1995). Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol.* ;27(6):1163-1172. doi:10.1007/BF00020889
- McDonald KA, Hong LM, Trombly DM, Xie Q, Jackman AP. (2005). Production of human alpha-1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor. *Biotechnol Prog* 21, 728–734.
- Mercuri, NB. Bernardi, G. (2005). The 'magic' of l-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol. Sci.* 26 (7), 341-344.
- Merle C, Perret, S, Lacour T, Jonval V, Hudaverdian S, Garrone R, Ruggiero F, Theisen M (2002). Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. *FEBS Lett.* 515, 114–118.
- Mitchell, VS. Philipose, NM. Sanford, JP. (1993). The children's vaccine initiative. National Academy Press.

- Mizuno, Y. Ohta, S. Tanaka, M. Takamiya, S. Suzuki, K. Sato, T. Oya, H. Ozawa, T. Kagawa, Y. (1989). Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 163(3):1450–1455.
- Molina A, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J. (2004). High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol. J.* 2, 141–153 (2004).
- Morales-Aguilar M, Bolaños-Martínez OC, Maldonado AR, Govea-Alonso DO, Carreño-Campos C, Villarreal ML, Rosales-Mendoza S, Ortiz-Caltempa A. (2024). Establishment of the *Daucus carota* SMC-1 cell suspension line for poliovirus vaccine development. *Planta Med.* 90(1):63-72.
- Moravec T. Schmidt MA. Herman EM. Woodford-Thomas T. (2007). Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* 25, 1647–1657.
- Mori F, Hayashi S, Yamagishi S, Yoshimoto M, Yagihashi S, Takahashi H, & Wakabayashi K (2002) Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system. *Brain Res*, 941, 118-126.
- Mudgil, D. Barak, S. (2013) Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 61, 1–6.
- Murashige T, Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*15:473–497.
- Nochi T., Hidenori T., Yoshikazu Y., Lijun Y., Takehiro M., Mio M., Ushio N., Akiko M., Akihiro U., Takachika H., Shigeto M. Kunisuke T., Fumio T. y Hiroshi K. (2007). From the cover: rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10986–10991
- Obembe OO, Popoola, JO, Leelavathi S, Reddy SV (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Adv.* 29, 210–222.
- Orozco-Sánchez, F. Rodríguez, M. (2015), Caracterización, operación y escalado de biorreactores, Medellín: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Ortiz-Caltempa A, Hernández M, Pérez AL, Aguilar L, Guzmán C, Ayón-Núñez DA, Fragoso G, Bobes RJ, López ME, Sciutto E, Villareal ML (2022). Improvement of cell suspension cultures of transformed and untransformed *Carica papaya* cell lines, towards the development of an antiparasitic product against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 12:958741.
- Palma, JA. Kaufmann, H. (2018). Treatment of autonomic dysfunction in Parkinson disease and other synucleinopathies. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 33(3), 372–390. <https://doi.org/10.1002/mds.27344>
- Pan SH, Malcolm, BA. (2000). Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *Biotechniques.* 29(6):1234–123.

- Paul M, Ma, JKC. (2011) Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol Appl Biochem.* 58:58–67.
- Pniewski T, Milczarek M, Wojas-Turek J, Pajtasz-Piasecka E, Wietrzyk J, Czyż M. (2018). Plant lyophilisate carrying S-HBsAg as an oral booster vaccine against HBV. *Vaccine* 36(41): 6070–6076
- Pogrebnyak N. Golovkin M. Andrianov V. Spitsin S. Smirnov Y. Egolf R. Koprowski H. (2005). Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9062–9067
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045–2047.
- Prakash G, Srivastava, AK. (2005). Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures. *Process Biochem.* 40, 3795–3800.
- Rasche S, Herwartz D, Schuster F, Jablonka N, Weber A, Fischer R, Schillberg, S. (2016). More for less: improving the biomass yield of a pear cell suspension culture by design of experiments. *Sci Rep.* 6:23371.
- Rashid, A. (1988). *Cell Physiology and Genetics of Higher Plants*, Vol.1. Ed. CRR. Florida.
- Raven N, Rasche S, Kuehn C, Anderlei T, Klöckner W, Schuster F, Henquet M, Bosch D, Büchs J, Fischer R, Schillberg, S. (2015). Scaled-up manufacturing of recombinant antibodies produced by plant cells in a 200 L orbitally-shaken disposable bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 112, 2:308–321.
- Richter, LJ. Thanavala Y. Arntzen CJ. Mason HS. (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* 18, 1167–1171.
- Ritala A, Wahlström EH, Holkeri H, Hafren A, Mäkeläinen K, Baez J, Mäkinen K, Nuutila AM. (2008). Production of a recombinant industrial protein using barley cell cultures. *Protein Expr Purif.* 59(2):274–281.
- Rosales-Mendoza S, Nieto-Gómez, R. (2018). Green Therapeutic Biocapsules: Using Plant Cells to Orally Deliver Biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol.* 36(10):1054–1067.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, López-Revilla R, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solís, AG. (2008). Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Rep* 27:79–84.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Han Y, Alpuche-Solís AG, Korban SS. (2011). Transgenic carrot tap roots expressing an immunogenic F1-V fusion protein from *Yersinia pestis* are immunogenic in mice. *J Plant Physiol.* 168(2):174-180. doi:10.1016/j.jplph.2010.06.012
- Rosales-Mendoza S. Tello-Olea, MA. (2015). Carrot cells: a pioneering platform for biopharmaceuticals production. *Mol Biotechnol.* 57(3):219–232.

- Rosales-Mendoza, S. Rubio-Infante, N. Zarazúa, S. Govea-Alonso, DO. Martel-Gallegos, G., & Moreno-Fierros, L. (2014). Plant-based vaccines for Alzheimer's disease: an overview. *Expert review of vaccines*, 13(3), 429–441. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.874948>
- Rosales-Mendoza, S. Soria-Guerra, RE. de Jesús Olivera-Flores, MT. López-Revilla, R. Argüello-Astorga, GR. Jiménez-Bremont, JF. García-de la Cruz, RF. Loyola-Rodríguez, JP. Alpuche-Solís, AG. (2007). Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin b subunit (LTB) in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant cell reports*, 26(7), 969–976. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0310-2>
- Sánchez-Guajardo V, Barnum CJ, Tansey MG, Romero-Ramos M (2013). Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to α -synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. *ASN Neuro* 5:113–139.
- Scheller J, Guhrs KH, Grosse F, Conrad, U. (2001). Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nature Biotechnol* 19, 573–577.
- Schouten A, Roosien J, van Engelen FA, de Jong GA, Borst-Vremsen AW, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J. (1996). The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway. *Plant Mol. Biol.* 30; 4:781–793.
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, Dym O, Boldin-Adamsky SA, Silman I, Sussman JL, Futerman AH, Aviezer, D. (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J.* 5, 5:579–590.
- Sharp JM, Doran, PM. (2001). Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol Prog* 17, 979–992.
- Shin, EC. Cho, SE. Lee, DK. Hur, MW. Paik, SR. Park, JH. Kim, J. (2000). Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages, *Mol Cells* 10, 65–70.
- Sijmons PC, Dekker, BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJM, Hoekema, A. (1990). Production of correctly processed human serum-albumin in transgenic plants. *Nat Biotechnol* 8, 217–221.
- Silver, DE. Ruggieri, S. (1998). Initiating therapy for Parkinson's disease. *Neurology* 50 (6), S18–S22.
- Sivakumar G, Medina-Bolivar F, Lay JO, Jr, Dolan MC, Condori J, Grubbs SK, Wright SM, Baque MA, Lee EJ, Paek, KY. (2011). Bioprocess and bioreactor: Next generation technology for production of potential plant-based antidiabetic and antioxidant molecules. *Curr Med Chem* 18, 79–90.
- Smith ML, Mason HS, Shuler, ML. (2002). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. *Biotechnol Bioeng* 80, 812–822.

- Sopher BL, Koszdin KL, McClain ME, Myrick SB, Martinez RA, Smith AC, La Spada AR (2001) Genomic organization, chromosome location, and expression analysis of mouse beta-synuclein, a candidate for involvement in neurodegeneration. *Cytogenet Cell Genet* 93:117–123
- Spillantini MG, Divane A, Goedert M (1995) Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 27:379–381
- Srivastava S, Srivastava, AK. (2012) Statistical medium optimization for enhanced azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Pl.* 48, 73–84.
- Tanaka H, Nishijima F, Suwa M, Iwamoto, T. (1983). Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. *Biotechnol Bioeng* 25, 2359–2370.
- Taticek R., Murray M. Legge, R. (1991). The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 24; 139-158.
- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli, R. (2009). Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv.* 27:449–67.
- Toonen, M. Hendriks T. Schmidt D. Verhoeven H. Kammen A. Vries, S. (1994). Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta*,194; 565-572.
- Torres E, Vaquero, C, Nicholson L, Sack M, Stöger E, Drossard J, Christou P, Fischer R, Perrin, Y. (1999). Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic Res.* 8, 6:441–449.
- Touchman JW, Dehejia A, Chiba-Falek O, Cabin DE, Schwartz JR, Orrison BM, Polymeropoulos MH, Nussbaum RL (2001) Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. *Genome Res* 11:78–86.
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P. (2003). Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 31(4):1174–1179. doi:10.1093/nar/gkg221
- Ullisch DA, Müller CA, Maibaum S, Kirchhoff J, Schiermeyer A, Schillberg S, Roberts JL, Treffenfeldt W, Büchs, J. (2012). Comprehensive characterization of two different *Nicotiana tabacum* cell lines leads to doubled GFP and HA protein production by media optimization. *J Biosci Bioeng* 113, 242–248.
- Uvarova EA, Belavin PA, Permyakova NV, Zagorskaya AA, Nosareva OV, Kakimzhanova AA, Deineko EV. (2013). Oral Immunogenicity of plant-made *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10. *Biomed Res Int* 316304.
- Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, Jakes R, Goedert M, Fink AL (2002) Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins. *J Biol Chem* 277:11970–11978.
- Vaidya BK, Mutalik SR, Joshi RM, Nene SN, Kulkarni, BD. (2009). Enhanced production of amidase from *Rhodococcus erythropolis* MTCC 1526 by medium optimisation using a statistical experimental design. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 671–678.

- Vasilev N, Grömping U, Lipperts A, Raven N, Fischer R, Schillberg, S. (2013). Optimization of BY-2 cell suspension culture medium for the production of a human antibody using a combination of fractional factorial designs and the response surface method. *Plant Biotechnol J* 11, 867–874.
- Vasilev N, Schmitz C, Gromping U, Fischer R, Schillberg, S. (2014). Assessment of cultivation factors that affect biomass and geraniol production in transgenic tobacco cell suspension cultures. *PLoS ONE* 9:e104620.
- Weathers PJ, Towler MJ, Xu, JF. (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1339–51.
- Weihofen A, Patel H, Huy, C. (2017). Binding and functional characterization of human-derived anti-alpha-synuclein antibody B1B054. *Neurodegener Dis.* 17(suppl 1):59.
- Wen Su W, Jun He B, Liang H, Sun, S. (1996). A perfusion air-lift bioreactor for high density plant cell cultivation and secreted protein production. *J Biotechnol* 50, 225–233.
- Wilken LR, Nikolov ZL. (2012). Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnol Adv.* 30(2):419-433.
- Wilson, G. (1971). Nutrition and differentiation of cells of *Acer pseudoplatanus* L. in suspension culture. Ph. D. thesis, University of Birmingham.
- Withers, GS. George, JM. Banker, GA. Clayton, DF. (1997). Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons, *Brain Res Dev Brain Res.* 99(1): 87–94.
- Wynn JP, Hanchar R, Kleff S, Senyk D, Tiedje, T. (2016). Biobased technology commercialization: the importance of lab to pilot scale-up. In S. San Dien (ed.), *metabolic engineering for bioprocess commercialization* (pp. 101-119). Cham: Springer International Publishing.
- Xia J, Wang G, Lin J, Wang Y, Chu J, Zhuang Y, Zhang, S. (2016). Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. In J. Bao, Q. Ye, & J.-J. Zhong (Eds.), *Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications II* (pp. 137-151). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Xu H, Montoya FU, Wang Z, Lee JM, Reeves R, Linthicum DS, Magnuson, NS. (2002). Combined use of regulatory elements within the cDNA to increase the production of a soluble mouse single-chain antibody, scFv, from tobacco cell suspension cultures. *Protein Expr. Purif.* 24, 384–394.
- Xu J, Ge X, Dolan, MC. (2011). Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnol Adv.* 29, 278–299.
- Yang Q, Liang Q, Balakrishnan B, Belobrajdic DP, Feng QJ, Zhang W. (2020). Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients.* 12(2).
- Yusibov V, Streatfield SJ, Kushnir, N. (2011). Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Hum Vaccin* 7:313–321.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Tortosa EG, Del Ser T, Munoz DG, De Yebenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55:164–173.

- Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS. (2006). Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol J.* 4:419–432.
- Zhang, H. Liu, M. Li, Y. He, H. Yang, G. Zheng, C. (2010). Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot-derived vaccine candidate expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. *Protein Expression and Purification*, 69(2), 127–131.

Apéndice 1

Expresión y purificación la proteína recombinante rLTB-Syn en cultivos de *Escherichia coli*

1) Introducción

1.1 Sistema de expresión en bacterias

Existen muchos huéspedes que se utilizan para la producción de proteínas recombinantes, como bacterias, levaduras, insectos, plantas y animales. *E. coli* ha sido el medio más popular para producir proteínas recombinantes durante más de dos décadas, ya que puede crecer en medios económicos en condiciones de laboratorio bien definidas y tiene un tiempo de duplicación muy corto, es decir, 20 minutos. Debido a su rápido crecimiento, la selección de mutantes es fácil y conveniente. Además, las células de *E. coli* son muy eficientes para recibir (incorporar) ADN exógeno y expresar proteínas recombinantes a un ritmo muy alto (Cronan, 2005).

La producción extracelular de proteína recombinante es muy deseable para reducir los costos y para mejorar la calidad del producto. El uso del sistema de expresión de *E. coli* está limitado debido a la falta de sistemas de secreción para la liberación eficiente de proteínas en el medio de cultivo, la limitada formación extensa de enlaces disulfuro, la inactividad de la proteína, su toxicidad e incapacidad para conferir modificaciones postraduccionales que pueden resultar en una menor estabilidad de la proteína y una mayor inmunogenicidad (Yin *et al.*, 2007). Sin embargo, Con el avance en la tecnología de ADN recombinante, se han desarrollado numerosos vectores plásmidos y huéspedes diseñados para expresar estas proteínas difíciles (Guzmán *et al.*, 1995). Pero, aun así, depende completamente de la selección adecuada de la cepa. Actualmente existen diferentes estrategias moleculares para expresar proteínas complejas mediante la optimización de varios parámetros, como la temperatura de cultivo, las concentraciones de inductores, el crecimiento celular y la coexpresión con acompañantes en el momento de la inducción y el uso de aditivos en el medio de cultivo (García-Fraga *et al.*, 2015).

1.2 Vector de expresión pET

Un vector de expresión se diseña de manera que un gen clonado se transcriba y/o traduzca. Comprende todos los componentes para la expresión de genes de interés. El sistema de expresión de *E. coli* comercial más popular es con los vectores pET basados en el promotor T7 del bacteriófago T7 (Pan y Malcolm, 2000). El sistema de expresión pET ganó popularidad ya que más del 90% del banco de datos de proteínas (PDB) se han expresaron mediante este sistema. La expresión requiere una cepa huésped lisogénica con un

fragmento del fago DE3, que codifica para la RNA polimerasa T7 (gen 1 del bacteriófago T7), que promueve la transcripción y traducción de alto nivel. El gen de la ARN polimerasa T7 se integra cromosómicamente bajo el control del promotor lacUV5 inducible por IPTG en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Wilson *et al.*, 2007). La ARN polimerasa T7 se transcribe cuando el IPTG se une y desencadena la liberación de tetrámero LacI del operador lac, y la transcripción del gen de interés es iniciada posteriormente por la ARN polimerasa T7 (Figura 1).

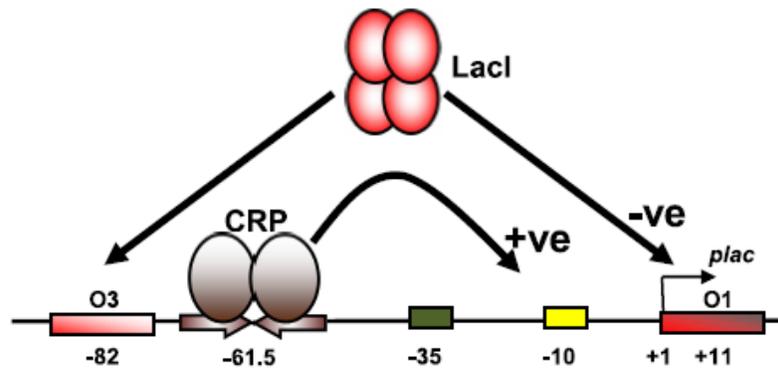


Figura 1. Esquema representativo del operón lac de *E. coli*. La proteína tetrámera represora del operón de lactosa (LacI) se une a los operadores O1 (+11) y O3 (-82) para formar un bucle de represión, silenciando la expresión del operón lac (-ve), mientras que CRP activa la transcripción (+ve). La unión de lacI a O1 detiene la actividad del promotor lac, pero la represión puede romperse por la presencia de la IPTG o por el azúcar análogo lactosa, que se unen al represor LacI y hacen que libere ADN operador (tomada de Wilson *et al.*, 2007).

1.3 Cepa de expresión *E. coli* DE3

La elección de la cepa de *E. coli* adecuada es obligatoria para la expresión exitosa de proteínas recombinantes y depende del vector de expresión utilizado. Para la expresión del gen en el vector que contiene los promotores T7, se prefiere una cepa de *E. coli* BL21 (DE3), porque produce la RNA polimerasa para este promotor. BL21 es una cepa robusta de *E. coli* capaz de crecer vigorosamente en medios mínimos (Chart *et al.*, 2000). DE3 se refiere al profago lambda que lleva el gen 1 del fago T7, que codifica para la RNA polimerasa T7. La expresión del gen 1 de T7 está controlada por el promotor lacUV5 en las cepas DE3. El fragmento DE3 (presente dentro del sitio cromosómico att) también porta un gen lacI con su promotor nativo. Así, la inducción de la ARN polimerasa T7 en cepas DE3 está mediada por IPTG o lactosa en el caso de protocolos de autoinducción (Studier, 2005).

1.4 Purificación de proteínas recombinantes

En principio, las proteínas expresadas de forma recombinante pueden dirigirse a tres lugares diferentes: el citoplasma, el periplasma o el medio de cultivo. Varias ventajas y desventajas están relacionadas con la dirección de una proteína recombinante a un compartimento celular específico. Las etiquetas de afinidad se utilizan para la purificación en un solo paso de la proteína recombinante del grupo total de proteínas de las células huésped. Además de la proteína recombinante, el sistema de células huésped también produce una gran cantidad de proteínas metabólicas, por lo que la recuperación de la proteína recombinante de interés a partir de la fuente biológica cruda se logra mediante la expresión de la proteína etiquetada por afinidad. Estos incluyen poli (His), proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP) y glutatión-S-transferasa (GST). La etiqueta poli (His) es una etiqueta de proteína ampliamente utilizada; se une a matrices metálicas. El número de residuos de histidina varía de 3 a 10 en la etiqueta de poli-His. La etiqueta 6x His ofrece varias ventajas, su tamaño pequeño (0,84 kDa) que rara vez interfiere con la estructura y función de la proteína, ausencia de carga eléctrica, bajos niveles de toxicidad e inmunogenicidad, utilizada en condiciones nativas y desnaturalizantes (Zhao *et al.*, 2013). La proteína de interés se puede eluir en condiciones suaves mediante competencia con imidazol o pH bajo.

Además, para purificar proteínas recombinantes etiquetadas con poli-His, se utiliza la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) para aislar los péptidos de unión a metales en función de la interacción entre los iones de metales de transición e His cargados negativamente (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) inmovilizados en una matriz (Chaga, 2001). Las resinas IMAC de uso común, como la agarosa con ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) o la agarosa con aspartato de carboximetilo (Talon), tienen una alta capacidad de unión y se pueden usar para la purificación de proteínas de fusión directamente a partir de lisados celulares crudos (Kimple y Sondek, 2013). Las etiquetas de afinidad generalmente se eliminan después de la purificación *in vitro* y esto se logra mediante el uso de sitios de escisión entre la etiqueta y la proteína recombinante, lo que facilita la proteólisis específica del sitio.

1.5 Objetivo general

- Expresar y purificar la proteína recombinante rLTB-Syn en cultivos de *Escherichia coli* (Rosetta DE3).

1.6 Objetivos específicos

- Determinar la expresión de la proteína en fracciones celulares y subcelulares totales antes y después de la inducción.
- Detectar la proteína rLTB-Syn por ensayos de electroforesis SDS-PAGE y Western blot.

- Determinar la cantidad de proteína producida por densitometría de los patrones electroforéticos.
- Purificar y cuantificar la proteína rLTB-Syn según sus características de solubilidad.

1.7 Metodología

1.7.1 Vector pET15b y cepa *E. coli* (Rosetta D3)

El gen sintético *LTB-Syn* que codifica la expresión de la proteína recombinante LTB-Syn fue sintetizado por Gene Script (USA). El gen *LTB-Syn* fue optimizado con codones de uso preferencial para su expresión en citoplasma, con el fin de expresarlo eficientemente en el modelo bacteriano y contar con un control positivo para los ensayos inmunológicos. El gen *LTB-Syn* se mandó a clonar en el plásmido pET15b (GeneScript) (Figura 2). La longitud del plásmido es de 5708 pb, presenta el gen de resistencia a ampicilina y contiene el promotor T7 del bacteriófago T7, que no es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*. El gen LTB-Syn se clonó bajo el control del promotor T7 y el operador *lac* el cual solo se expresará en presencia de un agente inductor y de la RNA polimerasa T7 de la cepa DE3 (Studier, 2005). En este trabajo se utilizó la cepa *E. coli* (Rosetta D3) que porta el gen 1 del fago T7 para producir la ARN polimerasa necesaria en el promotor T7 del vector. La expresión del gen 1 de T7 está controlada por el promotor lacUV5 inducible por IPTG o lactosa (Pan y Malcolm, 2000).

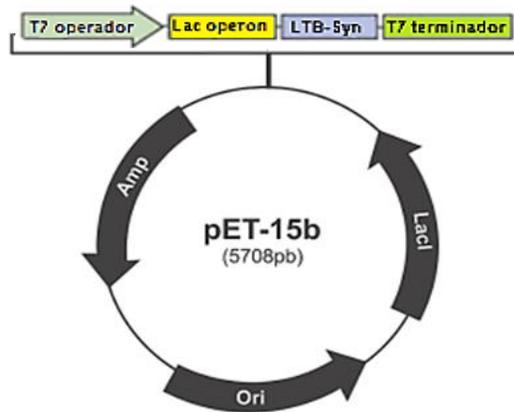


Figura 2. Mapa del vector de expresión pET15b con el gen LTB-Syn bajo el control del promotor T7

1.7.2 Células competentes (método cloruro de calcio)

Las células de *E. coli* se crecieron en medio LB a 37°C hasta una $OD_{600} \approx 0.4-0.5$, se transfirieron a un tubo de 1.5 mL y se incubaron por 20 min en hielo. Las células se concentraron por centrifugación a 4000 rpm (2800g) por 10 min a 4°C y se resuspendieron en 15 mL de solución $CaCl_2$ 0.1 M en frío (no vortex). Las células se incubaron nuevamente en hielo por 30 min, se centrifugaron a 4000 rpm (2400 g) a 4°C por 10 min y se resuspendieron en 2.5 mL de $CaCl_2$ 0.1 M y 15% de glicerol en frío. Las células se alicuotaron (30 μ l) y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

1.7.3 Transformación de *E. coli* (choque térmico)

Los plásmidos recombinantes se transformaron en células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3) por choque térmico. Las células competentes junto con el plásmido pET15b (3 μ L DNA) se dejaron en hielo 15 min, luego 1 min a 42°C y se regresaron a hielo por 15 min. Se recuperaron en 500 μ L de LB por 1 hora a 37°C y se plaquearon con 50 μ L y 80 μ L en LB agar con antibióticos (cloranfenicol 40mg/ml/ ampicilina 100mg/ml) y se incubaron a 37°C toda la noche (Hanahan *et al.*, 1991).

1.7.4 Medio de cultivo bacteriano

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes medios de cultivo bacteriano:

- Medio Luria–Bertani (LB): 10 g/L peptona de soya (1%), 5 g/L extracto de levadura (0.5%), 10 g/L cloruro de sodio (1%).
- Medio LB para inducción: 10 g/L peptona de soya (1%), 5 g/L extracto de levadura (0.5%), 10 g/L cloruro de sodio (1%) y lactosa (1.5 g/L).

1.7.5 Ensayos de expresión en 10 mL y 200 mL

Las clonas positivas obtenidas en la transformación se utilizaron en ensayos de expresión para seleccionar la clona productora con mayor cantidad de proteína recombinante en extractos totales. Una vez seleccionadas tres colonias transformadas independientes se cultivaron por separado en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 mg/mL) y cloranfenicol (40 mg/mL), a 37°C y 180 rpm. Después de 2-3 h cuando la OD_{600} alcanzó 0.8, se concentró en un volumen final de 10 mL. El cultivo se indujo con lactosa (1.5 g/L) con antibióticos a 28°C durante 20 h. Se tomó una muestra antes de la inducción como control negativo. Una vez seleccionada la clona, se realizaron ensayos de expresión en cultivos de 200 mL utilizando las mismas condiciones de temperatura, concentración de inductor, densidad óptica al inducir y tiempo de incubación posterior a la inducción. Los cultivos resultantes se centrifugaron y se usaron para los análisis de extracción.

1.7.6 Obtención de extractos de proteicos

Las células bacterianas se concentraron por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendieron en buffer de extracción [50 mM Tris, 0.5% Triton, 25% Sacarosa] por pipeteo a 4°C (Uma *et al.*, 2016). A continuación, las células se lisaron por sonicación en un equipo Sonics Vibracell (Sonics and Materials, Inc.) en hielo por 12 ciclos con pulsos de 15 s y descansos de 15 s cada uno, a una amplitud de 65%, seguido del lisado se sedimentó mediante centrifugación a 8000 rpm durante 15 min a 4°C (se tomó una muestra de proteína total antes de separar fracciones). El sobrenadante (fracción soluble) y el pellet residual (fracción insoluble) se recolectaron por separado (antes y después de la inducción) y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12%.

1.7.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con Coomassie

Para ver si existía la expresión diferencial antes y después de la inducción con el peso molecular esperado de la proteína recombinante LTB-Syn (~18kDa) se realizó una electroforesis desnaturante. Las muestras que contenían las proteínas del sobrenadante (fracción total y soluble) y el pellet residual (fracción insoluble) se hirvieron a 95°C durante 10 min y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% (Uma *et al.*, 2016). Para detectar las bandas de las proteínas se realizó la tinción con azul brillante Coomassie G-250. Posterior a la electroforesis, se deja el gel en agitación suave con suficiente volumen de solución A (7.5% Isopropanol, 5% ácido acético, 0.5% azul de Coomassie R-250) durante 20 min. Para desteñir el gel se colocó en solución decolorante D (7.5% Isopropanol, 7.5% ácido acético, 0.05% azul de Coomassie R-250) hasta que sólo queden teñidas de azul las bandas de proteínas, cambiando la solución decolorante D tantas veces como sea necesario hasta obtener el menor fondo posible.

1.7.8 Purificación de la proteína rLTB-Syn por IMAC

Con el fin de purificar la proteína rLTB se utilizó la metodología de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando la columna de Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) que contiene iones níquel como ligando. La columna se equilibró con el tampón A de lavado de proteína soluble (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.0) a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min hasta que se obtuvo una línea base lineal. La columna se cargó con 1 ml de muestra de proteína soluble a la misma velocidad de flujo. La proteína unida a la columna se eluyó con el tampón de lavado de proteína soluble B (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, pH 7.0). La detección al final de la columna se realizó midiendo absorbancia a 280 nm. Las fracciones de elución se recolectaron y se examinó su pureza mediante SDS-PAGE al 12%.

1.7.9 Purificación de la proteína rLTB-Syn por IEX

Para la cromatografía de intercambio iónico (IEX), la proteína se cargó en una columna de intercambio aniónico Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) y se equilibró con el tampón A IEX (Tris 20 mM, pH 8.0) para inyectar la muestra. Para eludir a la proteína rLTB-Syn se usó un gradiente escalonado de tampón B IEX al 50% (Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) seguido de 100% de tampón B IEX. La detección al final de la columna se realizó midiendo absorbancia a 280 nm. Para determinar el nivel de pureza de rLTB-Syn de las fracciones que se recolectaron de la columna de cromatografía IEX se realizó densitometría usando electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% y tinción con azul de Coomassie. Se comprobó la presencia de la proteína recombinante por análisis de inmunotransferencia Western Blot.

1.7.10 Detección de la proteína rLTB-Syn por Western blot

Para detectar y comprobar la expresión la proteína rLTB después de la purificación se realizó un Western blot. Posterior a la electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% las fracciones proteicas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, usando el tampón de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0.037% SDS, 20% metanol) a 500 mA por 60 min. Dado que el gen clonado en el vector pET15b no contiene cola de poli Histidinas unida al extremo 5', se utilizó un anticuerpo primario anti CTB de ratón (1:500) para la detección de la proteína rLTB-syn y un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa (1:2000); como control positivo se usó CTB puro (100 ng/μL) (Sambrook *et al.*, 2001). Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia en el equipo iBright system FL1000.

1.7.11 Densitometría

Las muestras de fracciones de proteínas se procesaron en geles SDS-PAGE al 12 % para la separación de proteínas en función del tamaño. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y la imagen del gel se analizó utilizando ImageJ para determinar el porcentaje de pureza de rLTB-Syn presente y concentración utilizando una curva de BSA estándar (Schindelin *et al.*, 2012). Se seleccionaron regiones de interés y se generó un histograma de la intensidad de la proteína teñida en el área. A partir del histograma, se calculó el área de rLTB-Syn como porcentaje del área total de proteínas teñidas para obtener el porcentaje de pureza y concentración.

1.8 Resultados

1.8.1 Transformación y expresión de rLTB-Syn en *E. coli*

La transformación del vector pET15b en la cepa *E. coli* (Rosetta DE3) se logró obtener colonias transformantes, de las cuales se eligieron tres colonias aisladas para su posterior inducción en cultivos de 10 mL en LB. El análisis de expresión por electroforesis SDS-PAGE con los extractos de proteínas totales de las tres colonias se observaron bandas de tamaño esperado de 18 kDa (flecha en rojo) que corresponden a la proteína rLTB-Syn en las fracciones de proteína total (sobrenadante después de la inducción) e insoluble (pellet después de inducción) (Figura 12). Mientras que la clona control negativo (sin inducir) no se detectó la expresión de la proteína rLTB-Syn en ninguna de las fracciones (Figura 1).

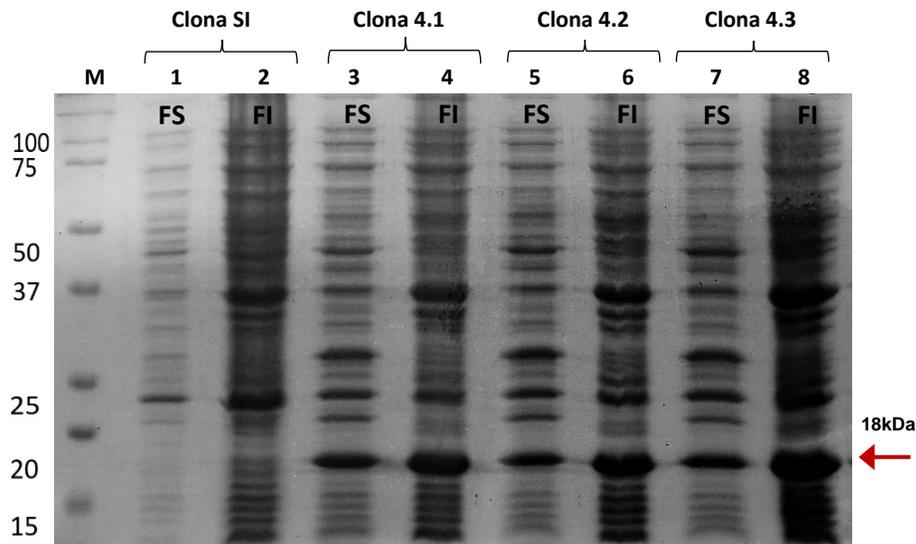


Figura 1. Detección de la proteína rLTB-Syn en electroforesis SDS-PAGE de tres clones transformados independientes en *E. coli* (Rosetta D3). Carriles: M, marcador de peso molecular kDa (BIO-RAD); 1-2, control negativo de la expresión (sin inducir); 3-8: extractos de proteínas después de la inducción en fracción soluble (FS) y fracción insoluble (FI). La flecha roja indica el tamaño esperado de proteína rLTB-Syn.

Posteriormente se realizó un análisis por densitometría de las bandas en gel SDS-PAGE de la fracción soluble de las tres clonas observando que la clona 4.1 se obtuvo un 40% de proteína soluble comparado con las clonas 4.2 y 4.3 (Figura 2). Esta clona fue seleccionada para una segunda expresión en un cultivo de 100 mL en las mismas condiciones anteriores, con el fin de obtener mayor fracción soluble (periplásmica) que se utilizaría para los análisis de purificación posterior. La Figura 3, se muestra por electroforesis SDS-PAGE

la expresión en la clona 4.1 después de inducir (por duplicado) y sin inducir (control negativo). De igual forma que la expresión en 10 mL, se observan bandas migrando en el tamaño esperado de la proteína rLTB-Syn de ~18kDa (flecha en rojo) correspondiente al estado monomérico de la proteína en las fracciones de proteína total, fracción soluble y fracción insoluble (después de inducción).

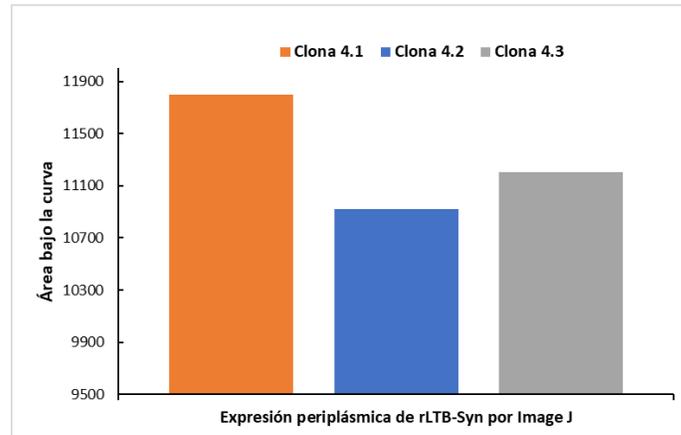


Figura 2. Comparación de área bajo la curva de rLTB-Syn en las fracciones solubles de las clonas 4.1-4.3 por densitometría.

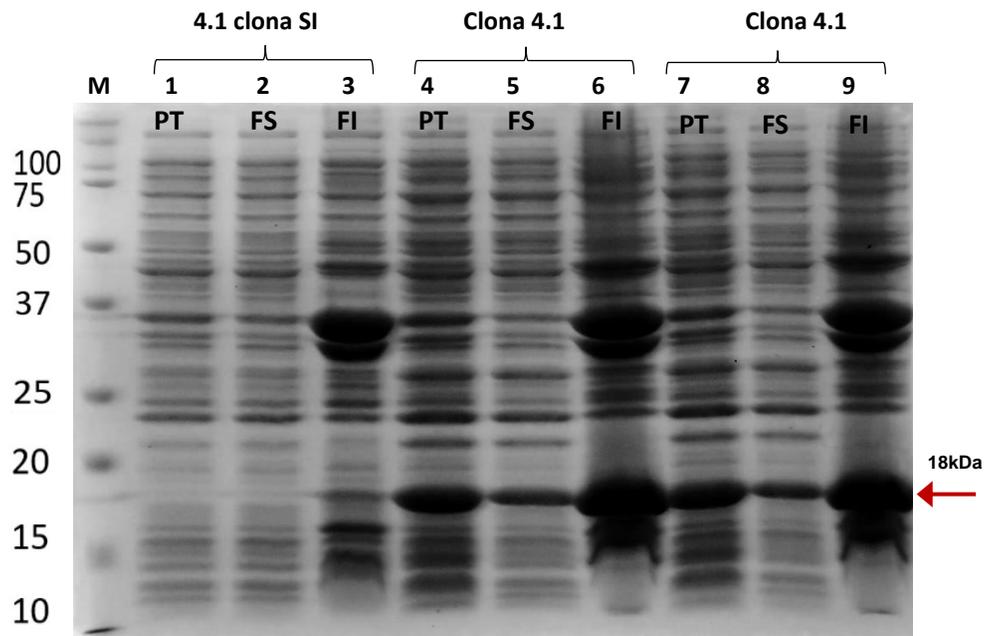


Figura 3. Detección de la proteína rLTB-Syn en electroforesis SDS-PAGE de la clona transformante 4.1 en *E. coli* (Rosetta D3) en cultivo de 200 mL. Carriles: M, marcador de peso molecular en kDa (BIO-RAD); 1-3, control negativo de la expresión (sin inducir); 4-9: extractos proteicos después de la inducción en fracciones de proteína total (PT), fracciones solubles (FS) y fracciones insolubles (FI). La flecha roja indica el tamaño esperado de la proteína rLTB-Syn.

1.8.2 Purificación de la proteína rLTB-Syn por IMAC

Con los resultados obtenidos en el análisis de las proteínas en gel SDS-PAGE producidas en la clona 4.1, se realizó la purificación de la fracción soluble por medio de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). La separación de proteínas usando IMAC ocurre con base en las interacciones entre ciertos residuos de aminoácidos, especialmente histidina, y los iones metálicos inmovilizados por un agente quelante (Porath, 1992). Se obtuvieron 8 fracciones con el tampón A que no se unieron a la columna, después se eluyeron las proteínas adsorbidas con el tampón B obteniendo 7 fracciones como se muestra en la Figura 4. Se analizaron las fracciones por geles SDS-PAGE para visualizar que tan limpia estaba la proteína rLTB-Syn después de la cromatografía IMAC. Las fracciones 1-5 después eluir con el tampón B (500 mM Imidazol) muestran que se logró eliminar la mayor parte de las impurezas, sin embargo, aún quedaban bandas de otras proteínas nativas contaminantes (Figura 5). El análisis de densitometría de las bandas en las fracciones 1-5 después de eluir mostraron un 54, 61, 55, 32 y 27% de pureza de rLTB-Syn, respectivamente.

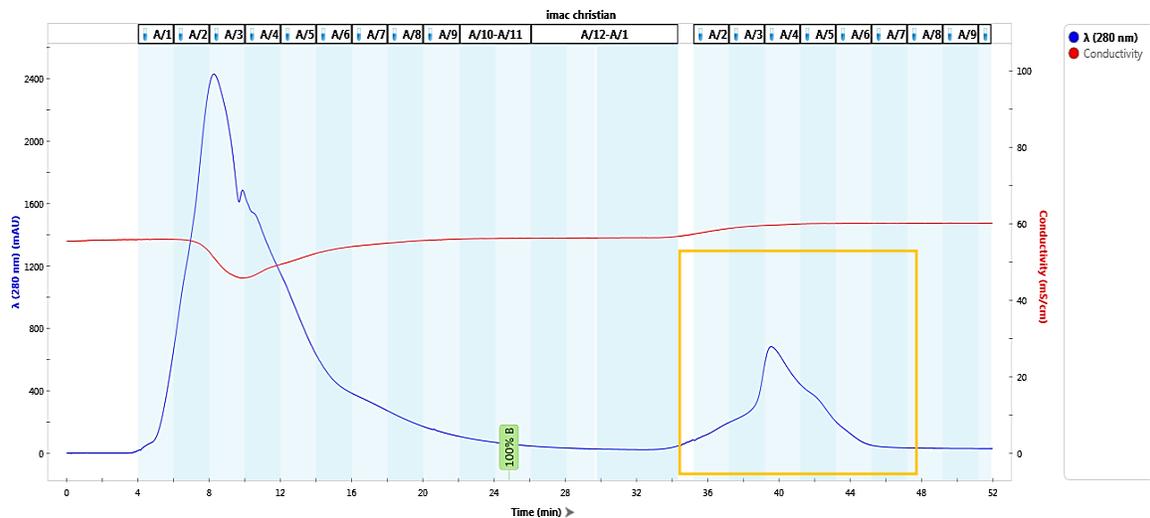


Figura 4. Cromatograma IMAC de fracción soluble en columna de Chelating Sepharose Fast Flow. Las siete fracciones después de eluir 100% tampón B (500mM imidazol) que contenían rLTB-Syn se resaltan en el recuadro naranja en el cromatograma IMAC.

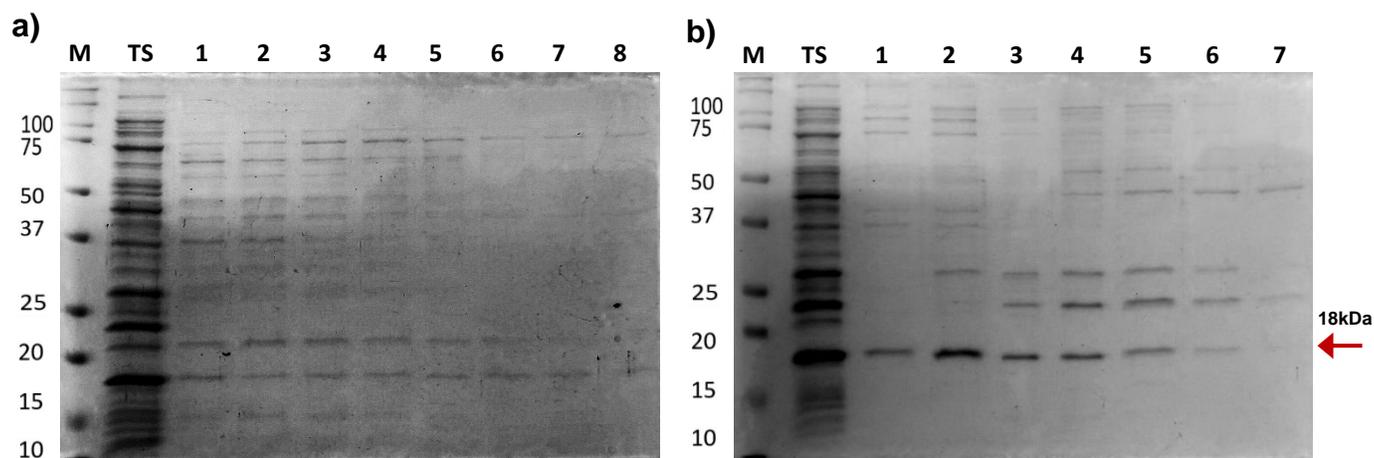


Figura 5. Fracciones purificadas por cromatografía IMAC y visualizadas en gel SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. a) carriles: M, marcador de peso molecular en kDa; TS: fracción de proteína soluble total; 1-3, son 8 fracciones después del tampón A; b) carriles: MPM, marcador de peso molecular en kDa; TS: fracción de proteína total soluble; 1-7; son 7 fracciones después de eluir con el tampón B (500 mM imidazol). La flecha roja indica la proteína rLTB-Syn (~18kDa).

1.8.3 Purificación de la proteína rLTB-Syn por intercambio iónico (IEX)

La cromatografía IEX se usó para aislar rLTB-Syn de las fracciones solubles con una columna de intercambio de aniones Q-Sepharose Fast Flow. El pico después de eluir con 1M NaCl en la cromatografía se observó que era simétrico y nítido (Figura 6). Para determinar la pureza en las fracciones que aparecía rLTB-Syn, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul de Coomassie para visualizar las proteínas. Las fracciones 1-4 obtenidas al alimentar el tampón B al 50% (0.5 M NaCl) se observó que la proteína de interés todavía contenía proteínas contaminantes, mientras que en las fracciones 5-8 después de eluir con el tampón B al 100% (1.0 M NaCl) se observó la proteína de interés con un alto grado de pureza (bandas carriles 5 y 6) (Figura 7). El análisis por densitometría de las fracciones en las bandas 5 y 6 después de eluir mostraron un 93% y 88% de pureza de rLTB-Syn, respectivamente. Después de concentrar todas las fracciones con una pureza >90% que resultaron positivas para rLTB-Syn, se logró una concentración final de rLTB-Syn de hasta 82.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que representa un rendimiento de 7,7 mg de proteína soluble rLTB-syn por litro de cultivo.

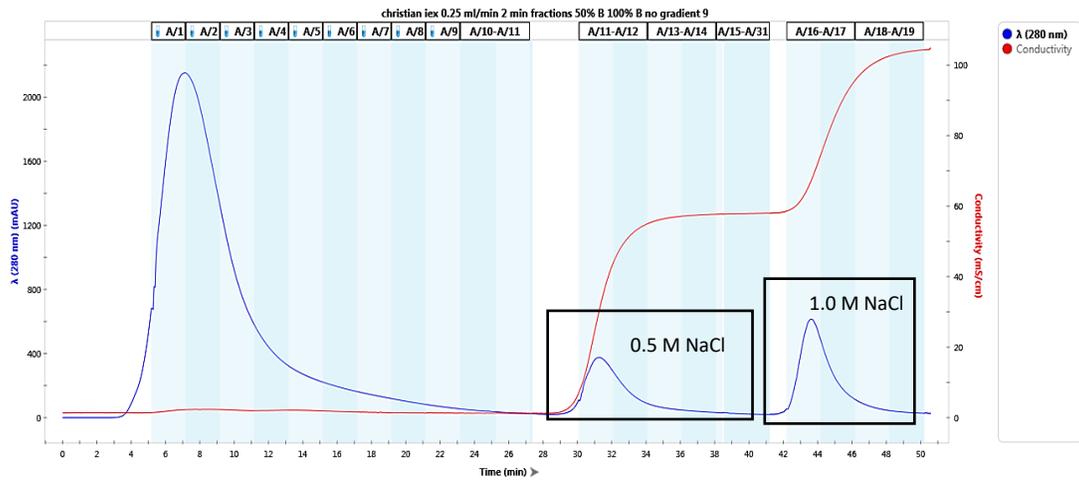


Figura 6. Cromatograma IEX de fracción soluble en columna de Q-Sepharose Fast Flow. Los picos de fracciones después de eluir a 0.5–1.0 M NaCl se resaltan en los bloques de color negro en el cromatograma IEX.

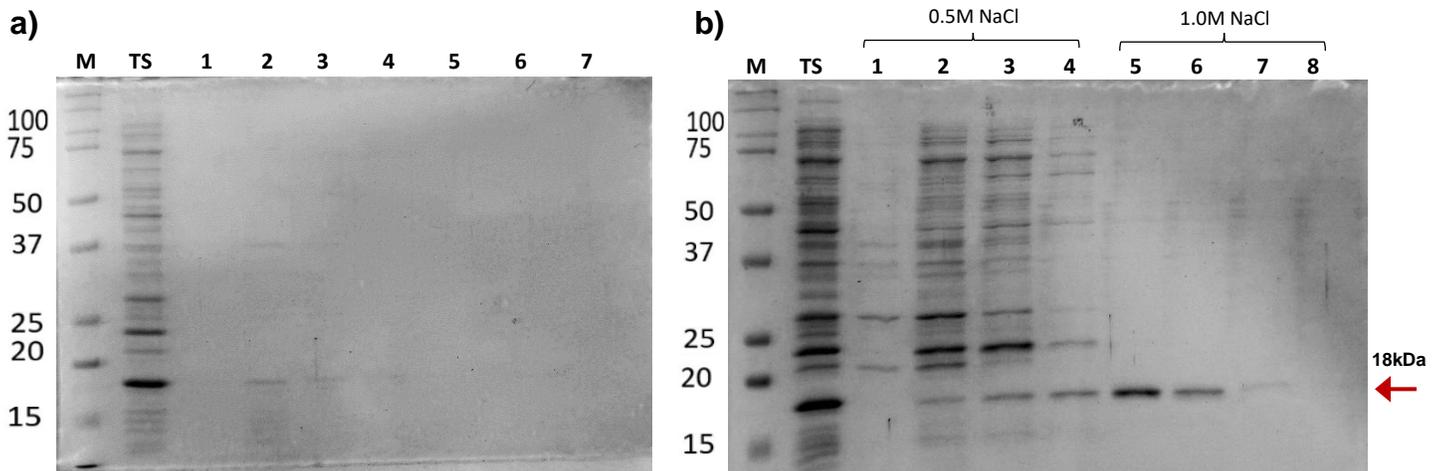


Figura 7. Fracciones purificadas por cromatografía IEX y visualizadas en gel SDS-PAGE 12% teñido con azul de Comassie. a) carriles: MPM, marcador de peso molecular en kDa; TS: fracción de proteína total soluble; 1-7, son las 7 fracciones después del tampón A; b) carriles: MPM, marcador de peso molecular en kDa; TS: fracción de proteína soluble total; 1-4; fracciones después de eluir con tampón B (0.5 M NaCl); 5-8; fracciones después de eluir con tampón B (1.0 M NaCl). La flecha roja indica el tamaño esperado de la proteína rLTB-Syn (~18kDa).

1.8.4 Detección de rLTB-Syn por Western blot

Para confirmar que se trataba de la proteína rLTB-Syn en las bandas observadas en la electroforesis después de la purificación por IEX se realizó un ensayo de Western blot. Se observó que el anticuerpo anti-CTB

detecto la proteína rLTB-Syn (~18kDa) en las fracciones después de eluir en 0.5 M y 1.0 M NaCl, también en la fracción de proteína soluble total y no así en la fracción sin inducir (Figura 8).

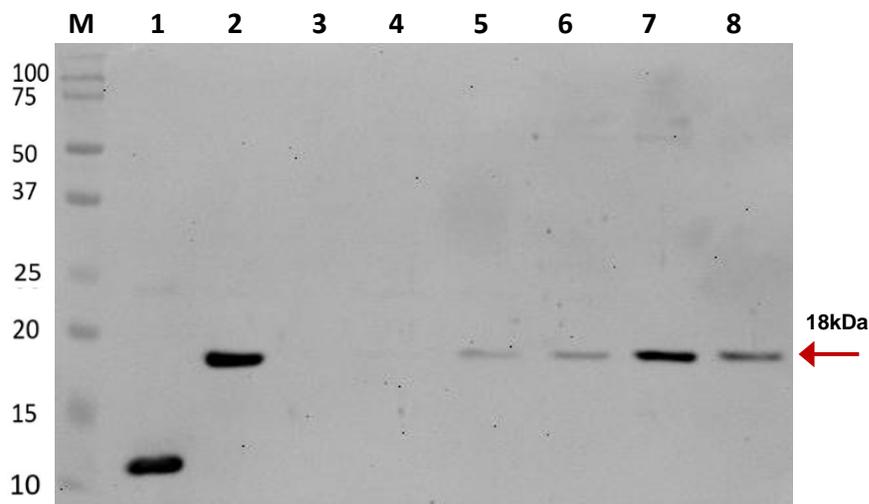


Figura 8. Detección de rLTB-Syn por Western blot. Carriles: M; marcador de peso kDa; 1; CTB control positivo (100 ng/ μ L); 2, fracción de proteína total soluble, 3, fracción sin inducir; 4-5; fracciones después de eluir con 0.5 M NaCl; 6-8; fracciones después de eluir con 1.0 M NaCl. La flecha roja indica el tamaño esperado de la proteína rLTB-Syn.

1.9 Discusión

La expresión periplásmica de proteínas recombinantes en *E. coli* está cobrando una importancia relevante, ya que el periplasma es el único compartimento en las cepas de *E. coli* que proporciona un entorno oxidante para el plegamiento adecuado de proteínas y la formación de enlaces disulfuro, lo que garantiza la producción de proteínas solubles y activas (Chang *et al.*, 2016). Actualmente para lograr la expresión de proteínas recombinantes se utiliza el promotor del operón lac de *E. coli* por sus características de regulación genética (Overton, 2014). La expresión de rLTB-Syn en las fracciones solubles e insolubles a partir de lisados bacterianos de las clonas transformadas mostró que el agente inductor (lactosa) modificó y removió el represor lac permitiéndole a la RNA polimerasa transcribir los genes de interés. Esto se confirmó puesto que no había expresión de la proteína rLTB-Syn en la ausencia de lactosa, sugiriendo que hay represión completa por parte del represor lac. Sin embargo, existió una mayor expresión de rLTB-Syn en la fracción insoluble debido principalmente a la acumulación de proteínas desnaturalizadas mal plegadas insolubles en el citoplasma conocidos como cuerpos de inclusión, los cuales carecen de actividad biológica (Fahnert *et al.*, 2004). Para el uso de estos cuerpos de inclusión se deben solubilizar y replegar las proteínas con el riesgo de obtener una mala recuperación de la proteína activa (cerca del 15-25 % de la proteína total) por

la pérdida de la estructura secundaria y la agregación durante la solubilización y el replegamiento (Datar *et al.*, 1993). En la actualidad existen diferentes protocolos para la purificación de α -syn humana recombinante en *E. coli* (Al-Azzani *et al.*, 2022). Entre los métodos de extracción más comunes es por precipitación ácida, calentamiento, precipitación con sulfato de amonio y lisis osmótica seguidos de diálisis más diferentes tipos de cromatografías de IEX, HIC y GF; con todo esto se han obtenido hasta un 96% de pureza de α -syn (Stephens *et al.*, 2020).

En este trabajo la expresión de la proteína rLTB-Syn contra sinucleinopatías se enfocó en la fracción soluble debido a que en esta región hay menos proteasas que el citoplasma, por lo que las proteínas recombinantes son biológicamente más activas y estables. Además, hay menos degradación de la proteína recombinante, lo que puede minimizar los costos de procesamiento posteriores, ya que la purificación involucra una mínima contaminación celular (Balasundaram *et al.*, 2009). Una combinación de baja concentración de NaCl y un pH alcalino alto facilitó el proceso de purificación, ya que está arriba del punto isoeléctrico de rLTB-Syn que es 4.6, con esto se logró obtener una pureza de más del 90% de rLTB-Syn después de la cromatografía de intercambio iónico y una concentración final de 82.6 μ g/mL. Además, se hizo la detección de la proteína rLTB-Syn por Western blot y los ensayos de ELISA mostraron que el GM1 había reconocido la conformación oligomérica nativa de rLTB-Syn, lo que indicaba un plegamiento correcto y formación de enlaces disulfuro, ya que este ensayo se basa en la unión específica de LTB pentámero a gangliósidos GM1 de las células epiteliales. Por lo tanto, estos datos fueron relevantes e indicaron que la proteína rLTB-Syn purificada es un antígeno funcional y puede usarse en futuras evaluaciones de inmunogenicidad en animales de prueba con el fin de generar una vacuna candidata contra las sinucleinopatías.

1.10 Conclusión

En el presente estudio, la expresión de rLTB-Syn se logró en *E. coli* con rendimientos convenientes (1.72 mg/g de biomasa) en poco tiempo. El método implementado para purificar rLTB-Syn es relativamente simple, compendio dos pasos y se logró generar una forma pentámera y antigénica de la proteína rLTB-Syn con alta pureza; ofreciendo un enfoque más simple, más corto y económico en comparación con otros métodos. Por lo que, se garantiza el uso de LTB-Syn expresado con *E. coli* en esquemas de inmunización de ratones para evaluar sus propiedades inmunogénicas y así avanzar en el desarrollo de vacunas contra las sinucleinopatías.

1.11 Referencias

- Al-Azzani M, König A, Outeiro TF. (2022). Production of recombinant alpha-synuclein: still no standardized protocol in sight. *Biomolecules*. 12(2):324.
- Balasundaram B, Harrison S, Bracewell DG. (2009). Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends Biotechnol*. 27(8):477-485.
- Datar RV, Cartwright T, Rosen CG. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology (N Y)*;11(3):349-357.
- Fahnert B, Lilie H, Neubauer P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 89:93-142.
- Fox BG, Blommel PG. (2009). Autoinduction of protein expression, *Curr. Protoc. Protein Sci*. Chapter 5 Unit 5 23.
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria, *Methods Enzymol*. 204-63e113.
- Stephens AD, Matak-Vinkovic D, Fernandez-Villegas A, Kaminski Schierle GS. (2020). Purification of recombinant α -synuclein: a comparison of commonly used protocols. *Biochemistry*. 59(48):4563-4572.
- Studier FW (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif*. 41:207-234.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol*. 185-60e89.
- Uma M, Rao PP, Nagalekshmi K, Hegde NR. (2016). Expression and purification of polioviral proteins in *E. coli*, and production of antisera as reagents for immunological assays. *Protein Expr. Purif*. 128, 115-122.

Apéndice 2

Reconocimiento de α -sinucleína en fibras nerviosas periféricas cutáneas con sueros anti-syn

2.0 Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo distintivo por la acumulación de α -sinucleína (a-syn) en inclusiones de cuerpos de Lewy (LB) y la pérdida de neuronas que contienen melanina (NM) y dopamina (DA) en la sustancia negra (SN). El plegamiento incorrecto y la propagación similar a un prión de la proteína alfa sinucleína (a-syn) es el rasgo molecular principal de los trastornos denominados colectivamente sinucleinopatías, entre los más importantes es la EP. Existe una correlación significativa de EP y melanoma que puede sugerir una fisiopatología compartida (Disse *et al.*, 2016; Rodríguez-Leyva *et al.*, 2016). Las neuronas y los melanocitos, ambos derivados de células neuroectodérmicas, pueden compartir vías de regulación y síntesis de proteínas que se vuelven disfuncionales en la EP y el melanoma (Pan *et al.*, 2012). Se ha demostrado que patologías de la piel que involucran proliferación de melanocitos como el melanoma o los nevus expresan abundantemente a-syn en la capa basal de la epidermis (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2017).

2.1 Objetivo general

Demostrar el reconocimiento de α -sinucleína en fibras nerviosas periféricas cutáneas con sueros anti-syn mediante ensayos de inmunohistoquímica.

2.2 Material biológico

Las biopsias de piel se obtuvieron por punción de 4 mm en el área retroauricular de pacientes de un centro de referencia terciario para dermatología y neurología de la clínica de trastornos del movimiento en el Hospital Central de San Luis Potosí, México y las biopsias de nevus se obtuvieron de un centro privado de dermatopatología en Florida. En total se analizaron 4 biopsias con nevus compuesto, 2 biopsias de piel de sujetos con EP y 2 biopsias de piel de sujetos sanos.

2.3 Metodología

2.3.1 Prueba de inmunohistoquímica (IHC) en biopsias de piel humana

Las biopsias se fijaron en paraformaldehído al 4% antes de incluirlas en bloques de parafina. Se recogieron cortes de tejido de cinco micrómetros en portaobjetos electrocargados (Biocare Medical LLC, Concord, CA). Los cortes se desparafinaron seguido de enjuagues con xileno y etanol para su rehidratación. La

recuperación del epítopo se realizó en solución DIVA decloacker (Biocare Medical LLC) en una olla a presión durante 3 min. Después, la peroxidasa endógena se eliminó incubando con H₂O₂ al 3%. Luego, las muestras de tejido se incubaron durante 15 min con un bloqueador de tinción de fondo no específico (Background Sniper; Biocare Medical LLC) y un bloqueador de proteínas de unión a biotina y biotina endógena (kit de bloqueo de avidina/biotina, Inc., Burlingame, CA) alternando con enjuagues con solución salina tamponada con Tris y Tween-20.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- α -sinucleína como control positivo y sueros de ratones de los grupos 2 (péptidos syn1-syn3), grupo 3 (biomasa *D. carota* línea MSRZ4) y grupo 4 (biomasa *D. carota* línea WT) como control negativo en diluciones de 1:100. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 60 minutos, seguidos de 30 minutos con un sistema de detección de estreptavidina-biotina (DAKO, Carpinteria, CA). La actividad de la peroxidasa se visualizó incubando las secciones con aminoetilcarbazol durante 9 minutos para obtener una coloración roja y contrastando con hematoxilina de Harris. Las fotomicrografías se tomaron en un microscopio óptico equipado con una cámara digital (Olympus; AmScope, Irvine, CA). Se capturaron tres campos por sección con el mismo aumento (10x y 40x) y se analizaron digitalmente utilizando el software Image Pro-Plus 7 (Media Cybernetics, Rockville, MD).

2.4 Resultados

2.4.1 Biopsias de nevus compuestos

Para demostrar unión de anticuerpos con α -sinucleína (a-syn) primero se realizaron los ensayos con tejidos compuestos nevus. En la figura 1 se muestra la estructura de la piel compuesta por la epidermis, la melanina en el citoplasma de los queratinocitos, y la dermis. Las células positivas para a-syn (rojo) se detectaron en toda la capa basal de la epidermis (Fig. 1; a). Mientras que el ensayo con suero del grupo G4 (biomasa *D. carota* no transformada WT), no se observó inmunoreacción positiva para a-syn en epidermis y dermis (Fig. 1; b). En la figura 2, se muestran la inmunopositividad en algunas células de la dermis (flechas azules) con el grupo G2 (Fig. 2, a). Por su parte, con los sueros de grupo G3 se observó inmunopositividad en células de la dermis (flechas azules) y en melanocitos de la epidermis (Fig. 2, b).

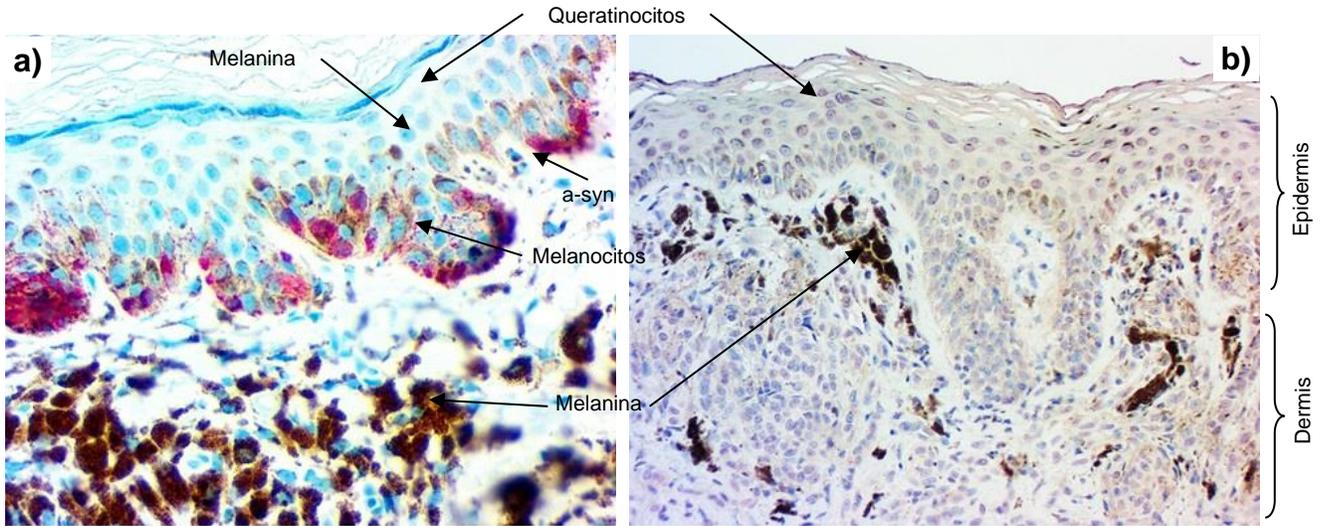


Figura 1. Expresión de alfa-sinucleína (a-syn) en tejido nevus compuesto revelada por inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal anti a-syn (a) y suero grupo G4 (b).

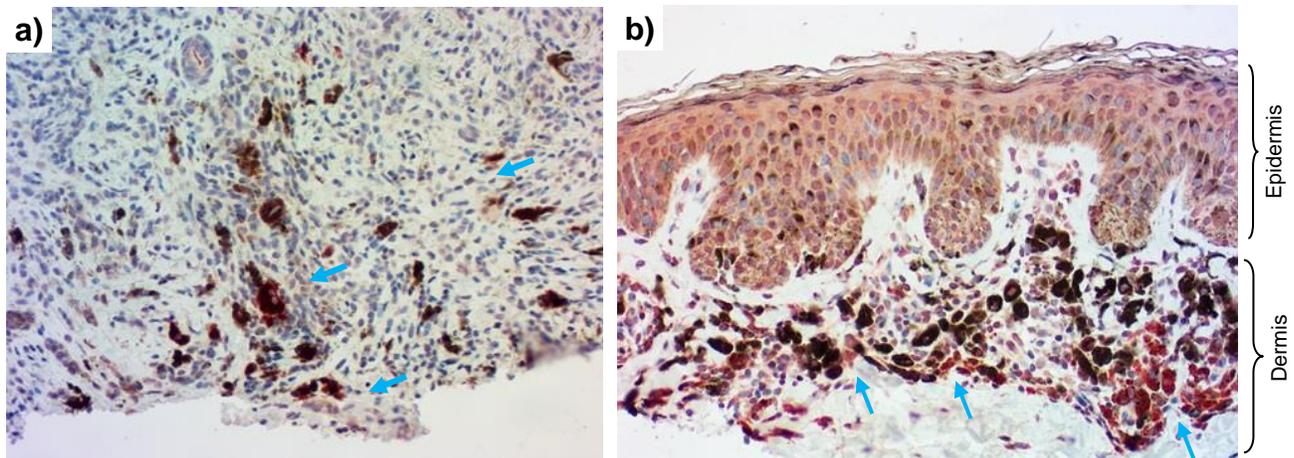


Figura 2. Ensayos de inmunopositividad en tejido nevus compuesto revelada por inmunohistoquímica con sueros del grupo G2 (a) y grupo G3 (b).

2.4.2 Biopsias de piel con Parkinson

Para continuar la demostración el reconocimiento de anticuerpos con α -sinucleína (a-syn) se realizaron ensayos con tejidos de sujetos sanos y con Parkinson. En la Figura 3, se muestran la expresión de a-syn en tejido de sujeto con Parkinson revelada por inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal anti a-syn. Se observaron múltiples células inmunopositivas para a-syn (rojo) en la capa basal de la epidermis y espacios intercelulares de melanocitos. En la Figura 4 a, se muestra el ensayo de inmunopositividad en algunos melanocitos de sujeto con Parkinson (flechas

verdes) utilizando suero del grupo G2. Mientras que en el ensayo con tejido de sujeto sano con el grupo 2 (péptidos) no se observó inmunoreacción positiva para a-syn en epidermis y dermis (Fig. 4, b). Los ensayos de inmunopositividad con el suero del grupo 3 (biomasa *D. carota* línea MSRZ4) en biopsia de piel de sujeto sano y sujeto con Parkinson reveladas por inmunohistoquímica, se muestran en la Figura 5. El resultado reveló que en los tejidos con Parkinson se observaron múltiples células inmunopositivas (flechas verdes) en el núcleo de melanocitos de la epidermis y en algunas células dispersas de la dermis (Fig. 5, a). Por el contrario, en el tejido de sujeto sano no se observan células inmunopositivas para a-syn en dermis y epidermis (Fig. 5, b).

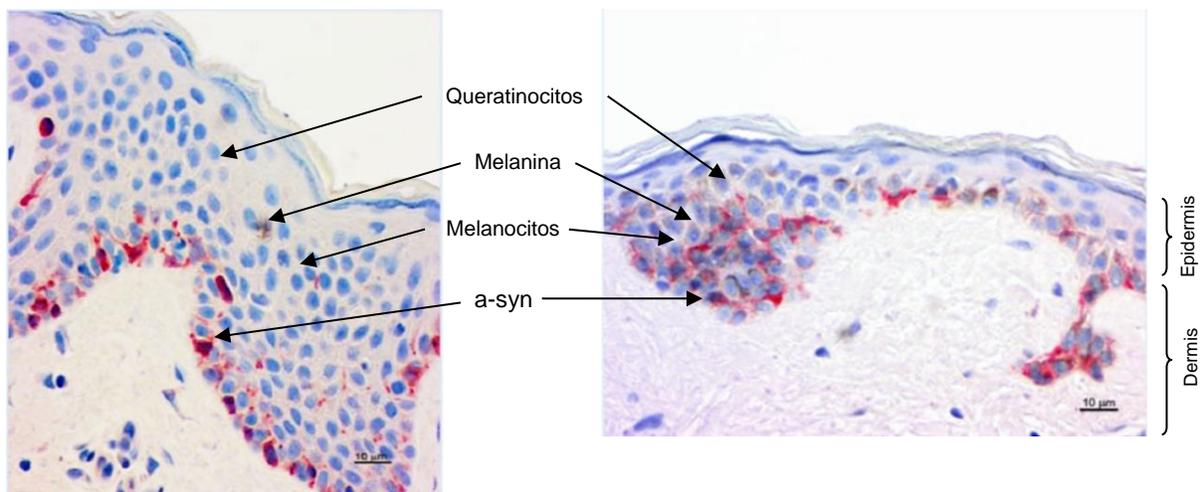


Figura 3. Expresión de alfa-sinucleína (a-syn) en tejidos de sujeto con Parkinson revelada por inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal anti a-syn.

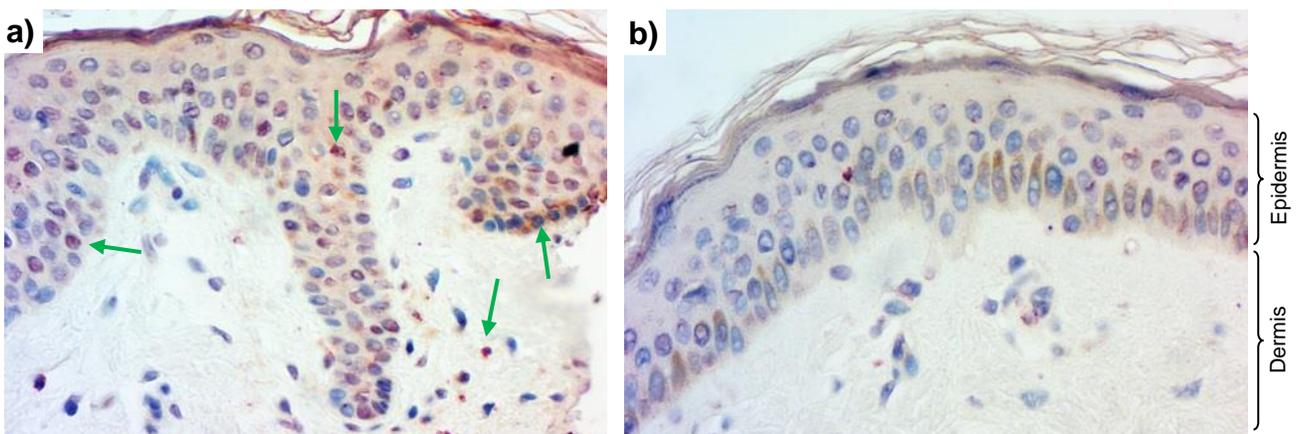


Figura 4. Ensayos de inmunopositividad en biopsia de piel de sujeto con Parkinson (a) y sujeto sano (b) reveladas por inmunohistoquímica con el suero del grupo G2 (péptidos).

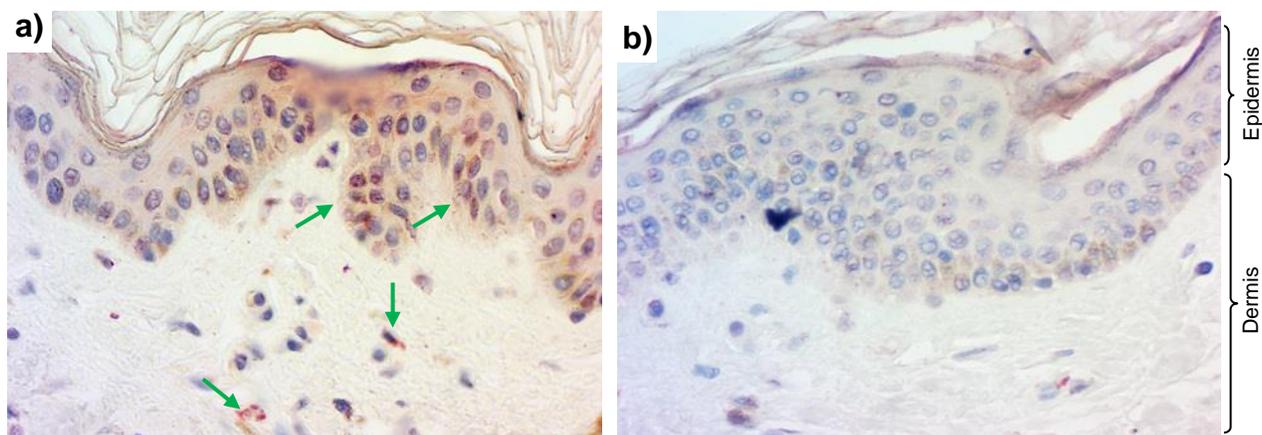


Figura 5. Ensayos de inmunopositividad en biopsia de piel de sujeto con Parkinson (a) y sujeto sano (b) reveladas por inmunohistoquímica con el suero del grupo G3 (biomasa *D. carota* línea MSRZ4).

2.5 Discusión

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza patológicamente por la formación de cuerpos de Lewy compuestos mayormente de agregados de α -syn, además de disfunción mitocondrial y mitofagia, neuroinflamación, estrés oxidativo y pigmentación de neuromelanina (NM) (Mehra *et al.*, 2019; Malpartida *et al.*, 2021). La síntesis de melanina cutánea inducida por la radiación ultravioleta (UVR) es un mecanismo de defensa contra el daño inducido por la radiación ultravioleta para el inicio de melanomas, mientras que el aumento la melanina sintetizada por melanocitos y neuronas dopaminérgicas (NM) ayudan a restaurar el daño o lesión neuronal inducida por el estrés oxidativo relevante en la EP (Trist *et al.*, 2019). Se ha propuesto por diferentes hallazgos que el melanoma y la EP podrían tener manifestaciones similares a una proteinopatía, ya que las células afectadas comparten un origen común embriológico y neural (Pan *et al.*, 2012). Además, los hallazgos de que α -Syn puede interactuar con la tirosinasa (TYR) e inhibir la tirosina hidroxilasa (TH), ambas enzimas involucradas en la biosíntesis de melanina y dopamina (DA), ha llevado a proponer que la α -Syn puede participar en la regulación de la síntesis de melanina (Wang *et al.*, 2016).

La detección de α -syn mediante biopsias de piel tiene numerosas ventajas para el diagnóstico de la EP, entre las que se destacan la alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad que también es conveniente y técnicamente confiable para los pacientes con EP (Donadio *et al.*, 2016). El presente trabajo confirmó la presencia de α -syn en tejidos cutáneos de nevos y sujetos con EP utilizando anticuerpos específicos monoclonales, por el contrario, en los tejidos cutáneos de sujetos sanos no se observó un patrón de sobreexpresión y localización de α -syn en la epidermis y dermis. La presencia y transferencia de α -syn en la EP y en nevos se puede atribuir a la capacidad de las neuronas y las células neuroectodérmicas para liberar agregados proteicos tóxicos por los exosomas (Vella *et al.*, 2008).

La aparente reacción positiva (color rojo) en los melanocitos de la epidermis se observó por primera vez en los tejidos con nevos utilizando suero de ratones inmunizados con biomasa de zanahoria (G3), así como también estuvo presente en queratinocitos de la dermis. A pesar de no tener la reacción positiva de α -syn como se esperaría en la capa basal de la epidermis, la reacción positiva puede ser atribuída a un reconocimiento de anticuerpos dirigidos a los tres epítopes nativos de la proteína α -syn mal plegada y no a una α -syn completa como están diseñados los anticuerpos monoclonales comerciales. Para el caso de los tejidos con EP también se logró observar una aparente reacción positiva en el citoplasma de los melanocitos (color en rojo) de la epidermis con sueros del G2 y G3, en comparación con las muestras de sujetos sanos. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes pues aún es necesario probar una dilución adecuada de anticuerpos, el uso de biopsias como melanomas, el método de fijación, y otras técnicas como la inmunofluorescencia para confirmar la presencia de α -syn, con el fin de poder diagnosticar la EP utilizando anticuerpos de bajo costo a partir de la inmunización con biomasa de zanahoria. Además, se necesitan neuropatólogos para analizar los resultados de la biopsia y técnicos experimentales para realizar los procedimientos de biopsia. En un futuro próximo, es factible que la biopsia cutánea se convierta en una herramienta ampliamente aceptada y de alta calidad para el diagnóstico de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas.

2.6 Conclusión

En conclusión, la detección de agregados de α -syn mediante biopsia de piel puede ser un método potencial de diagnóstico de EP con mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Además, es conveniente y muy aceptable para los pacientes. En este trabajo se confirmó que hay una inmunoreacción positiva en células de la epidermis y dermis en las biopsias de piel de sujetos con nevus compuesto y Parkinson. Por lo que este estudio abre vías de investigación experimentales y terapéuticas, brindando una conexión entre la patología cutánea y la neurodegeneración a través los patrones de agregación de α -syn.

2.7 Referencias

- Disse M, Reich H, Lee PK, Schram SS. (2016). A review of the association between Parkinson disease and malignant melanoma. *Dermatol. Surg.* 42:141–146.
- Donadio V, Incensi A, Piccinini C, Cortelli P, Giannoccaro, MP, Baruzzi, A, Liguori, R. (2016) Skin nerve misfolded α -synuclein in pure autonomic failure and Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2016;79(2):306–316.
- Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, Wade-Martins R, Ryan BJ. (2021). Mitochondrial dysfunction and mitophagy in parkinson's disease: from mechanism to therapy. *Trends Biochem Sci.* 46(4):329–343.
- Mehra S, Sahay S, Maji SK. (2019). α -Synuclein misfolding and aggregation: implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta (BBA) Proteins Proteom.* 1867(10):890–908.
- Pan T, Zhu J, Hwu W-J, Jankovic J. (2012). The role of alpha-synuclein in melanin synthesis in melanoma and dopaminergic neuronal cells. *PLoS One*; 7:e45183.
- Rodríguez-Leyva I, Chi-Ahumada E, Mejía M, Castanedo-Cazares, JP, Eng, W, Saikaly, SK, Carrizales, J, Levine TD, Norman, RA, Jimenez-Capdeville, ME. (2017). The Presence of Alpha-Synuclein in Skin from Melanoma and Patients with Parkinson's Disease. *Mov. Disord. Clin. Pract.* 4(5):724-732. Published 2017 Jun 1. doi:10.1002/mdc3.12494.
- Rodríguez-Leyva I, Jimenez-Capdeville ME, Chi-Ahumada E, Eng W, Saikaly S, Carrizales-Rodríguez J, Castanedo-Cazares J, Norman R. (2016). Expression of proteinopathies in the skin: alpha-synuclein in cells derived from the neural crest and in Parkinson disease. *Neurology*; 86 (16 Suppl):P6. 238.
- Trist BG, Hare DJ, Double KL. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 8(6).
- Vella LJ, Sharples RA, Nisbet RM, Cappai R, Hill AF. (2008). The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J.* 37:323–332.
- Wang JX, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M. (2016). Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *J Cell Commun Signal*;10:191–196.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales

Cuernavaca, Morelos, 21 de marzo del 2024.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **“Escalamiento del proceso de producción de la proteína antigénica LTB-Syn empleando suspensiones celulares de *Daucus carota* y evaluación de su inmunogenicidad”**, que presenta el **C. Christian Carreño Campos**, del Programa de Posgrado Doctorado en Ciencias Naturales, bajo la dirección de la DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA y codirección del DR. SERGIO ROSALES MENDOZA, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA (directora de tesis, CEIB UAEM)

DR. SERGIO ROSALES MENDOZA (codirector de tesis, UASLP)

DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL (CEIB UAEM)

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA (CEIB UAEM)

DRA. MARIA ESTHER JIMÉNEZ CATAÑO (UASLP)

DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE (UNAM)

DRA. VERONICA RODRÍGUEZ LOPEZ (FF UAEM)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2024-04-09 15:41:57 | Firmante

J4APBQZ4MkELRM0w6caRJKQCup3b3B80oQ97YPzj+9QogIRKY3hjlZloyN9M/+QyaU3SzwNHAGonweEMJnhtquc8+Gl4b2PqXpW4gaBFAxNyqBTAlDKM51Cj8kWiGrxchNf20DqKxWYx3b83K2wt01p8+iD66cqlMjVcbA/ys8/MSrLT0UZfAhY1Bh/pwV8MiAVtb5HKjiA02rTXL2Yo5Id+Kilj8nqEIMBvvnwQ12uUGg0LBwYmA3j/mYu04t/sEW1ZcqsW15ZO9gC2G0EBuVRTV13t/65unL+BdhMcF4kdQlwtzv6Vlwe7wYHOsbUKRLEeSeQrBYKZR3Nwkg==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2024-04-09 16:54:44 | Firmante

QPJe4ad/fNF8dz6nyk05mPh6nzcKhrJ9oh5p8sOVHMi5p43zvJvq576iIP7QD50g1JeiJsovXsu5qJa9tIAOMf0nhKwbPL5fhhJZhae5bRng2ly17WXg04RVWkg7CV20MxcwWSs1sF0GyiHC9p7IREqS8p1XK6cDrMGcoARl4QDUdUPUAa/GrpWzYLSUq5ScX2CvrozjDc/E7u+Lo/sMPn/moNO/khY TIRcAXHspsf2h5wq70vIIBvSVWV4zPaf89DINILwVpisa0gm11CH0aM00IlgKsjcxa5Kvw3VPp3F57UJeZBJG1Z35qRK1tM84nezy2q7wFgLD3MGqRIPw==

MARIA ESTHER JIMÉNEZ CATAÑO | Fecha:2024-04-09 20:23:16 | Firmante

JiA6Yiz7rbBs8EKJINs5OItE8MFQIVVgGq7zephHOjtNvDT12ABG+hRb0efaiFQcEIXUEkWCDCGPI0QAu7pTtGxeO96OkpJB3WTN3jIMmBQv/sfsoCBWL8CtvYBfJb71zbqfXiKQBMyL+LxORrNWF30ZUV3WT0ebbfD92iw3+quv5rdKDWi6q+AsZsI50e8cFjogtv9OAlr/eGKly/uv1vAl3/lwWnqFj40IrxnP4nPzCOyQSa+Vaf09cZvR+ihSaLVAc0JiHF1Ibkm951S8fpylXnCZR0Wry2eTjsLR6wfk5mAnYF8mg0mz4sxb0ltGESUYfP00pb/EUWekT1HQ==

SERGIO ROSALES MENDOZA | Fecha:2024-04-10 10:57:35 | Firmante

KzIM3eWBQn1PTiemc/hEq6xy1ufRBgYGuYmOikpLqeJpjiWnNFW0H39/ipOs9iZuK2cmxRcdP9TydUSyLlq6p0Fvc0NubZIIbz4ZyIUehyGibh/qIUOJQiHS3wjxdowS9xJoscylID+bD5Xi+Ili5435K6bKr+Iacbdv9q/4XVdzWSVctIPmlyXnwA8nkCrMrlFtctD0gdBzj8pBGJoGq6gLGy/oqvlbGzCvnkeuucwTzoNFKlgXuqDrJVTZNw5whQ5Klybyk1w/uud2N6uU+MwBdgVCLxRa8cvyM0aia/6Mj7TvyZyChNrtRJIhryuPVACenyr7gnYluKClKw==

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2024-04-10 17:18:04 | Firmante

b3mA90EtsQ0bjs75nxwYX57303bUnDerqd8PWXZoR7ZdR2ExygJFSYseGq7Vb+iwNaVxeQ/OGnVQZSx6y7MtzX8fmTIIOCN+XTbmzG0Box55llorbXYEwRcQ/h1cpILSPUspoAPK8GpgxwCeu+GhjASK+FlHxjBHp5OB7WbKdyFMCCm04qTIIHRJUJvDVG3Us11QVqu9dDbQp3j9nc1iYVdxK2BS4UgimhIWl624BS4KAXSWL43bgqJNNSU1oPJE077qwMz9od1su7BN0J+s9dZxhhSteTKa8y3B5EWM9SPqZ94JKyvamLEo/Bw7QYS20mlR0YUSfC1g6lphg==

EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE | Fecha:2024-04-11 15:13:21 | Firmante

EkXP0jAsOivMtcBdbar4wycuCALxEkqNuyN73q63f8PAYjz3OYTNn8HWK3wC3VXXZtTf4taEvFfdNZ9vrzZbSNWY3pTrQb8ghv8AnNsWaeHtMt0mNy/5SCQ+5N9/HviX00xsWJbiUUt25YBnVERXA/I4yFKc4dU74t8s0vUS1Oeis4WrwWZmkk6F4PaZRHUnCobWzll2j3+Fgig6EMjZ6IKNNIjHF2c+IMMLtUpQLO50/c9ajPYPIppxSEmE8leUsNTTMDYEBadAZyZ8ihLJ1UGbILSqqSPo2a/7MBt1BK/ggQcn7U6GX4MWr/36HfmpgGdR/7fGv00sRDBw==

VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha:2024-04-12 14:53:44 | Firmante

VY/dOOAf97eLvjZ6W/nz9oR7XbVm7AnJG6Ljqyl7qZXRN10epnBqUyzLBPk03n2BZNFsHCqHNxKqsXEafeflLRAutzjhSPkb/obbckmOf5tNB6G6/Bln5nLFZesAuQtJ8FdcE3mR1FXY4I6ObA8lcGBGUDBw5xEMsctyV+BGgKSVRm+US4MNU0HhKZfoJ6aSSirFQqiN28hgjHi4goGHO9zmWcD2Eee6SMOwsQyPHUR4kFw367eTisiYq75l2p5bPrO6fJxainls8qdGOCNvJHDwj75F2hwjRTsonHtSv8zR3VU6gSMimxBICynU5z8oUrxyvU7sJ8ywhdZ06dtpQ==

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



Zlq8Undjb

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TelopqQDCJuRQmTs8W4SNC3fGJh5PbY3>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029