



## “ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *IN VITRO* DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Daucus carota* PRODUCTORES DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA LTB-Syn, RELEVANTE EN LA ENFERMEDAD DEL PARKINSON”

Christian Carreño Campos<sup>1</sup>, Sergio Rosales-Mendoza<sup>2</sup>, Iván Arévalo-Villalobos<sup>2</sup>, María Luisa Villarreal<sup>1</sup> y Anabel Ortiz Caltempa<sup>1</sup>

Laboratorio de Plantas Medicinales (CEIB)<sup>1</sup>, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, C.P. 62210, Avenida Universidad #1001, Cuernavaca, Morelos, [chrcam12@gmail.com](mailto:chrcam12@gmail.com)

Laboratorio de Biofármacos Recombinantes<sup>2</sup>, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, 78210, SLP México.

Palabras clave: Parkinson, *Daucus carota*, LTB-Syn

**Introducción.** Las enfermedades neurodegenerativas (NDs) tienen un gran impacto en la salud humana a nivel mundial, y a la fecha no existen tratamientos efectivos disponibles para muchas de ellas. Como alternativa terapéutica para enfermedades como Alzheimer y Parkinson, se ha propuesto el desarrollado de vacunas orales contra las NDs, a partir de sistemas basados en plantas transgénicas como fuentes de biofármacos recombinantes (1). Recientemente se generaron callos transgénicos de zanahoria que expresan una proteína quimérica (LTB-Syn) compuesta por la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) y tres epítopes de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, los cuales son relevantes para la enfermedad de Parkinson (2).

El trabajo que aquí se presenta consiste en establecer cultivos *in vitro* de *Daucus carota* productores de la proteína LTB-Syn, que serán llevados a suspensión para luego escalarse en biorreactores *airlift* de 2l.

**Metodología.** Las líneas de callos transgénicos de *Daucus carota*, se establecieron en medio MS basal sólido (3) suplementado con 30g/L de sacarosa, 2,4-D (2mg/L) y cinetina (2mg/L). El pH del medio se ajustó a 5.7 antes de esterilizar (15 min a 120°C), se mantuvieron a 25±2°C en condiciones de luz constante (24  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y fotoperiodo (16hrs luz/ 8hrs oscuridad) durante 30 días. Los cultivos de células en suspensión se establecieron en medio MS líquido con los mismos nutrientes mencionados arriba con un inoculó del 10% de células en matraces Erlenmeyer de 250ml en condiciones de luz constante a 115rpm. Posteriormente se realizó una cinética de crecimiento de 45 días con sacrificios de tres matraces para mediciones analíticas cada 3 días. Las muestras se filtraron para determinar el peso fresco y se colocaron en la liofilizadora para establecer el peso seco empleando una balanza analítica. Durante la cinética se verificó el pH, viabilidad, PF, PS y consumo de azúcares. La extracción y cuantificación de la proteína quimérica LTB-Syn de la línea Z4 se realizará siguiendo los protocolos previamente reportados (2, 4).

**Resultados.** Se obtuvieron callos con características morfológicas de coloración crema-amarillo, nodulares y

friables entre los días 15 y 20. La cinética de las suspensiones celulares de la línea Z4 mostraron una  $\mu=0.06$  d<sup>-1</sup> y un Td=10 d<sup>-1</sup>. La captación de sacarosa fue absorbida por completo después de 15 días, el pH del medio inicio con 4,9 y aumento a 7,3 al día 45 (figura 1). La viabilidad celular inició con el 100% de células vivas y al día 40 se observó una caída del 20% (figura 2).

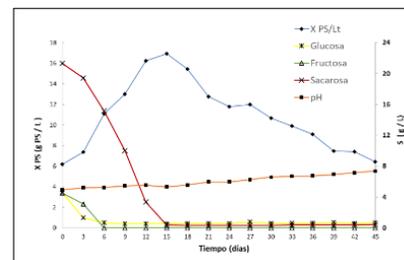


Figura 1. Parámetros cinéticos de células en suspensión en matraces de 250ml de la línea Z4 de *Daucus carota*

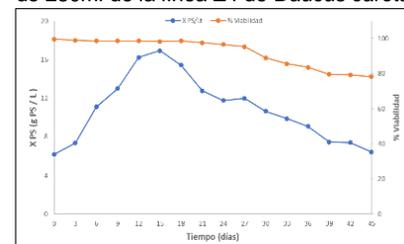


Figura 2. Porcentaje de viabilidad y peso seco de células en suspensión en matraces de 250ml de la línea Z4 de *Daucus carota*

**Conclusiones.** Se optimizaron por primera vez las condiciones de cultivo *in vitro* en callos y células en suspensión de la línea transgénica Z4 de *Daucus carota* productoras de la proteína quimérica LTB-Syn, para su posterior escalamiento en biorreactor *airlift* de 2-L.

**Agradecimientos.** A CONACyT por la beca otorgada para la realización de este proyecto No. 858164.

**Bibliografía.**

1. Arevalo-Villalobos, J. Rosales-Mendoza S. y Zarazua, S. (2017) *Expert Rev Vaccines*, (2):151-159.
2. Arevalo-Villalobos J, et al. (2017). *Planta.*; 245(6):1231-1239.
3. Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
4. Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002) *Transgenic Res* 11:479-493.

