



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

# **Desarrollo de una plataforma de expresión de proteínas recombinantes a través del bombardeo de suspensiones vegetales**

**TESIS**

Que presenta

**IBT. CRISTIAN EDUARDO FÉLIX OVALLES**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencia**

**Y**

**Tecnología de Alimentos**

Directores

**Dra. Lourdes Janeth Germán Báez**

**Dr. Angel Valdez Ortiz**

Culiacán, Sinaloa, México

Febrero de 2017

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética, del programa de posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Estuvo bajo la dirección de los doctores Lourdes Janeth Germán Báez y Angel Valdez Ortiz, y contó con la asesoría del Dr. David Ulises Santos Ballardo.

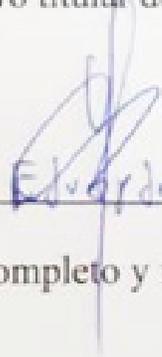


# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

## CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Sinaloa el día 18 del mes de julio del año 2020, el (la) que suscribe Cristian Eduardo Félix Ovalles alumno (a) del Programa de con número de cuenta 146602-1, de la Unidad Académica Maestría en Ciencia Y Tecnología de Alimentos , manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Angel Valdez Ortiz y cede los derechos del trabajo titulado “Desarrollo de una plataforma de expresión de proteínas recombinantes a través del bombardeo de suspensiones vegetales”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

  
Cristian Eduardo Félix Ovalles

Nombre completo y firma

## **AGRADECIMIENTOS**

A la universidad Autónoma de Sinaloa, en especial a la facultad de Ciencias Químico-Biológicas y a la maestría en ciencia y tecnología en alimentos, por permitirme ser parte del programa de posgrado.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

A los Doctores y Maestros de la MCTA por compartir sus conocimientos con el fin de emplearlos durante la realización de la maestría, así como el apoyo por parte de todos ellos para resolver dudas y comentarios.

A mis directores de tesis, la Dra. Lourdes Janeth Germán Báez y el Dr. Angel Valdez Ortiz, por su apoyo para realizar de manera acertada el proyecto de maestría y sobre todo por la oportunidad de permitirme formar parte del equipo de trabajo del Lab Big.

A mis compañeros de generación, a todos y cada uno de ellos agradezco las experiencias vividas a lo largo de toda la maestría.

A mis compañeros y amigos de laboratorio; Claudia, Karelia, Marely, Alejandra, Daniela, jhesu, Marco y al Sr. Humberto.

A mi familia por todo su apoyo durante mis estudios.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	v
	<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	vi
<b>I</b>	<b>RESUMEN</b>	1
	<b>ABSTRACT</b>	3
<b>II</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>III</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	7
	<b>A BIOTECNOLOGÍA</b>	7
	1 Biotecnología vegetal	8
	a Cultivo de tejidos	8
	b Transformación genética	10
	1) Métodos de transformación genética	10
	a) Electroformación	11
	b) Microinyección	13
	c) <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
	d) Biobalística	15
	2) Genes reporteros	17
	3) Genes marcadores de selección	20
	2 Expresión de proteínas recombinantes	22
	3 Sistemas de expresión de proteínas	23
	a Bacterias	23
	b Levaduras	24

c	Plantas	24
d	Células vegetales en suspensión	25
1)	Ventajas de las células vegetales en suspensión	27
2)	Células de tabaco NT1	28
<b>B</b>	<b>ALIMENTOS FUNCIONALES</b>	<b>30</b>
1	Compuestos nutraceuticos	31
2	Proteínas	32
a	Péptidos bioactivos	33
<b>C</b>	<b>AMARANTO</b>	<b>35</b>
1	Proteínas del grano de amaranto	36
a	Amarantina	37
b	Manipulación molecular de la amarantina	38
c	Expresión de amarantina recombinante en sistemas vegetales	39
<b>IV</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>42</b>
<b>V</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
A	OBJETIVO GENERAL	43
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
<b>VI</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>44</b>
A	MATERIALES	44
1	Material celular	44
2	Medios de cultivo	44
3	Patrones primarios (stock)	44

4	Vectores de transferencia genética	45
<b>B</b>	<b>METODOS</b>	<b>48</b>
1	Técnicas de cultivo y preservación	48
	a Mantenimiento de callos celulares	48
	b Establecimiento de suspensiones celulares	48
	c Conteo celular	49
2	Transformación Genética mediante Biobalística	51
	a Preparación del material celular	51
	b Preparación de las micropartículas de oro	51
	c Cobertura de microcarriers con ADN	51
	d Preparación del material celular	53
	e Bombardeo de las suspensiones celulares	53
3	Análisis bioquímico de las de las células transformadas	54
	a Expresión transitoria del gen <i>gusA</i>	54
	b Crecimiento en medio selectivo a higromicina	55
4	Análisis Molecular	55
	a Extracción de ADN	55
	b Análisis de PCR	56
5	Análisis de la expresión de Bioamarantina en células transformadas	57
	a Extracción de proteínas	58
	b Análisis electroforético (SDS-PAGE)	58
	c Detección inmunológica por Wenster Blot	59

6 Diseño Experimental	60
<b>VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	61
A Características de crecimiento celular de Tabaco NT1	61
1 Mantenimiento de callos celulares	61
B Transformación genética	61
1 Análisis de expresión transitoria del gen <i>gusA</i>	61
2 Análisis de los factores del diseño experimental	64
a ANOVA Multifactorial	64
b Presión de disparo	65
c Distancia de disparo	67
d Pretratamiento con solución osmótica	70
3 Confirmación de las células transformadas mediante selección	72
C Análisis molecular de las células transformadas con el plásmido bioamar KDEL	74
D Análisis inmunológico por Western blot	76
<b>VIII CONCLUSIONES</b>	80
<b>IX BIBLIOGRAFÍA</b>	81
<b>ABREVIATURAS</b>	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Representación esquemática de los principales métodos de transformación genética vegetal	12
2	Mapa genético del vector de transformación genética pCAMBIA1304	46
3	Mapa genético del vector de transformación genética pBioamarKDEL	47
4	Calculo del número celular utilizando la cámara de Neubauer	50
5	Pistola PDS-1000/He BioRad	52
6	Expresión transitoria del gen <i>gusA</i> en células de tabaco NT1	63
7	Prueba Fisher LSD $\alpha > 0.05$ para el factor presión de disparo	68
8	Prueba Fisher LSD $\alpha > 0.05$ para el factor distancia de disparo	69
9	Prueba Fisher LSD $\alpha > 0.05$ para el factor pretratamiento con solución osmótica	71
10	Células crecidas en medio selectivo a higromicina	73
11	Análisis molecular de PCR en clonas de tabaco generadas en medio selectivo utilizando el vector pBioamarKDEL	75
12	Análisis de expresión de Bioamarantia en callos celulares de tabaco. SDS-PAGE	77
13	Análisis inmunológico Western Blot	79

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Genes reporteros utilizados en la transformación de plantas.	19
2	Antibióticos tóxicos y genes marcadores utilizados para selección positiva de células vegetales transgénicas.	21
3	Comparación de los principales sistemas de producción de proteínas recombinantes con fines para beneficio humano.	29
4	Productos alimenticios con efectos nutracéuticos	34
5	ANOVA Multifactorial.	66

## I RESUMEN

La biotecnología vegetal es una poderosa herramienta que ha tenido avances interesantes en el uso de organismos eucariotas, tales como células vegetales, para su uso como biorreactores para la obtención de compuestos de alto valor como pueden ser proteínas, ácidos grasos, antibióticos entre otros, los cuales tienen un amplio rango de aplicaciones industriales. Actualmente existen diferentes sistemas de producción de proteínas recombinantes, de los cuales, el empleo de suspensiones celulares vegetales, ha recibido gran atención en los últimos años, debido a que posee una combinación de los beneficios de sistemas que utilizan plantas completas y de los que usan cultivos celulares animales y microbianos. Hellwig y col. (2004) demostraron que la aplicación de este método genera una serie de ventajas, como: rendimientos aceptables, mayor rapidez, menor gasto de recursos, consistencia en calidad de producto, posibilidad de generar modificaciones postraduccionales en las proteínas sintetizadas, menor riesgo de contaminación y mayor simplicidad en el procedimiento de aislamiento y purificación. Para la expresión de proteínas recombinantes se han establecido, hasta hoy, suspensiones celulares de diversas plantas como arroz, soya, tomate y tabaco, siendo este último el modelo más utilizado debido a que su transformación y propagación es fácil, además de que presenta características de crecimiento adecuado. Para potenciar la expresión de proteínas recombinantes en sistemas de suspensiones celulares se han utilizado técnicas de mejoramiento genético, como es la transformación mediante biobalística, por la cual se puede lograr la expresión de proteínas recombinantes mediante la combinación de diversos factores

como son la adición de un pretratamiento con medio osmótico, la presión y distancia de disparo.

En base a lo anterior, en el presente trabajo se propuso como objetivo: Establecer un sistema de transformación genética por biobalística, que permita la expresión de proteínas recombinantes en suspensiones celulares de tabaco. Se evaluó el efecto de tres factores sobre la expresión del gen reportero *gusA*: pretratamiento con medio osmótico (0.5 M manitol, 0.5M sorbitol, 0.25M manitol + 0.25M sorbitol), presión de disparo (900 y 1350 psi) y distancia de disparo (7 y 13 cm), encontrándose diferencia significativa en la aplicación de un pretratamiento con medio osmótico en todos los niveles sin embargo no se encontró diferencia significativa en la presión y distancia de disparo. El análisis de varianza multifactorial indicó las mejores condiciones donde se obtuvo alrededor de 60% de eficiencia de transformación (900 psi, 7 cm y pretratamiento con 0.5M sorbitol). Para validar estas condiciones se realizó la expresión de una proteína recombinante modelo, por lo cual se transformó con el plásmido BioamarkDEL, teniendo en un conteo preliminar 200 colonias crecidas en medio selectivo, subcultivando en medio selectivo se logró eliminar los falsos positivos y mediante un muestreo totalmente al azar se seleccionaron 20 colonias para el análisis molecular de PCR. El análisis de PCR dio como positivas 4 colonias las cuales se consideraron eventos de transformación estables obteniendo así un 20 % de eficiencia de transformación estable, estas colonias fueron sometidas al análisis inmunológico por western-blot, en el cual se observó 1 colonia positiva a la expresión de la proteína recombinante, por lo que se comprueba que el método de biobalística es un 25% eficiente para la transformación y expresión de proteínas recombinantes.

## **ABSTRACT**

Plant biotrecology is a powerful tool that has made interesting advances in the use of complex organisms such as plant cells for use as bioreactors to obtain high value compounds such as proteins, fatty acids, antibiotics among others which have a wide range of Industrial applications. Currently there are different systems for the production of recombinant proteins. Of these, the use of plant cell suspensions has received a great deal of attention in recent years because it has a combination of the benefits of systems using whole plants and those using animal and microbial cell cultures. Hellwig et al. (2004) demonstrated that the application of this method generates a number of advantages, such as: acceptable yields, greater speed, lower resource expenditure, consistency in product quality, possibility of posttranslational modifications in synthesized proteins, Risk of contamination, and greater simplicity in the isolation and purification process. For the expression of recombinant proteins, cellular suspensions of various plants such as rice, soybean, tomato and tobacco have been established until now, the latter being the most used model, since its transformation and propagation is Easy, as well as presenting adequate growth characteristics. To promote the system of cell suspensions have been used genetic improvement techniques to achieve the expression of recombinant proteins, a biotechnological tool for genetic improvement is the transformation through biobalistics whereby the expression of recombinant proteins can be achieved by combining Several factors such as the addition of a pre-treatment with osmotic medium, pressure and shooting distance. Based on the above, the objective of this work was to: Establish a genetic transformation system by biobalistics, allowing the expression of recombinant proteins

in tobacco cell suspensions. The effect of three factors on the expression of the reporter gene *gusA* :: pre-treatment with osmotic medium (0.5 M mannitol, 0.5M sorbitol, 0.25M mannitol + 0.25M sorbitol), firing pressure (900 and 1350 psi) and distance of (7 and 13 cm), with a significant difference in the application of a pre-treatment with osmotic medium at all levels, but no significant difference in pressure and shooting distance was found.

The multivariate analysis of variance indicated the best conditions where about 60% of transformation efficiency (900 psi, 7 cm and pretreatment with 0.5M sorbitol) was obtained for the expression of a model recombinant protein whereby it was transformed with the plasmid BioamarKDEL , Having in a preliminary count 200 colonies grown in selective medium, subcultivating in a selective medium the false positives were eliminated and by means of a completely random sampling 20 colonies were selected for the molecular analysis of PCR. The analysis of pcr gave as positive 4 colonies which were considered stable transformation events thus obtaining a 20% stable transformation efficiency, these colonies were submitted to the immunological analysis wenster-blot, in which 1 positive colony was observed to the expression Of the recombinant protein, so it is proven that the biobalistics method is 25% efficient for the transformation and expression of recombinant proteins.

## II INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene la información necesaria para la síntesis de proteínas. El descubrimiento del código genético abrió la posibilidad de obtener péptidos y/o proteínas a gran escala a partir de diversos organismos en los cuales no se producen de manera natural. A las proteínas obtenidas de esta manera se les conoce como proteínas recombinantes (PR). Éstas se pueden producir en microorganismos como bacterias, hongos, y levaduras, así como en líneas celulares cultivables de plantas las cuales han tomado gran importancia en los últimos años debido a sus excelentes características (Jonasson y col 2002; Palomares y col., 2004), otras opciones son animales y plantas transgénicas (Farrokhi y col 2009). La sobreexpresión de PR ofrece la ventaja de producir grandes cantidades de la proteína de interés con características similares a la proteína natural y de manera relativamente fácil y rápida. Esta tecnología cuenta con al menos 35 años y por su aplicación tanto en la industria farmacéutica y alimentaria, como en la investigación científica, se encuentra entre los desarrollos más importantes del siglo XX (Porro y col 2005). El procedimiento para producir una PR consiste en introducir el ADN que codifica para la proteína de interés, junto con sus regiones reguladoras, en el genoma de un huésped que realiza la expresión de la misma, para lograr esto es necesario un método de transformación genética eficiente, el cual permita transformar a las células de manera rápida y con una fácil selección de las células transformadas. Existen dos principales métodos de transformación genética los cuales son muy eficientes; la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* y la biobalística, del primero existen diversos reportes donde mediante este método se ha logrado transformar diversas especies de

plantas y cultivos celulares como el reportado por Santos-Ballardo y col (2012) donde se logró obtener clonas que expresaban una proteína recombinante modelo, sin embargo, este método cuenta con diversas desventajas como la exposición de la célula con la bacteria y los altos índices de contaminación. Un método alternativo para la transformación genética de plantas y células vegetales es la transformación por biobalística, el cual es un método directo por lo que no es necesaria la interacción con otros microorganismos además al ser un método robusto nos permite modificar diversas variables con la finalidad de aumentar su eficiencia.

Bajo este contexto, en la presente investigación se propuso como objetivo: Establecer un sistema de transformación genética por biobalística, que permita la expresión de proteínas recombinantes en suspensiones celulares de tabaco.

### III REVISIÓN DE LITERATURA

#### A BIOTECNOLOGÍA

La biotecnología se puede definir como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos u organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (Laguna-Fortiz, 2009).

La biotecnología ha evolucionado gracias al resultado de los avances tecnológicos en diferentes disciplinas del conocimiento como la biología celular, microbiología, genética, bioquímica, entre otras que sentaron las bases para su desarrollo y aplicación; lo que hoy conocemos como biotecnología moderna surge después de la descripción de la doble hélice del ADN, con lo que se logró el desarrollo de una serie de herramientas como la ingeniería genética y la transformación genética, mediante técnicas conocidas como “tecnología de ADN recombinante”, esta es la que nos permite introducir en plantas o diferentes organismos complejos, genes provenientes no sólo de otras especies vegetales, sino incluso de organismos de especies totalmente diferentes entre sí, como lo son hongos, virus, bacterias y animales, y puede ser utilizada para introducir determinados caracteres en las plantas, la aplicación más sobresaliente de esta técnica es la expresión de proteínas recombinantes específicas (Hodson-Jaramillo 2005).

Por su parte, la biotecnología vegetal es un área innovadora y en pleno desarrollo, que ofrece un gran potencial productivo, especialmente si se tiene en cuenta la cantidad de sustancias que producen las células vegetales con aplicaciones medicinales, farmacéuticas y alimentarias. En este sentido, las técnicas de

micropropagación y mejoramiento de plantas han permitido desarrollar procesos de producción de compuestos utilizando células vegetales en diferentes tipos de biorreactores (Stanton y col 2005).

## **1 Biotecnología Vegetal**

Puede definirse como la aplicación de la ciencia y la tecnología a las plantas, sus partes, productos y modelos con el fin de alterar materiales vivos o inertes para el desarrollo de conocimiento, bienes y servicios. Debido a que las plantas son los grandes fabricantes de oxígeno, son los componentes claves en los ciclos biológicos básicos ciclo del agua, formación del suelo, etc. Además, son la principal fuente de energía y material orgánico en los ecosistemas, por lo que han sido el objeto de estudio para el desarrollo de tecnología como la mejora postcosecha, la mayor productividad, mejora nutritiva, biocombustibles, fitoremediación y biofabricas (Cruz-Mendívil 2010).

### **a Cultivo de tejidos**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo aséptico de explantes (embriones, tejidos, células y protoplastos) en medios artificiales, de composición química definida y bajo condiciones ambientales controladas. Esta herramienta consiste en la multiplicación de copias genéticamente idénticas de plantas por reproducción asexual, esta nos permite producir y perpetuar a gran escala, plantas asépticas con características únicas y uniformes, tiene sus bases en dos principios fundamentales, plasticidad y totipotencia (Razdan, 2003; Cruz-Mendívil 2010).

La plasticidad se refiere a la capacidad de las plantas de adaptarse a diferentes condiciones ambientales, ajustando su morfología y fisiología a través de la variación genética y la plasticidad en su forma, constituye una parte importante de la habilidad de las plantas para sobrevivir en condiciones ambientales heterogéneas (Razdan 2003). En tanto que , la totipotencia, es una característica muy importante que se refiere a que todas las células vegetales, bajo estímulos específicos, son capaces de expresar el potencial genético completo de la planta fuente (Cruz-Mendívil 2010).

Entre las aplicaciones principales del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se encuentran: la producción de plantas libres de enfermedades, la micropropagación, conservación de germoplasma, transformación genética y producción de metabolitos secundarios (Razdan 2003).

La micropropagación comprende 5 etapas básicas: Selección y preparación del explante inicial; establecimiento de un cultivo aséptico; inducción y multiplicación de brotes; y aclimatación de las plántulas a condiciones *ex vitro* (Cruz-Mendívil 2010).

Las principales ventajas de esta herramienta son: una multiplicación asexual más rápida que la propagación de plantas con un ciclo de vida completo; salto del periodo de crecimiento de la planta debido a que se propagan plantas en estado adulto; establecimiento de bancos genéticos debido a las variantes entre las especies micropropagadas, además dicho proceso es llevado a cabo en espacios reducidos y periodos cortos de tiempo (Tiwari y col 2009).

## **b Transformación genética**

La transformación genética de especies vegetales es un mecanismo ampliamente utilizado dentro del campo de la biotecnología vegetal, aunque no reemplaza al mejoramiento genético tradicional, puede mejorar la eficiencia en el mejoramiento de los cultivos. Esta tecnología permite insertar genes foráneos dentro de un tejido vegetal receptor para la creación de plantas genéticamente modificadas, conocidas también como plantas transgénicas (Blanco y col 2003).

La transformación genética vegetal depende de la incorporación estable del transgen en el genoma de la planta huésped, para lo cual, se han desarrollado diversas estrategias, sin embargo, en la actualidad los métodos de transferencia genética de plantas más utilizados son la transformación mediada por *Agrobacterium*, y el bombardeo de partículas (Biobalística) los cuales se encuentran representados en la figura 1 (Mirkov 2003).

### **1) Métodos de transformación genética**

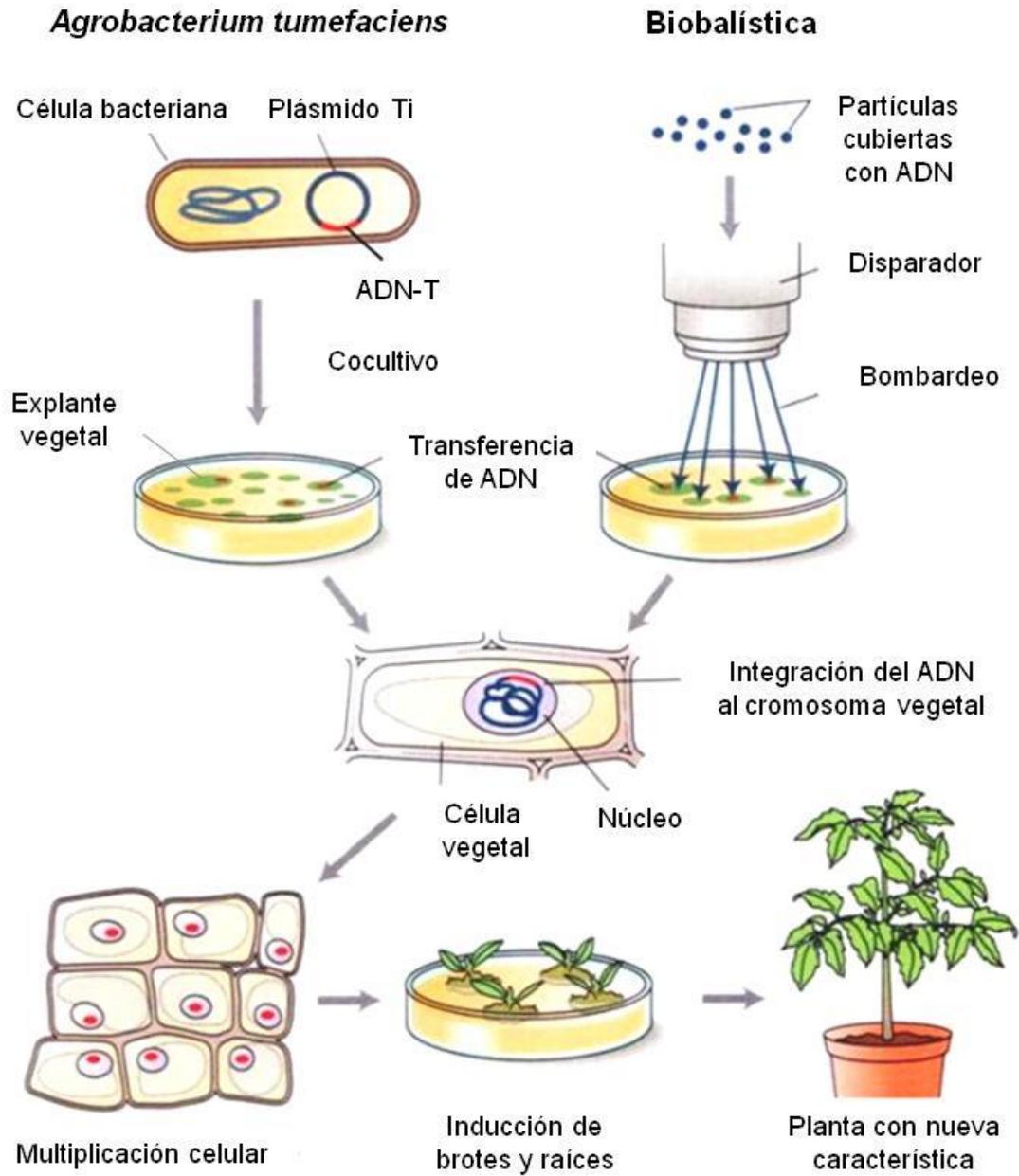
Los métodos de transferencia de genes pueden ser de dos clases: 1) sistemas de transformación indirecta y 2) sistemas de transformación directa.

La transferencia indirecta mediante la bacteria *Agrobacterium* es la más utilizada aprovechando la habilidad natural de la bacteria para actuar como ingeniero genético. El bombardeo de microproyectiles con ADN o Biobalística es el segundo método empleado, perteneciendo a los métodos de transferencia directa, otros métodos que se han desarrollado dentro de esta categoría son la electroporación, tratamientos con polietilenglicol (PEG), microinyección y el uso de microfibras (Sharma y col 2005).

Para la obtención de plantas transgénicas los principales elementos a considerar son: a) tener un sistema eficiente de regeneración, para la recuperación de las clonas transformadas evitando falsos positivos. b) una construcción genética; debe contener un promotor, gen de interés, marcador de selección y terminador. c) un sistema de transformación eficiente; el cual permita un alto número de clonas transgénicas. d) recobrar y multiplicar plantas transgénicas; un sistemas bien establecido de selección con antibióticos.

#### **a) Electroporación**

La electroporación es un tratamiento de naturaleza física, consiste en someter a la célula a altos voltajes, lo que causa temporalmente la formación de poros en la membrana, se usa en protoplastos, células intactas y tejidos. Aunque la transformación genética por este método ha sido efectiva, la eficiencia de transformación es significativamente baja. Se ha podida lograr expresión transitoria con esta técnica en protoplastos y células intactas de cebolla (Lindsey y Jones 1990) y la transformación



**Figura 1. Representación esquemática de los principales métodos de transformación genética vegetal. Adaptada de Mirkov (2003).**

en protoplastos de arroz (Shimamoto y col 1990) y en embriones de maíz (Songstad y col 1995).

Dentro de los factores que influyen en este sistema de transformación se pueden citar la intensidad del campo eléctrico, duración, número, intervalo entre impulsos, concentración de ADN, tipo de explante entre otros (Sharma y col 2005).

### **b) Microinyección**

La tecnología de microinyección en el caso de células vegetales ha mostrado gran dificultad para la introducción de material genético. Resultando incapaz de producir plantas transgénicas en número suficiente. Se utiliza una micropipeta con una punta muy fina (0.5-10  $\mu\text{m}$ ) por donde el ADN es transferido al interior de la célula, la cual es inmovilizada por un soporte sólido. El alto costo del equipo, la manipulación de células simples o pequeñas cantidades de ellas, uso de microscopio, precisión en la inyección, son algunas de las limitantes para el uso extensivo de este método (Sharma y col 2005).

### **c) Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens***

*A. tumefaciens* es una bacteria gram-negativa aeróbica y su capacidad patogénica está asociada a la presencia de un plásmido Ti (inductor de tumor) de más de 200 kpb que incluye un segmento denominado T-ADN (región del plásmido Ti que se transfiere) que contiene dos tipos de genes, los genes oncogénicos, que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de auxinas (AIA) y citocinina (2-isopentil-AMP) responsables de la formación del tumor, y los genes que codifican para la síntesis de opinas, compuestos formados de un amino ácido y un azúcar y que son excretados

por las células del tumor como fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria. Las cepas de *A. tumefaciens* son clasificadas de acuerdo al tipo de opina que producen, así tenemos cepas del tipo nopalina octopina, leucinopina y succinamopina. El T-ADN esta flanqueado, además, por dos repetidos directos de 25 pares de bases, lo que permite transferir dicha secuencia de ADN localizada entre estos bordes (Herrera-Estrella y col 2004).

El plásmido Ti contiene también los genes *vir* que participan en el proceso de transferencia del T-ADN. Esta región *vir* de 30 a 40 kpb aproximadamente, involucra ocho operones (*virA-virH*), de los cuales seis son esenciales (*vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E*, *vir G*) y dos no esenciales (*Vir F*, *vir H*) (De la Riva y col. 1998).

En la mayoría de las cepas empleadas para transformación genética vegetal, se sustituye el plásmido Ti, para esto, se emplea un sistema consistente en dos plásmidos (Cruz-Mendivil, 2010).

El primero contiene las secuencias del regulón *vir*, cuyos productos transfieren el ADN-T, el cual se encuentra en un segundo plásmido. Dicho ADN-T, ha sido modificado mediante la remoción de los genes oncogénicos responsables del crecimiento de tumores. Con esto se pueden incorporar casetes de expresión con genes de interés en el ADN-T, lo cual se logra mediante una inserción dentro de secuencias de clonación múltiple, asegurando de paso que, las células transformadas puedan regenerar plantas (Laguna-Fortiz, 2009).

La transformación genética mediada por *A. tumefaciens* es afectada por diversos factores, cepa y concentración de *A. tumefaciens*, método y duración de la infección, uso de células alimentadoras, acetosiringona (AS) y reguladores de crecimientos en el pre y cocultivo; así como la temperatura y duración del cocultivo (Sanjaya y Chan 2005). Otras desventajas de este método indirecto de transformación son la inserción de un bajo número de copias, lo que disminuye la probabilidad de que el proceso de transformación sea satisfactorio, es tejido dependiente, por lo que el proceso de transformación es diferente para cada tipo de explante, el riesgo de contaminación es muy alto y los explantes se vuelven un foco de contaminación que es complicado de eliminar, este método de transformación genética es dependiente de plantas dicotiledóneas (Laguna-Fortiz, 2009; Ikarán, 2012).

#### **d) Transformación genética mediante Biobalística**

El bombardeo de partículas se desarrolló en el año 1980 como un método alternativo para la transformación genética de plantas recalcitrantes a la transformación mediante *Agrobacterium*, en su mayoría cereales y leguminosas (Taylor y Fauquet 2002).

Esta tecnología involucra partículas metálicas microscópicas (0.4 a 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro) de oro o tungsteno cubiertas con el material genético y que son impulsadas a alta velocidad sobre un tejido blanco para permitir que dicho material sea liberado en el interior de la célula. Estas partículas son aceleradas mediante macroacarreadores de polietileno o de nylon (cilíndricos o de disco), que a su vez son impulsadas por la onda de choque causada por un gas acarreador (Helio) a alta presión, entonces, los

tejidos son colocados en una cámara bajo un vacío parcial, lo que evita el desaceleramiento de los microacarreadores como consecuencia de la fricción con el aire; al momento del bombardeo, el gas se deja pasar a una presión dada por la membrana de ruptura que al romperse impulsa las partículas cubiertas con el ADN hacia los tejidos blanco, quedando la membrana retenida en una malla. El impacto de las partículas sobre el tejido presenta un patrón circular de uno a varios centímetros dependiendo de la distancia al a que se coloca el tejido blanco (Teylor y Fauquet 2002).

Los primeros ensayos se limitaron a la expresión transitoria de genes marcadores, realizándose con células de cebolla, las cuales, permanecieron viables y mostraron la expresión del ácido nucleico foráneo, otros cultivos empleados fueron maíz, soya, trigo, frijol y arroz (Wang y col.1990). El primer sistema para impulsar los microproyectiles fue desarrollado por Sanford y col (1991), siendo modificado posteriormente para dar lugar a la pistola PDS-1000/He (Russell 2003).

El éxito del bombardeo depende de varios factores como son el tipo de explante, tamaño de las micropartículas y su preparación, presión de bombardeo, distancia recorrida por el ADN, nivel de vacío generado, cantidad y calidad del ADN, así como parámetros biológicos como el estado fisiológico del explante, ya que el tejido blanco debe ser capaz de recibir e integrar el ADN foráneo, estar bajo selección para asegurar un evento transgénico exitoso y además regenerar y producir plantas fenotípicamente normales y fértiles.

El uso de la biobalística permite la transformación de especies recalcitrantes a la transformación mediante *Agrobacterium*, como las monocotiledoneas, solo requiere

de la secuencia de ADN de interés, se puede introducir más de un gen y más de un plásmido a la vez, se elimina la interacción planta-bacteria y es un método práctico y robusto (Sanford y col 1990).

Existen diversos tratamientos los cuales incrementan la eficiencia de transformación; el tratamiento del tejido blanco antes y después del bombardeo ha tenido un efecto significativo en la frecuencia y éxito del evento de transformación (Taylor y Fauquet 2002).

Se han usado agentes osmóticos como sacarosa, manitol, sorbitol o una combinación de manitol-sorbitol, sometiendo el tejido varias horas antes y después del bombardeo. Se cree que el estrés osmótico previo causa un efecto de plasmólisis parcial en las células disminuyendo la presión en el interior, de esa forma, reduce o previene la muerte celular debido a la expulsión de protoplasma a través de las heridas causadas en la célula por la entrada de las microparticulas (sanford y col1991).

En varios estudios, el tratamiento de las células blanco con agentes osmóticos previo al bombardeo incremento la frecuencia y el éxito de la transformación (Suga y col 2004).

El mecanismo de integración del ADN externo a las células huésped es poco conocido, pero se sugiere que ocurre mediante un proceso llamado recombinación ilegítima. Este proceso se cree que ocurre en dos pasos; primero el ADN foráneo puede experimentar recombinaciones homologas y ligaciones previas a la inserción al genoma de la célula para crear arreglos del ADN introducido, que a su vez puede incluir fragmentos de plásmido y copias rotas del cassette de expresión. En la segunda

fase los arreglos de ADN son insertados en el genoma de la célula. La integración involucra mecanismos de reparación del ADN nativo y recombinación no homologa en los sitios de ruptura de la doble cadena en el cromosoma de la célula (Tzfira y col 2004).

## **2) Genes reporteros**

Una herramienta biotecnológica para la detección de células transformadas es mediante el uso de genes reporteros los cuales permiten identificar de manera visual a las células transformadas, algunos ejemplos son el gen *gusA*, el gen *luc* y el gen *gfp* (Brasileiro y Aragao 2001), de estos, el gen más ampliamente utilizado en la transformación de plantas es el gen *gusA* el cual fue aislado de *E. coli* y codifica para la enzima B-glucoronidasa, en este sistema la enzima cataliza el rompimiento de una amplia variedad de glucuronidos. En presencia del sustrato X-gluc (5-bromo-4 cloro-3 indolil glucuronide) la reacción produce un precipitado azul, lo que permite la localización espacial del gen. El gen *luc* es un reportero basado en la bioluminiscencia, las enzimas responsables de la producción de luz se llaman luciferasas, que emiten luz a una longitud de onda de 547 hasta 593 nm (Vázquez y col 2005). El gen *gfp* codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) es una molécula reportera usada para monitorear la expresión del gen en vivo y en tiempo real. La proteína GFP emite luz verde a (509 nm) cuando se excita con luz UV (495 nm) (Kitts y col 1995). En el cuadro 1 se pueden observar algunos de los genes de más utilizados para la transformación de células vegetales.

**Cuadro 1.** Genes reporteros utilizados en la transformación de plantas

Sustrato generado	Gen reportero	Abreviación	Fuente del gen	Método de detección
ONPG, X-gal	$\beta$ -Galactosidasa	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	Fluorométrico
MUG, X-gluc	$\beta$ -Glucuronidasa	<i>uidA (gusA)</i>	<i>E. coli</i>	Fluorométrico / histoquímico
Luciferina	Luciferasa	<i>Luc</i>	<i>Photinus pyralis</i>	Luminiscencia
Decanal	Luciferasa	<i>luxa, B, F</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	Luminiscencia
Acido oxálico	Oxalato oxidasa	<i>OxO</i>	Trigo	Histoquímico
Ninguno	Proteína verde fluorescente	<i>Gfp</i>	<i>Aequorea victoria</i>	Fluorescencia
Ninguno	Fitoeno sintasa	-	<i>Erwinia herbicola</i>	Visual

Adaptado de Miki y McHugh (2004).

### 3) Genes marcadores de selección

Debido a que la transformación en células vegetales es un evento de bajo porcentaje en eficiencia, es importante el uso de genes marcadores de selección los cuales le confieren a las células vegetales transformadas, resistencia a antibióticos y/o herbicidas (Vázquez y col2005).

Un gen marcador de selección ideal debe ser capaz de expresarse en cualquier célula o tejido y en un gran número de especies vegetales, y generalmente confieren características agronómicas a las células vegetales transformadas, como resistencia a algunos compuestos fito-tóxicos (antibióticos y herbicidas), la habilidad para utilizar una fuente de carbono no convencional o la capacidad de regenerar en ausencia de reguladores de crecimiento; estos genes de selección son introducidos al genoma de la planta junto con los genes de interés y pueden estar separados o físicamente ligados en el vector (Laguna-Fortiz, 2009; Cruz-Mendivil 2010).

El marcador de selección más utilizado es el gen de neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), que confiere resistencia a kanamicina (KM), mediante su inactivación por fosforilación; sin embargo, algunos cultivos (p. ej. cereales) exhiben una resistencia natural hacia la kanamicina, por lo que otros genes de selección como el *hptII* que codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa, la cual cataliza la fosforilación de la higromicina para su inactivación, o bien los genes de resistencia a espectinomicina y fosfinotricina, son bastante usados (Vázquez y col 2005). En el cuadro 2 se puede observar los genes marcadores de selección más utilizados en células vegetales.

**Cuadro 2.** Antibióticos tóxicos y genes marcadores utilizados para selección positiva de células vegetales transgénicas

<b>Antibiótico</b>	<b>Gen</b>	<b>Enzima</b>	<b>Fuente</b>
Kanamicina	<i>nptII</i>	Neomicina fosfotransferasa	<i>E. coli</i> Tn5
Higromicina B	<i>hpt</i>	Higromicina fosfotransferasa	<i>E. coli</i>
Estreptomina	<i>spt</i>	Estreptomina fosfotransferasa	<i>Shigella</i> Tn5
Cloranfenicol	<i>cat</i>	Cloranfenicol acetil transferasa	<i>E. coli</i> Tn5
Espectinomicina	<i>aadA</i>	Aminoglycosida-3"-adenil transferasa	<i>Shigella</i> spp.

Adaptado de Miki y McHugh (2004).

## **2 Expresión de proteínas recombinantes**

El ADN contiene la información necesaria para la síntesis de proteínas. El descubrimiento del código genético abrió la posibilidad de obtener péptidos y/o proteínas a gran escala a partir de diversos organismos en los cuales no se producen de manera natural. A las proteínas obtenidas de esta manera se les conoce como proteínas recombinantes (PR). Éstas se pueden producir en microorganismos como bacterias, hongos, virus y levaduras, así como en líneas celulares cultivables de insectos, plantas y mamíferos (Jonasson y col 2002; Palomares y col 2004), en sistemas de expresión de proteínas “sin células” y también en animales y plantas transgénicas (Farrokhi y col 2009). La sobreexpresión de PR ofrece la ventaja de producir grandes cantidades de la proteína de interés con características similares a la proteína natural y de manera relativamente fácil y rápida. Esta tecnología cuenta con al menos 35 años y por su aplicación tanto en la industria farmacéutica y alimentaria, como en la investigación científica, se encuentra entre los desarrollos más importantes del siglo XX. El procedimiento para producir una PR consiste en introducir el ADN que codifica para la proteína de interés en un vector de sobreexpresión (plásmidos, virus, cósmidos). El vector contiene un origen de replicación que le permite copiarse dentro de la célula hospedera, una región promotora que permite la producción de la proteína de interés, un sitio de clonación múltiple (SCM), que es una región que contiene diversos sitios de restricción que permiten la inserción de ADN entre ellos y en algunos casos, genes de resistencia a antibióticos y genes reporteros, que facilitan la selección de las colonias de bacterias que tendrían el vector con la información genética insertada (Guevara-Hernández y col 2013).

### **3 Sistemas de expresión de proteínas**

Un sistema de expresión de proteínas debe de presentar diferentes características, entre las que destacan la fácil manipulación del organismo, que permita modificaciones postraduccionales, además de ser de fácil escalamiento industrial (Morales-Camacho 2011).

#### **a Bacterias**

Los microorganismos más utilizados para la síntesis de proteínas recombinantes son las bacterias, más concretamente la especie *Escherichia coli*. Esta bacteria es fácil de cultivar y de modificar genéticamente. A nivel de síntesis de proteínas, es un trabajador rápido y de alto rendimiento, y puede acumular proteínas recombinantes en una proporción que puede llegar hasta el 80% de su peso seco, lo que hace que sea la primera posibilidad que se tiene en cuenta cuando se quiere expresar proteínas recombinantes (Morales-Camacho 2011).

Las bacterias son ideales para producir proteínas de tamaño pequeño que no requieran modificaciones postraduccionales. Pero al ser procariontes, no son tan idóneas para sintetizar proteínas de gran tamaño o procedentes de organismos superiores. Éstas últimas a menudo muestran plegamientos complejos que incluyen muchos puentes disulfuro o que necesitan la intervención de chaperonas celulares en el plegamiento, características no presentes en los procariontes. Además, muchas de estas proteínas requieren para su función la inclusión de modificaciones tras su síntesis, que no pueden llevarse a cabo en organismos procariontes. Un ejemplo de ello

es la glicosilación, esencial para la función de muchas proteínas eucariotas (Stanton y col 2005).

## **b Levaduras**

Las levaduras presentan muchas de las ventajas en cuanto a crecimiento de las bacterias (alto rendimiento, estabilidad de la cepa productora, crecimiento a alta densidad, productividad, crecimiento en medios baratos y químicamente definidos). Pero, además, como buenos eucariotas, son capaces de glicosilar y de plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro, ya que su proceso de producción es muy similar al de las células de mamíferos. La adición de una secuencia señal en el gen permite la excreción de la proteína al medio de cultivo, Además, algunas levaduras, como *S. cerevisiae*, tienen una larga historia de utilidad en procesos de fermentación industrial (Rader, 2008).

Otro aspecto en el que las levaduras se muestran como valiosos productores de proteínas recombinantes es la disponibilidad de algunos promotores muy fuertes y de regulación muy precisa, sobre todo en las levaduras metilotrofas, como *Pichia*, *Candida*, o *Hansenula* (Rader 2008).

## **c Plantas**

Las plantas, en comparación con los animales y los cultivos procedentes de animales, ofrecen una producción más segura y rápida, que requiere menos tiempo y es más ventajosa en términos de almacenamiento y distribución. En cuanto a seguridad, presentan menos riesgo de contaminación con patógenos animales, ya que no son infectadas por virus animales y los virus vegetales a su vez no son transmisibles

al ser humano. El escalado es mucho más barato: se necesita únicamente agua, fertilizantes y sol para lograr cultivos a gran escala. Por si fuera poco, el producto es susceptible de producirse envasado de forma natural (en los frutos o las hojas) para su transporte y conservación estable. Las plantas son capaces incluso de producir proteínas complejas de varias subunidades, como anticuerpos funcionales. Otros productos que se han producido con éxito son la beta-D-glucuronidasa, la avidina y la tripsina, así como antígenos para vacunas como el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Sin duda la síntesis de proteínas recombinantes a partir de plantas es aún un camino en vías de explotación (Guevara-Hernández 2013).

#### **d Células vegetales en suspensión**

Las suspensiones celulares vegetales se basan en la utilización de callos celulares friables en medios de cultivo líquidos, para obtener el crecimiento de células aisladas y/o pequeños agregados, los cuales acumulen metabolitos secundarios o proteínas recombinantes de interés, por lo que ofrecen un gran potencial para la producción de compuestos con importantes aplicaciones en la industria química, farmacéutica o alimentaria (Hellwig y col 2004).

El sistema de cultivo de células vegetales en suspensión (CVS) es un poderoso implemento para la producción de metabolitos secundarios de interés como flavonoides, antocianinas, antquinonas y también de proteínas recombinantes, por otra parte, es importante para llevar a cabo estudios de organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición, bioquímica y metabolismo (Fernández-Chuyn y col.2002).

Un sistema de cultivo de CVS efectivo debe contar con ciertas características que incluyen una tasa de crecimiento rápida, facilidad de transformación genética, alta capacidad de expresión del compuesto de interés, baja actividad proteolítica endógena, bajo contenido de compuestos fenólicos y otros fitoquímicos que pudieran intervenir en el proceso de extracción, alta capacidad de procesamiento postraducciona l y una buena estabilidad de cultivo (Wetzstein y He 2000). Las ventajas principales de estos sistemas, es la manipulación de las condiciones ambientales, la rapidez de producción, y el uso de esquemas de extracción para la recuperación del producto simples y económicos (Yesil-Celikta 2010).

Una manera de obtener productos de interés a gran escala mediante el cultivo de CVS es hacer uso del escalamiento en biorreactores; encontrando que actualmente existen tres diferentes grupos de biorreactores, los cuales pueden ser seleccionados dependiendo del tipo de cultivo, estos son: células en suspensión, células inmovilizadas y reactores de biopelícula (Kargi y Rosenberg 1987).

En los últimos años, se han implementado estrategias para incrementar la producción de compuestos bioactivos, donde destaca la sobreexpresión de ADNc en un sistema heterólogo apropiado con el cual, una vez establecidos los sistemas de transformación genética de los mismos, se posibilita la obtención de células transgénicas que exhiban las características deseadas, e incluso que acumulen el producto de interés en un lugar específico de la célula huésped para facilitar su aislamiento (Vitale y Pedrazzini, 2005; Ortiz-Caltempa 2008).

Otro objetivo que se busca con la transformación genética de cultivos CVS, es la expresión de compuestos bioactivos que la célula no genera por sí misma, en busca de obtener estos como concentrados y que se les pueda dar aplicaciones ya sea del aspecto farmacéutico, como vacunas y/o anticuerpos, y como suplementos alimenticios, así como ingrediente en la elaboración de algunos alimentos que presenten propiedades nutritivas y nutracéuticas importantes que se traduzcan en beneficios importantes para el consumidor (Medina-Godoy y col 2004; Valdez-Ortiz y col 2005).

### **1) Ventajas de las células vegetales en suspensión**

El uso de células vegetales cultivadas en una manera controlada, con el fin de que estas realicen reacciones específicas, y con lo que se obtengan materiales de interés ha generado gran interés, y recientemente, mediante diversas estrategias como estandarización del medio, sistemas de inmovilización, aplicación de estrés biótico o abiótico, se ha logrado elevar la producción de biomoléculas (Portner y col 2005; Tiwari y col 2009). A raíz de esto, se ha buscado el desarrollo de biorreactores de células vegetales cuya modificación le permita producir metabolitos heterologos en grandes cantidades, logrando así, la generación permanente y controlada de diversos compuestos con importantes beneficios para la salud del hombre ya que estos sistemas de producción presentan las siguientes ventajas descritas por Yesil-Celiktas (2010):

- Permitir modificaciones postraduccionales de las proteínas de interés expresadas; ya que al ser organismos más complejos que las bacterias, su maquinaria genética es más completa.
- Alta producción en espacios reducidos.
- Purificación simple, debido a que no son organismos patógenos para el ser humano por lo que se reducen las operaciones unitarias en su proceso de purificación.
- Alta calidad del producto
- Tiempo corto de producción

En el Cuadro 3 se muestra una comparación de las características que presentan los principales sistemas de expresión.

## **2) Células de tabaco NT1**

En la aplicación de cultivos celulares vegetales para la producción de proteínas recombinantes se ha enfocado sólo en un pequeño número de líneas celulares bien caracterizadas, las más populares son las de los cultivares “bright yellow 2” (BY-2) y sus derivadas *Nicotiana tabacum* 1 (NT1) (Hellwig y col., 2004).

Las células de tabaco, especialmente las líneas celulares antes mencionadas son ampliamente usadas como sistema modelo vegetal en la investigación de transgénicos, entre otras razones, debido a que son molecularmente bien entendidas, su mapeo genético está casi completo, la transformación genética y propagación es relativamente simple y bien establecida (Mayo y col., 2006; Jube y Borthakur 2007).

**Cuadro 3.** Comparación de los principales sistemas de producción de proteínas recombinantes con fines para beneficio humano

Sistema	Costo de producción	Tiempo de producción	Escalabilidad	Calidad de Producto	Glicosilación	Costo de almacenaje
Bacterias	Bajo	Corto	Alto	Bajo	Ninguna	Moderado
Levaduras	Medio	Medio	Alto	Medio	Incorrecta	Moderado
Cultivos células de mamíferos	Alto	Largo	Muy bajo	Muy alto	Correcta	Elevado
Plantas transgénicas	Muy bajo	Largo	Muy alto	Alto	Diferencias menores	Sin costo
Cultivos de células de plantas	Medio	Medio	Medio	Alto	Diferencias menores	Moderado

Adaptado de Ma y col. (2003).

## **B ALIMENTOS FUNCIONALES**

Los alimentos funcionales se han descrito como aquellos alimentos en los que se ha demostrado un efecto benéfico específico a la salud, además de poseer propiedades nutricionales adecuadas, de tal manera que son relevantes ya sea, para una mejora del estado de salud y bienestar o en la reducción del riesgo de enfermedades, al mismo tiempo que pueden compensar los desequilibrios alimentarios y garantizar las ingestas de nutrientes recomendadas por los especialistas en nutrición (Silveira y col 2003; Bernal y col 2011). A pesar que aún no hay una definición establecida para este grupo de alimentos, la mayoría de las organizaciones relacionadas a la ciencia de los alimentos, coinciden en que un producto alimentario solo puede ser considerado funcional si, junto con su impacto nutricional básico, tiene también efectos sobre una o más funciones del organismo humano. Además, la cantidad y la forma de ingesta del alimento funcional debe ser como habitualmente se consume en la dieta; por lo que la presentación de un alimento funcional no puede ser en forma de pastillas o capsulas, sino en la forma de un alimento normal (Siró y col, 2008; Bernal y col 2011).

Los alimentos funcionales más populares son el conjunto de alimentos fermentados por bifidobacterias y lactobacilos, y pertenecen al grupo denominado prebióticos. El yogurt y otros derivados lácteos fermentados son los principales representantes de este grupo de alimentos funcionales, al que también pertenecen algunos vegetales y productos cárnicos fermentados (Silveira y col, 2003). Otra categoría importante, dentro de los alimentos funcionales, son las bebidas funcionales,

estas son bebidas no alcohólicas fortificadas con vitaminas u otro ingrediente funcional. Así mismo, los cereales funcionales, en particular la avena y cebada, ofrecen otra alternativa de producción de alimentos funcionales. La carne y sus derivados también pueden ser considerados dentro de este grupo de alimentos debido al extenso número de componentes funcionales que contiene; así como el huevo que recientemente ha tomado un particular interés desde el punto de vista funcional (Silveira y col 2003; Siró y col 2008).

## **1 Compuestos nutraceuticos**

En los últimos años, debido a los problemas de salud a nivel mundial y a la conciencia pública que se ha generado en torno a los alimentos seguros y saludables, muchas investigaciones se han enfocado al estudio de compuestos nutraceuticos, definidos como: componentes de los alimentos que aportan un beneficio añadido para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2000). El interés por el estudio y desarrollo tanto de alimentos funcionales como de compuestos nutraceuticos ha aumentado debido a su evidente valor terapéutico, así como su potencial importancia para la industria alimenticia; se estima que estos productos pudieran presentar una gran repercusión económica ya que existe una gran demanda en el mercado, misma que sigue en aumento (Martínez y Martínez, 2006). Actualmente existe una renovada atención en incluir ciertos componentes a los alimentos procesados con el objeto de complementar alguna deficiencia nutricional de la población (Morales-Camacho 2011).

La clasificación de los compuestos nutraceuticos es muy compleja debido a la gran cantidad de este tipo de componentes que se han reportado. Algunos autores las clasifican de acuerdo a la estructura química o al efecto biológico que ejercen en el cuerpo humano; se han catalogado como fibra dietética (soluble e insoluble), probióticos, antioxidantes fenólicos (fenólicos, antocianinas, flavonoides), antioxidantes vitamínicos (vitamina A, E, C), péptidos bioactivos, entre otros (Cuadro 4) (Goldberg, 1994; Hurst, 2002).

## **2 Proteínas**

Las proteínas que se consumen a través de la dieta proporcionan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y el mantenimiento de las células y los tejidos de nuestro organismo. Sin embargo, las proteínas alimentarias se investigan recientemente, no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino debido a que se han encontrado diversos beneficios para la salud humana derivados de su consumo, lo que las hace de gran utilidad para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Estos efectos benéficos son atribuidos a los péptidos y aminoácidos liberados por la hidrólisis de proteínas, por lo que éstas, están siendo consideradas recientemente como materia prima para la obtención de compuestos bioactivos. El hecho que las proteínas sean precursores de moléculas biológicamente activas, es particularmente atractivo para el desarrollo de alimentos funcionales. Existen diversos beneficios a la salud humana que pueden ser derivados del consumo de proteínas, como son las actividades antibacterial, antioxidante, inmunoestimulante, antitrombótica y antiinflamatoria (Bernal y col, 2011; Jao y col, 2012).

## **a Péptidos bioactivos**

En la actualidad se considera que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar péptidos bioactivos, los cuales, debido a su potencial en el mejoramiento de la salud y sus perfiles de seguridad, pueden ser utilizados como componentes en alimentos funcionales o nutracéuticos. Estos péptidos son definidos como fragmentos de proteínas, o secuencias de aminoácidos que, además de su valor nutricional establecido, impactan positivamente en el funcionamiento del cuerpo humano, lo que influye en última instancia en la salud humana. Otra forma de definir los péptidos bioactivos es como hidrolizados de proteínas que inducen respuestas fisiológicas benéficas en el cuerpo humano (Erdmann y col 2008; Agyei y Danquah 2011; Mulero-Cánovas y col 2011).

Desde un punto de vista estructural, los péptidos bioactivos son moléculas de naturaleza proteínica que ejercen un efecto fisiológico en el cuerpo humano. Usualmente son cadenas que contienen de 2 a 20 aminoácidos; sin embargo, en algunos casos poseen más de 20 aminoácidos y son considerados componentes derivados de proteínas alimentarias (Vermeirssen y col 2004).

Estos péptidos se encuentran comúnmente inactivos en las proteínas que los contienen y cuando son liberados por hidrólisis durante el proceso digestivo o durante el proceso de elaboración de los alimentos, adquieren propiedades funcionales (Hartmann y Meisel 2007). Los péptidos bioactivos pueden absorberse por el intestino o entrar intactos a la circulación sanguínea y ejercer efectos benéficos en el organismo o producir sólo efectos a nivel del sistema digestivo (Kitts y Weiler 2003).

**Cuadro 4.** Productos alimenticios con efectos nutracéuticos

Producto	Sustancia nutracéutica	Efecto
Barras de cereal	Ácido fólico Calcio Proteína de soya	Prevención de cáncer y osteoporosis
Alimentos con soya	Isoflavonas	Disminución de los síntomas de la menopausia
Derivados lácteos	Ácido linoleico, proteínas	Reducción de ciertos tipos de cáncer y prevención de enfermedades cardiovasculares
Pastas y cereales	Fibra insoluble	Reducción de cáncer de colon
Aceites	Ácidos grasos insaturados	Prevención de enfermedades cardiovasculares y mejora de las funciones cerebrales.

Adaptado de Morales-Camacho (2011).

Dentro de estas diversas funciones que pueden ejercer se encuentran la antihipertensiva, hipocolesterolémica, antioxidante, antimicrobiana, inmunomoduladora, antitrombótica y la opioide (Erdmann y col 2008).

Debido a las ventajas que presentan los péptidos bioactivos, como la baja toxicidad, amplio espectro de acción terapéutica y bajos niveles de acumulación en el cuerpo, pueden ser una alternativa para reducir el consumo de fármacos (Marx, 2005). Además, debido al potencial de mejorar la salud y los perfiles de seguridad que ofrecen, se pueden usar como componentes en alimentos funcionales y nutraceúticos (Korhonen y Pihlanto 2003). Los péptidos bioactivos han sido aislados de diferentes fuentes, tanto animales como vegetales; entre las primeras se pueden mencionar a la caseína, el queso a base de suero de leche, la leche fermentada, el músculo de pollo y pescado entre otras y de origen vegetal se han aislado del gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, frijol, entre otras (Das Neves y col 2006), los cuales han presentado diversas actividades biológicas de interés, por lo que el estudio de más fuentes vegetales para obtener estos péptidos con diferentes actividades biológicas, está siendo un atractivo en el sector industrial tanto de alimentos como de farmacéutica, ya que podrían ser incluidos en diversos sistemas alimenticios y/o medicamentos para lograr su efecto en el organismo del consumidor final (Domínguez-Magaña 2008).

## **C AMARANTO**

El amaranto es considerado como un pseudocereal ya que presenta algunas características similares a los cereales como el trigo, el maíz o la cebada, pertenece al orden *Caryophyllales*, a la familia *Amaranthaceae* y al género *Amaranthus*.

Aproximadamente más de 60 géneros y 800 especies de amaranto son conocidos en todo el mundo, sin embargo, la mayoría de ellos se consideran como especies de malezas ya que sólo pocas especies se utilizan como alimento (Bressani 1993). El amaranto es una de las pocas plantas dicotiledóneas C4, lo que les permite tener una alta eficiencia fotosintética en un amplio rango de condiciones medioambientales. Estas características hacen posible que el amaranto pueda adaptarse a una gran variedad de ambientes lo que justifica su presencia en diversas zonas geográficas (Bressani 1993; Amicarelli 2002).

En los últimos años varios reportes han proporcionado una amplia información respecto al valor nutricional y nutracéutico que tiene el grano del amaranto. Entre lo más destacado se encuentra el alto contenido de proteínas y aminoácidos, los cuales satisfacen los requerimientos de proteína en niños y adolescentes y proporciona hasta un 70% de la energía en una dieta normal (Amicarelli 2002, Paredes López y col 2006). Aunado a esto, el consumo del amaranto provee beneficios a la salud, entre los que destacan la disminución de osteoporosis, el poder antioxidante que presentan algunos pigmentos que se encuentran en el grano, la reducción de los niveles de colesterol en sangre y la actividad antihipertensiva provocada por los péptidos que se generan al hidrolizar proteínas presentes en el grano (Paredes López y col 2006; Vechi y Añón 2009; Barba de la Rosa y col 2010; Hernández-Ledesma y col 2010).

## **1 Proteínas del grano de Amaranto**

Los granos de amaranto poseen un contenido importante de proteínas (15-17%), las cuales poseen un balance muy equilibrado de aminoácidos esenciales, acercándose

mucho al óptimo requerido en la dieta humana, el contenido de lisina es muy alto comparado con otras proteínas de plantas, y a pesar que presenta deficiencias en leucina no se considera una limitante, ya que este es encontrado en importantes cantidades en otros alimentos (Bressani 2006). El valor nutricional de la proteína de amaranto es considerado como bueno, ya que su calificación química, realizando la corrección para proteínas vegetales, es de 67, un valor alto comparado con el maíz (44) y el trigo (60) (Mazza 1998).

Se ha observado que la proteína del grano de amaranto posee características funcionales como buena solubilidad, capacidad de absorción de agua y aceite, actividad emulsificante y estabilidad de emulsión, capacidad de gelificación, y un buen comportamiento ante el tratamiento térmico, lo cual indica un gran potencial para su aplicación como ingrediente de alto valor nutricional en sistemas alimentarios. Recientemente, el estudio de las proteínas de amaranto se ha enfocado en la caracterización de péptidos con importantes funciones biológicas encriptados en estas proteínas (Valdez-Ortiz y col 2005; Avanza y Añón 2006; Huerta-Ocampo y Barba de la Rosa 2012).

Las principales fracciones proteínicas presente en el grano de amaranto son albúminas (49-65 %), globulinas (22-42 %) y glutelinas (14-18 %) (Avanza y Añón 2007), de éstas, las proteínas aisladas principalmente de las fracciones de albúminas y globulinas se han empleado en la modificación genética de maíz, trigo y papa con el fin de mejorar su calidad nutricional (Valdez-Ortiz 2005).

#### **a Amarantina**

La amarantina representa cerca del 18.6% de la proteína total del grano de amaranto, la mayor parte de las globulinas 11S presentes en el amaranto es amarantina representando aproximadamente el 90% del total de estas. Esta proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 300-400 kDa y está constituida por seis subunidades de 53 kDa, cada una con un polipéptido ácido (34-36 kDa) y un polipéptido básico (22-24 kDa) unidos por un puente disulfuro (Barba de la Rosa y col, 1992; Sanfeng y Paredes-López 1997). La secuencia nucleotídica completa del ADNc de la amarantina natural presenta un marco de lectura abierto de 1506 pares de bases (pb) que codifican para un polipéptido de 477 residuos de aminoácidos. Los primeros 23 residuos del extremo amino son aminoácidos hidrofóbicos y funcionan como péptida señal para el transporte hacia el retículo endoplásmico. Asimismo, esta secuencia tiene los cuatro residuos de cisteína conservados entre las globulinas 11S, responsables de mantener las subunidades ácida y básica unidas (Barba de la Rosa y col, 1996).

Gracias al alto porcentaje de amarantina, el amaranto contiene un buen balance de aminoácidos esenciales. Por ejemplo, el alto contenido de lisina (3.7- 7.6%) y aminoácidos azufrados (3.1-7.1%) permite que el amaranto sea una fuente importante de estos aminoácidos (Barba de la Rosa y col, 1992).

## **b Modificaciones de la amarantina**

Debido a sus propiedades nutricionales, nutraceúticas y funcionales, la estructura primaria de la amarantina ha sido objeto de diversas modificaciones basadas en el empleo de la ingeniería de proteínas, enfocadas principalmente a proporcionarle

características que faciliten su manipulación y expresión en diferentes sistemas biológicos, así como a mejorar sus características funcionales. Medida-Godoy y col. (2006) le confirieron a la amarantina propiedades de estabilidad al incorporar en su estructura primaria la señal de retención al retículo endoplásmico (KDEL), utilizando como sistema de expresión la levadura *Pichia pastoris*, logrando con ello una acumulación más estable comparada con la amarantina nativa. Luna-Suárez y col. (2010), lograron modificar la estructura primaria de la subunidad ácida de la amarantina mediante la inserción de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva, introduciendo, en la estructura interna una secuencia repetida de cuatro dipéptidos VY y un IPP en el extremo carboxilo, obteniendo versiones de la proteína modificada con expresión y acumulación estables en sistemas bacterianos.

### **c Expresión de amarantina recombinante en sistemas vegetales**

La secuencia completa de la amarantina ha sido incorporada y expresada de manera estable en semillas de tabaco transgénico, resultando tener un patrón apropiado de acumulación (Valdez-Ortiz y col, 2005). Esta misma proteína, debido a las sobresaliente características nutricionales y funcionales que presenta, ha sido expresada en el endospermo de maíz, un cultivo básico en la alimentación humana, demostrando que esta proteína puede acumularse en cuerpos proteínicos de manera estable en un cultivo que, originalmente, no acumula proteínas tipo globulinas, obteniendo un maíz transgénico con un incremento del 32% en la acumulación de proteína total, y de los aminoácidos esenciales Lisina en un 18%, Isoleucina un 36% y Triptófano en un 22% (Rascón-Cruz y col, 2004). Demostrándose, además, que la

amarantina recombinante expresada en maíz puede ser hidrolizada por fluidos gástricos de manera similar a la proteína nativa, así mismo, estudios de alergenicidad realizados en un modelo animal han demostrado que esta proteína es inocua para ser empleada en preparaciones alimentarias (Sinagawa-García y col, 2004).

Por otra parte, a la versión de la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos bioactivos VY en la región interna se le incorporó la señal KDEL en el carboxilo terminal y fue expresada en tejido foliar de tabaco, obteniendo una proteína recombinante con potencial antihipertensivo, presentando un  $IC_{50}$  de  $0.035 \text{ mg ml}^{-1}$ , lo cual muestra que la incorporación del péptido bioactivo VY en la estructura de la amarantina logra incrementar su potencial antihipertensivo in vitro hasta 3.5 veces (Germán-Báez, 2009).

Esta misma versión de la amarantina fue expresada por Santos-Ballardo y col. (2013) en suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) línea NT1, detectando la acumulación y la expresión de la proteína recombinante usando análisis de inmunodetección por Western-Blot, así como el nivel de inhibición de ECA de los hidrolizados de callos transgénicos, mostrando niveles 10 veces mayores a lo reportado por proteínas de tipo silvestre. Finalmente, German-Báez y col. (2014) expresaron, en el fruto de tomate transgénico, la subunidad ácida de la amarantina conteniendo los cuatro péptidos VY y la señal KDEL. Por medio del análisis inmunológico se demostró que la proteína recombinante expresada se acumuló de forma estable a niveles de hasta 12.71% con respecto al contenido total de proteínas de los frutos transgénicos, logrando con esto un incremento notable en el contenido

de proteína total (de 5-22%) de los frutos de tomate transgénico con respecto a los frutos no transformados. También se detectaron aumentos específicos de aminoácidos esenciales como valina (31-40%), tirosina (29-34%), isoleucina (21-31%), leucina (28-31%) y fenilalanina (28-29%) en las líneas transgénicas respecto a las líneas de tipo silvestre, mientras que la inhibición de ECA vario en valores de  $IC_{50}$  entre 0.376-3.241  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; esto representa un aumento de hasta 13 veces en la actividad inhibidora en comparación con los hidrolizados de proteínas de frutos de tomate no transformados, sugiriendo el empleo del fruto de tomate transgénico como un método de producción masiva de la amarantina recombinante y su potencial empleo en el tratamiento o prevención de la HTA y como consecuencia la prevención de enfermedades de tipo cardiovascular.

#### **IV JUSTIFICACIÓN**

El establecimiento de un sistema de expresión de proteínas recombinantes mediante bombardeo de suspensiones celulares, representa una herramienta biotecnológica con gran potencial para la producción de proteínas recombinantes, que presenten excelentes características nutricionales, nutracéuticas y farmacológicas.

## V OBJETIVOS

### A OBJETIVO GENERAL

Establecer un sistema de transformación genética por biobalística, que permita la expresión de proteínas recombinantes en suspensiones celulares de tabaco.

### B OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el efecto de las condiciones de transformación por biobalística sobre la expresión del gen reportero *gusA*.
2. Validar las condiciones de transformación mediante la incorporación del ADNc de bioamarantina, como proteína modelo, en el genoma de las suspensiones celulares.
3. Confirmar molecularmente la inserción del ADNc de bioamarantina en el genoma de las células de tabaco transformadas.
4. Analizar la expresión de bioamarantina en la suspensión de células vegetales de tabaco transformadas.

## VI MATERIALES Y MÉTODOS

### A MATERIALES

#### 1 Material celular

Como material celular se utilizaron callos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) L. Línea celular NT1.

#### 2 Medios de Cultivo

Se utilizó el medio de crecimiento NT1, el cual contiene 4.3 g L<sup>-1</sup> de sales MS (Murashige y Skoog), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 50 mL L<sup>-1</sup> de solución MES (ácido etanosulfónico 2-morfolino mono hidratado; Sigma-Aldrich), 10 mL L<sup>-1</sup> de B1-inositol, 3 mL L<sup>-1</sup> de solución de Millers y 2.2 mL L<sup>-1</sup> de 2.4-D en agua destilada y con un pH ajustado a 5.7 con NaOH. Para medio sólido se adicionan 8 g L<sup>-1</sup> de agar. Para mantener selección de las células transformadas se agregaron 20 mg L<sup>-1</sup> de higromicina en el medio (Mayo y col 2006).

Los medios de cultivo se esterilizaron por autoclave y los antibióticos se esterilizaron por filtración y se agregaron a los medios después de pasar por el autoclave y enfriamiento de los mismos (Mayo y col 2006).

#### 3 Patrones primarios

Para preparar la solución MES (10 mg mL<sup>-1</sup>) se disolvió 10 g de MES (Sigma-Aldrich No. producto M8250) en agua destilada y se aforo para alcanzar un volumen final de 1 L, el pH se ajustó a 5.7 con NaOH (Mayo y col 2006).

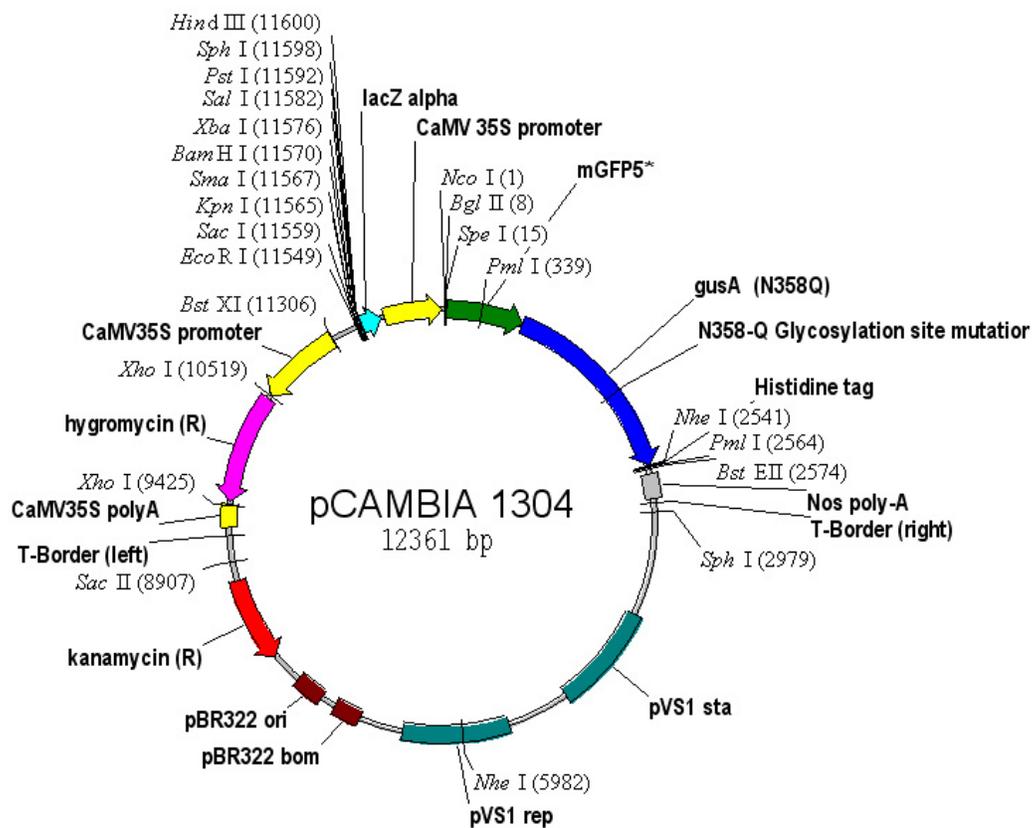
Se disolvió 0-1 g de Tiamina-HCL (SIGMA-ALDRICH, No. producto No. T3902) y 10 g de Myo-inositol (SIGMA-ALDRICH, No. producto I3011) en agua destilada para llevarla a un volumen final de 1 L y se ajusta el pH a 5.7 con NaOH (Mayo y col., 2006).

Solución de Millers 1 (60 mg mL<sup>-1</sup>) se disolvió 60 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich No. producto P5379) en agua destilada para llevarla a un volumen de 1 L (Mayo y col 2006).

Solución 2,4-D (1 mg mL<sup>-1</sup>), para preparar 50 mL de solución, se disolvió 50 mg de 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacético, Sigma-Aldrich No. producto D7299) con 2 o 3 gotas de NaOH 0.2 M, se agitó con calentamiento bajo para disolver y se completara el volumen final con agua destilada (Mayo y col 2006).

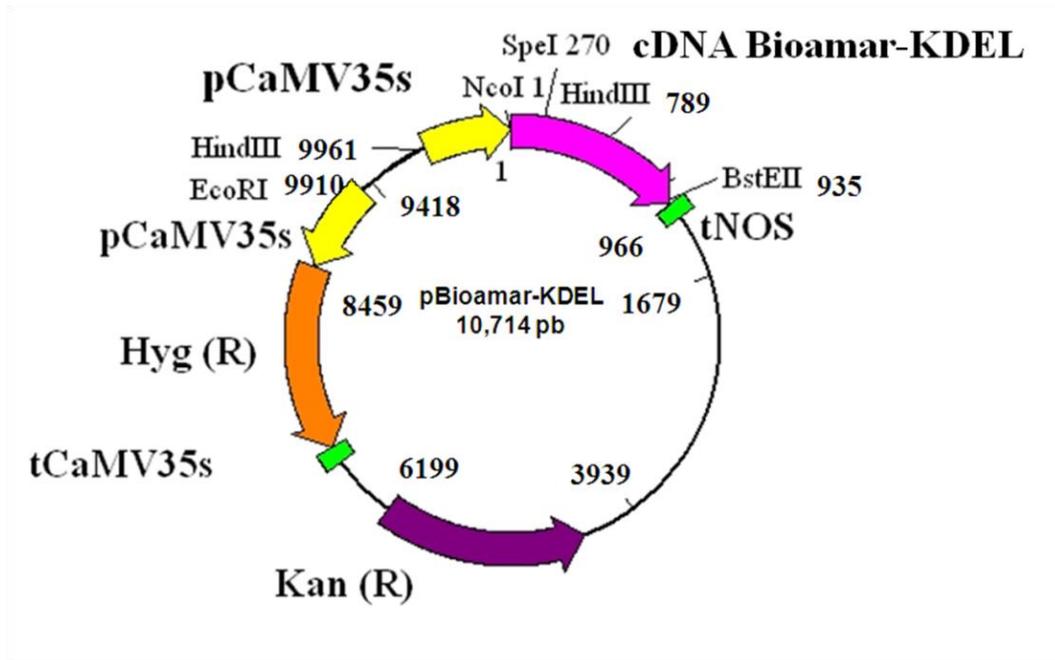
#### **4 Vectores de transformación genética**

Para la transformación, se utilizó el vector de transferencia pCAMBIA 1304 (figura 3), el cual contiene en su mapa genético el gen de la  $\beta$ -glucoronidasa (*gus*) que se utiliza como reportero en la transformación, además, cuenta con genes de resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina, para selección por resistencia, de las células transformadas respectivamente (Wilson y col., 1999). También se utilizó el vector de transformación genética nombrado pBioamaKDEL (figura 4), el cual contiene el ADNc de la subunidad ácida de la amarantina modificada con los péptidos VY, posee genes de selección que proporciona resistencia a higromicina, para selección las células vegetales transformadas; y un gen de resistencia a kanamicina para selección de bacterias transformadas (Germán-Báez 2009).



**Figura 2. Mapa genético del vector de transformación genética pCAMBIA1304.**

Adaptada de Wilson y col. 1999.



**Figura 3. Mapa genético del vector de transformación genética pBioamarKDEL.**

Tomada de Germán-Báez, 2009.

## **B MÉTODOS**

### **1 Técnicas cultivo y preservación**

#### **a Mantenimiento de callos celulares**

Para establecer el mantenimiento y crecimiento de las células de tabaco, se sub-cultivaron pequeñas porciones de los callos celulares en cajas con medio sólido de crecimiento NT1, estas actividades se realizaron en una campana de flujo laminar y bajo condiciones asépticas, utilizando pinzas de acero inoxidable, esterilizadas con alcohol y flama. Las cajas se mantuvieron en oscuridad y a temperatura de 26 °C, realizándose sub-cultivos cada tres semanas, manteniendo así, una fuente de material celular disponible (Forretier y col 1997; Castillo-Reyna 2010).

#### **b Establecimiento de suspensiones celulares**

Para iniciar las suspensiones celulares, se tomaron 48 mL de medio NT1, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, estos se inocularon añadiendo 2 g de callos celulares de tabaco NT1 friables, con color y crecimiento adecuado, todo este procedimiento fue realizado en campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas. Los frascos se mantuvieron en un agitador orbital en condiciones controladas de 150 rpm, 26 °C y oscuridad (Castillo-Reyna 2010).

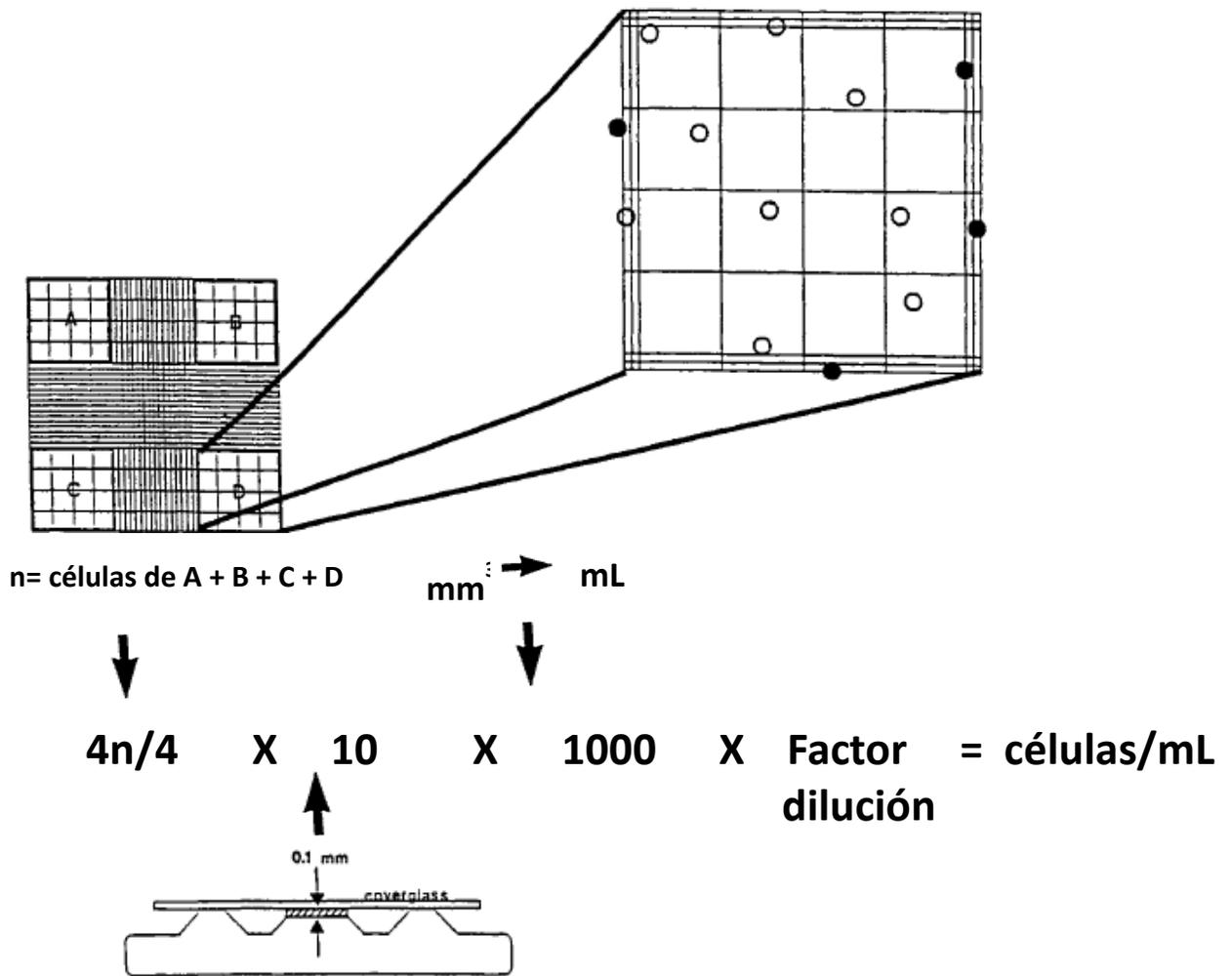
Cada 7 días, se realizó un cambio de medio NT1, para esto, se pasó el contenido del frasco a un tubo falcón de 50 mL y se centrifugó a 3000 x g por 10 minutos, el sobrenadante fue descartado por decantación, se agregaron 50 mL de medio NT1 fresco al pellet celular y se regresó a las condiciones de cultivo establecidas. De este

modo las suspensiones celulares se mantuvieron por varias semanas (Becerra-Arteaga y col 2006).

Después de 3 - 4 semanas de cultivo, la consistencia de la suspensión se vuelve espesa y el cambio de medio se realiza de manera diferente; se toman 2 mL de suspensión celular con una pipeta de boca ancha y se pasa a un frasco Erlenmeyer estéril de 250 mL que contenga 48 mL de medio NT1 fresco, colocándose nuevamente en las condiciones de cultivo establecidas (Mayo y col 2006).

### **c      Conteo celular**

El conteo se realizó por triplicado, se utilizó un microscopio óptico (OLYMPUS CX21) y un hemocitómetro o cámara de recuento celular Neubauer, la cual está dividida en nueve cuadros. Se contaron las células presentes en los cuatro cuadros ubicados en las esquinas de la cámara, el número obtenido se dividió entre cuatro y se multiplicó por 10000; si se hizo una dilución, se multiplicó también por el factor de dilución (Figura 5); el valor resultante es el número de células por mililitro (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota 2006).



**Figura 4. Cálculo del número celular utilizando el hemocitómetro.** Para el conteo celular, se cuentan todas las células dentro del área limitada por las líneas triples. Adaptada de Richardson y Fedorof (2001).

## **2 Transformación Genética mediante biobalística**

### **a Preparación del material**

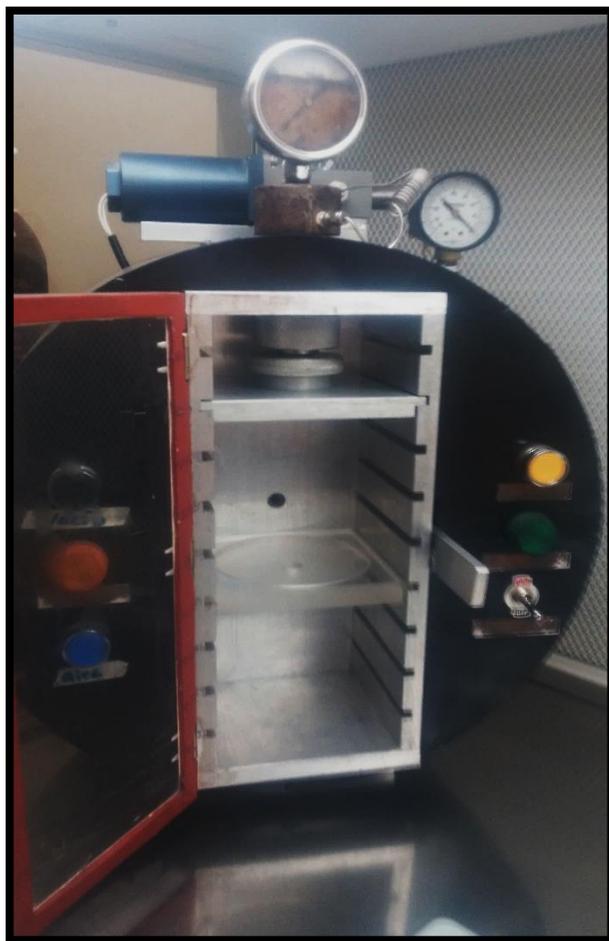
Se utilizó una pistola PDS-He 1000 BioRad (Figura 6), todos sus componentes fueron esterilizados por autoclave, los discos de ruptura, Holders, macrocarriers y las mallas de retención fueron esterilizadas por luz UV y EtOH al 70% por 1 hr.

### **b Preparación de las suspensiones de micropartículas de oro**

Para 120 disparo (500 ug/ disparo) de utilizó el protocolo de Sanford y col (1993). Se pesó 30 mg de oro en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregó 1 ml de EtOH 100% y se vortexeo por 2 min, se centrifugó a 10000 x g por 5 min, posteriormente se decantó el sobrenadante, se le adicionó 1 ml de EtOH al 70% (recién preparado) y se vortexeo durante 2 min, posteriormente se incubó por 15 min dando un spin cada 3 min a temperatura ambiente, terminado el tiempo de incubación la solución paso por centrifugación a 10000 x g por 2 min, se aplicaron 2 lavados agregando 1 ml de agua estéril, se vortexeó por 1 min y se dejó precipitar las partículas por 1 min a temperatura ambiente, para centrifugar 2 min a 10000 x g y descartar el sobrenadante, posteiomentes se realizaón dos lavados y se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en glicerol al 50%, esta solución se alicuotó de 50 µl en enppendorfs de 1.5 ml, se almacenaron a 4° C hasta su posterior uso.

### **c Cobertura de microcarriers con ADN**

Se tomó una alícuota de microcarriers preparados en glicerol al 50% se vortexearon 30 seg, para resuspender y disrumpir partículas aglomeradas,



**Figura 5.** Pistola PDS-1000/He con todos sus componentes, para transformación mediante biobalística.

Se agregó 5  $\mu\text{l}$  de ADN ( $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M, 20  $\mu\text{l}$  de espermidina 0.1 M se vortexeo continuamente por 3 min, se dejó precipitar la solución a temperatura ambiente por 2 min, posteriormente la solución fue centrifugada 1 min a  $10000 \times g$  para precipitar los microcarriers, se removió el sobrenadante con una pipeta, se realizaron 2 lavados con EtOH al 70% centrifugando por 1 min a  $1000 \times g$  y descartando el sobrenadante cuidadosamente con una micropipeta, la pastilla se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de EtOH al 90% con ayuda de un vortex. Se colocaron 6  $\mu\text{l}$  a cada macrocarrier y se dejaron secar en campana sobre papel filtro.

#### **d Preparación del material celular**

Se tomó una concentración de  $1 \times 10^5$  Cel  $\text{ml}^{-1}$  de las suspensiones celulares, se colocaron en tubos eppendorffs de 1.5 ml y se centrifugaron a  $3000 \times g$  por 5 min se descartó una parte del sobrenadante y las suspensiones celulares se plaquearon formando una pequeña capa en cajas con medio NT1 sólido y se dejaron secar en campana por 30 min. Una vez que las placas se secaron, se le adicionó la solución osmótica correspondiente a cada tratamiento; 0.5 M Manitol, 0.5 M Sorbitol y la mezcla de 0.25 M Manitol + 0.25 M Sorbitol, dando un tiempo de incubación de 3 hr en campana de flujo laminar, posteriormente los restos de la solución osmótica fueron decantados.

#### **e Bombardeo de las suspensiones celulares**

Para el bombardeo se colocó la válvula del tanque de helio a 1500 psi, se encendió la pistola y se dio un disparo de prueba esto con el fin de llenar la cámara con helio y evitar la presurización. Se colocó el disco de ruptura y el holder unido al macrocarrier en sus respectivos soportes, la caja con la capa fina de células fue puesta a la distancia de 7 o 13 cm, la cámara fue cerrada, posteriormente se encendió la bomba de vacío hasta que el barómetro indicó un vacío de 50 mmHg se presionó el botón de disparo escuchando un ligero ruido de ruptura, se apagó la bomba de vacío y se presionó el botón de aire para eliminar el vacío de la cámara, la caja fue retirada y tapada. Se reemplazaron el disco de ruptura, macrocarrier y malla de retención, el proceso se repitió para los demás disparos.

Una vez terminado el proceso de transformación mediante biobalística, las células se colocaron a 25° C en condiciones de oscuridad por 48 hr, para que las células pasen por un proceso de recuperación previo al análisis bioquímico del gen *gusA*.

### **3 Análisis bioquímico de las células transformadas**

#### **a Expresión transitoria del gen *gusA***

Pasado el tiempo de recuperación de las células presuntamente transformadas con el vector de transferencia pCAMBIA 1304, estas fueron recolectadas en tubos eppendorf de 1.5 mL y se les adicionó el sustrato X-Gluc (GUSS-1K, Sigma, EUA), como control negativo se utilizaron callos celulares NT1 no transformados, se procedió a incubar a 37 °C durante 24 h, en oscuridad, con un posterior lavado con etanol al 70 %. La reacción se evaluó utilizando un microscopio estereoscópico Motic DM143 (Motic, Richmond, British Columbia, Canadá).

Se calculó el % de eficiencia de transformación mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de transformación} = \frac{\text{Células } gusA (+)}{\text{Células Totales}} \times 100$$

El tratamiento que mostro mayor eficiencia de transformación se utilizó para transformas con el vector de transformación BioamarkDEL.

#### **b Crecimiento en medio selectivo**

Una vez concluido el proceso de transformación, 48 hr después del proceso las células fueron colocadas en medio selectivo con higromicina a una concentración de 15 µg mL<sup>-1</sup>.

Después de 4 semanas en selección las colonias individuales que mostraron mayor crecimiento fueron subcultivadas en medio liquido NT1 selectivo con la finalidad de eliminar falsos positivos y un mayor crecimiento celular.

#### **4 Análisis molecular**

La detección de la inserción de los genes de interés se realizó por PCR (Polymerase Chain Reaction). Para llevar a cabo dicha detección, fue necesaria la extracción de ADN de las clonas transformadas, mismas que presentaron resistencia selectiva al antibiótico utilizado y en el caso del vector pCAMBIA 1304 que mostraron reacción positiva en el ensayo histológico *gus*.

##### **a Extracción de ADN**

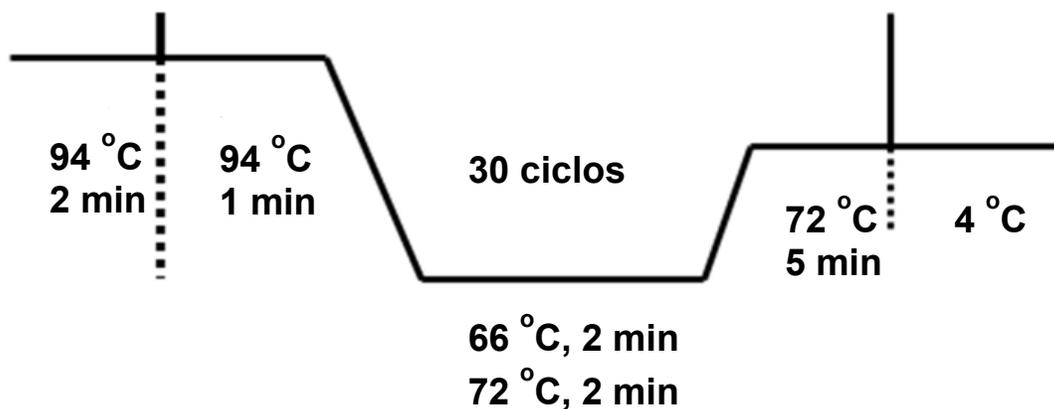
La extracción de DNA se llevó a cabo en base a lo reportado por Laguna-Fortiz (2009) y Germán-Báez (2009) con algunas modificaciones, como se describe a continuación; en tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron 30 mg de callo celular transformante, se congelaron y se trituraron utilizando un homogeneizador y mini brocas estériles. Se adicionaron 500  $\mu$ L de buffer de extracción (TRIS-HCl 100 mM, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM) más 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y 27  $\mu$ L de SDS al 10 %, se homogeneizó y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se sometió a baño maría a 65 °C por 30 min. Posteriormente, se adicionaron 400  $\mu$ L de cloroformo, se homogeneizó y se procedió a centrifugar a 12000 x *g* por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó isopropanol a 4 °C en una relación de 1:1, se incubó a -20 °C por 15 min, después, se centrifugó nuevamente a 12000x *g* por 15 min, se decantó el sobrenadante y se conservó la pastilla, misma que se secó en campana de extracción por 15 min. Se realizaron dos lavados con 200  $\mu$ L etanol (al 100 % y al 70 % respectivamente) centrifugando a 12000 x *g* por 10 min y retirando el sobrenadante después de cada lavado. Finalmente se secó la pastilla obtenida, en campana de extracción por 20 min, se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua destilada y se almacenó a -20 °C.

#### **b Análisis molecular de PCR**

El ADN extraído de células transformadas (para ambos vectores de transferencia) y de las no transformadas (control) se diluyó hasta obtener una concentración de 100 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> para llevar a cabo la PCR.

La mezcla para ambas reacciones de la PCR (20  $\mu\text{L}$  de volumen final) consistieron en 2  $\mu\text{L}$  de buffer taq 10X, 0.6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  [50 mM], 0.4  $\mu\text{L}$  de dNTPs [10 mM], 0.6  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa, 14.4  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril, 1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los iniciadores [4 mM], 1  $\mu\text{L}$  de ADN [ $0.1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ ]. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Techne flexigene™) utilizando las siguientes condiciones de amplificación:

Para realizar la comprobación de la integración de la bioamarantina en las suspensiones celulares se utilizaron los oligos directo 5'GGCGCACCATTTGAGCCTCATGGTCTTC'3, e inverso 5'GGTAACCCTACAGTTCATCTTTATTGGGAAGGTACCTTGAACCCCTGCTACC-3', que amplifican un fragmento de aproximadamente 714 pb; mientras que la amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones (Germán-Báez, 2009):



Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1 % y se tiñeron con bromuro de etidio durante 30 min, las imágenes se capturaron en un fotodocumentador.

## 5 Análisis de la expresión de bioamarantina en células transformadas

## **a Extracción de proteína**

La extracción de proteínas de las células transformadas se realizó según lo reportado por Nagaraj y col (2007) con algunas modificaciones. Se utilizaron suspensiones celulares con 14 d de cultivo, originadas a partir de callos transgénicos en los cuales se comprobó la integración de bioamarantina por PCR.

Se tomó 1 mL de la suspensión celular, se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 3000 x *g* por 10 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y el pellet se sometió a la extracción de proteínas. Este se molió utilizando un homogeneizador y mini brocas estériles, se añadieron 400 µL del buffer de extracción (TRIS-HCl 100 mM, EDTA 5 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, PMSF 2 mM, 50 % etilenglicol, pH 7.7), se realizaron 3 repeticiones de un proceso de sonicación utilizando una disruptor celular ultrasónico (microson™) que consistió en agitación por 1 min, reposo en hielo 1 min, 10 pulsos de 2 seg c/u, mas reposo en hielo 3 min, se procedió a centrifugar a 13000 x *g* por 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante que contenía las proteínas totales de las células., las cuales fueron cuantificadas mediante el método de Bradford siguiendo el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich).

## **b Análisis electroforético (SDS- PAGE)**

Los extractos de proteínas de las suspensiones celulares se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE), teñidos de azul de Coomasie (blue R-250). Las muestras de proteína se mezclaron con el amortiguador de carga 5X [Tris 50 mM, SDS 2 % (v/v), glicerol 10 % (v/v), pH 6.8], la mezcla se desnaturalizó calentándola por 3 min a 95 °C y enfriándola posteriormente en hielo.

Finalmente, se cargaron las muestras en los geles y se corrieron a 110 V y 14 W, durante 90 minutos (Germán-Báez 2009).

### **c Detección inmunológica por Western blot**

La detección de bioamarantina recombinante expresada en los callos celulares de tabaco se realizó conforme el método reportado por Germán-Báez (2009). Los geles de poliacrilamida, con las proteínas previamente separadas, se pre-equilibraron junto a las membranas de nitrocelulosa con buffer amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 %), posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas a la membrana empleando una cámara de electroforesis (mini Trans-Blot; Bio-Rad) a 50 V (por cada gel) durante 60 min. Al terminar la transferencia, la membrana se lavó con TTBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0.05%, pH 7.5) a temperatura ambiente; posteriormente ésta se bloqueó con BSA (Albúmina sérica bovina) al 1 % durante 2 h con agitación suave. Después de realizar dos lavados con TTBS, se añadió el primer anticuerpo (anti-amarantina) a una dilución 0.5:30000 preparada en BSA 1 % en TTBS y se incubó durante 2 h en agitación suave. Después de retirar el primer anticuerpo se realizaron dos lavados con TTBS a la membrana y se añadió el segundo anticuerpo anti-conejo conjugado a la enzima peroxidasa a una dilución 1:2000 y se incubó por 1 h con agitación suave. Después de eliminar el segundo anticuerpo, la membrana se lavó nuevamente en TTBS y TBS. Finalmente, la membrana se reveló empleando una solución preparada con diaminobencidina (DAB) y TBS. Después de la aparición de color café se detuvo la reacción de detección lavando la membrana con agua y finalmente secando al aire.

## 6 Diseño experimental

Se realizó un análisis anova multifactorial, con tres factores y distintos niveles para cada factor; Pretratamiento con solución osmótica (Control 0.5M manitol, 0.5M y sorbitol 0.25M manitol + 0.25M sorbitol), Presión de disparo (900 y 1350 psi) y distancia de disparo (7 y 13 cm). Teniendo como respuesta el % de transformación, el cual fue calculado mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de transformación} = \frac{\text{Células } gusA (+)}{\text{Células Totales}} \times 100$$

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO CELULAR DE TABACO (*Nicotiana tabacum* NT1)

#### 1 Mantenimiento de los callos celulares

Las células de tabaco NT1 mostraron buen crecimiento tanto en suspensiones como en medio sólido NT1, utilizando la metodología de Santos-Ballardo, 2012, logrando así mantener las líneas celulares, de igual forma las colonias transformadas crecidas en medio selectivo con higromicina a una concentración de  $15 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  no presentan alteración en su crecimiento ni en sus características morfológicas, formando callos celulares similares a las colonias nativas.

### B TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Para encontrar las mejores condiciones de transformación genética para celular de tabaco NT1 por el método de biobalística se evaluaron un total de 16 tratamientos, cada tratamiento se realizó por triplicado y después de 48 h se realizó en análisis de la expresión del gen *gusA*.

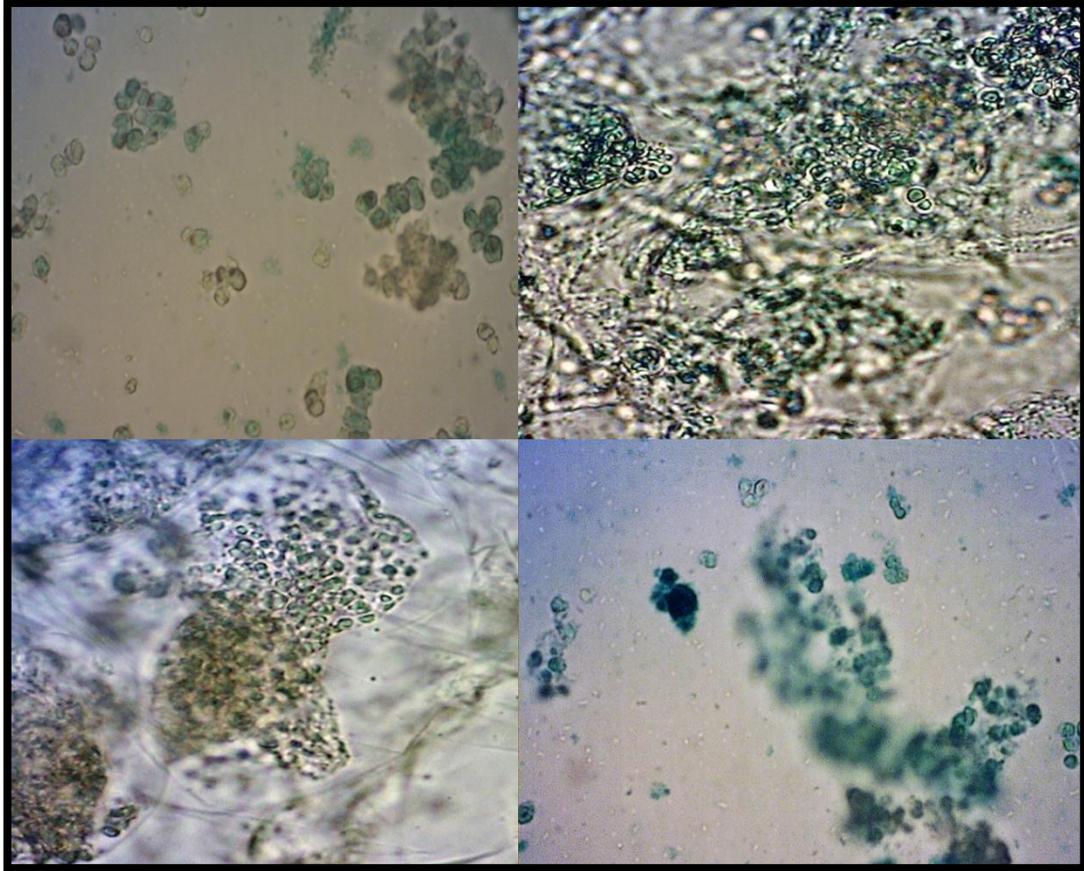
#### 1 Análisis de expresión transitoria del gen *gusA*

En análisis de la expresión transitoria del gen *gusA* se realizó mediante un ensayo bioquímico con el sustrato X-Gluc, el cual es hidrolizado por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, generando un producto de color azul, por lo que, la aparición de este color en las células sometidas a los diferentes tratamientos de transformación, nos indica una expresión del gen *gusA*. En la figura 7 se puede observar la expresión transitoria del

gen *gusA*, donde se logró detectar expresión en todos los tratamientos que se probaron utilizando el vector pCAMBIA1304 observándose la coloración azul índigo característica, demostrando que por el método de biobalística es posible la inserción de material genético externo a la célula de tabaco NT1, además de que la célula no sufrió un daño severo, por lo que le es posible realizar sus procesos de expresión de proteínas y de esta manera lograr la hidrólisis del sustrato X-Gluc.

Cada punto azul que se observa en la figura 6 se refiere a una célula transformada, en este sentido, en varios de los tratamientos se logró obtener más del 50% de células transformadas, lo cual se encuentra por arriba de lo reportado por Santos-Ballardo y col (2013) quienes obtuvieron un índice de expresión transitoria del gen *gusA* del 38% al transformar callos de células de tabaco NT1 mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Se determinó la eficiencia de transformación para cada tratamiento y se muestra en el cuadro 5. Como se puede observar, en todos los tratamientos se logró expresión transitoria, en algunos en menor medida con respecto a los otros, destacando la tendencia al aumento en la expresión cuando se trata de presiones bajas de disparo y distancias cortas, notando una sinergia en ambos factores, de la misma manera se puede observar que los tratamientos sin un pretratamiento con solución osmótica presentaron un bajo nivel de eficiencia de transformación esto podría explicarse debido a que estas células presentaron un mayor índice de muerte celular, por lo tanto no fueron capaces de expresar el gen reportero *gusA*.



**Figura 6.** Células transformadas con el plásmido pCAMBIA1304, cada punto azul hace referencia a una célula transformada.

Los tratamientos que no recibieron un pretratamiento con solución osmótica se encuentra muy por debajo de la media, resultados que pueden compararse con Quintana-Sierra y col (2000) donde mediante este método de transformación obtuvieron resultados similares con explantes de cebolla, así mismo Vain y col (1993) al transformar explantes de maíz mediante este método observaron que los tratamientos eran más eficientes con la adición de un pretratamiento osmótico.

## **2 Análisis de los factores del diseño experimental.**

### **a ANOVA multifactorial**

En el cuadro 5 se contrasta los análisis individuales de los factores durante el proceso de transformación, notándose que existe sinergia entre los factores la cual se ve reflejada en el porcentaje de transformación, como puede observarse, existe una tendencia a aumentar la eficiencia de transformación en los tratamientos que poseen combinaciones de presiones bajas (900psi), distancias cortas (7cm) y con un pretratamiento con solución osmótica, obteniéndose así un mejor tratamiento con el cual se logró un 60% de eficiencia de transformación, el cual consiste de un pretratamiento con sorbitol al 0.5M, una distancia de disparo de 7 cm y una presión de disparo de 900 psi. La eficiencia de transformación alcanzada bajo estas condiciones es superior a lo reportado por diversos autores al transformar mediante este método diversos tipos de explantes, como es el caso de Rajasekaran y col, (2000) donde al transformar cultivos celulares de algodón lograron eficiencias del 34%, y Quintana-sierra y col, 2009 quienes al transformar células de cebolla bajo condiciones similares lograron obtener 40% de eficiencia de transformación.

Estas condiciones de transformación que fueron estadísticamente mejores, al presentar la eficiencia de transformación más alta, fueron utilizadas para llevar a cabo la transformación genética de células de tabaco NT1 con el plásmido pBioamarkDEL

#### **b Presión de disparo**

En la figura 7 se puede observar la gráfica de la prueba de medias Fisher LSD  $\alpha < 0.5$  del factor presión de disparo, se puede apreciar que no existe diferencia significativa entre las dos presiones de disparo, sin embargo, se presenta una tendencia a aumentar cuando la presión de disparo es baja, 900 psi, este resultado es comparable al de Congping y col (2005), donde al transformar microalgas mediante biobalística, observaron una tendencia a disminuir su eficiencia de transformación a presiones por arriba de los 1100 psi, lo cual puede deberse a que la pared celular tanto en las microalgas como a las células de tabaco, no soportan el daño tan severo causado por estas presiones.

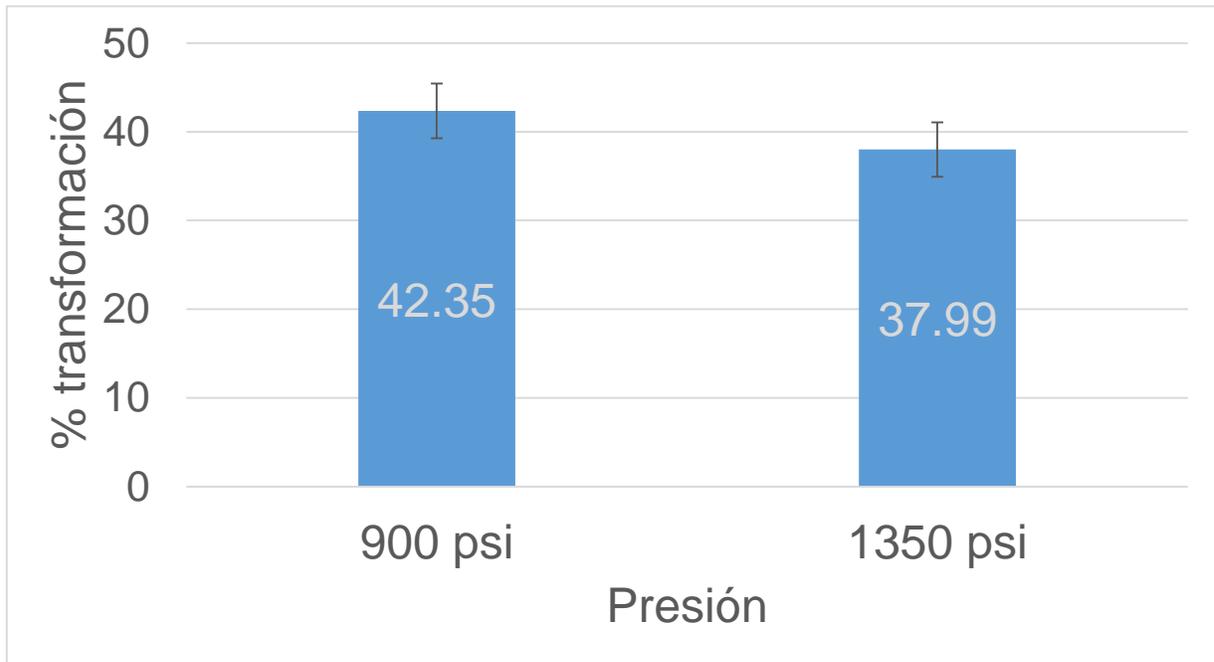
De la misma manera Vain y col (1993) observaron que, mediante el uso de presiones altas (mayores a 1100 psi) se logra aumentar la transformación de hojas de maíz, lo que podría sugerir que el uso de presiones altas es más eficiente en explantes con pared celular gruesa.

**Cuadro 5.** ANOVA multifactorial.

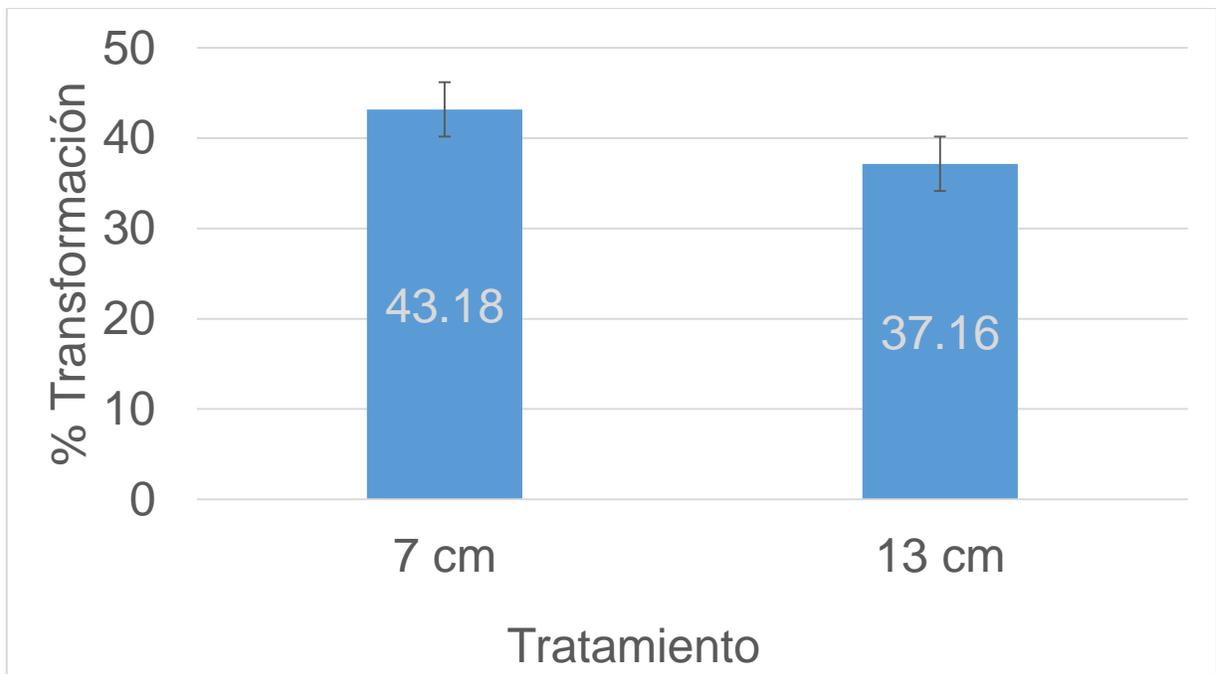
Medio	Presión (psi)	Distancia (cm)	% transformación
0.5M (man)	900	7	45.167 ± 2.06 <sup>gh</sup>
	900	13	42.633 ± 2.32 <sup>fg</sup>
	1350	7	46.167 ± 2.55 <sup>gh</sup>
	1350	13	40.000 ± 2.01 <sup>ef</sup>
0.5M (sor)	900	7	59.933 ± 1.26 <sup>k</sup>
	900	13	51.567 ± 1.19 <sup>ij</sup>
	1350	7	53.667 ± 1.27 <sup>j</sup>
	1350	13	45.800 ± 1.13 <sup>gh</sup>
0.25M (man) + 0.25M (sor)	900	7	47.273 ± 3.49 <sup>hi</sup>
	900	13	33.067 ± 0.91 <sup>cd</sup>
	1350	7	37.467 ± 5.27 <sup>de</sup>
	1350	13	33.150 ± 1.85 <sup>cd</sup>
Control	900	7	30.403 ± 0.61 <sup>bc</sup>
	900	13	28.767 ± 0.29 <sup>bc</sup>
	1350	7	25.400 ± 5.86 <sup>ab</sup>
	1350	13	22.333 ± 2.52 <sup>a</sup>

### **c Distancia de disparo**

En la figura 8 se puede observar la gráfica y la prueba de medias Fisher LSD  $\alpha < 0.5$  del factor distancia de disparo, a pesar que para este factor no existió diferencia significativa entre las dos nieles probados, se pudo percibir un ligero aumento cuando se utilizaron distancias de disparo cortas, este fenómeno puede deberse a que el viaje de los microcarriers en el vacío dentro de la cámara, no se ve afectado por la distancia, sin embargo la superficie de contacto de las células a la distancia de 7 y 13 cm debe de ser muy similar, por lo que la diferencia no se ve reflejada en la prueba estadística. Russell (2003) obtuvo resultados similares de expresión transitoria con explantes de germinado de frijol en diferentes distancias. Por otro lado El mayor porcentaje de supervivencia y expresión de GUS con las distancias de disparo de 7 cm sugiere quizás un menor impacto en la intensidad del bombardeo, atribuida probablemente a que la presión utilizada durante el disparo es compensada con la distancia del mismo, reduciendo así el daño a la célula, y por ende, obtener la mejor condición de recuperación (Rasco–Gaunt y col 1999; Russell 2003);



**Figura 7.** Prueba de medias Fisher LSD  $\alpha < 0.5$  del factor presión de disparo.



**Figura 8.** Prueba de medias Fisher LSD  $\alpha < 0.5$  del factor distancia de disparo.

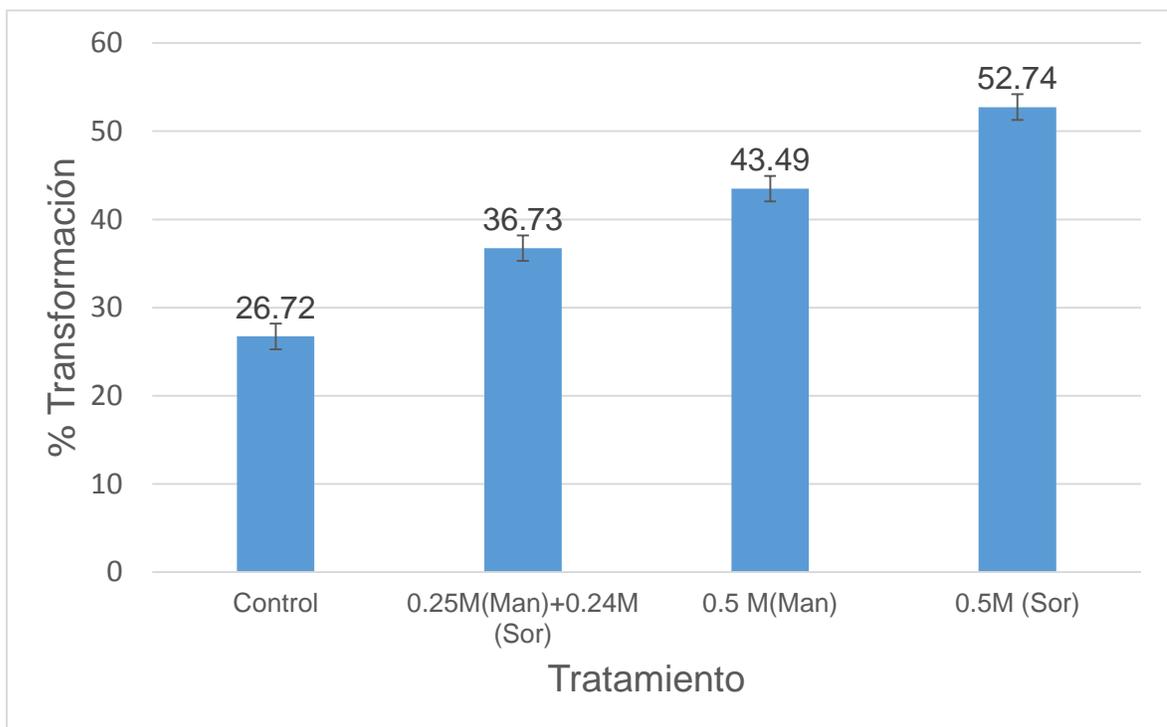
contrario a los efectos obtenidos con las distancias mayores, donde las partículas tienen contacto directo y mayor intensidad hacia los embriones, provocando daños severos y la imposibilidad de su recuperación. Por otro lado, las distancias mayores hacen posible la escasa distribución y penetración exitosa de las partículas en el tejido, minimizando los eventos de transformación (Janna y col 2006).

#### **d Pretratamiento con solución osmótica**

En la figura 9 se puede observar la gráfica de la prueba de medias Fisher LSD  $\alpha < 0.5$  del factor pretratamiento con solución osmótica, el cual presento diferencia significativa en todos los tratamientos, mostrando un mejor resultado en el tratamiento con 0.5 M Sorbitol, con el cual se logró una eficiencia de transformación del 53%, resultado superior al obtenido por Russel y col en el 2003, quienes al utilizar un pretratamiento con una solución de 0.25M de rafinosa, obtuvieron 40% de eficiencia de transformación utilizando como explantes germinados de frijol.

De igual manera Taylor y col en el 2002 al transformar por este método células de maíz utilizando un pretratamiento con una solución osmótica de 0.25M manitol + sorbitol, lograron obtener una eficiencia de transformación del 35% resultado inferior al reportado en el presente trabajo.

Con los resultados del presente estudio se puede observar que la eficiencia de transformación se ve aumentada al utilizar un pretratamiento con solución osmótica, esto se debe a que, al exponer a las células durante un periodo de tiempo a una solución osmótica se produce un efecto de plasmólisis en la pared celular



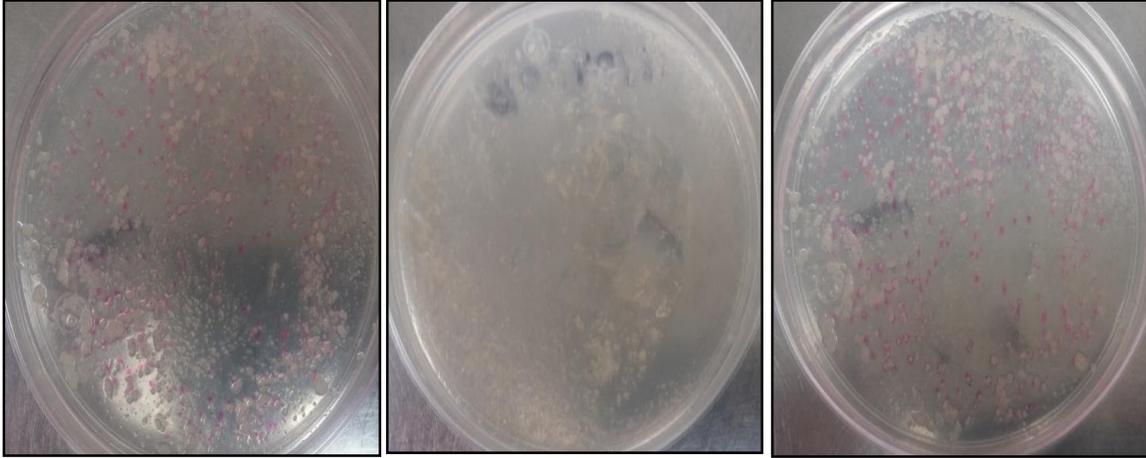
**Figura 9.** Gráfica de la prueba de medias Fisher LSD  $\alpha < 0.5$  del factor pretratamiento con solución osmótica

el cual consiste en hacer la pared celular más permeable reduciendo la presión en el interior de la célula, estas células plasmolizadas pueden tener menos probabilidades de extruir su protoplasma después de la penetración de la célula por partículas (Sanford y col 1992). El estado plasmolizado debe mantenerse durante unas pocas horas antes del evento de transformación y puede mantenerse después del bombardeo para ayudar a la recuperación celular (Sanford y col 1992).

## **2 Confirmación de las células transformadas mediante selección**

En la figura 10, se puede observar el crecimiento de colonias aisladas en medio selectivo con higromicina, las cuales fueron transformadas con el plásmido pBioamarKDEL, en un primer muestreo se obtuvo un promedio de 200 colonias crecidas en medio selectivo, resultado superior al reportado por Rajasekaran y col (2000) donde al transformar mediante este método cultivos celulares de algodón, lograron obtener un aproximado de 140 colonias crecidas en medio selectivo a kanamicina.

Este fenómeno podría deberse a que las condiciones bajo las cuales ocurrió el evento de transformación fueron más adecuadas en la inserción del material genético así como la aceptación misma por parte de las células, además se evitó en su mayoría la muerte celular, por lo tanto se ve reflejado en un mayor número de colonias crecidas en medio selectivo, sin embargo puede darse el caso de presentar falsos positivos por lo que es necesario hacer subcultivos en medio selectivo hasta confirmar por medio de técnicas moleculares la transformación genética estable de las colonias (Rajasekaran y col 2000).



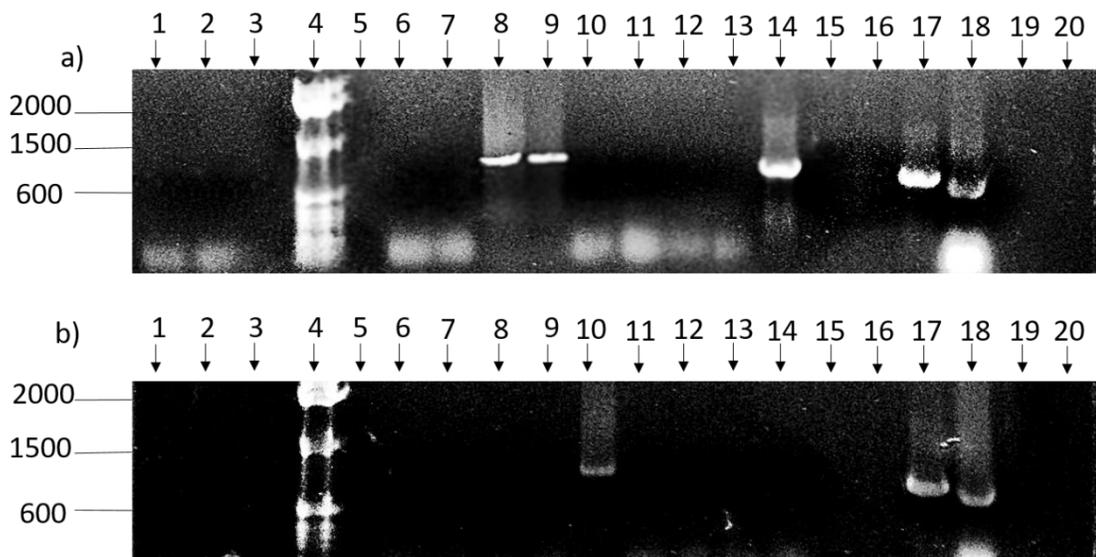
**Figura 10.** Células crecidas en medio selectivo a higromicina.

## **C ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO BioamarKDEL**

Se seleccionaron totalmente al azar 18 clonas de las que se obtuvieron al transformar con el vector pBioamarKDEL; éstas se analizaron por PCR para seleccionar las células que incorporaron el gen de manera positiva (Figura 11).

En los carriles 1 y 2 se muestran los controles negativos para asegurar que las bandas obtenidas sean productos exclusivamente de la reacción de PCR; los carriles 5 y 16 se corrieron vacíos con el fin de separar las muestras de los controles y marcadores; en los carriles del 6 al 15 tanto en la figura 12a y 12b muestran los productos de PCR de las clonas seleccionadas; el marcador de peso molecular (carril 4) y el control positivo (carril 17-18) se utilizaron como referencia del tamaño del fragmento amplificado.

Se observó la presencia del fragmento esperado (714pb) en 4 de las 18 muestras analizadas con lo que se comprueba la inserción del gen en estas células de tabaco NT1, mediante la transformación genética por biobalística, resultado comparable con lo reportado por Santos-Ballardo y col (2013) al transformar células de tabaco NT1, quienes obtuvieron de un muestreo de 6 colonias, 5 resultados positivos a PCR.



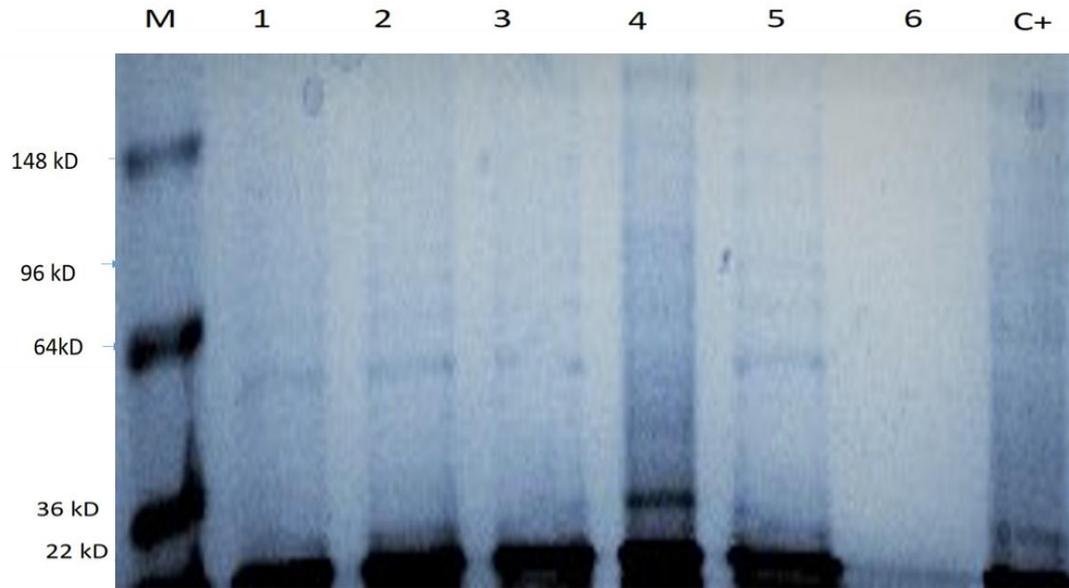
**Figura 11. Análisis molecular de PCR en clonas de tabaco generadas en medio selectivo utilizando el vector pBioamarKDEL. a;**(1) Control negativo: ADN de tabaco no transformado, (2) Control negativo: H<sub>2</sub>O; (3) Espacio vacío, (4) Marcador de peso molecular de 1kb, (5) Carril vacío, (6-15) Clonas de tabaco transformadas, (16) Carril vacío, (17-18) Control positivo: tejido foliar de tabaco transgénico. **b;** (1) Control negativo: ADN de tabaco no transformado, (2) Control negativo: H<sub>2</sub>O, (3) Espacio vacío, (4) Marcador de peso molecular de 1kb, (5) Carril; vacío, (6-15) Clonas de tabaco transformadas, (16) Carril vacío, (17-18) Control positivo: tejido foliar de tabaco transgénico

## **D ANÁLISIS INMUNOLOGICO POR WENSTER-BLOT.**

Se realizó la extracción de proteínas a partir de los callos celulares, obteniendo un extracto de proteínas totales conteniendo de manera presuntiva la bioamarantina recombinante expresada de manera estable. Se extrajo también proteína de tabaco sin transformar como control negativo.

En la figura 12 se muestran los resultados de la separación del extracto total de proteínas por SDS-PAGE., Podemos observar una banda de aproximadamente 32 kDa que corresponde al tamaño de la bioamarantina, cabe mencionar que dicha banda se observa también en el extracto de células sin transformar, pero en menor intensidad, lo cual podría deberse a que como se trata de

Al realizar la detección inmunológica por Western blot (Figura 13), se comprueba que dentro de la banda marcada por las proteínas de aproximadamente 32 kDa se encuentra la bioamarantina, con esto comprobamos que en una de las clonas que amplificaron el fragmento por PCR, esta proteína es estable al ser expresada en los callos celulares transgénicos y que a partir de estos se pudieran iniciar suspensiones celulares para obtener cantidades mayores de dicha proteína proteínas totales de la célula es posible la presencia de proteínas nativas de tamaño similar.

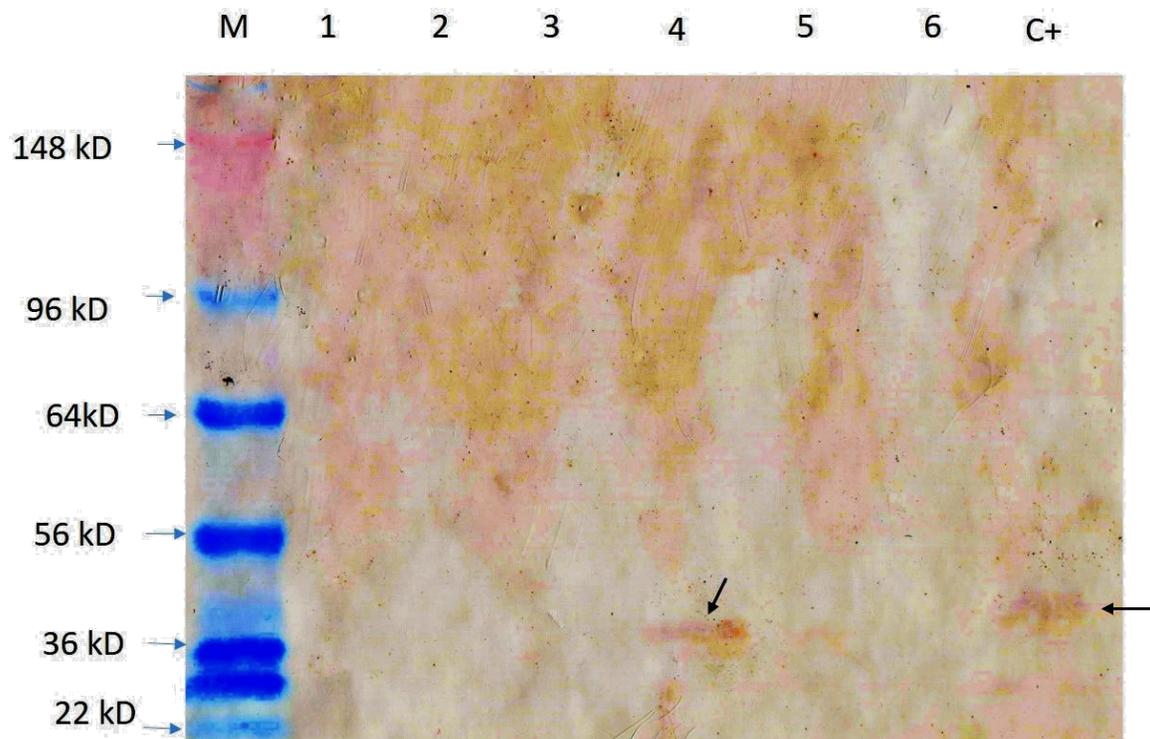


**Figura 12. Análisis de expresión de bioamarantina en callos celulares de tabaco.** Separación por SDS-PAGE. (M) Marcador de peso molecular (1) Control negativo: extracto sin transformar; (2-5) Extractos de células transformadas con PbioamarkDEL; (6) Vacío;(C+) Control positivo: extracto de E. coli. Se cargaron 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteínas en el extracto.

Al realizar la detección inmunológica por Western blot (Figura 13), se comprueba que dentro de la banda marcada por las proteínas de aproximadamente 32 kDa se encuentra la bioamarantina, con esto comprobamos que en una de las clonas que amplificaron el fragmento por PCR, esta proteína es estable al ser expresada en los callos celulares transgénicos y que a partir de estos se pudieran iniciar suspensiones celulares para obtener cantidades mayores de dicha proteína.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Germán-Báez (2009) donde expresaron bioamarantina en tejidos foliares de tabaco, corroborando que esta proteína puede ser expresarse en tejidos diferentes a los tejidos de reserva e incluso en células individuales indiferenciadas, como es el caso del presente trabajo, además pudiéramos pensar que la proteína expresada se almacena en el retículo endoplásmico, debido a la presencia de la señal de retención KDEL con que cuenta esta proteína; abriendo la posibilidad de iniciar cultivos de células transgénicas que generen cantidades aceptables de bioamarantina, con buenas posibilidades de establecer sistemas de extracción y purificación sencillos.

A pesar de lo satisfactorio de los resultados obtenidos en la presente investigación, éstos estuvieron por abajo de lo reportado por Santos-Ballardo y col (2013) al transformar callos celulares de tabaco NT1 mediante *Agrobacterium tumefaciens* quienes lograron obtener 2 clonas que expresaron la proteína recombinante.



**Figura 13. Análisis de expresión de bioamarantina en callos celulares de tabaco.** Detección inmunológica por Western blot. (M) Marcador de peso molecular (1) Control negativo: extracto sin transformar; (2-5) Extractos de células transformadas con PbioamarKDEL; (6) Vacío;(C+) Control positivo: extracto de E. coli. Se cargaron 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteínas en el extracto.

## VIII CONCLUSIONES

- 1 Un tratamiento con medio osmótico a las células de tabaco, previo al bombardeo, facilita la inserción del material genético dentro de la célula, aumentando el porcentaje de transformación y la supervivencia celular.
- 2 Aunque, de forma individual, la presión y distancia de disparo no influyen en la eficiencia de transformación, de forma conjunta, los tres factores evaluados tuvieron efecto sobre la misma, encontrando que la mejor combinación fue un pretratamiento con sorbitol 0.5 M, 900 psi de presión de disparo y 7 cm de distancia de disparo.
- 3 Es posible realizar la transformación genética estable de células de tabaco NT1 mediante el método de biobalística, obteniendo una eficiencia de transformación del 22.22%.
- 4 Se logró comprobar que las células de tabaco NT1 tienen la capacidad para soportar el método de transformación por biobalística incorporando en su genoma el ADN exógeno, y llevando a cabo la expresión de la proteína recombinante.

## IX BIBLIOGRAFIA

**Avanza MV, Añón MC. 2006.** Efecto del tratamiento térmico en las propiedades fisicoquímicas de albúminas y globulinas de *Amaranthus Hypochondriacus*. Universidad Nacional del Noroeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: E-031.

**Avanza MV, Añón MC. 2007.** Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:616-623.

**Barba de la Rosa AP, Herrera A, Utsumi S, Paredes-López O. 1996.** Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology* 149: 527-532.

**Becerra-Arteaga A, Mason HS, Shuler ML. 2006.** Production, secretion, and stability of human secreted alkaline phosphatase in tobacco NT1 cell suspension cultures. *Biotechnology Propagation* 22: 1643-1649.

**Bernal J, Mendiola JA, Ibañez E y Cienfuentes A. 2011.** Advance analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55: 758-774.

**Blanco M, Valverde R, Gómez L. 2003.** Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía costarricense* 27(1): 19-28.

**Brasileiro A, y Aragao F. 2001.** Markers genes for in vitro selection of transgenic plants. *Journal of Plant biotechnology* 3: 1113-121.

- Bressani R. 2006.** Estudios sobre la industrialización del grano de amaranto, caracterización química y nutricional de productos intermedios y finales del procesamiento. Proyecto FODECYT No. 23-2002. CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA – CONCYT- Guatemala. Pp. 1-53.
- Bressani R, Gonzales JM, Zuñiga J, Breuner M, Elías LG. 1987.** Yield, selected chemical composition and nutritional value of 14 selection of amaranth grain representing four species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 38:347-353.
- Chang YS, Eun-Kyoung S, Gyllenhaal C, Block KI. 2003.** Panax ginseng: A role in Cancer Therapy?. *Integrative Cancer Therapies* 2: 13-33.
- Chen S, Paredes-López, O. 1997.** Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seed. *Journal of food Biochemistry* 21: 53–65.
- Congping T, Song Q, Qun Z, Peng J y Fangqing Z. 2005.** Establishment of a micro.particle bombardment transformations system for *Dunaliella salina*. *Journal of Microbiology*. P: 361-365.
- Croteau R, Hefner J, Hezari M, Lewis NG. 1996.** Taxol biosynthesis: cyclization and early hydroxylation steps of the pathway. *Current Top Plant Physiology* 15: 94-104.
- Cruz-Mendívil A. 2010.** Establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* de tejidos y transferencia genética en tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Micro-Tom. Tesis de Maestría. Culiacán, Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa.

- Cruz-Mendivil A, Rivera-López J, Germán-Báez LJ, López-Meyer M, Hernández-Verdugo S, López-Valenzuela JA, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A. 2011.** A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv microtom from leaf explants. *Hortscience* 46(12):1655-1660.
- Das N, Campos M, Márquez T. 2006.** Modulación de la Presión Arterial por Hidrolizados Protéicos. *Brazilian Journal of Food Technology*. 3: 81-86.
- De la Riva G, Gonzales-Cabrera J, Vázquez-Padrón R y Ayra-Pardo C. 1998.** *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1: 118-133.
- Domínguez G, Dávila A, Martínez A, Guerrero A, Betancur. 2008.** Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2:158-168.
- Erdmann KB, Cheung, Shroder. 2008.** The possible roles of food derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18:643-654
- Farrokhi, N., Hrmova, M., Burton, R. A. & Fincher G. B. 2009.** Heterologous and Cell Free Protein Expression Systems. *Methods in Molecular Biology*. 513:175-198.
- Fernández-Chuyn O, Ojito-Céspedes E, Pérez-Artiles L. 2002.** Obtención de flavonoides a partir del cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L. *Revista Universidad EAFIT* 124: 65-71.

**Forretier C, Kirschner M, Nover L. 1997.** Stable transformation of an arabidopsis cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *The Plant Cell* 9: 2171-2181.

**Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T. 1981.** Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell reports* 1: 61-63.

**Germán-Báez LJ. 2009.** Expresión de una proteína de reserva de semilla (Bioamar-KDEL) en tejido foliar, y evaluación *In vitro* de su actividad antihipertensiva. Tesis de Maestría. Culiacán, Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa.

**Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota FA. 2006.** Growth measurements. Estimation of cell division and cell expansion. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 318: Plant cell culture protocols. Second Edition. Loyola-Vargas VM, Vazquez-Flota FA. (Eds). Humana press Inc., Totowa, NJ. Pp. 51-58.

**Goldberg, I. 1994.** Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals Aspen publishers, United States of America 303:571.

**Guevara-Hernandez E, Lopez-Zavala A, Jimenez-Gutierrez L y Sotelo-Mundo R. 2013.** Prespectivas actuales del uso de proteínas recombinants y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotechnia*.

**Hancock, R. Sahl H. 2006.** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biothecnology*. 12:1551- 1557.

- Hayes, M., C. Stanton, H. Slattery, O. O'Sullivan, C. Hill, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross. 2007.** Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4658-4667.
- Hellwig S, Drossard J, Twiman RM, Fisher R. 2004.** Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology* 22: 1415-1422.
- Herrera-Estrella L, Martínez-Trujillo M. 2004.** Plantas transgénicas. En: *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Bolívar-Zapata FG (Ed). Cd. de México, México: Colegio Nacional. Pp. 167-193.
- Hodson-Jaramillo E. 2005.** Transformación genética de plantas para resistencia a virus. *Revista Académica Colombiana de Ciencias* 110: 5-24.
- Hurst JW. 2002.** *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. United States of America. Crc press. 399p.
- Janna, O.A., Maziah, M., Ahmad-Parveez, G.K.A., Saleh, K. 2006.** Factors affecting delivery and transient expression of  $\beta$ -glucuronidase gene in *Dendrobium Sonia* protocorm-like body. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 88-94.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A. y Stahl, S. 2002.** Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 35:91-105.

- Jube S, Borthakur D. 2007.** Expression of bacterial genes in transgenic tobacco: methods, applications and future prospects. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 452-467.
- Kim SK, Wijesekara I. 2010.** Development and biological activities of marine- derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods* 2:1-9.
- Kitts DD, Weiler K. 2003.** Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*.13:09-23.
- Laguna-Fortiz E. 2009.** Transformación genética de ajo (*Allitum sativum* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de maestría. Texcoco, Edo. de México: Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.
- Lindsey, k. y Jones, M. 1987.** Transient gene expresión in electroporated protoplasts and intac cells of sugar beet. *Pant Molecular Biology*. 10: 43-52.
- López-Meyer M, Nessler CL, McKnight TD. 1994.** Sites of accumulation of the antitumor alkaloid camptothecin in *Camptotheca acuminata*. *Planta Medica* 60: 558-560.
- Luna-Suárez S, Medina-Godoy S, Cruz-Hernández A y Paredes-López O. 2008.** Expression and characterization of the acidic subunit from 11S Amaranth seed protein. *Biotechnology Journal* 3: 1-11.
- Luna-Suárez S, Medina-Godoy S, Cruz-Hernández A y Paredes-López O. 2010.** Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory

peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology 148: 240-247.

**Ma JK, Drake PM, Christou P. 2003.** The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics 4: 794-805.

**Mao t, YanQ, Zhou F, Shen Y. 1997.** Isolation and identification of berberine from cell cultures of *Coptis chinensis*. Chinese Journal of Biotechnology 13: 193-199.

**Martínez CA, Giulietti AM, Rodríguez-Talou J. 2011.** Expression of a KDEL-tagged dengue virus protein in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* and *Morinda citrifolia*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 107: 91-100.

**Martínez C, Petruccelli S, Giulietti AM, Alvarez MA. 2005.** Expression of the antibody 14D9 in *Nicotiana tabacum* hairy roots. Electronic Journal of Biotechnology 8(2): 170-176.

**Mayo KJ, Gonzales BJ, Mason HS. 2006.** Genetic transformation of tobacco NT1 cells with *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Protocols 1(3): 1105-1111.

**Mazza GD. 1998.** Functional Foods: Biochemicals and processing aspects. Editorial Technomic Publishing Co. Inc Lascaster, P.A. Pp. 293-328. .

**Medina-Godoy S, Nielsen NC, Paredes-López O. 2004.** Expression and characterization of a His-Tagged 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli*. Biotechnology Progress 20: 1749-1756.

**Miao Y, Ding Y, Sun QY, Xu ZF, Jiang L. 2008.** Plant bioreactors for pharmaceuticals. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 25: 363-380.

**Miki R, McHugh S. 2004.** Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* 107(2004): 193-232.

**Mirkov TE. 2003.** The molecular basis of genetic modification and improvement of crops. En: *Plants, Genes, and Crop Biotechnology. Second Edition.* Chrispeels MJ, Sadava DE. (Eds). Jones and Bartlett Publishers Inc., Mississauga, Canada. Pp. 124-152.

**Morales J. 2011.** Optimización de la expresión de una proteína de amaranto con propiedades antihipertensivas en *Escherichia coli*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma De Querétaro. Santiago de Querétaro, Queretaro.

**Nagaraj S, Lei Z, Watson B, Sumner L, Gallardo K, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Robert F, Thiery O, Valot B, Mathesius U, Triplett E, Oelkers K. 2007.** Proteomics of *Medicago truncatula*. En: *Medicago truncatula Handbook.* Mathesius U, Journet EP, Sumner LW (eds). ISBN 0-9754303-1-9. Pp. 4-15. Disponible en: <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/Proteomics.pdf>.

**Ortiz-Caltempa A. 2008.** Establecimiento de un cultivo de células transformadas de *Galphimia glauca* en suspensión para la producción de triterpenos. Tesis Doctoral. Yauatepec, Morelos: Instituto Politécnico Nacional.

- Osuna-Castro JA, Rascón-Cruz Q, Napier J, Fido RJ, Shewry PR, Paredes-López O. 2000.** Overexpression, purification and *in vitro* refolding of the 11S globulin from amaranth seed *in Escherichia coli*. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 48: 5249-5255.
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. y Ramírez, O. T. 2004.** Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology*. 267:15-52.
- Paredes-López O, Valverde MA. 2006.** Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *Revista CINVESTAV* 25 (03): 65-73.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P. y Mattanovich, D. 2005.** Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*. 31:245-259.
- Portner R, Nahel-Meyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. 2005.** Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100: 235-245.
- Quintana M. 2009.** Transformacion genetica de cebolla (*Allium cepa* L.) Mediante Biobalística. Tesis Doctoral. Montecillo texcoco, Estado de México.
- Rader, R. A. 2008.** Expression Systems for Process and Product Improvement: A Perspective on Opportunities for Innovator and Follow-On Product Developers. *BioProcess International*. 6:S4-S9.

**Rajasekaran K, Hudspeth R, Cary J, Anderson D y Cleveland T. 2000.** High-frequency stable transofmraction of cotton (*Gossypium hisutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell reports* 19: 539-545.

**Ramírez N, Lorenzo D, Palenzuela D, Herrera L, Ayala M, Fuentes A, Pérez M, Gavilondo J, Oramas P. 2000.** Single chain antibody fragments specific to hepatitis B surface antigen, produced in recombinant tobacco cell cultures. *Biotechnology Letters* 22: 1233-1236.

**Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcello, P., Lazzeri, P.A. 1999.** Analysis of particle bombardment parameters to optimize DNA delivery into wheat tissue. *Plant Cell Rep.* 19: 118–127.

**Rascón-Cruz Q, Sinagawa-García S, Osuna-Castro JA, Bohorova N, Paredes-López O. 2004.** Accumulation, assembly, and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 335-342.

**Razdan MK. 2003.** Cell culture. En *Introduction to plant tissue culture*. Razdan MK. (Ed) Second Edition. Science Publishers, Inc. Einfield, USA. Pp. 43-59.

**Richardson A, Fedoroff S. 2001.** Quantification of cells in culture. En *Protocols for Neural Cell Culture*. Fedoroff S, Richardson A. (Eds) Third Edition. Humana press Inc., Totowa, NJ. Pp. 333-339.

**Russell K, J. 1993.** The Biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 221-226.

- Sanford J, Devit J, Russell J, Smith F, Harpending P, Roy M y Johnton S. 1991.** An improved, helium-driven biolistic device. *Technique* 3: 3-16.
- Sharma AK, Sharma MK. 2009.** Plants as bioreactors: Recents developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* 27: 811-832.
- Shimamoto. K., Terada, R., Izawa T. y fujimoto H. 1990.** Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- Silveira MB, Monedero S y Molina B. 2003.** Funtional Foods and Optimun Nutrition: A way or Away?. *Revista española de salud Pública* 77: 317-331.
- Siró I, Kálpona E, Kálpona B y Lugasi A. 2008.** Funtional food. Produt development, marketing and consumer acceptance- A review. *Appetite* 51: 456-467
- Songstad D, Halaka D, Deboer C, Armstrong M, Hincsee C, Ford-Santino S, Brown M, y Horsh R. 1993.** Transient expression of gus and anthocyanin contrus in intact maize immature embryos following electroporation. *Pan Cell, Tissue and Culture* 33: 195-201.
- Suga M, Kusanagi I y Hatakeyama T. 2003.** High osmotic stress improves electrotransformation efficiency of fission yeast. *FEMS Microbiology Letters* 225: 235-239.
- Taylor N y Fauquet C. 2002.** Microparticle bombardment as a tool in plant scicenece and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* 2: 963977.

- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R. 2009.** Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances* 27: 449-467.
- Tseng TH, Hsu JD, Lo MH, Chu FP, Huang CL, Wang CJ. 1998.** Inhibitory effect of Hinisus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Letters* 126: 199-207.
- Tzfira T, Frankman L, Vaidya M y Citovsky V. 2003.** Site-specific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-AND via double-strated intermediates. *Plants Physiology* 133: 1011-1023.
- Vain P, Michael D y Finer J. 1992.** Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cells Reports*. 12: 84-88.
- Valdez-Ortiz A, Rascón-Cruz Q, Medina-Godoy S, Sinagawa-García SR, Valverde-Gonzales ME, Paredes-López. 2005.** One-Step purification and structural characterization of a recombinant His-Tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology* 115: 413-423.
- Vázquez T, Mohamed D, y Palomares J. 2005.** Utilización de genes eucarióticos de luciferasa en el marcado de microorganismos y en el análisis de la transferencia génica. *Microbiología y parasitología. Universidad de Sevilla*. 61: 660-668.
- Vermeirssen V, Van Camp J, y Verstraete W. 2004.** Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition* 92: 357-366.

- Vitale A, Pedrazzini E. 2005.** Recombinant pharmaceuticals from plant: The plant endomembrane system as bioreactor. *Molecular interventions* 5: 216-225.
- Wang Y, Klein M, Fromm J, Sanford J, y Wu R. 1998.** Transient expression of foreing genes in rice, wheat and soybeen cells following particle bombardment. *Plant molecular Biology* 11: 433-439.
- Wetzstein H, He Y. 2000.** Anatomy of plant cells. En: *Encyclopedia of cell technology*. Spier R. (Ed.). Wiley, New York. Pp. 24-31.
- Wilson KJ, Parra A, Botero L. 1999.** Application of the GUS marker gene technique to high-throughput screening of *rhizobial* competition. *Canadian Journal of Microbiology* 45(8): 678-685.
- Yamada T, Hoshino M, Hayakama T, Ohhara H, Yamada H, Nakazawa T, Lida M, Ogasawara T, Uchida A, Hasegawa C, Murasaki G, Miyaji M, Hirata A, Takeuchi T. 1997.** *The American Journal of Physiology* 273: 355-364.
- Yesil-Celiktas O, Gurel A, Vardar-Sukan F. 2010.** Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. En: *Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors*. Pandalai SG. (Ed). Transworld Research Network. Kerala, India. Pp. 1-54.
- Yue-Zhong S. 1998.** Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products* 61: 1053-1071.

**Zhao D, Wang Y, Zhao J. 1998.** Effects of some factors on callus growth and flavonoids formation in callus cultures of *Saussurea medusa*. Chinese Journal of Biotechnology 14: 141-147.

## ABREVIATURAS

2,4 D	2,4- Ácido diclorofenoxiacético
AA	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
A.C.	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
BY-2	Bright yellow 2
°C	Grados centígrados
C4	Cuatro carbonos
Cel.	Células
CEVAMEX	Campo experimental del valle de México
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Col	Colaboradores

Cv	cultivar
D	diámetro
d	Días
DBA	Diaminobencidina
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm
dt	Tiempo de duplicación
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	Etilendiaminotetracético
EUA	Estadis Unidos de America
FAO	Organización de alimentación y agricultura
FEMSA	Fomento Económico Mexicano, S.A.
GFP	Proteína verde flourescente
<i>Gus</i>	$\beta$ - glucoranidasa
Ha	Hectáreas
INIFAP	Instituto nacional de investigaciones forestales, Agrícolas y pecuarias

IPP	Isoleucina-prolina-prolina
K	Potasio
kDa	Kilodaltones
KDEL	Lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-Leucina
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico
Kpb	Kilo pares de bases
H	Hora
HCL	Ácido clorhídrico
HBsAg	Anticuerpo monoclonal derivado de suero humano
HBV	Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
hGM-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos
HHL	hipuril-histidil-leucina
HTA	Hipertensión arterial
<i>Htp</i>	higromicina fosfotransferasa
IC	Índice de crecimiento celular

IC <sub>50</sub>	Media máxima concentración inhibitoria
ITESM	Instituto tecnológico de estudios superiores de Monterrey
L	litro (s)
l	longitud
kb	Kilo base
Ln	Logaritmo natural
LT-B	La subunidad B de la toxina termolábil
MES	Ácido etanosulfónico 2-(morfolino) monohidratado
MUG	4-metil-umbeliferil- β-D-glucorónido
NaCl	Cloruro de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de potasio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCRPIS	North Central regional Plant Introduction Station
ng	Nano gramos

NV	No viables
nm	Nanometro (s)
<i>npfl</i>	neomicina fosfotransferasa II
NT-1	<i>Nicotiana tabacum -1</i>
NTH	Medio de crecimiento NT-1 mas higromicina
NTTH	Medio de crecimiento NT-1 mas timentina mas higromicina
NVCP	Cápside de la proteína del virus Norwalk
pb	Pares de bases
$P_0$	Peso inicial
Pa	Pascal (es)
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polietilenglicol
PER	Relación de eficiencia protéica
$P_F$	Peso final

pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVP	Poli vinil pirridolina
RPM	Revoluciones por minuto
s	Segundo (s)
SDS	Docecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	El Electroforesis en gel de poliacrilamida con docecil sulfato de sodio
t	Tiempo
Ti	Inductor de tumores
TRIS	<b>tris</b> (hidroximetil)aminometano
Tyr	Tirosina
V	Volt (s)
Val	valina
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1
<i>vir</i>	Genes de virulencia
VY	Valina-tirosina

VYVYVYVY	Valina-tirosina-valina-tirosina-valina-tirosina-valina-tirosina
WHO	Organización mundial de la salud
WT	Wild type
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido
X	Biomasa al tiempo t
X <sub>0</sub>	Biomasa inicial