



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
Y DE LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: EXPRESIÓN DE TRIPSINA HETERÓLOGA EN SUSPENSIONES
DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) MEDIANTE TRANSFECCIÓN POR EL
SISTEMA NANOSTRAW**

AUTOR: GARZÓN FREIRE, DIEGO FRANCISCO

DIRECTORA: Dra. PROAÑO TUMA, KARINA ISABEL Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**EXPRESIÓN DE TRIPSINA HETERÓLOGA EN SUSPENSIONES CELULARES DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) MEDIANTE TRANSFECCIÓN POR EL SISTEMA NANOSTRAW.**” fue realizado por el señor *Garzón Freire, Diego Francisco* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de junio del 2019

Firma:

Karina Isabel Proaño Tuma, Ph.D.

C.C. 1707245104



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Garzón Freire, Diego Francisco*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “*Expresión de tripsina heteróloga en suspensiones de tabaco (Nicotiana tabacum) mediante transfección por el sistema nanostraw.*” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 19 de junio del 2019

Firma:

Diego Francisco Garzón Freire

C.C. 1721031191



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN

*Yo, Garzón Freire Diego Francisco autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Expresión de tripsina heteróloga en suspensiones de tabaco (Nicotiana tabacum) mediante transfección por el sistema nanostraw en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad***

Sangolquí, 19 de junio del 2019

Firma:

Diego Francisco Garzón Freire

C.C. 1721031191

DEDICATORIA

A mis padres Victor y Eugenia,
por su incondicional apoyo
en cada momento de mi vida
y por mantener siempre constante
su confianza en mi.

A mis hermanos David y Domenica,
por brindarme todo su apoyo.

A todos mis amigos,
que han representado mi apoyo
en todo momento.

Diego Francisco Garzón Freire

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que siempre han estado a mi lado, siendo mi modelo a seguir y soporte imprescindible para culminar esta etapa de mi vida. Cada uno contribuyendo con sus enseñanzas y dedicando su tiempo para formar la persona que soy.

A mis hermanos, que han sido mis amigos y me han ayudado a aprender en cada una de las aventuras que hemos vivido juntos.

A mi mentora Dra. Karina Proaño, por depositar su confianza en mí, permitiéndome ser parte de su equipo de trabajo y por todas sus enseñanzas tanto académicas como personales. A Gabriela Miño técnica de laboratorio, por todo el tiempo brindado para apoyar cada uno de los proyectos que me proponía.

A todos mis profesores, que han contribuido en esta fase académica de mi vida y que siempre llevaré en mi memoria sus enseñanzas para plasmarlas en mi vida profesional. A todos mis compañeros de aula, que directa o indirectamente han contribuido en mi desarrollo académico.

A mis compañeros de laboratorio, Mayra y Alexis por todo el conocimiento y vivencias compartidas en el laboratorio, a Israel y Giulette por ser mis pasantes con los que compartimos mucho bulling dentro y fuera del laboratorio.

A mi novia Emilia y a mis amigos, Negro, Daniel, Sebas, Caro, Tany, Sofy, Marianela, Mauro y Naty por haber compartido conmigo toda esta experiencia dentro y fuera de la universidad.

Diego Francisco Garzón Freire

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE FIGURAS	viii
LISTADO DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Marco teórico.....	4

1.4.1 Producción de biomoléculas en modelos vegetales.....	4
1.4.1.1 <i>Nicotiana tabacum</i> como biofábrica celular	5
1.4.1.2 Expresión de biomoléculas en tabaco	6
1.4.2 Transfección en modelos vegetales	6
1.4.2.1 Tecnologías de transfección	8
1.4.2.2 Importancia de la transfección	11
1.4.3 Biomoléculas de interés comercial	11
1.4.3.1 Tripsina.....	13
1.5 Hipótesis	15
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 Participantes	16
2.2 Zona de estudio.....	16
2.3 Duración de la investigación	16
2.4 Metodología.....	17
2.4.1 Obtención y viabilidad de suspensiones celulares de tabaco	17
2.4.2 Extracción del plásmido	18
2.4.3 Estandarización del sistema nanostraw	20
2.4.3.1 Selección de la solución de electroporación.....	20
2.4.4.2 Selección de la fuerza de centrifugación.....	20
2.4.4.3 Selección de los parámetros de electroporación.....	21
2.4.4.4 Ensayo de introducción del plásmido pSIM 24	22
2.4.4.5 Ensayos de debilitamiento de pared de las suspensiones celulares.....	23
2.4.4.6 Viabilidad celular post-transfección.....	24

	vi
2.4.5 Expresión de tripsina	25
2.4.5.1 Diseño del gen de la tripsina	25
2.4.5.2 Clonación del gen de tripsina	26
2.4.5.3 Introducción del gen de tripsina	28
2.4.5.4 Evaluación de la expresión de tripsina	29
2.5 Diseño experimental.....	30
2.6 Análisis estadístico	30
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	31
3.1 Obtención y viabilidad de suspensiones celulares de tabaco	31
3.2 Extracción del plásmido	33
3.3 Estandarización del sistema nanostraw	35
3.3.1 Evaluación de las soluciones de electroporación	35
3.3.2 Evaluación de la fuerza de centrifugación.....	37
3.3.3 Evaluación de los parámetros de electroporación	42
3.3.4 Eficiencia de transfección con el plásmido pSIM24	49
3.3.5 Eficiencia del debilitamiento de la pared	52
3.3.6 Viabilidad post-transfección.....	55
3.4 Expresión de tripsina	56
3.4.1 Ensamblaje del plásmido pSIM 24- TRP	56
3.4.2 Introducción del gen de la tripsina	57
3.4.3 Eficiencia de la expresión de la tripsina	58
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	61

Transfección de células tabaco mediante el sistema nanostraw	vi 61
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	67
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	68
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Programa de la PCR directa del gen GFP de células transformadas	23
Tabla 2 Concentraciones de los reactivos de la digestión P _{sim24} y TRP	26
Tabla 3 Reactivos de la ligación del plásmido pSIM 24 y gen TRP	27
Tabla 4 Programas para la PCR colony del gen TRP de células transformadas	28
Tabla 5 Concentración y calidad de las diferentes extracciones del plásmido utilizando el Kit Qiagen y el método combinado	35

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1 Dispositivo Nanostraw.....	10
Figura 2 Diseño del Gen de tripsina (TRP).....	26
Figura 3 Número de células disgregadas en el medio MS en relación a la concentración de callo durante 16 días.A: Concentración 1 g/ml de callo, B:Concentración 2 g/ml de callo	31
Figura 4 Ensayo de tinción de núcleos para determinar viabilidad de las suspensiones celulares de tabaco en las concentraciones de 1g/100mL y 2g/100mL.....	32
Figura 5 Viabilidad de las suspensiones celulares de tabaco para las concentraciones de 1g/100mL y 2g/100mL callo durante 16 días.....	33
Figura 6 Gel de electroforesis al 1% de la comparación de los tres protocolos de extracción del plásmido pSIM24 con control de temperatura (T1,T2 y T3) y sin control de temperatura(T4,T5 y T6)	34
Figura 7 Gráfico de barras de la eficiencia de las	36
Figura 8 Ensayo de viabilidad celular con PI luego de la exposición a las fuerzas de centrifugación de 200, 250 y 300g.	38
Figura 9 Gráfico de barras de la viabilidad celular luego	39
Figura 10 Eficiencia de introducción del PI en las células después de los tratamientos de centrifugación (200, 250 y 350 g) y la electroporación.....	40
Figura 11 Gráfico de barras de la eficiencia de introducción del PI luego de la exposición a las fuerzas de centrifugación (200, 250 y 300g) y a la electroporación	41

Figura 12	Eficiencia de introducción del PI en células de tabaco al ser expuesto a distintos voltajes (0,25,30,35V) de electroporación	43
Figura 13	Gráfica de barras de la relación de la viabilidad.....	44
Figura 14	Eficiencia de introducción del PI en células de tabaco al ser expuesto a intervalos de tiempo entre pulso de electroporación de 60, 40 y 20 s.	46
Figura 15	Gráfica de barras de la relación de la viabilidad.....	47
Figura 16	Eficiencia de la introducción del PI en células de tabaco al ser expuesto a 3 y 6 pulsos de electroporación	48
Figura 17	Gráfica de barras de la relación de la viabilidad celular y la eficiencia de introducción del PI cuando se expone a 3 y 6 pulsos de electroporación.	49
Figura 18	Transfección de células de tabaco con el plásmido pSIM24 utilizando dos distintas soluciones de electroporación PBS y TE. Fotos en campo claro, fluorescencia y combinado	50
Figura 19	Gel de agarosa al 1% de la PCR directa del gen GFP de las	51
Figura 20	Transfección de células de tabaco con el plásmido pSIM24 después del debilitamiento de la pared con DMSO, pectinasa y solución de preplasmólisis.....	53
Figura 21	Gráfico de barras de la comparación de la eficiencia de la transfección con el plásmido después del pretratamiento de las células.	54
Figura 22	Viabilidad de los transformantes después.....	55
Figura 23	Gel de electroforesis al 1% del corte del gen TRP y plásmido con las enzimas XbaI y HindIII.	57
Figura 24	Gel de electroforesis al 1% de la PCR directa de los 4 cultivos transfectados y el plásmido pSIM 24-TRP con el gen TRP.....	58

Figura 25 Comparación de la concentración de la proteína total en 5 días, en cultivos sin electroporar (C-), cultivo con electroporación sin plásmido (C), tanto en medio como en la biomasa59

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
cm	centímetro
g.	gravedades
g	gramos
M	Molar
mg	Microgramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Murashige & Skoog
PCR	Polymerase chain reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Yoduro de propidio
PM	Peso molecular
TRP	Tripsina
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
°C	Centígrado

RESUMEN

En la actualidad el mundo se enfrenta a grandes problemas como son el cambio climático, la seguridad alimentaria y la seguridad energética. El termino bioeconomía ha sido introducido como respuesta para solventarlos. Debido a la capacidad para desarrollar modelos de manera sostenible. Uno de los modelos más utilizados en la actualidad es el “biofarming”, que consiste en la producción de moléculas en células vegetales. La obtención producción de biomoléculas, requieren de una técnica de transfección capaz de traspasar la pared celular, sin causar la muerte de las células. El sistema nanostraw ha presentados buenos resultados de transfección en células humanas, debido a que ha combinado dos técnicas de transfección como son la electroporación y la microinyección con nanomateriales. Por ello, la presente investigación propone la expresión de una biomolécula como la tripsina en suspensiones celulares de tabaco utilizando el sistema nanostraw. Las condiciones óptimas en la estandarización del sistema nanostraw fue de 36 V, 6 pulsos y 20 s entre cada pulso, obteniendo una eficiencia del 0.27 % en la eficiencia de introducción del plásmido pSIM24. La expresión de tripsina en el modelo de suspensiones celulares transfectadas por el sistema nanostraw presentó una eficiencia de expresión para el medio de 0,28423 mg de tripsina /ml de medio y de la biomasa de 0,3913 mg de tripsina /Kg en la biomasa.

PALABRAS CLAVES:

- **TABACO**
- **TRIPSINA**
- **NANOSTRAW**

ABSTRACT

At present, the world is facing major problems such as climate change, food security, and energy security. The term bioeconomy has been a source of response to solve these. Due to the ability to develop models of production of biomolecules of interest in various fields in a sustainable manner. One of the most used models today is the "biofarming" in cell suspensions of tobacco, which involves the production of molecules in plant cells. Obtaining cell suspensions that produce biomolecules, the requirements of a transfection technique capable of go through the cell wall, without causing cell death. The nanostraw system has been successful transfection results in human cells, because it has combined two transfection techniques such as electroporation and microinjection with nanomaterials. For that, the present investigation proposes the expression of a biomolecule such as the trypsin in cell suspensions of tobacco using the nanostraw system. The optimal conditions in the standardization of the nanostraw system were 36 V, 6 pulses and 20 s between each pulse, obtaining an efficiency of 0.27% in the efficiency of the introduction of the pSIM24 plasmid. The expression of tripsyn in the model of cell suspensions transfected by the nanostraw system showed an expression efficiency for the medium of 0.28423 mg of trypsin / ml of medium and of the biomass of 0.3913 mg of trypsin / kg in the biomass

KEYWORDS:

- **TOBACCO**
- **TRYPSIN**
- **NANOSTRAW**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La tripsina es una de las enzimas digestivas más importante a nivel mundial por su variedad de aplicaciones en la industria y la medicina. En la lista de productores de tripsina constan países como Estados Unidos, China, Japón y la Unión Europea. Según Global Info Research, en el año 2017 el mercado de la tripsina recombinante creció en un 6.66% llegando a una producción de 120 millones de litros y una ganancia de 37 millones de dólares (Global Info Research, 2018).

En América del sur la producción de tripsina se limita a la obtención de esta enzima a partir del páncreas de bovinos y de cerdos. Sin embargo, el rendimiento de extracción de la enzima es bajo comparado con la gran cantidad de materia prima necesaria, lo que provoca un aumento en el precio de venta (Woodard, *et al.*, 2003). En Ecuador no existen registros de producción de tripsina, aunque se ha evidenciado la importación de este producto para suplir necesidades en el campo agrícola, farmacéutico, industrial y alimenticio (MAG, 2018).

Los métodos de producción masiva de proteínas, comúnmente usados a nivel mundial, consisten en la expresión de moléculas dentro organismos como bacterias, levaduras y células vegetales. No obstante, en el Ecuador la falta de sistemas de producción estandarizados en el país, han llevado al encarecimiento de estas moléculas y sus productos derivados (Ramírez M. , 2018). Estos problemas junto con el incremento anual en la demanda de tripsina en la industria, convierte

a esta proteína en un bioproducto de interés para la producción masiva en sistemas de expresión sustentables (Global Info Research, 2018).

De tal manera, que el objetivo de este trabajo es buscar un sistema de producción estandarizado capaz de obtener la tripsina como bioproducto para beneficiar al área productiva ecuatoriana.

1.2 Justificación del problema

Los procesos industriales en el Ecuador han involucrado la utilización de una gran cantidad de enzimas, es así que se estima que el 60% de enzimas utilizadas en esta área son proteasas (Haard, 2012). Las principales enzimas con aplicación en la industria son la tripsina, bromelina y pepsina (Kumar & Chand, 2005), las cuales se utilizan principalmente en curtido de cueros, cultivo celular, producción de fármacos, procesamiento de alimentos y formulación de detergentes (Haard, 2012).

A pesar de la importancia de las enzimas en la industria, en el país no existen empresas dedicadas a la producción de las mismas, lo que encarece el precio de los productos finales. Uno de los factores para la inexistente producción nacional es la falta de sistemas de producción eficientes, de bajo costo y responsables con el ambiente para la obtención de proteasas útiles para la industria.

En los últimos años se han presentado como alternativas algunos sistemas capaces de producir moléculas de interés industrial de manera sostenible y económicamente factible (Kumar & Chand, 2005). Entre los principales sistemas utilizados se encuentran las bacterias, levaduras,

animales y plantas (Meena & Hasrishi, 2001). Actualmente se ha brindado un mayor énfasis a la producción de biomoléculas en modelos vegetales conocido como “biofarming”, debido a la facilidad de escalamiento y manipulación de estos modelos (Hellwing, Drossard, Twyman, & Fischer, 2004). Se ha puesto especial interés en células vegetales de tabaco (*Nicotiana tabacum*), por la alta tasa de expresión de proteínas heterólogas como anticuerpos, proteínas antibacterianas, péptidos terapéuticos, enzimas, entre otros (Twyman, Stoger, Schillberg, Chritou, & Fischer, 2003).

En el Ecuador, el “biofarming” no se ha desarrollado por el momento, debido a la falta de técnicas estandarizadas de transfección que permitan la inserción de ADN foráneo para la expresión de biomoléculas. Por tal razón, el sistema nanostraw que propone este trabajo de investigación es una alternativa para lograr la transfección, debido a la versatilidad que presenta (Aalipour, Xu, Leal-Ortiz, Garner, & Melosh, 2014). Por lo antes mencionado, este trabajo plantea una alternativa para la expresión de tripsina heteróloga a partir de suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante la transfección con el sistema nanostraw.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Expresar tripsina heteróloga en suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum* (tabaco) mediante transfección por el sistema nanostraw.

1.3.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la viabilidad celular de los cultivos de tabaco antes y después de la transfección con el sistema nanostraw.
- Determinar la eficiencia de transfección del sistema nanostraw en las suspensiones celulares de tabaco.
- Evaluar la eficiencia de expresión de tripsina en las suspensiones celulares de tabaco.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Producción de biomoléculas en modelos vegetales

La producción de biomoléculas en modelos vegetales o biofarming consiste en la sobreproducción de moléculas necesarias para la industria en diferentes tejidos de plantas (Demain & Vaishnav, 2009). En la última década, la expresión en modelos vegetales ha ganado fuerza debido a la capacidad para usar la fotosíntesis como fuente de energía y la gran cantidad de biomasa útil en la planta para la producción de proteínas (Xu, Dolan, Medrano, Cramer, & Weather, 2011).

Las plantas como modelo vegetal para la producción de biomoléculas presentan varias ventajas debido al potencial para producir moléculas con buena calidad y a bajo costo. La capacidad que poseen las plantas de realizar la mayoría de las modificaciones post-traduccionales complejas de los eucariotas, la flexibilidad en el escalamiento, la bioseguridad que otorga al no ser susceptible a los patógenos humanos y la facilidad de purificación comparable con modelos procariotas, hacen

que las plantas sean un modelo cada vez más utilizado en el mundo (Howard, Nikolov, & Hood, 2011).

Los principales modelos vegetales utilizados por su eficiencia de transformación y por su alta tasa de producción son el maíz, la soya, el tabaco, el arroz, la papa, la alfalfa y la *Arabidopsis*. Varios de estos han sido escalados a nivel industrial para la producción de enzimas, anticuerpos y proteínas terapéuticas (Davies, 2010) .

1.4.1.1 *Nicotiana tabacum* como biofábrica celular

Nicotiana tabacum es una planta que tiene un tamaño medio entre 50 cm y 130 cm de altura originaria del sur del continente americano, perteneciente a la familia de las solanáceas. Esta planta es comúnmente conocida por la importancia industrial en la obtención de nicotina para la producción de cigarrillos (Mondragon, 2009).

Actualmente la planta de tabaco es utilizada como modelo vegetal para conocer los diferentes ciclos biológicos y fisiológicos de las plantas, los procesos de expresión, así como la función de genes y proteínas. En la industria biotecnológica se la ha utilizado como biofábrica debido al amplio conocimiento que se tiene sobre esta y al alto rendimiento para acumular proteínas y biomoléculas en sus diferentes tejidos (Xu, Dolan, Medrano, Cramer, & Weather, 2011)

Uno de los tejidos con mayor uso son las suspensiones celulares de tabaco. Las suspensiones son cultivos celulares que se encuentran disgregados libremente en un medio líquido. Se obtienen de un callo cultivado en medio sólido, transferido a un medio líquido y mantenido en agitación constante (Fischer, Emans, Schuster, Hellwig, & Drossard, 1999). La fermentación de

suspensiones de tabaco se puede desarrollar utilizando el mismo equipamiento que el utilizado en la fermentación de los modelos procariontes. Este sistema presenta algunas limitaciones como son la baja tasa de crecimiento celular, la variación somaclonal y el silenciamiento de genes, sin embargo, cada una de ellas puede ser optimizada con la adición de nutrientes, precursores o elicitores (Sato, Nakayama, & Shigeta, 1996).

Las suspensiones celulares en la biotecnología han sido utilizadas en su mayoría para la producción de metabolitos secundarios naturales o heterólogos. Algunos de ellos son la shikonin, las antocianinas, anticuerpos y algunos anticancerígenos como el taxol, vincristina y vinblastina (Noble, 1990).

1.4.1.2 Expresión de biomoléculas en tabaco

El proceso de expresión de biomoléculas en tabaco se encuentra dividido en tres etapas. La primera etapa se refiere al diseño de la secuencia de la biomolécula (Fischer, Emans, Schuster, Hellwig, & Drossard, 1999), en la cual se debe tomar en cuenta los procesos de extracción y purificación dependiendo de la localización y conformación de la proteína (Sato, Nakayama, & Shigeta, 1996). La segunda etapa consiste en la transfección y la expresión del gen. La tercera etapa es la fermentación, que consiste en la estandarización de los procesos de crecimiento para la obtención del mayor rendimiento posible (Fischer, Emans, Schuster, Hellwig, & Drossard, 1999).

1.4.2 Transfección en modelos vegetales

La transfección es un procedimiento natural o artificial que permite la introducción de material genético foráneo (ADN o ARN) en organismos eucariotas. Esta técnica representa una

herramienta para el estudio de la función, regulación y expresión de genes (Kyung & Eberwine, 2010).

La transfección puede ser de tipo transitoria o estable dependiendo de la naturaleza del material genético introducido (Recillas-Targa, 2006). Para el tipo transitorio, el ADN se introduce de manera circular de tal forma que los genes expresados permanecen únicamente durante un tiempo limitado. Por el contrario el tipo estable, integra fragmentos de ADN lineal en su genoma, permitiendo una expresión del gen permanente (Glover, Lipps, & Jans, 2005).

Se han realizado estudios con ambos tipos de transfección en diferentes organismos eucarióticos, empleando modelos como hongos, células de mamíferos y plantas. La transfección en plantas presenta un gran potencial debido a las diferentes aplicaciones en la investigación básica de plantas, en la biotecnología moderna vegetal y el en cultivo molecular o biofarming (Chen, Chou, Liu, Chang, & Lee, 2007).

En el año de 1984 fue descrita por primera vez la inserción de material genético foráneo en la planta de tabaco, *Nicotiana tabacum* (Narusaka, Narusaka, Yamasaki, & Iwabuchi, 2012). La inserción se realizó a través del cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (De Block, Herrera-Estrella, Montagu, Schell, & Zambryski, 1984). A partir de estas investigaciones, el desarrollo de las tecnologías de transformación hasta el día de hoy se han ido incrementado, obteniendo como resultado plantas modificadas genéticamente con resistencia a insectos, virus, bacterias y factores abióticos (Keshavareddy, Kumar, & Vemanna, 2018).

1.4.2.1 Tecnologías de transfección

La transfección de plantas ha permitido la comprensión de la función de varios genes y proteínas, además del desarrollo de moléculas de interés a nivel industrial y farmacéutico (Maas & Werr, 1989). Esto se ha dado gracias al amplio avance en las tecnologías de transfección (Narusaka, Narusaka, Yamasaki, & Iwabuchi, 2012).

El ingreso del material genético por medio de las tecnologías de transfección pueden darse de forma biológica y no biológica. La forma biológica consiste en el uso de virus o bacterias como vehículos para la transferencia de genes (Keshavareddy, Kumar, & Vemanna, 2018). La principal bacteria utilizada es el *Agrobacterium tumefaciens*, la cual causa tumores en la planta, debido a su habilidad para transferir parte de su ADN plasmídico en el genoma nuclear de la planta infectada (Gelvin, 2000).

La forma no biológica consiste en el uso de métodos físicos o químicos para el ingreso del material genético (Birch, 1997). Los métodos químicos utilizan las propiedades de compuestos como el polietilenglicol para cambiar la carga y estructura de la membrana celular, abriendo poros en la misma para el paso del ADN (Marthur & Koncz, 1997). Los métodos físicos consisten en aplicaciones de pulsos eléctricos, punciones o descargas de materiales a presión a través de la membrana celular para el ingreso del ADN a la célula (Sanford, Klein, Wolf, & Allen, 1987) .

1.4.2.1.1 Electroporación

La electroporación es un método directo de transfección, que aprovecha los campos eléctricos fuertes para abrir canales físicos temporales en la bicapa lipídica, permitiendo introducir

moléculas polares dentro de las células (De Palma, 2014). La técnica fue diseñada para la inserción de material genético en células animales, sin embargo, en años posteriores esta técnica se adaptó para el uso en plantas (Terzaghi & Cashmore, 2012).

La técnica de electroporación ha presentado un gran potencial en procesos de transfección en plantas debido a su facilidad y bajo costo, sin embargo se ha limitado su uso debido al requerimiento de material vegetal específico para su aplicación como los protoplastos (Fromm, Taylor, & Walbot, 1986). La principal limitante es la rigidez y fortaleza de la pared celular que restringe el paso del ADN. Según Lindsey & Jones (1987), se ha logrado transfectar granos de polen, protoplastos y algunos tejidos intactos (Lindsey & Jones, 1987).

1.4.2.1.2 Microinyección de carburo de silicio

Las fibras de carburo de silicio son nanomateriales con un diámetro entre 5 a 150 μm , compuestos por una composición de carbono y silicio. La composición proporciona una gran resistencia a la temperatura, expansión térmica y corrosión química, además de un bajo peso y gran fuerza de resistencia (Maxwell, Chavez, Springer, Maskaly, & Goodin, 2007). Debido a las propiedades de este compuesto se lo ha utilizado en la industria y en la investigación (Kaeppler, Gu, Somers, Rines, & Cockburn, 1990).

En el área de investigación se ha aprovechado este material para realizar transfección y transformación a nivel celular. Para lograrlo se ha desarrollado microprojectiles recubiertos con material genético, los cuales son capaces de penetrar la pared celular al aplicar una fuerte homogenización (Klein, Wolf, Wu, & Sanford, 1987). La tecnología de microinyección se ha

utilizado en células de insectos y en suspensiones celulares vegetales, llegando a tener eficiencias de alrededor de 0.001 % de transformantes (Kaepler, Gu, Somers, Rines, & Cockburn, 1990).

1.4.2.1.3 Sistema nanostraw

El sistema nanostraw consiste en un dispositivo que combina la técnica de electroporación y la de microinyección. Esta técnica contiene una placa sobre la que se encuentran depositados nanotubos (20 nm) de óxido de aluminio y policarbonato, los cuales permiten el paso del ADN mediante el equipo de electroporación con voltajes bajos (Figura 1)(Xie, et al., 2013).

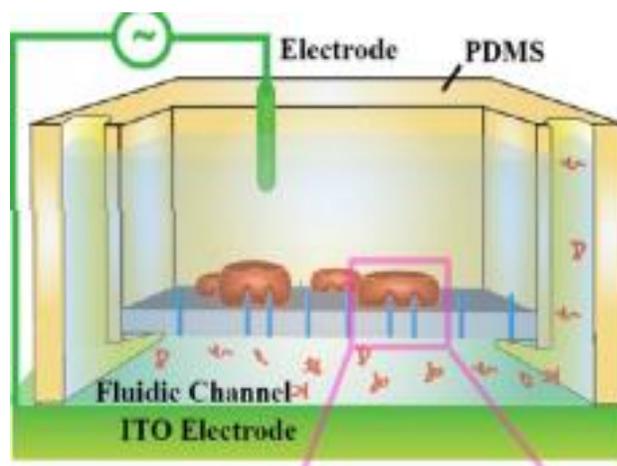


Figura 1. Dispositivo Nanostraw.

La unión de las dos técnicas de transfección permiten el incremento en la eficiencia de inserción de moléculas y la disminución en la muerte celular, debido a la capacidad del dispositivo para centralizar la apertura de canales en un solo punto de la célula con el uso de menores voltajes (Aalipour, Xu, Leal-Ortiz, Garner, & Melosh, 2014). La técnica ha conseguido

una eficiencia del 81 % y una viabilidad celular mayor al 98 % en la transfección de suspensiones celulares de mamíferos (Xie, et al., 2013).

1.4.2.2 Importancia de la transfección

La transfección en plantas ha tenido un gran potencial en la ciencia básica, debido a que ha sido utilizado para el estudio de la actividad, función y expresión de genes. Además de facilitar el entendimiento de la regulación genética y bioquímica de los sistemas complejos adaptivos y de crecimiento de las plantas. (Klee, Horsch, & Rogers, 1987).

La transfección ha permitido explotar de igual manera la capacidad para otorgar nuevas características fenotípicas a los cultivos, buscando aumentar la producción sustentable de alimentos a través de la disminución del uso de químicos peligrosos, gracias a las plantas resistentes a las plagas. Además se han obtenido modelos de producción a partir de plantas capaces de generar eficazmente y eficientemente productos farmacéuticos y nutracéuticos a nivel industrial que satisfagan la demanda para el área de la salud (Potenza, Aleman, & Sengupta, 2004).

1.4.3 Biomoléculas de interés comercial

En los últimos años como respuesta a los grandes problemas del mundo, como son el cambio climático, la seguridad alimentaria, la salud, la reestructuración industrial y la seguridad energética, se han introducido algunos términos como es el caso de la bioeconomía (Bugge, Hansen, & Klitkou, 2016). Este término ha ganado fuerza debido a su capacidad para crear soluciones de manera sustentable, amigable con el ambiente y rentable económicamente (Pulzl, Kleinschmit, & Arts, 2014). Entre los mayores logros se encuentran la producción de biocombustibles a partir de

desechos industriales, producción en masa de biomoléculas de interés industrial en espacios reducidos y la obtención de biomoléculas como tratamientos en la medicina (Richardson, 2012).

Las biomoléculas han generado gran interés en el mundo debido a que representan una solución en diferentes áreas. En el área de la salud se han desarrollado tratamientos alternativos contra patógenos que han creado resistencia a los fármacos convencionales, tratamientos para enfermedades sin cura y medicamentos con menores efectos secundarios que los medicamentos existentes en la actualidad (Baneyx, 1999).

En el área industrial se han generado productos como biocombustibles, lubricantes, aditamentos y aceites para el sector automotriz. También se han mejorado procesos industriales como la obtención de alcohol y el uso de enzimas en la curtiembre de textiles para la reducción de contaminantes (Karra, Trigui, Yust, Awad, & García, 2018).

En el área agrícola se han creado nuevos biocontroladores de patógenos como las defensinas y péptidos provenientes de genes de inmunidad primaria y moléculas capaces de otorgar protección a la planta frente factores abióticos o rayos UV como la rutina y la kercetina (Komarnytsky, Borisjuk, Borisjuk, Alam, & Raskin, 2000).

En el área alimenticia se han desarrollado péptidos para la desinfección y conservación de alimentos, así como moléculas capaces de evitar la oxidación de frutas y vegetales. Se han desarrollado además enzimas como la tripsina y la quimosina para fabricar alimentos procesados como embutidos, quesos y vinos gourmet (Maliga & Bock, 2011).

1.4.3.1 Tripsina

La tripsina (E.3.4.21.4) es una enzima de 23.3KDa, cuya función es hidrolizar los enlaces peptídicos en la unión C terminal de los residuos de lisina y arginina (Baird, 2017). Esta enzima comúnmente se la encuentra como un zimógeno cuando el páncreas es estimulado por la colecistoquinina, para una posterior activación por un corte en su estructura por la enteropeptidasa (Gudmundsdottir, Stefansson, & Bragi, 2013).

Las condiciones normales de trabajo de la enzima varían en relación del organismo que las produce, lo cual depende de la temperatura que podrá estar en el rango 4°C a 65 °C y del pH 7 a 8. Es importante conocer las condiciones óptimas de trabajo de la enzima, ya que esto ayudará a evitar la autólisis de la proteína y las modificaciones por metilación reductivas. Logrando así conservar la estructura nativa de la proteína (Barret & Rawlings, 1994).

1.4.3.1.1 Usos de la tripsina

La tripsina es una enzima digestiva que tiene un gran número de aplicaciones medicinales e industriales. Esta enzima tiene la capacidad para realizar una proteólisis controlada, lo que le otorga una gran especificidad durante los procesos industriales (Macouzet, Simpson, & Lee, 2005). La tripsina es ampliamente utilizada por su estabilidad bajo condiciones industriales como altas temperaturas, pHs alcalinos y presencia de surfactantes y agentes oxidantes (Ktari, *et al.*, 2012).

En el área alimenticia la tripsina se ha sido utilizada como controlador de péptidos hipoalergénicos, estabilizador de cerveza durante el congelado, ablandador de carne, suavizante de la textura de mariscos, controlador de aromas de quesos y productos lácteos, además como

catalizador para la obtención de proteínas para embutidos y sazonadores. Inclusive como aditivo enzimático para el horneado de pan (Polgar, 2005).

En el área agropecuaria se ha utilizado como suplemento alimenticio para mejorar la asimilación de nutrientes en la crianza de bovinos, porcinos y peces (Sagiv, 2001). También se ha descrito como un potencial insecticida y herbicida para el campo agrícola (Vasquez, Revin, Higaki, & Creaik, 1989).

En el área industrial se emplea como suplemento en detergentes para retirar manchas de ropas, en la fabricación de alimentos a partir de residuos industriales, además de ser usado como precursor para obtener materias primas como harinas, aminoácidos y colágeno hidrolizado. (Pratt, Voet, & Voet, 2008).

En el área de la salud ha servido como facilitador de la digestión, disolvente de coágulos sanguíneos y desinflamante, mientras que en el área de investigación biomédica se usa para el cultivo celular, para la identificación de la estructura péptidos por espectrometría de masas y la secuenciación de distintos péptidos (Harel, et al., 2019).

1.4.3.1.2 Obtención de tripsina

La extracción de tripsina generalmente se realiza del páncreas de bovinos y porcinos, aunque en la última década ha tomado fuerza la extracción a partir de modelos de expresión de ADN recombinante como bacterias, levaduras y plantas (Macouzet, 2004). La obtención usual de tripsina se ha desarrollado por medio de páncreas de bovinos y porcinos debido a la facilidad en

los procesos de extracción y purificación, sin embargo se ha dejado de lado este método por el bajo rendimiento y el alto costo de la materia prima (Baneyx, 1999).

El modelo de expresión más utilizado ha sido la bacteria *Escherichia coli*, la cual ha proporcionado un alto nivel de expresión y una alta densidad celular. Sin embargo, este modelo presenta algunos problemas en la purificación por la formación de cuerpos de inclusión (Yee & Blanch, 1993). Otro modelo utilizado es la levadura *Pichia pastoris*, la cual presenta altos niveles de expresión en fermentadores de hasta 5 L. Este modelo con levaduras presenta problemas cuando se emplean fermentadores más grandes, lo cual impide el escalamiento industrial (Macouzet, Simpson, & Lee, 2005). Por último, se ha utilizado al maíz como modelo vegetal para la sobreexpresión de tripsina en la raíz. Este modelo proporciona un buen rendimiento y facilidad en la purificación, sin embargo, el escalamiento implica un mayor infraestructura en comparación con los otros modelos (Woodard, et al., 2003).

1.5 Hipótesis

La transfección con el sistema nanostraw permite la expresión de tripsina en suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum* (tabaco).

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente investigación ha sido elaborada por Diego Garzón Freire egresado de la Carrera Ingeniería en Biotecnología, bajo la tutoría de la Dra. Karina Proaño Ph.D. jefe del laboratorio de Biotecnología Vegetal y la asesoría de Sergio Leal Ortiz Ph.D. investigador de la Universidad de Standford de Estados Unidos. El financiamiento de la investigación estuvo a cargo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armada-ESPE.

2.2 Zona de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE campus ubicado en Sangolquí, ubicado en el cantón Rumiñahui, de la Provincia de Pichincha en la Av. General Rumiñahui S/N y calle Ambato, Sector Santa Clara, Latitud: 0°18'53"S, Longitud: 78°26'36"O.

2.3 Duración de la investigación

El tiempo de duración de esta investigación fue de aproximadamente 12 meses. Se inició en el mes de mayo del 2018 y culminó en mayo del 2019.

2.4 Metodología

El presente estudio se realizó en tres fases: La primera fase consistió en la obtención de suspensiones celulares, las cuales se obtuvieron a partir de cultivos de callo de tabaco del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas. En la segunda fase se estandarizó el sistema nanostraw utilizando microscopia de fluorescencia y en la tercera fase se analizó la expresión del gen de tripsina en células vegetales.

2.4.1 Obtención y viabilidad de suspensiones celulares de tabaco

Las suspensiones celulares se obtuvieron a partir de callos friables de tabaco de la variedad BY2 de un mes de edad. En los ensayos, las suspensiones celulares se prepararon colocando en un erlenmeyer de uno a dos gramos de callo por cada 100 ml de medio Murashige & Skoog (MS) e incubando en agitación a 28°C a 300 RPM. A partir de lo cual se procedió con el conteo cada dos días del número de células viables, para obtener un cultivo con mayor viabilidad. Cada cultivo establecido se lo subdividió en erlenmeyers con 100 ml de medio Murashige y Skoog para incrementar el número de las suspensiones celulares. Los subcultivos fueron cambiados de medio cada 7 días.

La viabilidad celular consistió en un ensayo de fluorescencia con PI (yoduro de propidio), debido a la capacidad que tiene de ingresar a la célula y teñir el núcleo cuando la membrana celular ha sufrido un daño.

El ensayo se llevó a cabo a partir de un cultivo de suspensiones celulares madre, el cual fue diluido a 50000 células en 400 ul de medio MS. La viabilidad se evaluó cada 2 días después de la

siembra. La evaluación se llevó a cabo en el microscopio invertido Olympus IX 53, con un filtro rojo de absorbancia de 600-680nm y el conteo celular se lo realizó utilizando el programa Cell Sens.

2.4.2 Extracción del plásmido

El aislamiento y purificación del plásmido se realizó comparando tres métodos diferentes. El primero usando el kit Pure Link Quick Plasmid Miniprep de la casa comercial Thermofisher, el segundo utilizando el método de Lisis Alcalina y el tercero una combinación de ambos.

El primer método se llevó a cabo utilizando 3 ml de medio saturado LB con *Escherichia coli* DH5alfa. Las bacterias se centrifugaron a 13000 RPM por 1 minuto. Se recolectó el pellet y se resuspendió en 250 ul de buffer R3 y 250 ul de buffer L7. Se dejó reposar la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 350 ul de Buffer N4 y se homogenizó por inversión. La mezcla fue centrifugada por 10 minutos a 13000 RPM. El sobrenadante obtenido se colocó en una columna de sílica y se centrifugó a 13000 RPM por 1 minuto. La purificación fue realizada haciendo lavados con 500 ul del buffer W10 y 700 ul del buffer W9 y una posterior centrifugación por 1 minuto a 13000 RPM por cada uno de los buffers. Finalmente, se eluyó el plásmido con 75 ul de buffer TE por 2 minutos a 13000 RPM.

El segundo método es una modificación del método de Lisis Alcalina de Sambrook y Russell(2001). Este consiste en la separación del ADN plasmídico del genómico a través de la desnaturalización del ADN por medio de la variación del pH. El método inicia con una centrifugación de 13000RPM por 1 minuto a 3 ml de medio saturado con bacterias. El pellet se

resuspendió en 250 ul de solución de Lisis 1 (50mM glucosa o dextrosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8), y se dejó incubar por 2 minutos. Luego se colocó 250 ul de la solución de Lisis 2 (0,2N NaOH, 1 % (w/v) SDS), se homogenizó por inversión y se incubó por 5 minutos en hielo. Posteriormente se colocó 350 ul de solución de Lisis 3 (5M de acetato de potasio, ácido glacial acético) y se incubó inmediatamente por 10 minutos en hielo. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó por 10 minutos a 13000RPM. El sobrenadante resultante se purificó utilizando el doble del volumen de etanol absoluto y se centrifugó a 13000 RPM por 30 minutos. El pellet resultante se lavó con etanol al 70% y se centrifugó por 20 minutos a 13000RPM. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 ul de agua DEPC.

El tercer método consistió en una combinación del primer y segundo método, en el cual se utilizó las soluciones de extracción del Kit y se usó el sistema de purificación del método de Lisis Alcalina. Se centrifugaron a 13000 RPM por 1 minuto las bacterias del cultivo inicial. El pellet resultante se resuspendió en 250 ul de buffer R3 y 250 ul de buffer L7. La mezcla se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 350 ul de Buffer N4 y se centrifugó por 10 minutos a 13000 RPM. El sobrenadante obtenido se mezcló con el doble del volumen de etanol absoluto y se centrifugó a 13000 RPM por 30 minutos. El pellet resultante se lavó con etanol al 70% y se centrifugó por 20 minutos a 13000RPM. Finalmente, el pellet se "resuspendió en 50 ul de agua DEPC.

2.4.3 Estandarización del sistema nanostraw

La estandarización del sistema nanostraw se realizó a través de la cuantificación de la viabilidad y la eficiencia de inserción del PI bajo los efectos de: diferentes soluciones, fuerzas de centrifugación, voltajes, número de pulsos y tiempo de descanso de los pulsos.

2.4.3.1 Selección de la solución de electroporación

Para seleccionar la solución óptima de transfección, se evaluó la capacidad de cada solución para conducir el plásmido pSIM24 del primer compartimento hacia el compartimento donde se coloca las células. Se midió la concentración inicial del plásmido diluido en las soluciones PBS 1X (0.137M Cloruro de Sodio, 0.0027M Cloruro de potasio, 0.01M Fosfato disódico, 0.0018M fosfato monopotásico), EPR (10 mM MES, 10 % glucosa, 4mM cloruro de sodio), TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA) y Cloruro de Calcio (12mM) para cada uno de los casos en el espectrofotómetro Nanoview de General Electrics. Luego se procedió hacer una electroporación e 3 pulsos de 40 segundos a 15 V, 200us, 40 hz, con un descanso de 80 segundos entre pulsos utilizando el sistema de entrega NAV100 de la empresa NAVAN. Finalmente se midió la concentración de plásmido en el compartimento donde se encuentran las células.

2.4.4.2 Selección de la fuerza de centrifugación

La selección de la fuerza de centrifugación óptima se realizó a través de la evaluación de la eficiencia de inserción del PI dentro de las células y la viabilidad celular. En el ensayo se evaluaron las fuerzas de centrifugación de 200, 250 y 300 g, tomando en cuenta el resultado de la selección

de la solución de electroporación y las condiciones de electroporación de 3 pulsos de 40 segundos a 15 V, 200us, 40 hz, con un descanso de 80 segundos entre pulsos.

Las células se prepararon utilizando 5 ml de un cultivo de 72 horas, las cuales fueron centrifugadas por 5 minutos a 5000 revoluciones y resuspendidas en PBS 1 X, luego se llevaron a una concentración de 50000 células en 350 ul de PBS, mientras que el cargo o la solución de traspaso se preparó en una relación PI: PBS de 1:7.

Para el ensayo de viabilidad se colocaron las suspensiones celulares en la cubeta nanostraw y se centrifugaron por 5 minutos para cada una de las fuerzas de centrifugación, luego de lo cual se realizó el ensayo de viabilidad celular.

En el ensayo de eficiencia se analizó las fuerzas de centrifugación después de la electroporación utilizando las condiciones mencionadas anteriormente y 70 ul de la solución de traspaso. La evaluación se llevó a cabo en el microscopio invertido Olympus IX 53, con un filtro rojo de absorbancia de 600-680nm.

2.4.4.3 Selección de los parámetros de electroporación

Para seleccionar los parámetros óptimos de electroporación se tomó en cuenta tres condiciones: el voltaje, el número de pulsos y el intervalo de tiempo entre cada pulso. Cada uno de ellos se evaluó de manera individual y el resultado de estos influyó en las condiciones de la siguiente variable a evaluar. Para cada uno de los parámetros se tendrá como variables de respuesta a la viabilidad y la eficiencia de inserción del PI.

Para seleccionar el voltaje óptimo se realizó diferentes electroporaciones, variando el voltaje y manteniendo las condiciones de 3 pulsos de 40 segundos a 200us, 40 hz, con un descanso de 80 segundos entre pulsos. Además, se realizó una centrifugación previa a la electroporación de las células en la cubeta nanostraw a 250 g. El voltaje se varió de 0 a 35 con un aumento de 5 en 5 para cada uno de los tratamientos. Inmediatamente después de la electroporación, se evaluó la viabilidad y la eficiencia de introducción mediante microscopia de fluorescencia.

El intervalo óptimo entre cada pulso se seleccionó disminuyendo en 20 segundos el tiempo a partir de 60 s hasta 20 s. Las electroporaciones de cada uno de los tratamientos se realizaron utilizando 3 pulsos de 40 segundos a 36 V, 200us, 40 hz y variando el tiempo de descanso entre cada pulso. Luego de la electroporación se evaluó la viabilidad y la eficiencia de introducción mediante el método de fluorescencia.

El número de pulsos se evaluó utilizando las condiciones de 40 segundos a 36 V, 200us, 40 hz con un tiempo de 20 s entre pulso. Se utilizó un número de pulsos de 3 y 6 para evaluar la condición que otorga una mayor viabilidad y eficiencia de introducción del PI.

2.4.4.4 Ensayo de introducción del plásmido pSIM 24

La introducción del plásmido pSIM24 se realizó utilizando PBS 1X o TE como solución de electroporación. Las células se prepararon a una concentración de 50000 células en 350 ul, mientras que el cargo fue preparado a una concentración de 20 ug de plásmido pSIM24 en 70 ul de PBS 1x o TE. En la electroporación se utilizaron las siguientes condiciones: 35 V, 6 pulsos con un descanso de 20 segundos, 200 us, 40 hz y 40 segundos de pulso. Luego de la electroporación se

incubó por 2 horas en medio MS suplementado con 1mg/L de 2,4D. Posteriormente se colocó en un medio MS suplementado con 1 mg/L de 2,4 D y 20 mg/L de kanamicina y se dejó incubar por 72 horas. Se evaluó el número de células con fluorescencia verde en el microscopio invertido Olympus IX53, con filtro verde de absorbancia de 480 nm.

Para confirmar que la fluorescencia provenía del gen introducido se realizó una PCR directa de los cultivos transformados utilizando el par de primer PSIM24 (F:CACAAATCAGAAGGAAGAGA y R: CCGATGATACGAACGAAG) para el gen GFP, con el programa detallado en la Tabla 1. Las concentraciones de los reactivos utilizados en la PCR directa se detallan en el Anexo 2. Finalmente se realizó una corrida electroforética del resultado en un gel de agarosa al 1 % por 1 hora a 100v 300 mAmp.

Tabla 1

Programa de la PCR directa del gen GFP de células transformadas

Desnaturalización inicial	95 °C	2 min
Desnaturalización	95 °C	45 s
Anealing	55 °C	1 min
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	5 min

2.4.4.5 Ensayos de debilitamiento de pared de las suspensiones celulares

El ensayo de debilitamiento de pared se basó en tres metodológicas para disminuir la fortaleza de la membrana o de la pared celular antes de la electroporación. El primer pretratamiento fue con DMSO al 1%, el cual fue preparado en TE. Este tratamiento consistió en la centrifugación

de las células a 13000 RPM por 5 minutos y en la resuspensión de las células a una concentración de 50000 células en 350 ul de la solución de DMSO al 1 %, previo a la electroporación.

El segundo pretratamiento consistió en el debilitamiento de la pared celular utilizando una solución pectinasa al 0.5%. La solución enzimática se preparó en medio MS y se incubó 24 horas a 4 °C para la activación de la misma. Posteriormente, se centrifugó 10 ml de células y se resuspendió 10 ml de solución enzimática. Luego se incubó la muestra por 1 hora. Finalmente se lavó las células centrifugándolas a 5000 rev por 5 minutos para resuspenderlas en 10 ml en TE.

El tercer pretratamiento fue una preplasmólisis, el cual consistió en la incubación de 1 hora con 1 ml de solución EP (5 mM de CaCl₂, 10 mM NaCl, 8.7% de glicerol, 0.4M sucrosa , 10Mm MES) a temperatura ambiente.

Luego de los pretratamientos se realizó la introducción del plásmido y su posterior evaluación, utilizando la metodología descrita en el ensayo de la introducción con el plásmido pSIM24.

2.4.4.6 Viabilidad celular post-transfección

La viabilidad celular consistió en un ensayo para evaluar la fuente de carbono que aumentaba la viabilidad celular de los transformantes durante el tiempo. El ensayo consistió en colocar las suspensiones celulares inmediatamente después de la electroporación en medio MS suplementado con 1 mg/L de 2,4 D más glucosa, sacarosa, sucrosa, manitol o manosa

respectivamente en cada tratamiento por 1 hora. Luego se cambió las células al mismo medio aumentado con 50 mg/L de Kanamicina por 5 días. La evaluación de la viabilidad celular y de los transformantes se la realizó diariamente utilizando microscopia de fluorescencia.

2.4.5 Expresión de tripsina

2.4.5.1 Diseño del gen de la tripsina

El gense diseñó utilizando la secuencia de la tripsina aniónico de Bos Taurus (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/CAA38513>), obtenida del ENA (European Nucleotide Archive) y conservando una secuencia de señalización para la expulsión del péptido de la célula. Adicionalmente se añadió un sitio de corte para Hind III en el extremo 5´ y XbaI en el extremo 3´ y 10 nucleotidos extras para permitir el corte de las enzimas de restricción (Fig. 2). Finalmente se envió a sintetizar de manera química el gen a la casa comercial Thermo Fisher®.

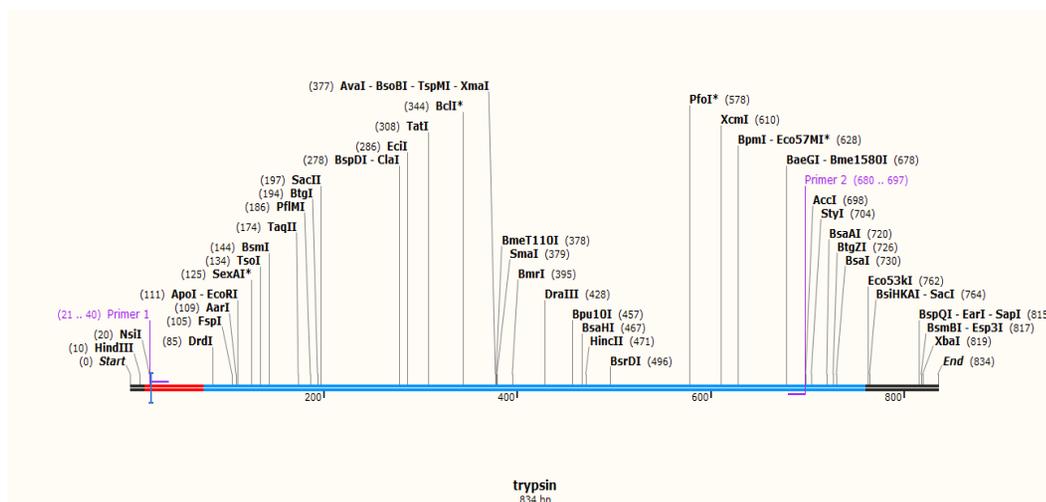


Figura 2. Diseño del Gen de tripsina (TRP).

2.4.5.2 Clonación del gen de tripsina

Para clonar el gen de tripsina se realizó una digestión por 5 horas del plásmido pSIM24 y del gen TRP con las enzimas HindIII y XbaI utilizando dos diferentes buffers de corte (Tango o React 2). Las concentraciones utilizadas en la digestión se muestran en la Tabla 2. Luego del corte, los fragmentos fueron corridos en un gel de agarosa al 1% por 1 hora a 100V y 300 mAmp.

Tabla 2

Concentraciones de los reactivos de la digestión Psim24 y TRP

Reactivo	Cantidad (ul)
Buffer 5X (Tango o React 2)	2
ADN (plásmido o gen)	1
XbaI	1
HindIII	2
Agua DPC	16

A continuación, se cortó la parte del gel que contenía los fragmentos de interés, los cuales se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction. Los fragmentos se disolvieron por 10 minutos a 50°C con el buffer QG en una proporción de 100 ul por 100 mg de gel. Luego se añadió 1 volumen de isopropanol y se colocó en la columna de separación. La columna se centrifugó por 1 min a 13000 rev y se reconstituyó con 750 ul de buffer PE para centrifugar nuevamente. La recolección del ADN se realizó colocando 50 ul del buffer EB en la columna y se centrifugó en un tubo de recolección.

La ligación del gen TRP dentro del plásmido pSIM24 se la realizó utilizando una ligasa T4. En la Tabla 3 se muestra los reactivos empleados para la ligación.

Tabla 3

Reactivos de la ligación del plásmido pSIM 24 y gen TRP

Reactivo	Cantidad (ul)
Buffer 5X	4
ADN plásmido	3
ADN gen TRP	15
Ligasa	1
Agua DPC	8

El producto obtenido de la ligación se lo insertó en la bacteria *Escherichia coli*, colocando 100 ul de células competentes DH5alfa y 10 ul de producto de ligación en una cubeta de electroporación. La mezcla se electroporó a 1.8V e inmediatamente después se la incubó en 1 ml

de LB sin antibiótico a 37 °C. Posteriormente se sembró 200 ul de las bacterias en LB con 100 mg/L de ampicilina y se dejó incubar por 48 horas a 37°C.

La identificación de bacterias que contenían el gen TRP se realizó mediante una PCR colony, utilizando el programa detallado en la Tabla 4 y el par de primers TRP (F: TCCCCTGCTTATCCTTGCCT y R:CTGGAGCTGTCCGTTGCAA). En el Anexo 3 se adjunta las concentraciones de los reactivos necesarios.

Tabla 4

Programas para la PCR colony del gen TRP de células transformadas

Desnaturalización inicial	95 °C	2 min
Desnaturalización	95 °C	45 s
Anealing	60 °C	1 min
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	5 min

Los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Finalmente, las colonias que contenían el gen fueron resembradas en medio LB con 100 mg/L de Ampicilina y después de un día de incubación se mezclaron con 1 ml de glicerol al 10 % para su posterior almacenamiento a -80 °C.

2.4.5.3 Introducción del gen de tripsina

La introducción del gen de tripsina se realizó obteniendo el plásmido a través del método combinado de extracción. Las células se prepararon con pectinasa al 0.5% y la electroporación se

realizó con la solución TE, en base a las condiciones óptimas obtenidas del ensayo de debilitamiento de pared. Finalmente, la verificación de la introducción del gen se realizó mediante una PCR directa utilizando los primers del gen TRP. Los resultados se evaluaron a través de una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1 %.

2.4.5.4 Evaluación de la expresión de tripsina

La expresión de la tripsina se evaluó diariamente por 6 días durante el periodo de selección con kanamicina. Después del periodo de selección, las células se centrifugaron a 5000 rev por 5 minutos para separar el medio de la biomasa. La biomasa como el medio resultante fueron resuspendidos en 15 ml de tampón de extracción (50mM Tris HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 10 mM ETSH) y a 1 ml de TEMED. Posteriormente se congelaron las mezclas utilizando nitrógeno líquido y se homogenizaron utilizando pistilos de plástico. La mezcla obtenida fue centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos. Finalmente, el sobrenadante resultante fue transferido a un tubo limpio.

La evaluación de la expresión de proteína se realizó a través del método de Bradford. Para la obtención de la curva estándar, se preparó tubos de BSA (Suero de albumina bovina) diluidos en cloruro de sodio(0.15M) a concentraciones de 0, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 ug/ul. Luego se mezcló 800 ul de la solución de BSA y 200 ul de la solución de Bradford (50 mg Coomassie G-250, 50 ml de metanol y 100 ml de Ácido fosfórico al 85%) para medir en un espectrofotómetro a una longitud de 595 nm para cada una de las concentraciones. Para cada una de las extracciones se realizó el mismo procedimiento y se extrapolo la absorbancia utilizando la curva de estandarización. Finalmente, para obtener la eficiencia se comparó cada uno de los tratamientos con el control.

2.5 Diseño experimental

En los ensayos se utilizó un diseño experimental completamente al azar con distintos tratamientos, en los que se evaluó una variable independiente y varias variables dependientes como la viabilidad y la eficiencia por ensayo (Anexo 5).

2.6 Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos se analizaron con ayuda del software R para confirmar el efecto de cada uno de los parámetros sobre la viabilidad y la eficiencia. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha=0.05$).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Obtención y viabilidad de suspensiones celulares de tabaco

Las suspensiones celulares necesarias para la investigación, se obtuvieron a partir de callo no embriogénico de tabaco. Se evaluó la concentración de callo (1 y 2 g/ml) en relación al número de células disgregadas en el medio. El cultivo con 2 g de callo mostró una mayor cantidad de células iniciales, con el tiempo se pudo observar una leve disminución en el número de células hasta estabilizar su decaimiento en el décimo día (Figura 3A). El cultivo con 1g de callo durante la evaluación presentó un aumento celular creciente desde el día 2 hasta el día 16 (Figura 3B).

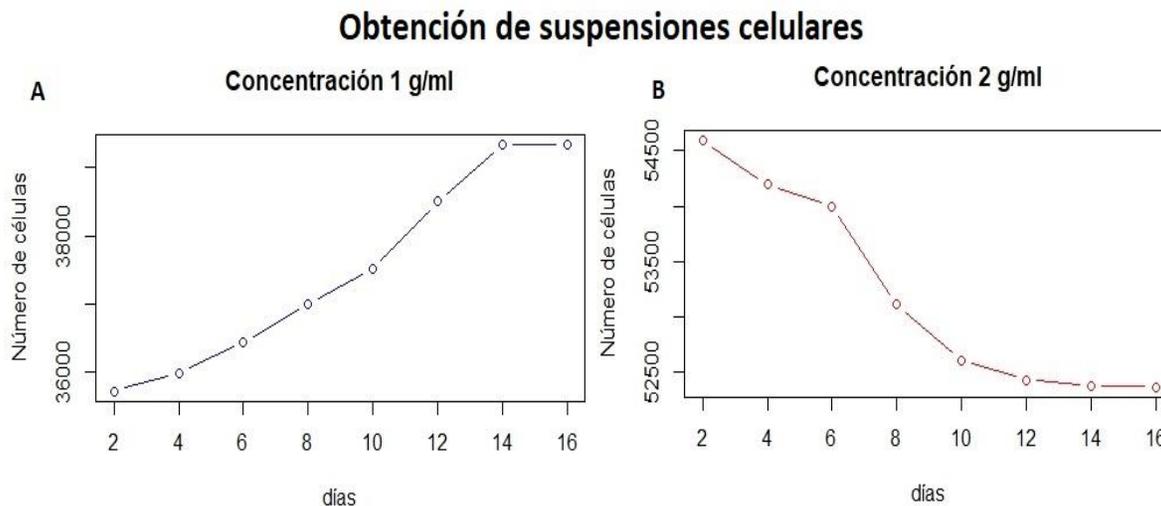


Figura 3. Número de células disgregadas en el medio MS en relación a la concentración de callo durante 16 días. A: Concentración 1 g/ml de callo, B: Concentración 2 g/ml de callo

EL ensayo de viabilidad celular se realizó mediante la tinción de núcleos de células de tabaco con PI, utilizando microscopía de fluorescencia (Fig 4). Este experimento evaluó la mortalidad de células (núcleos teñidos) en dos concentraciones de callos (1 y 2 g/100ml).

Viabilidad de las suspensiones celulares

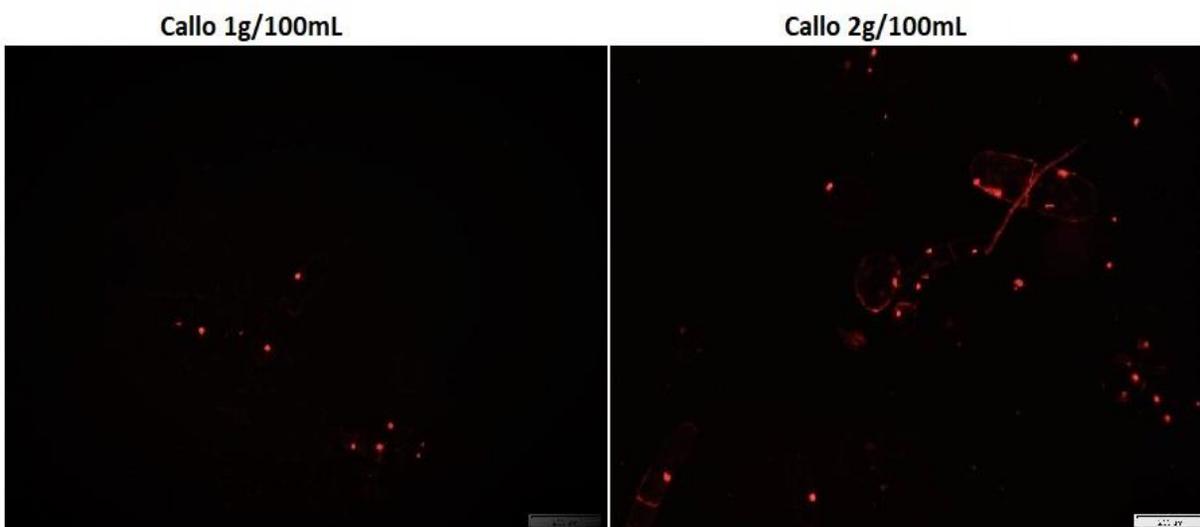


Figura 4. Ensayo de tinción de núcleos para determinar viabilidad de las suspensiones celulares de tabaco en las concentraciones de 1g/100mL y 2g/100mL

El cultivo de 1 g de callo mostró una viabilidad constante de aproximadamente 99.7% durante todo el periodo de evaluación (Fig 5A). En cambio, el cultivo de 2 g de callo mostró una

disminución de viabilidad de 0.6 % durante los primeros 12 días hasta igualar la viabilidad del cultivo de 1 g (Fig 5B).

Viabilidad de la suspensión celular

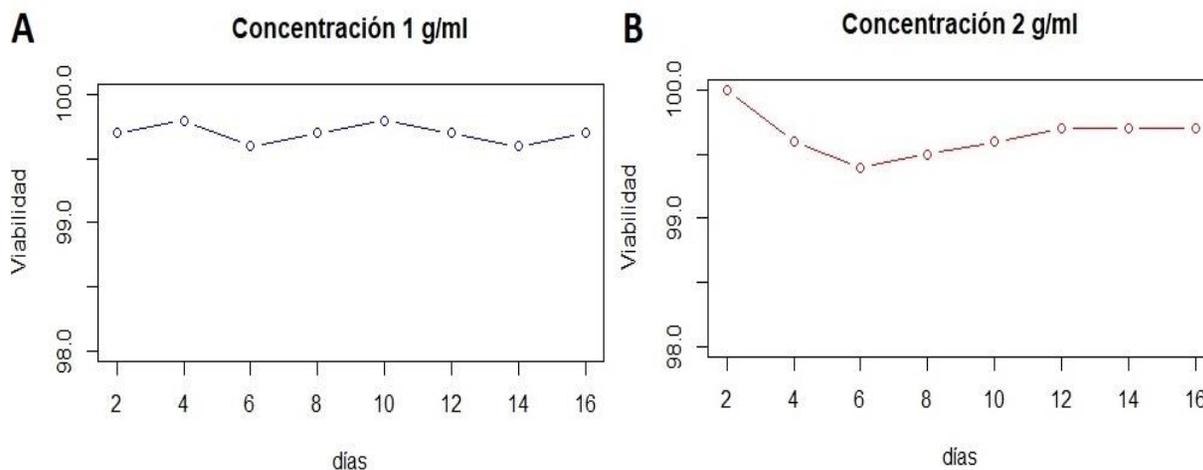


Figura 5. Viabilidad de las suspensiones celulares de tabaco para las concentraciones de 1g/100mL y 2g/100mL callo durante 16 días

Estos resultados sugieren que una menor cantidad de callo beneficia tanto a la proliferación como a la viabilidad celular.

3.2 Extracción del plásmido

En los ensayos de extracción de plásmido se evaluó los resultados de tres diferentes protocolos, el kit Qiagen de Thermo Fisher, el método de Lisis Alcalina y un método Combinado de los dos anteriores. En estos protocolos se evaluó además el efecto de la temperatura durante la centrifugación. En la figura 6 se puede observar los resultados de la comparación entre los tres protocolos y el efecto de la temperatura sobre los mismos. En la figura se pudo evidenciar que la baja temperatura durante el proceso de centrifugación es un paso indispensable, debido a la

ausencia de bandas de 8000 bp o superior en los tres protocolos. Se observó que tanto el método de extracción con Kit como el combinado fueron capaces de obtener la banda que corresponde al tamaño del plásmido.

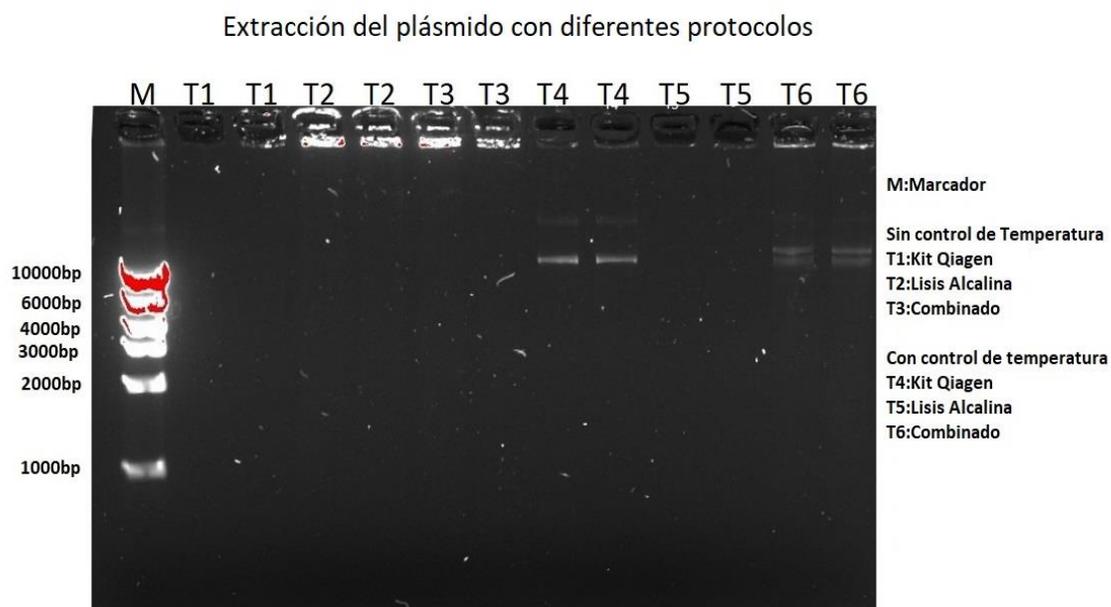


Figura 6. Gel de electroforesis al 1% de la comparación de los tres protocolos de extracción del plásmido pSIM24 con control de temperatura (T1,T2 y T3) y sin control de temperatura(T4,T5 y T6)

A continuación, se realizaron ensayos entre el kit Qiagen y el método combinado para determinar el protocolo con mayor eficiencia. La evaluación se realizó a través de las mediciones de la concentración y la calidad del ADN plasmídico obtenido por ambos métodos (Tabla 5).

Tabla 5

Concentración y calidad de las diferentes extracciones del plásmido utilizando el Kit Qiagen y el método combinado

Tratamiento	Concentración (ng/ul)	260/280
Método combinado	6390	1,97
Kit Qiagen	1000	1,94

Al comparar los métodos de extracción se pudo observar que el método combinado presenta mejores resultados en la concentración y calidad de ADN. Estos resultados se confirman mediante la prueba Tukey (Anexo 4), donde se observa que el método combinado presenta una concentración de ADN significativamente mayor y una calidad similar en relación a la extracción con el kit Qiagen. Estos resultados pueden indicar que el método de purificación con solventes permite tener una menor pérdida de ADN plasmídico en comparación con la columna de purificación de sílica empleada en los kits de extracción.

3.3 Estandarización del sistema nanostraw

3.3.1 Evaluación de las soluciones de electroporación

En este ensayo se evaluó diferentes soluciones de electroporación para seleccionar el mejor medio de transporte, el cual permitirá introducir la mayor cantidad de plásmido a través del nanostraw hasta el compartimento de las células. En este experimento se analizó cuatro soluciones de transporte (EPR, TE, PBS y CaCl₂) a través de la medición de la cantidad de plásmido en el cargo antes de la electroporación y en el compartimento de las células después de la electroporación.

En la Figura 7 se muestra los resultados de la eficiencia de las cuatro soluciones analizadas, en donde la solución PBS presentó una eficiencia del 50%, TE del 45 %, el EPR del 37% y el CaCl₂ de 30%. Estos resultados junto con el análisis de la prueba Tukey (Anexo 6), muestran que el PBS y el TE presentan una mayor eficiencia de transporte celular, posiblemente por la mayor cantidad de sales en su composición.

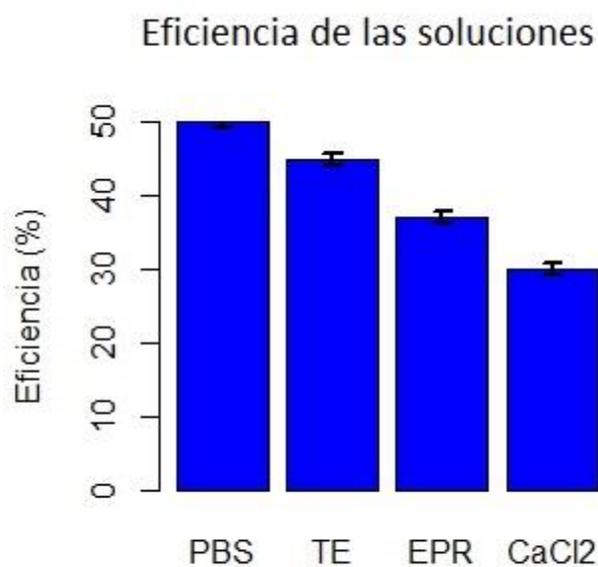


Figura 7. Gráfico de barras de la eficiencia de las cuatro soluciones para transportar el plásmido del compartimento del cargo al compartimento de las células

3.3.2 Evaluación de la fuerza de centrifugación

En este ensayo se determinó la fuerza de centrifugación a la que debían ser expuestas las células para lograr la penetración de los nanostraw en la pared celular, sin provocar la muerte de las células. La medición de la viabilidad se realizó contando las células teñidas después de la centrifugación a las fuerzas de 200, 250 y 300g. Los resultados de este experimento muestran un comportamiento similar de las células frente a las fuerzas de centrifugación evaluadas (Fig 8). El tratamiento sin exposición a la centrifugación no presentó células teñidas, por lo que no hubo muerte celular.

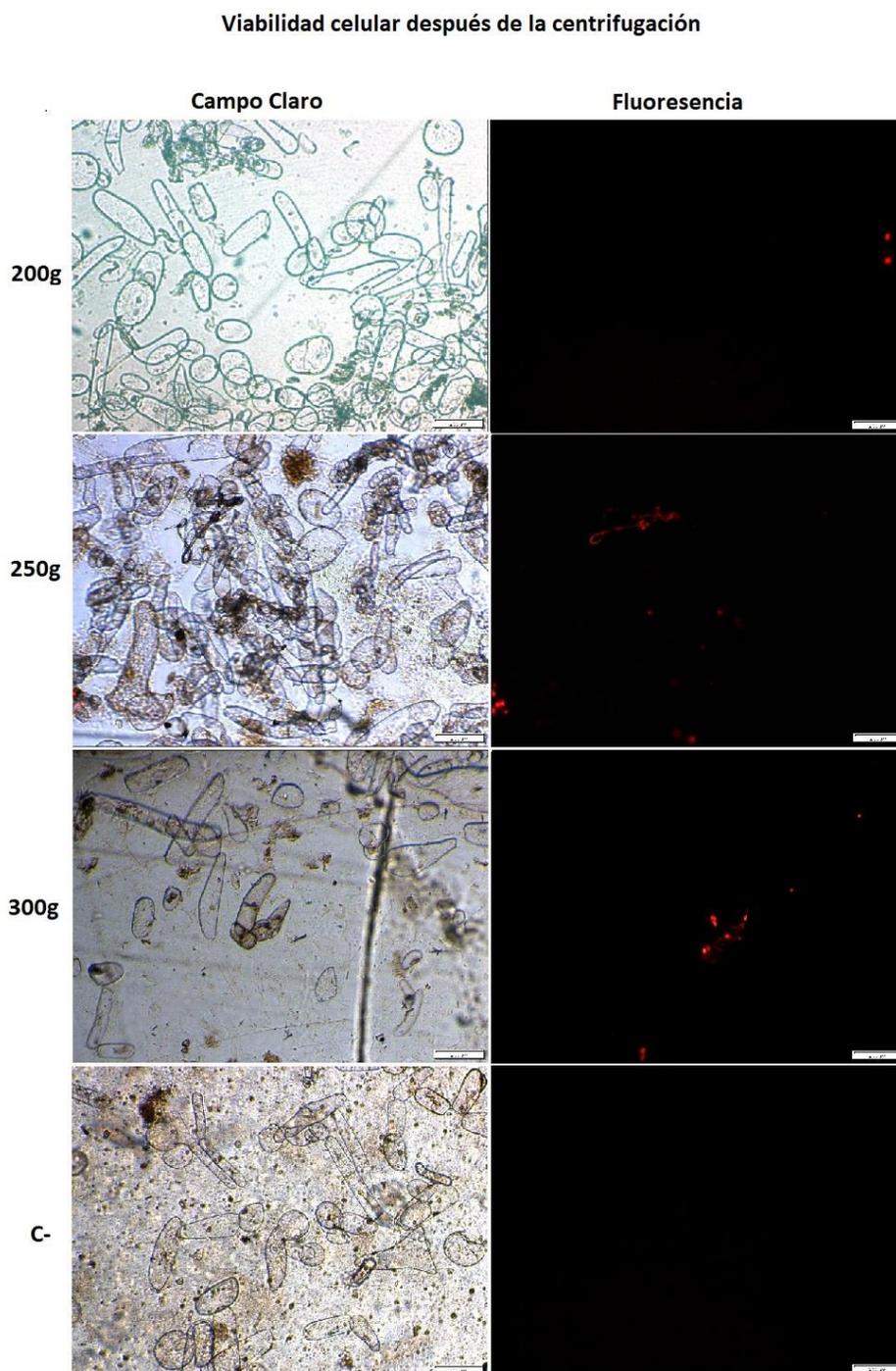


Figura 8. Ensayo de viabilidad celular con PI luego de la exposición a las fuerzas de centrifugación de 200, 250 y 300g.

Al realizar la comparación de la viabilidad entre las tres fuerzas de centrifugación y el control, se evidenció que no existe diferencia estadística entre los tratamientos (Fig. 9). Estos resultados se corroboran con las pruebas estadísticas ANOVA y Tukey (Anexo 7).

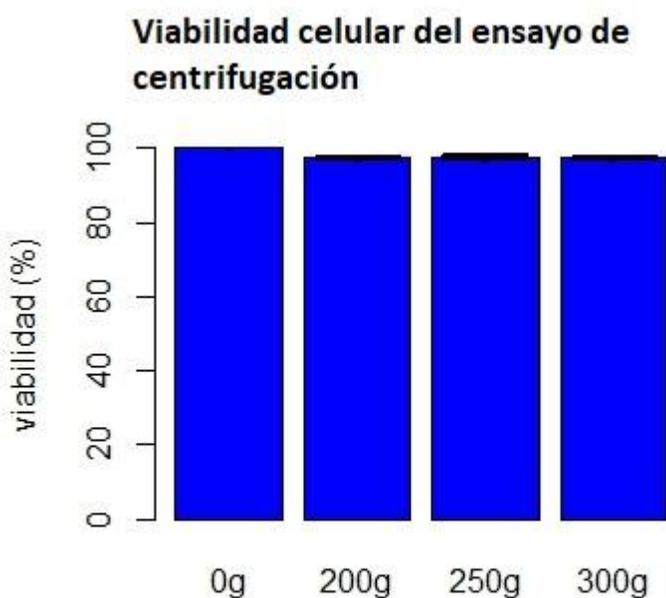


Figura 9. Gráfico de barras de la viabilidad celular luego de la exposición a las fuerzas de centrifugación de 200, 250 y 300 g.

Posteriormente se llevó a cabo la evaluación de la penetración de los nanostraw. Este experimento se realizó cuantificando la cantidad de células teñidas con PI después de la centrifugación y electroporación. El ensayo mostró que los nanostraw fueron capaces de penetrar las células cuando se aplicó las fuerzas de 250 y 300g. En cambio, el control y el tratamiento aplicando la fuerza de centrifugación de 200g, no presentaron células con fluorescencia (Fig 10).

Eficiencia de introducción del PI después de la centrifugación

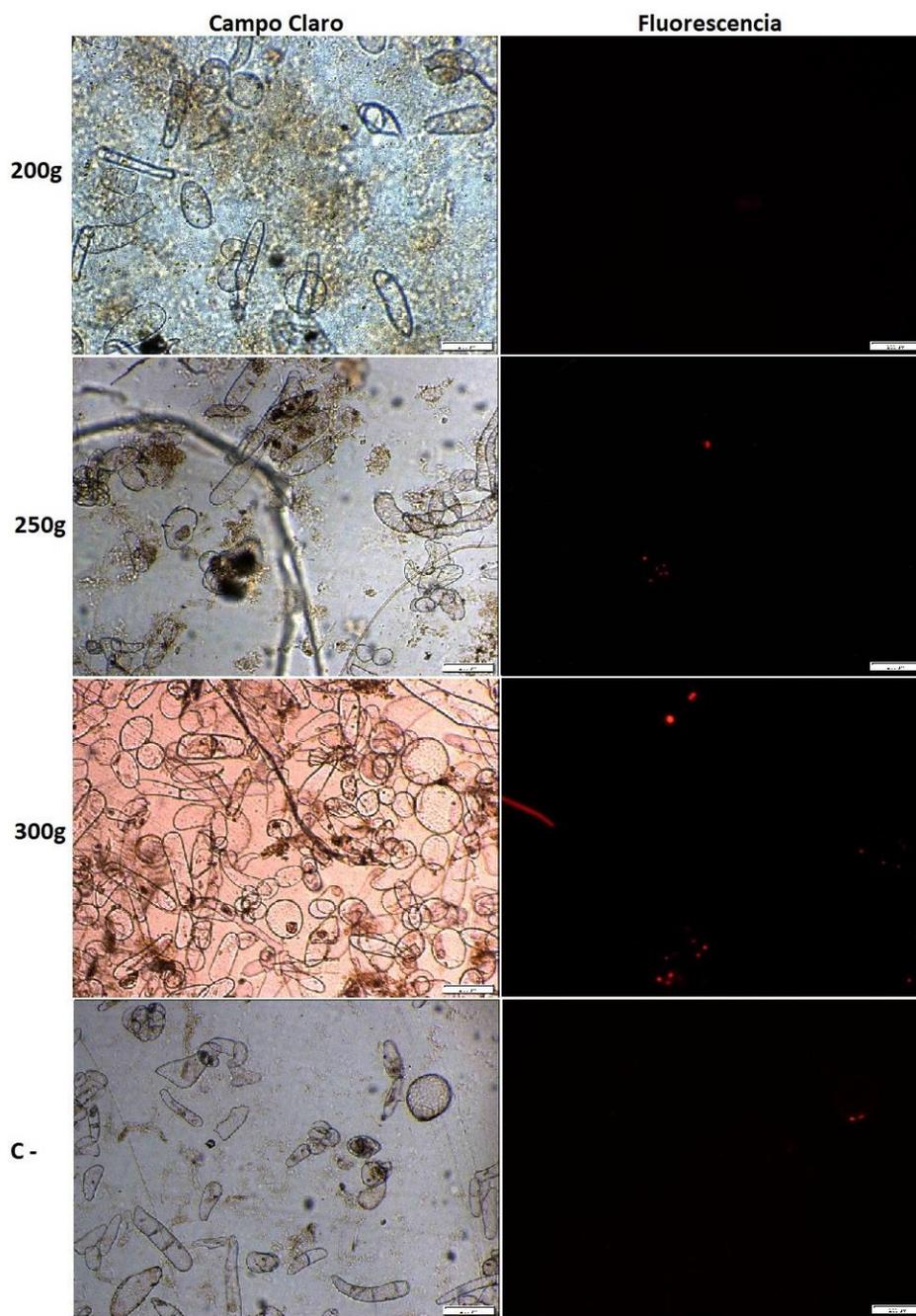


Figura 10. Eficiencia de introducción del PI en las células después de los tratamientos de centrifugación (200, 250 y 350 g) y la electroforación.

La comparación de la eficiencia de penetración de los nanostraw con diferentes fuerzas de centrifugación se muestra en la figura 11. En esta gráfica se evidencia que la fuerza de 300 g fue el tratamiento que proporcionó la mayor eficiencia de penetración seguida del tratamiento de 250 g, mientras que el tratamiento de 200g, obtuvo una eficiencia casi nula muy similar al control. Estos resultados fueron corroborados mediante las pruebas estadísticas ANOVA y Tukey (Anexo 8).

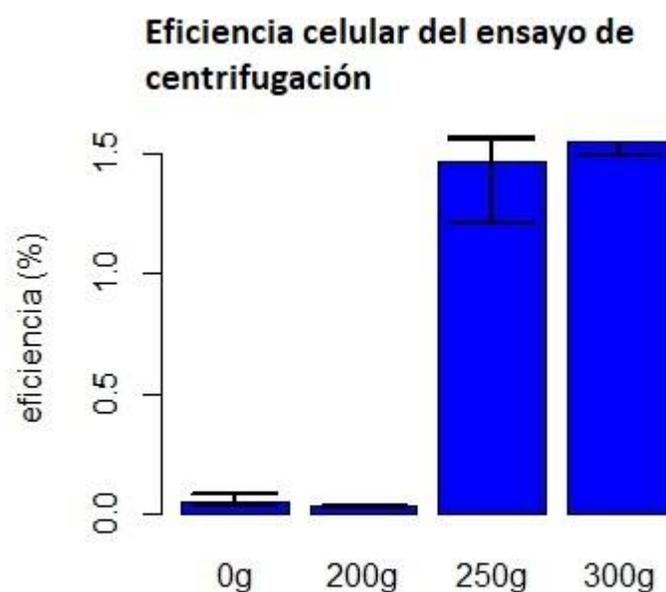


Figura 11. Gráfico de barras de la eficiencia de introducción del PI luego de la exposición a las fuerzas de centrifugación (200, 250 y 300g) y a la electroporación

Los resultados obtenidos en los ensayos de eficiencia de penetración de los nanostraw y la viabilidad celular mostraron que la fuerza de centrifugación óptima fue la de 300 g, debido a que proporciona la mayor eficiencia de penetración del PI y la menor tasa de mortalidad celular. Esto

sugiere que la penetración de las células por los nanostraw a partir de 250g, es suficiente para la penetración de la pared celular, sin provocar muerte celular.

3.3.3 Evaluación de los parámetros de electroporación

En este apartado de la investigación se evaluaron los parámetros de la electroporación como el voltaje, el número de pulsos y el intervalo de tiempo entre pulsos.

En el primer ensayo, se determinó el voltaje al que se debían electroporar las células para aumentar la cantidad del PI dentro de las mismas, sin incrementar la muerte celular. La cantidad del PI se cuantificó a través del conteo del número de células fluorescentes después de la electroporación, a intervalos de voltajes de 0 a 35 V. Este experimento mostró que el tratamiento de 35 V fue el que presentó la mayor cantidad fluorescencia en relación al resto de tratamientos (Fig 12).

Eficiencia de introducción del PI a distintos voltajes

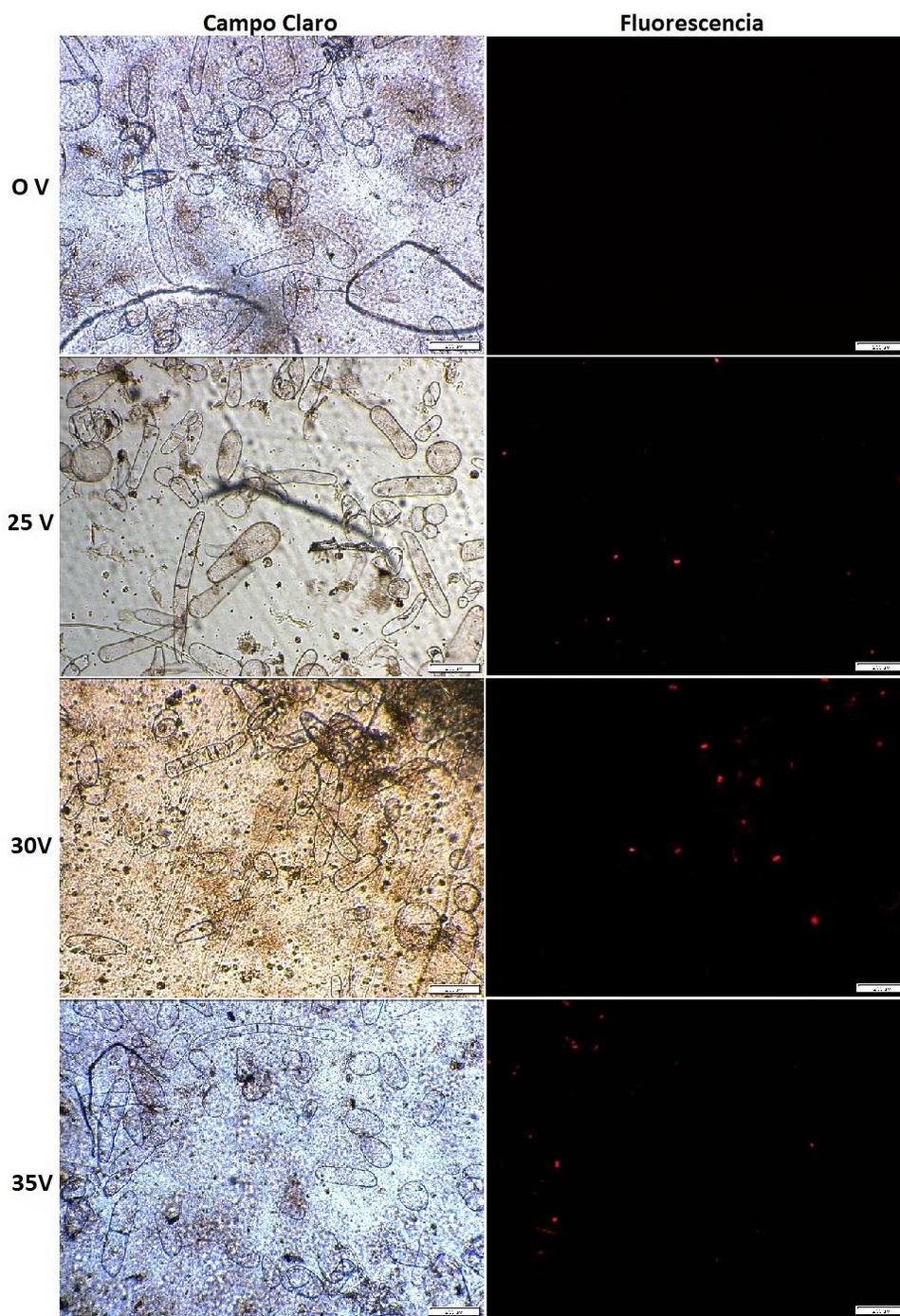


Figura 12. Eficiencia de introducción del PI en células de tabaco al ser expuesto a distintos voltajes (0,25,30,35V) de electroporación

La comparación de los resultados de la eficiencia de penetración de los nanostraw y la viabilidad celular a los distintos voltajes se muestra en la figura 13. La gráfica muestra que la eficiencia aumenta al incrementarse el voltaje, al contrario de la viabilidad la cual disminuye al incrementar el mismo. Estos resultados sugieren que la eficiencia es directamente proporcional al voltaje, al contrario de la viabilidad que es inversamente proporcional a este.

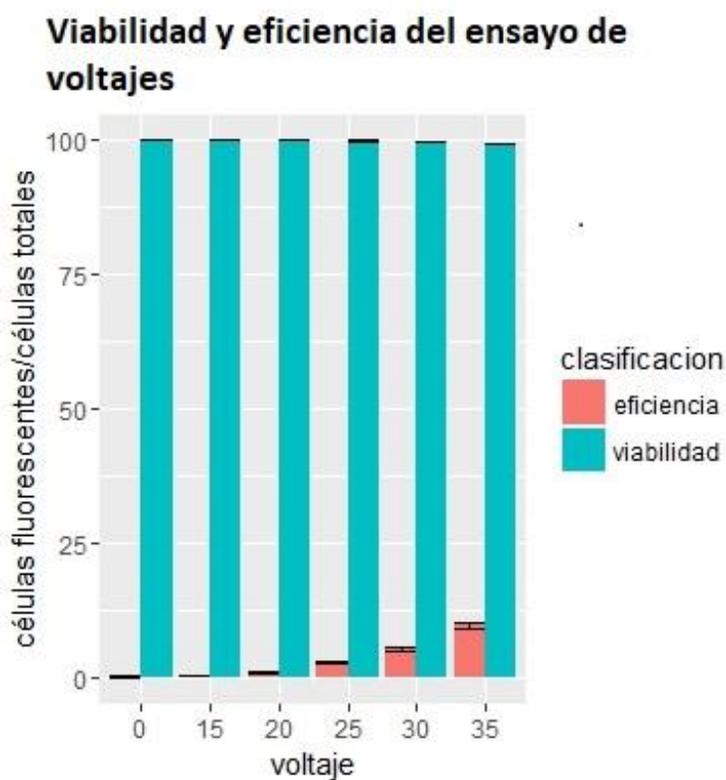


Figura 13. Gráfica de barras de la relación de la viabilidad celular y la eficiencia de introducción del PI a los voltajes de 0,15,20,25,30 y 35 V

En el segundo ensayo se determinó el intervalo óptimo de tiempo que se debía dejar reposar las células, entre cada pulso, para aumentar la eficiencia de penetración del PI sin disminuir la viabilidad celular. La introducción del PI se midió a través del conteo del número de células fluorescentes, después de la electroporación con los tiempos de reposo de 60, 40 y 20 s. Este experimento reflejó que el tratamiento de 20 s de reposo, es aquel que mayor cantidad de células fluorescentes presentó en comparación a los otros tratamientos (Fig 14).

Eficiencia de la introducción del PI del ensayo de tiempo de reposo

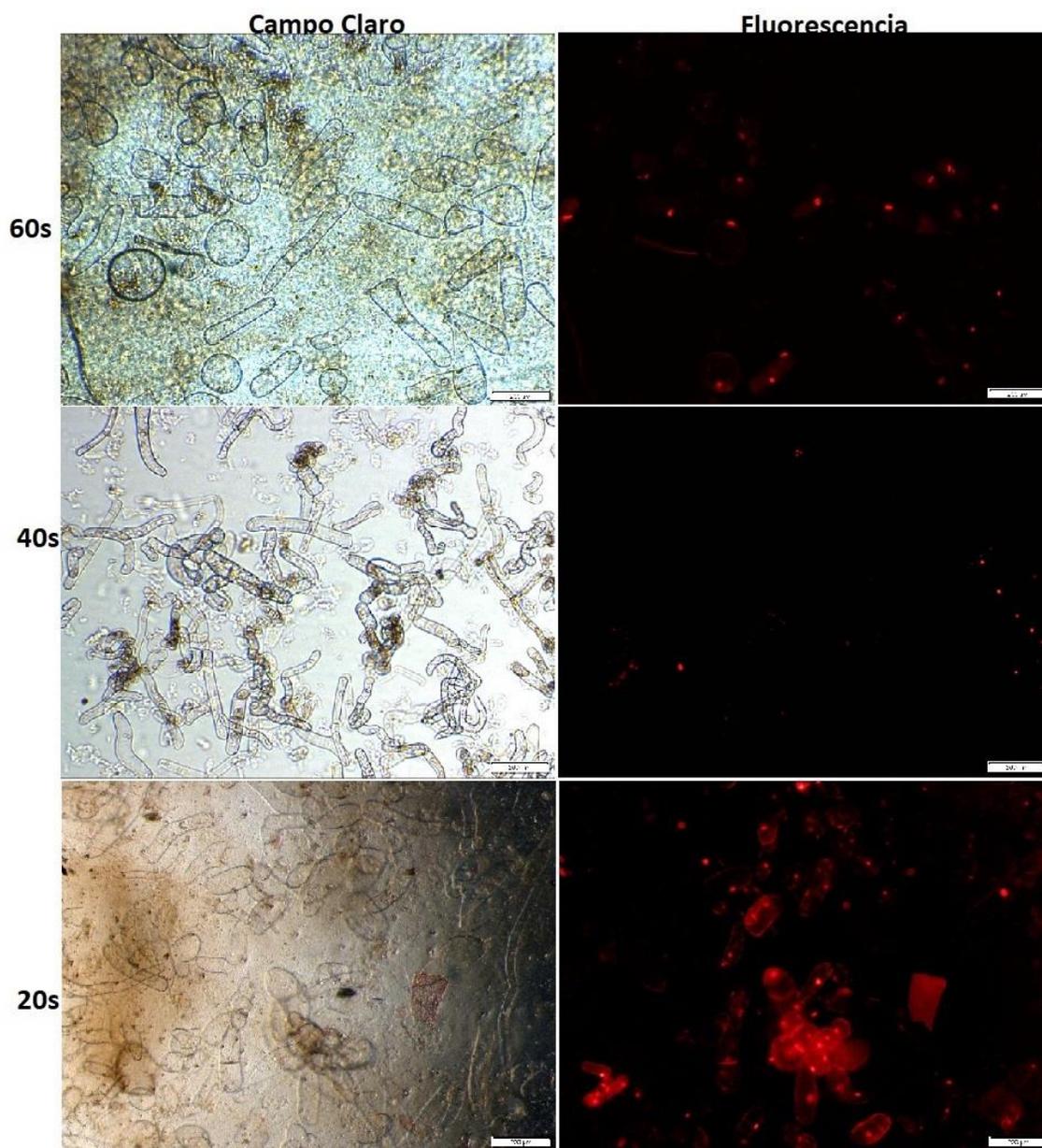


Figura 14. Eficiencia de introducción del PI en células de tabaco al ser expuesto a intervalos de tiempo entre pulso de electroporación de 60, 40 y 20 s.

La comparación de los resultados de la eficiencia de ingreso del PI y la viabilidad celular a los distintos intervalos de tiempo entre pulso, se muestra en la figura 15. La gráfica muestra que, al disminuir el intervalo de tiempo entre cada pulso, la eficiencia de introducción del PI aumenta, mientras que la viabilidad disminuye. Estos resultados sugieren, que al disminuir el tiempo de descanso entre pulsos la eficiencia de transfección del sistema nanostraw aumenta.

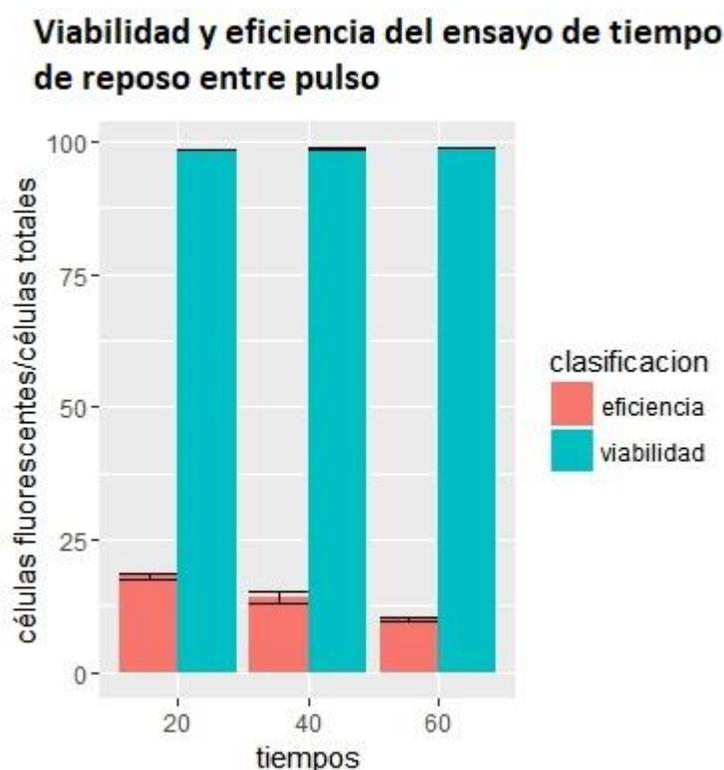


Figura 15. Gráfica de barras de la relación de la viabilidad celular y la eficiencia de introducción del PI a los tiempos de reposo de 60, 40 y 20 s.

En el tercer ensayo, se evaluó el efecto del número de pulsos sobre la viabilidad celular y la eficiencia de inserción del PI en las células. En el experimento se evidenció que las células fluorescentes aumentaron en número al exponerlas a 6 pulsos de electroporación en comparación al tratamiento de 3 pulsos (Fig 16)

Eficiencia de la introducción del PI del ensayo de número de pulsos

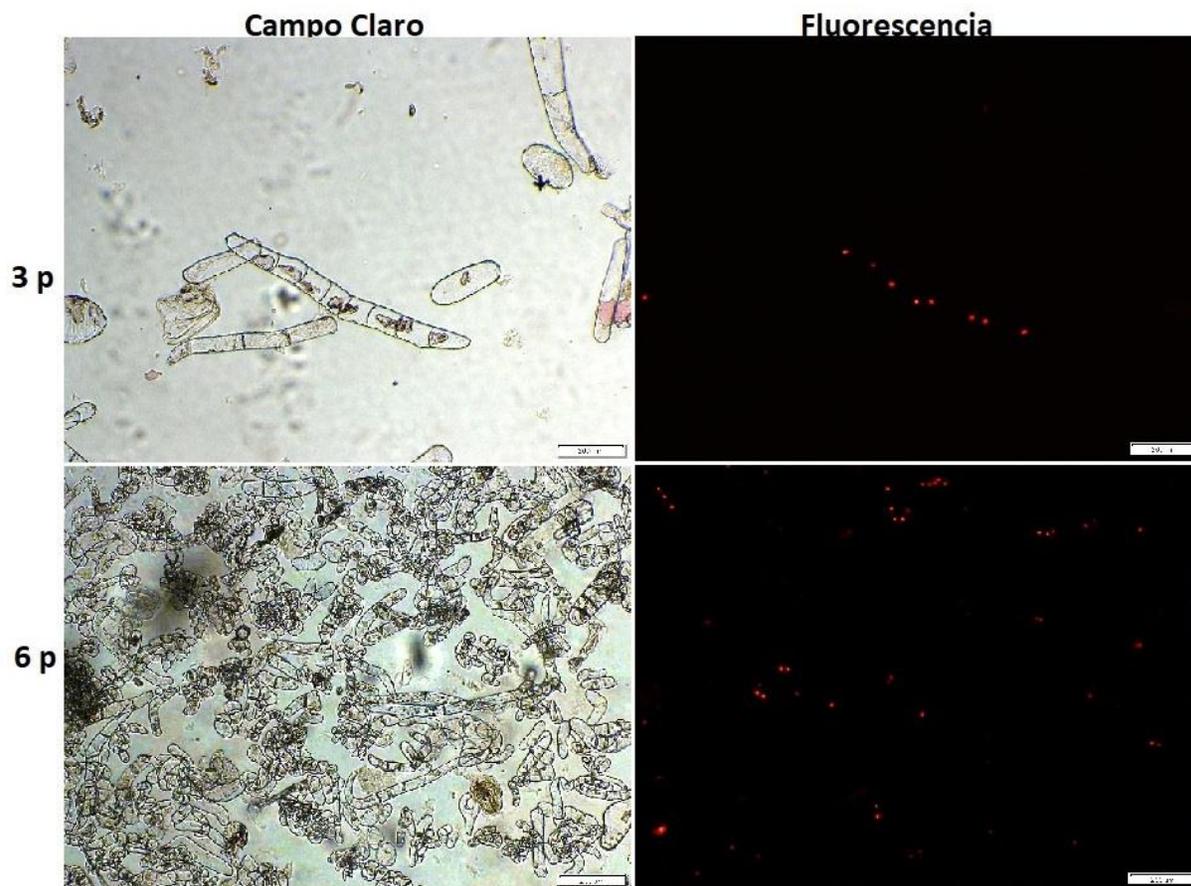


Figura 16. Eficiencia de la introducción del PI en células de tabaco al ser expuesto a 3 y 6 pulsos de electroporación

La evaluación de la viabilidad y la eficiencia de ingreso del PI a las células al variar el número de pulsos se observa en la figura 17. Al aumentar el número de pulsos se incrementa la eficiencia de transfección con el PI, mientras que la viabilidad disminuye ligeramente. El tratamiento de 6 pulsos proporcionó una eficiencia del 24 %, mientras que el tratamiento de 3 pulsos una eficiencia del 19%. Estos resultados sugieren que bajo las condiciones 36 V, 20 s de reposo y 6 pulsos, se puede hacer una transfección con el sistema nanostraw con una eficiencia superior al 20 %.

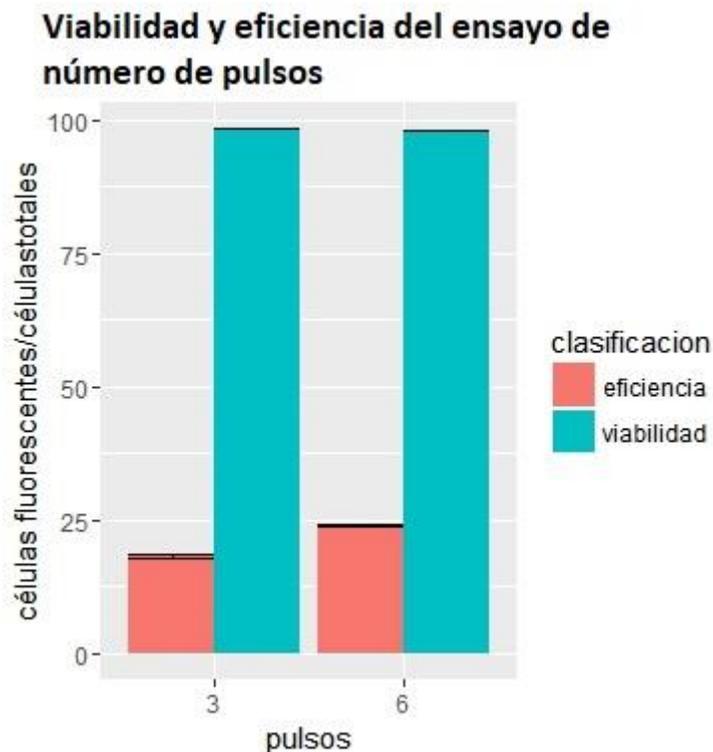


Figura 17. Gráfica de barras de la relación de la viabilidad celular y la eficiencia de introducción del PI cuando se expone a 3 y 6 pulsos de electroporación.

3.3.4 Eficiencia de transfección con el plásmido pSIM24

En el ensayo de eficiencia de transfección se evaluó la capacidad de introducir el plásmido pSIM24 dentro de las células, bajos los parámetros de centrifugación y electroporación estandarizados anteriormente. Se pudo observar, que el tratamiento con la solución TE permitió el ingreso del plásmido, mostrando células con fluorescencia verde con un porcentaje de eficiencia del 0.27, en comparación a la solución PBS que no presentó fluorescencia (Fig 18). Lo que sugiere que a pesar de que la solución PBS demostró tener la mayor eficiencia para transportar el plásmido, éste no fue capaz de transfectar a las células

Eficiencia de la introducción del plásmido pSIM24

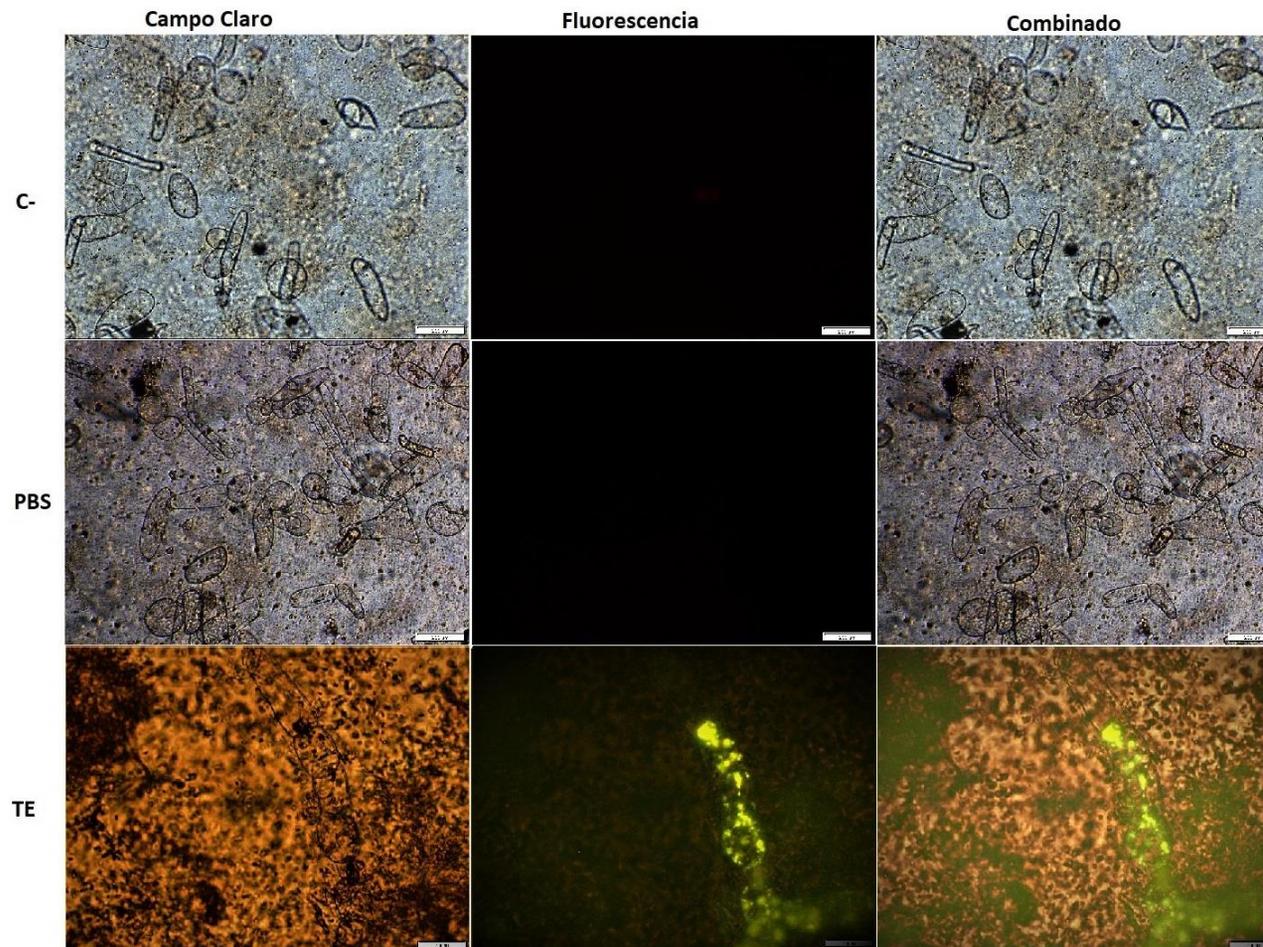


Figura 18. Transfección de células de tabaco con el plásmido pSIM24 utilizando dos distintas soluciones de electroporación PBS y TE. Fotos en campo claro, fluorescencia y combinado

Al obtener fluorescencia de color verde en las células de tabaco, se procedió a confirmar la transfección mediante una PCR del gen GFP. En la figura 19 se muestra la presencia de una única banda de 780 bp, lo que confirma la presencia del plásmido dentro de las células transfectadas con la solución TE. Estos resultados sugieren que la composición del TE permite que las células sean transfectadas de mejor manera, a diferencia de las tratadas con PBS.

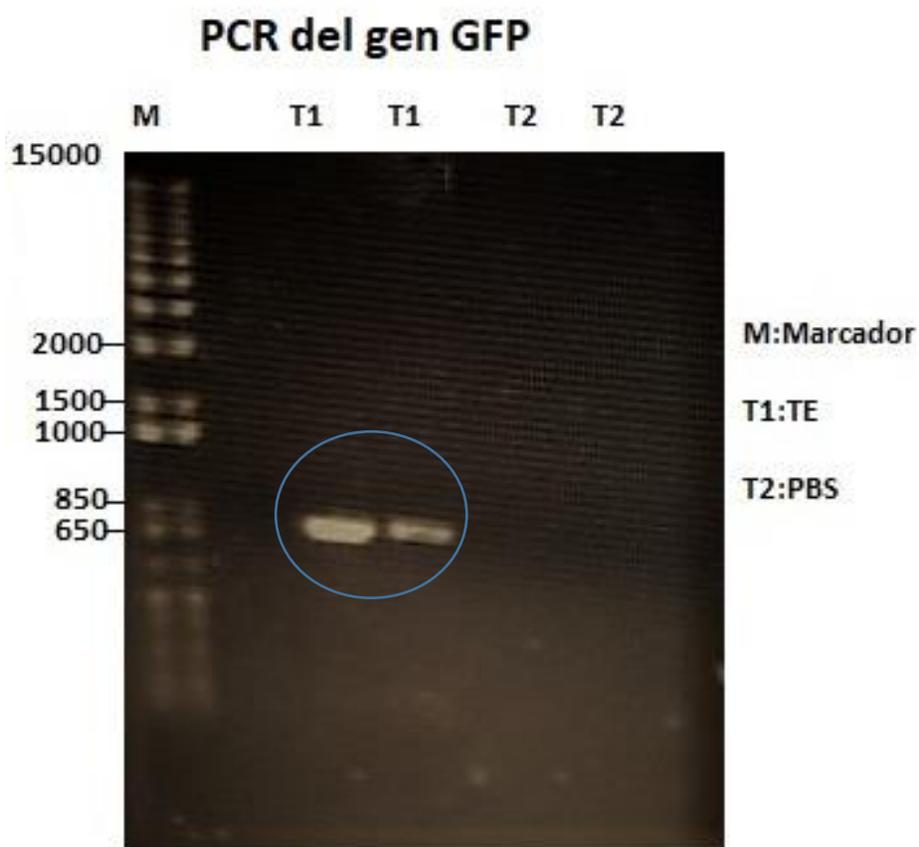


Figura 19. Gel de agarosa al 1% de la PCR directa del gen GFP de las células transfectadas con las dos soluciones de electroporación (T1:TE y T2:PBS).

3.3.5 Eficiencia del debilitamiento de la pared

En este ensayo se evaluó el mejor pretratamiento de las células para debilitar la pared celular previo a la electroporación. El experimento se desarrolló comparando la solución de DMSO 1%, la de preplasmólisis y la de pectinasa al 0.5%, para aumentar la eficiencia de transformación con el plásmido pSIM 24. La fluorescencia de las células expuesta a los tres tratamientos se muestra en la figura 20, en donde se evidenció que los tres tratamientos presentaron células fluorescentes. El tratamiento con pectinasa fue el que mayor cantidad de células verdes presentó, seguido del tratamiento con la solución de preplasmólisis.

Eficiencia de transfección con el plásmido pSIM 24 del ensayo de debilitamiento de pared

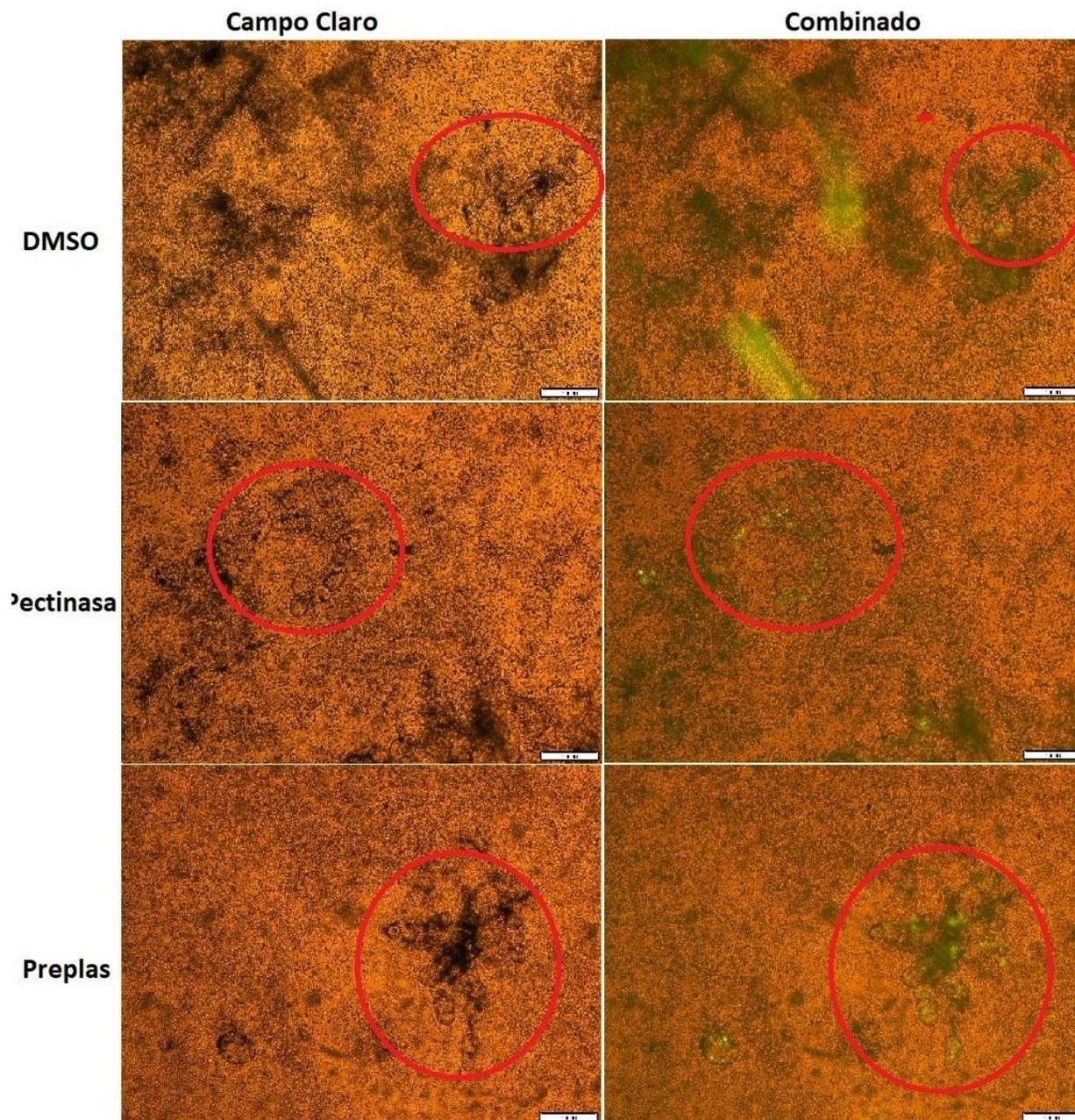


Figura 20. Transfección de células de tabaco con el plásmido pSIM24 después del debilitamiento de la pared con DMSO, pectinasa y solución de preplasmólisis

La evaluación del efecto de los pretratamientos de las células sobre la eficiencia de introducción del plásmido se observa en la figura 21. Este gráfico muestra que todos los pretratamientos mejoraron la eficiencia de introducción del plásmido pSIM 24 en comparación al control. La eficiencia conseguida con el pretratamiento con pectinasa fue de un 0.49%, con preplasmólisis de un 0.393% y con DMSO de 0.327 %. Estos resultados sugieren que la fortaleza de la pared celular interviene directamente en la eficiencia de transfección.

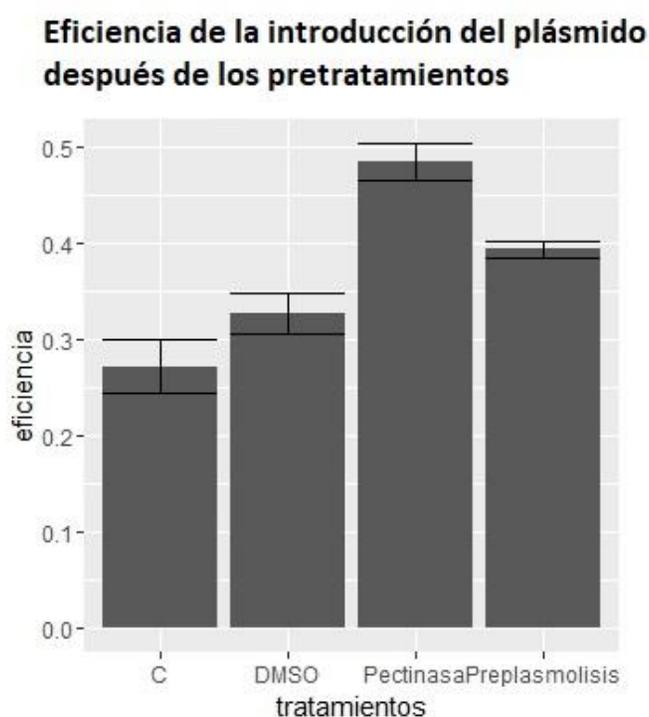


Figura 21. Gráfico de barras de la comparación de la eficiencia de la transfección con el plásmido después del pretratamiento de las células.

3.3.6 Viabilidad post-transfección

En este ensayo se evaluó el efecto de distintos medios suplementados con azúcares sobre la viabilidad post-transfección de las células y de los transformantes por 5 días. El experimento se desarrolló exponiendo a las células transfectadas a medios suplementados con glucosa, sacarosa, manosa y manitol respectivamente. La viabilidad de los transformantes se muestra en la figura 22, donde se evidencia en los dos primeros días una disminución de la viabilidad de los transformantes. A partir del tercer día, la viabilidad empezó estabilizarse levemente. Todos los tratamientos presentaron una pérdida de la viabilidad de los transformantes del 60 %, a excepción del medio con manitol que proporcionó una pérdida del 30%.

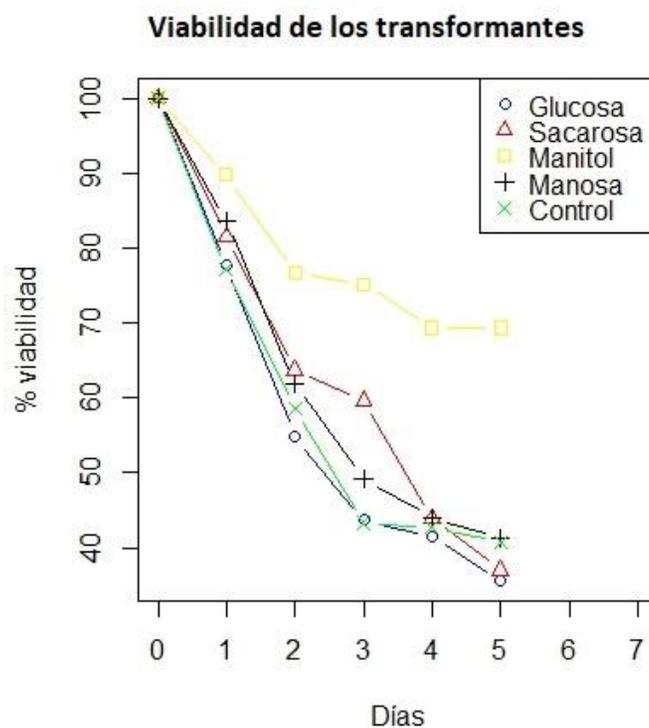


Figura 22. Viabilidad de los transformantes después de la transfección durante 5 días

Estos resultados sugieren que el medio con manitol, permite mantener a los transformantes durante un mayor tiempo, para evaluar la eficiencia y la viabilidad de los ensayos.

3.4 Expresión de tripsina

3.4.1 Ensamblaje del plásmido pSIM 24- TRP

En este ensayo se evaluó la capacidad de dos distintos buffers (Tango y React A) de digestión para cortar un mismo fragmento con las enzimas Hind III y XbaI. En la figura 23 se muestra el gel de agarosa al 1% con los fragmentos resultantes del corte, utilizando los buffers mencionados anteriormente. En esta figura se observa que ambos buffers fueron capaces de producir los fragmentos de interés tanto el del gen TRP (850 bp) como el del plásmido (7000bp).

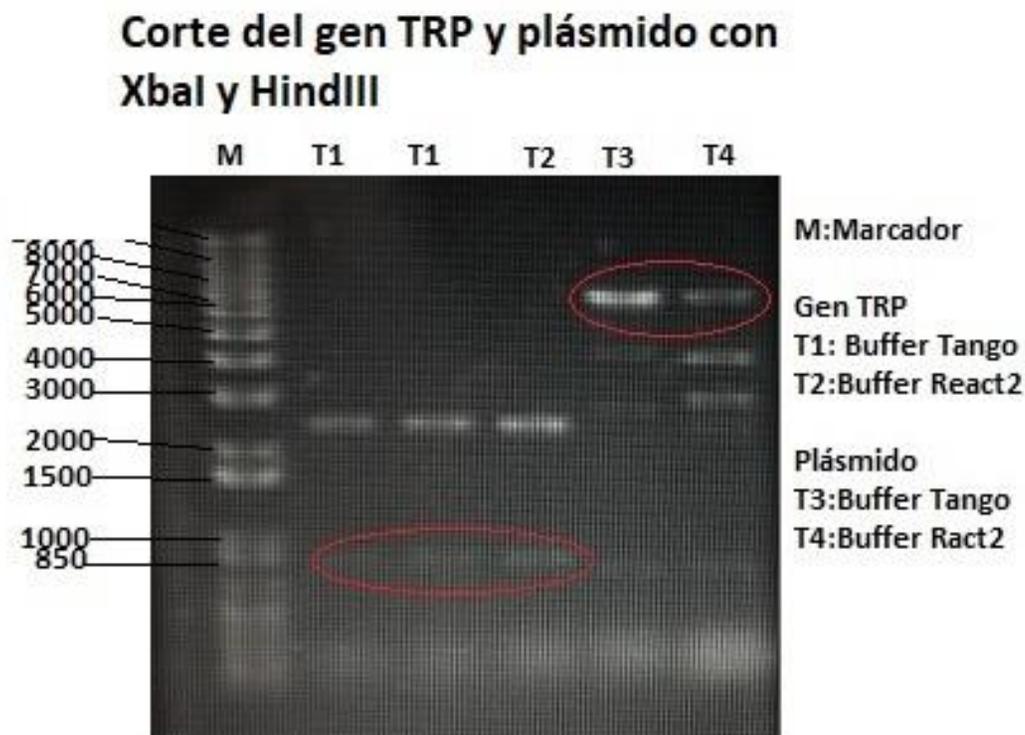


Figura 23. Gel de electroforesis al 1% del corte del gen TRP y plásmido con las enzimas XbaI y HindIII.

3.4.2 Introducción del gen de la tripsina

En este ensayo se realizó la verificación de la introducción del gen de la tripsina en los 4 cultivos transfectados por una PCR directa. En el experimento se transfectaron los 4 cultivos utilizando las condiciones óptimas obtenidas en los ensayos de estandarización del sistema nanostraw. En la figura 24, se muestra el gel de electroforesis de las PCR directas de los 4 cultivos y el control con el plásmido pSIM 24-TRP, en el cual se observa la presencia de una banda de 850 bp para todos los tratamientos. Esto confirma que la banda es el gen TRP.



Figura 24. Gel de electroforesis al 1% de la PCR directa de los 4 cultivos transfectados y el plásmido pSIM 24-TRP con el gen TRP

3.4.3 Eficiencia de la expresión de la tripsina

La eficiencia de la expresión de la tripsina se calculó a través de la diferencia de la proteína total en el medio y de la biomasa. La cuantificación de la concentración de la proteína total se realizó a través del método Bradford por 5 días. En este ensayo se observó que en la biomasa como en el medio de los cultivos transfectados con el gen de tripsina, hubo un aumento de la concentración de la proteína durante los días analizados. Al contrario, los tratamientos sin transfección (C Medio y C Biomasa) y sin electroporación (C- Medio y C- Biomasa) mantuvieron

su concentración proteica durante los 5 días. Esto sugiere que el modelo de expresión en suspensiones celulares de tabaco mediante el sistema nanostraw es factible.

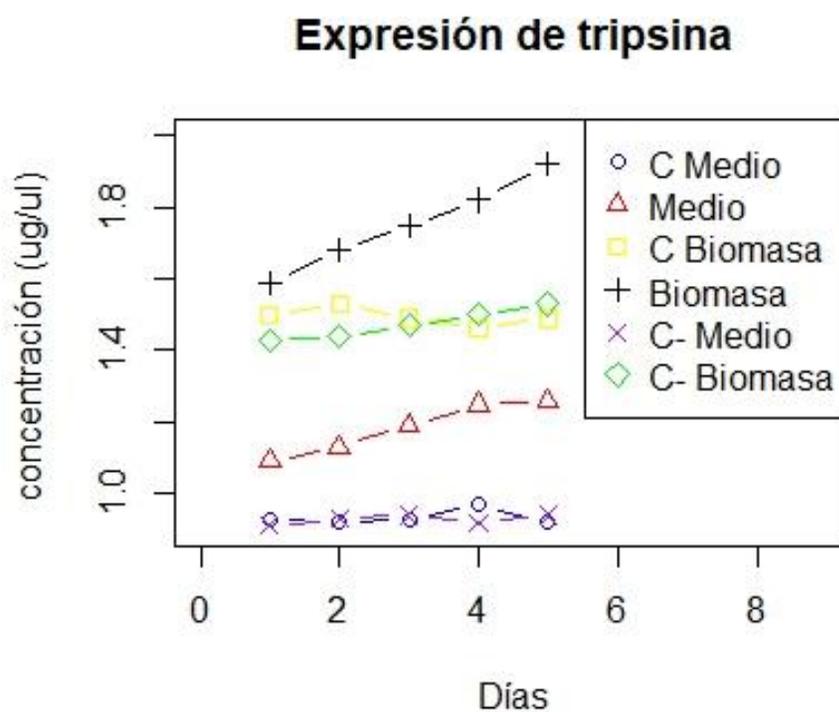


Figura 25. Comparación de la concentración de la proteína total en 5 días, en cultivos sin electroporar (C-), cultivo con electroporación sin plásmido (C), tanto en medio como en la biomasa

La eficiencia de la producción de tripsina se calculó tomando como referencia el mayor valor de la proteína total del control con electroporación sin plásmido. Se calculó la diferencia con la concentración de la proteína total tanto de la biomasa como la del medio del cultivo transfectado

con el gen TRP. El resultado obtenido para el medio celular fue de 0,28423 mg de tripsina /ml de medio y para las suspensiones celulares de 0,3913 mg de tripsina /Kg de biomasa.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Transfección de células tabaco mediante el sistema nanostraw

El objetivo de la presente investigación es la expresión de proteínas por medio de la transfección de células de tabaco a través del sistema nanostraw.

En primer lugar, es necesario establecer cultivos en suspensión celular, debido al beneficio de trabajar con células que permiten un alto rendimiento de producción *in vitro* (Birch, 1997). El presente trabajo estandarizó un protocolo con características óptimas de viabilidad y proliferación.

Los resultados obtenidos del establecimiento del cultivo en suspensión celular sugieren el uso de pequeñas cantidades de callo, lo que beneficia tanto a la proliferación como a la viabilidad celular. Esto es corroborado por estudios realizados por Ramachandra & Ravishankar en el 2002, donde mencionan que la disminución celular de los cultivos en suspensiones, dependen de la biomasa existente en relación a los nutrientes disponibles en el medio. Esto sugiere que existe una autoregulación de la población celular hasta alcanzar el número de individuos óptimos para la supervivencia del cultivo.

La división celular ocurre únicamente cuando las condiciones nutricionales de la célula progenitora han sido cubiertas, por esta razón un aumento en la población celular significa que existe una relación equilibrada entre la cantidad de células y los nutrientes e inductores óptimos para el crecimiento (Kieran, Macloughin, & Malone, 1997). Esto puede explicar los resultados

obtenidos en el presente trabajo, donde el establecimiento de la suspensión celular con 1 g de callo presentó un aumento en el crecimiento durante los 16 días de evaluación.

El protocolo estandarizado de suspensiones celulares de tabaco obtuvo una viabilidad del 99.7% en la fase exponencial aproximadamente en el día 12, resultados que fueron similares a los observados por Umichimiya & Murashige (1974). Estos autores obtuvieron una viabilidad del 99.5 % en el día 10 de establecimiento del cultivo de suspensiones celulares de la misma variedad de tabaco.

Luego de establecer el protocolo de suspensión celular, se debe estandarizar el método de transfección. El sistema nanostraw fue la técnica seleccionada para la introducción del plásmido, debido a su potencial de transfección en células eucarióticas (Aalipour, Xu, Leal-Ortiz, Garner, & Melosh, 2014).

El sistema nanostraw es la unión de dos técnicas de transfección. La electroporación y la microinyección con nanomateriales, por lo que se deben tomar en cuenta los factores que afectan ambas técnicas (Xie, *et al.*, 2013). Los factores que influyen en la electroporación son el voltaje, la solución de electroporación, la concentración del material genéticos, el número de pulsos y el intervalo de tiempo entre pulsos (Taurus, *et al.*, 1989). Los factores que influyen la microinyección utilizando nanomateriales son la fuerza de aplicación y las medidas del nanomaterial (Kaeppler, Gu, Somers, Rines, & Cockburn, 1990). Por tal razón, esta investigación seleccionó como variables para estandarizar: la fuerza de centrifugación, la solución de electroporación, el voltaje, el intervalo de tiempo entre pulsos y el número de pulsos.

La primera variable de la estandarización del sistema nanostraw fue la solución de electroporación. Esta será la encargada de transportar el ADN plasmídico desde el compartimento de cargo a través de los nanostraw hasta el compartimento de las células. Esta solución debe tener la capacidad de formar cationes que interactúen con el ADN permitiéndole ingresar a la célula (Kang, et al., 2010). En esta investigación se seleccionaron cuatro soluciones salinas, PBS, TE, EPR y CaCl₂. Los resultados obtenidos mostraron que el PBS es la solución que mejor conduce el plásmido entre cada uno de los compartimentos, seguido de la solución TE. La eficiencia de transporte de ácidos nucleicos del PBS, se debe a su composición de sales de fosfato que le permiten formar iones monovalentes y divalentes que interactúan con el ADN (Herrera, Melendez, & Miranda, 2016). En cambio, la capacidad del TE para transportar el ADN se debe tanto al Tris HCl, que es una base débil que forma iones catiónicos que se asocian al ADN formando complejos como el EDTA que es un quelante del magnesio, que permite desactivar las DNAasas evitando la degradación del ADN (Sanderson, Araki, Lilley, Guerrero, & Lewis, 2014).

La segunda variable fue la fuerza de centrifugación. Esta se encarga de inducir la penetración de los nanostraw a las células. En esta investigación se determinó que se requiere una fuerza mínima de 250 g, para producir la penetración de la pared celular por los nanomateriales. Estos resultados se corroboran por el estudio realizado en 1990 por Kaeppler y sus colaboradores, quienes describen una penetración de los nanomateriales en células de tabaco del 0.1%, utilizando la fuerza de agitación del vórtex.

A continuación, se estandarizó los parámetros relacionados con la electroporación. Esta técnica de introducción de ADN utiliza un campo eléctrico para abrir de forma reversible la

membrana celular, por lo cual se deben optimizar los parámetros de la electroporación para obtener transfección celular y no causar un daño permanente en la membrana (Dhir, Dhir, Hepburn, & Widholm, 1991). En los ensayos de la investigación se observó que la combinación de los parámetros de 35 V, 6 pulsos y 20 s de intervalo de tiempo entre pulsos mostraron una eficiencia de 24 % de penetración del PI. Estos valores son corroborados por Saunders y sus colaboradores (1995), quienes al realizar una electroporación con un equipamiento tradicional bajo las condiciones de 500 V, 6 pulsos y 10 s de descanso entre pulso, obtienen una eficiencia del 25 %.

Luego de estandarizar el sistema nanostraw con PI, se debe estandarizar el sistema con ADN plasmídico. La transfección con el plásmido pSIM24 mostró que la mejor solución de electroporación es el TE, con una eficiencia del 0.27 %, frente al 0% de transfección con la solución PBS. La razón principal por la cual se logró la transfección con el TE es por la presencia del EDTA en su composición. El EDTA tiene la capacidad de quelar los metales divalentes como el Ca (Sanderson, Araki, Lilley, Guerrero, & Lewis, 2014). Este elemento participa en la defensa innata de las plantas, especialmente en el endurecimiento de la pared celular (Gómez, Vernier, Dejne, Vicentem, & Gundersen, 2008). Esto sugiere que al capturar el calcio del medio, el estrés producido por la electroporación no producirá un cambio en la textura de la pared celular, permitiendo realizar la transfección de manera óptima.

La pared celular es una barrera difícil de traspasar debido a su composición estructural. La presencia de pared en los cultivos de suspensiones celulares es una de las causas en la dificultad de la penetración de los nanomateriales, así como en la heterogeneidad de las poblaciones celulares (Saunders, *et al.*, 1995). Con el objetivo de disminuir la rigidez de la pared celular se realizaron

varios pretratamientos, lo cuales presentaron buenos resultados debilitando la pared. El pretratamiento con pectinasa es el que proporcionó la mayor eficiencia de introducción del plásmido, debido posiblemente a la función de esta enzima de degradar la pectina de la pared celular vegetal, debilitándola y permitiendo la transfección de mejor manera (Sakai, Sakamoto, Hallaert, & Vandamme, 1993).

El proceso de electroporación al que son expuestas las células produce estrés, que puede generar daños permanentes en la membrana y finalmente la muerte celular (Gómez, Vernier, Dejneke, Vicentem, & Gundersen, 2008). Esto puede explicar la disminución de la viabilidad celular en los dos primeros días después de la transfección.

Al analizar los medios post-transfección, se observó que el medio suplementado con manitol presentaba una menor pérdida de viabilidad celular en comparación con los otros glúcidos. Algo similar mencionan Pharr y sus colaboradores en 1995, donde ensayos realizados con manitol muestran que este azúcar se encuentra relacionado con la ruta de reparación del daño de la membrana celular en plantas. El manitol protege a la célula al entrar en ella, estabilizando y potenciando la activación de la ruta de reparación de la membrana celular.

La expresión de tripsina tras la estandarización del sistema nanostraw, permitió obtener una eficiencia de 0,28423 mg de tripsina por ml de medio. Se obtuvo además, una eficiencia de 0,3913mg de tripsina por Kg de biomasa. Este la primera investigación a nivel nacional sobre expresión de proteínas en modelos vegetales. Hay registros de rendimiento de 0.27mg de tripsina purificada por g de biomasa en modelos bacterianos como *Escherichia coli* (Ahsan, Aoki, &

Watabe, 2005), lo que motiva a seguir con la investigación para obtener una producción mayor a nivel comercial e industrial.

La estandarización de la transfección mediante el sistema nanostraw en suspensiones celulares de tabaco, es el sistema base que permitirá la expresión de proteínas de interés a nivel del laboratorio. Esta investigación se centró en la expresión de tripsina como biofábrica celular, por su importancia en a nivel mundial.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- El establecimiento de la suspensión celular de tabaco con 2 y 1 g de callo, permitieron obtener cultivos con una viabilidad del 99.7% y con un alto número de células disgregadas, mostrando que ambas cantidades de callo pueden ser utilizadas para el establecimiento de cultivos viables.
- Se logró determinar las condiciones óptimas para la transfección de suspensiones celulares de tabaco por el sistema nanostraw, en 300g de fuerza de centrifugación, TE como solución de electroporación, 35 V por pulso de 40 s y 6 pulsos con un tiempo de descanso de 20 s entre pulso.
- Se obtuvo bajo las condiciones óptimas estandarizadas una eficiencia de 0.27% de transfección con GFP, sin embargo, la eficiencia se incrementó al exponer a las suspensiones celulares a pretratamientos con DMSO, preplasmólisis y pectinasa aumentando la eficiencia hasta 0.33, 0.39 y 0.48 respectivamente.
- En el método de transfección se logró reducir en un 20 % la pérdida de viabilidad de los transformantes adicionando manitol al medio. Lo que incrementó la capacidad de mantener la transformación en los cultivos en suspensión celular.
- El rendimiento de la expresión de tripsina fue de 0,28423 mg de tripsina por ml de medio y 0,3913mg de tripsina por Kg de biomasa.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar ensayo de electroporación con callos embriogénicos y no embriogénicos para evaluar la influencia de esto sobre la viabilidad.
- Se recomienda realizar ensayos aumentando el voltaje y disminuyendo el tiempo del pulso para evidenciar si existe un mayor rendimiento de transfección.
- Se recomienda realizar la selección de transformantes por un mayor tiempo y mayor número de generaciones para lograr tener únicamente cultivos con la característica deseada.
- Realizar la purificación de la tripsina y la corrida en un gel de poliacrilamida para corroborar que efectivamente se trata de esta proteína

CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA

- Aalipour, A., Xu, A., Leal-Ortiz, S., Garner, C., & Melosh, N. (2014). Plasma Membrane and Actin Cytoskeleton as Synergistic Barriers to Nanowire Cell Penetration . *Langmuir*, A-D.
- Ahsan, N., Aoki, H., & Watabe, S. (2005). Overexpression in Escherichia coli and functional reconstitution of anchovy trypsinogen from the bacterial inclusion body. *Mol Biotechnology*, 193-205.
- Baird, T. (2017). Trypsin. *Reference module in life science* , 375-432.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current Opinion n Biotechnology*, 411-421.
- Barret, A., & Rawlings, N. (1994). Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology*, 19-61.
- Birch, R. (1997). Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review Plant Physiology*, 297-326.
- Bugge, M., Hansen, T., & Klitkou, A. (2016). What is the Bioeconomy? A review of the literature. *Sustainability*, 691-699.
- Chen, C., Chou, J., Liu, B., Chang, M., & Lee, H. (2007). Transfection and expression of plasmid DNA in plant cells by an arginine-rich intracellular delivery peptide without protoplast preparation. *FEBS Letters*, 581-585.

- Davies, H. (2010). Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of proteins products: evolution and prospects. *Plant Biotechnology*, 845-861.
- De Block, M., Herrera-Estrella, L., Montagu, M., Schell, J., & Zambryski, P. (1984). Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO Journal*, 1681-1689.
- De Palma, A. (2014). *Genetic Engineering & Biotechnology News*. Obtenido de <https://www.genengnews.com/insights/electroporation-and-competing-transfection-methods/>
- Demain, A., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* , 297-305.
- Dhir, S., Dhir, S., Hepburn, A., & Widholm, J. (1991). Factors affecting transient gene expression in electroporated Glycine max protoplasts. *Plant Cell Reports*, 106-110.
- Fischer, R., Emans, N., Schuster, F., Hellwig, S., & Drossard, J. (1999). Towards molecular farming in the future: using plant cell suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol.Appl.Biochem*, 109-112.
- Fromm, M., Taylor, E., & Walbot, V. (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation . *Nature*, 791-793.
- Gelvin, C. (2000). Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 223-256.

- Global Info Research. (2018). *Bussiness Risk & Industry Analysis Reports*. Obtenido de <https://www.globalinfoforesearch.com/>
- Glover, D., Lipps, H., & Jans, D. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet*, 299-310.
- Gómez, F., Vernier, T., Dejneka, P., Vicentem, A., & Gundersen, M. (2008). Pulsed electric field reduces the permeability of potato cell wall. *Bioelectromagnetics*, 296-301.
- Gudmundsdottir, A., Stefansson, B., & Bragi, J. (2013). Trypsin I in Fish. *Handbokk of Proteolytic Enzymes*, 2621-2624.
- Haard, N. (2012). A Review of Proteolytic Enzymes from Marine Organisms and Their Application in the Food Industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 37-41.
- Harel, M., Berchansky, A., Hodis, E., Bowlin, L., Canner, D., Jones, G., . . . Prilusky, J. (2019). *Proteopedia*. Retrieved from <https://proteopedia.org/wiki/index.php/Trypsin#Function>
- Hellwing, S., Drossard, J., Twyman, R., & Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*, 1415-1422.
- Herrera, L., Melendez, A., & Miranda, D. (2016). Considerations on electrical impedance measurements of electrolyte solutions in a four-electrode cell. *Journal of Physics Conference Series*, 50-62.

- Howard, J., Nikolov, Z., & Hood, E. (2011). Enzyme production systems for biomass conversion . *Plant Biomass Conversion*, 227-253.
- Kaepler, H., Gu, W., Somers, D., Rines, H., & Cockburn, A. (1990). Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports*, 415-418.
- Kang, J., Ramu, S., Lee, S., Aguilar, B., Kumar, S., Yoo, J., . . . Hong, Y. (2010). Phosphate-Buffered Saline-Based Nucleofection of Primary Endothelial Cells. *Anal Biochem*, 251-255.
- Karra, M., Trigui, M., Yust, M., Awad, M., & García, P. (2018). Biochemistry: Production of High-Added Value Biomolecules for Industrial Uses. *Biomed Research International*, 120-122.
- Keshavareddy, G., Kumar, A., & Vemanna, S. (2018). Methods of plant transformation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2656-2668.
- Kieran, P., Macloughlin, P., & Malone, D. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* , 39-52.
- Klee, H., Horsch, R., & Rogers, S. (1987). Agrobacterium-mediated plant transformation and its further application to plant biology . *Annual Reviews Plant Physiology*, 467-486.
- Klein, T., Wolf, E., Wu, R., & Sanford, J. (1987). High velocity microprojectiles for delivery nucleic acids into living cells. *Nature*, 70-73.

- Komarnytsky, S., Borisjuk, N., Borisjuk, L., Alam, M., & Raskin, I. (2000). Production of Recombinant Proteins in Tobacco Guttation Fluid. *Breakthrough technologies*, 927-933.
- Ktari, N., Khaled, H., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., & Nasri, M. (2012). Trypsin from zebra blenny viscera: Purification characterisation and potential application as a detergent additive. *Food chemistry*, 467-474.
- Kumar, D., & Chand, T. (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl. Microbial Biotechnol*, 726-736.
- Kyung, T., & Eberwine, J. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 3173-3178.
- Lindsey, K., & Jones, M. (1987). Transient gene expression in electroporated protoplast and intact cells of sugar beet. *Plant Mol Biol*, 43-52.
- Maas, C., & Werr, W. (1989). Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts. *Plant Cell Reports*, 148-151.
- Macouzet, M. (2004). *Cloning and expression of Conner-fish Trypsin in Bacteria and Yeast*. Montreal: McGill University.
- Macouzet, M., Simpson, B., & Lee, B. (2005). Expression of a cold-adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 851-857.

MAG. (2018). *Manual para el registro de empresas y productos de uso veterinario*. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/MANUAL-PARA-EL%20REGISTRO-DE-EMPRESAS-Y-PRODUCTOS-DE-USO-VETERINARIO.pdf>

Maliga, P., & Bock, R. (2011). Plastid Biotechnology: Food, Fuel, and Medicine for the 21st Century. *Plant Physiology*, 110-117.

Marthur, J., & Koncz, C. (1997). PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA. *Methods in Molecular Biology*, 267-276.

Maxwell, J., Chavez, C., Springer, R., Maskaly, K., & Goodin, D. (2007). Preparation of superhard BxCy fibers by microvortex-flow hyperbaric laser chemical vapor deposition. *Diamon and Related Materials*, 1557-1564.

Meena, R., & Hasrish, P. (2001). Expression systems for production of heterologus proteins. *Current Science*, 1121-1128.

Mondragon, J. (2009). *Nicotiana tabacum*. Obtenido de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/nicotiana-tabacum/fichas/ficha.htm>

Narusaka, Y., Narusaka, M., Yamasaki, S., & Iwabuchi, M. (2012). Methods to transfer foreign genes to plants. *Transgenic plants advanves and limitations*, 177-188.

- Noble. (1990). The dicoverly of the vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer .
Biochemistry and cell biology , 1344-1351.
- Pharr, D., Stoop, J., Williamson, J., Studer, M., Massel, M., & Conkling, M. (1995). The Dual Role
of Mannitol as Osmoprotectant and Photoassimilate in Celery. *HortSciencie*, 1185-1192.
- Polgar, L. (2005). the catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and molecular life sciences* ,
2162-2172.
- Potenza, C., Aleman, L., & Sengupta, C. (2004). Targeting Transgene expressio in research,
agricultural and enviroment:Promoters used in plant transformation . *In Vitro Cellula &
Developmental Biology-Plant*, 401-422.
- Pratt, C., Voet, D., & Voet, J. (2008). *Fundamentals of Biochemistry-Life and Molecular L*Level.
Voet Tercera Edicion.
- Pulzl, H., Kleinschmit, D., & Arts, B. (2014). Bioeconomy-An emergng metadiscourse affecting
fores discourses . *Scand.J.For. Res*, 386-393.
- Ramachandra, R., & Ravishankar, G. (2002). Chemical factories of secondary metabolites.
Biotechnology Advances, 101-153.
- Ramírez, M. (2018). *Libro de Memorias del XV Foro Internacional del Banano* . Guayaquil :
Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador .

- Recillas-Targa, F. (2006). Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol*, 337-354.
- Richardson, B. (2012). From a fossil-fuel to a biobased economy. *Environ. Plan. C. Gov. Policy*, 282-296.
- Sagiv, K. (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles implications and applications for formulated diets. *Aquiculture*, 181-201.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., & Vandamme, E. (1993). Pectin, Pectinase and Pectinase: Production, Properties and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 213-294.
- Sambrook, & Russell. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring: Laboratory Press.
- Sanderson, B., Araki, N., Lilley, J., Guerrero, G., & Lewis, K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Anal Biochemical*, 44-52.
- Sanford, J., Klein, E., Wolf, & Allen. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Sci Technol*, 27-37.
- Sato, K., Nakayama, M., & Shigeta, J. (1996). Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cultures of strawberry. *Plant Science*, 91-98.

- Saunders, J., Ho Lin, C., Huei Ho, B., Cheng, J., Tsegwa, N., Lin, J., . . . Wert, S. (1995). Rapid Optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplast and pollen. *Molecular Biotechnology*, 181-190.
- Tautorus, T., Bekkaoui, M., Pilon, R., Datla, W., Crosby, L., . Fowke, D., & Dunstan, I. (1989). Factors affecting transient gene expression in electroporated black spruce (*Picea mariana*) and jack pine (*Pinus banksiana*) protoplasts. *Theoretical and applied genetics*, 531-536.
- Terzaghi, W., & Cashmore, R. (2012). *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press Inc.
- Twyman, R., Stoger, E., Schillberg, S., Chritou, P., & Fishcer, R. (2003). Molecular farming in plants: host systemss and expression technology. 50-62.
- Uchimiya, H., & Murashige, T. (1974). Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplast from cultured tobacco cells . *Plant Physiology*, 936-944.
- Vasquez, J., Revin, L., Higaki, J., & Creaik, C. (1989). An expression system for trypsin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 67-78.
- Woodard, S., Jocelyne, M., Bailey, M., Barker, D., Love, R., Lane, J., . . . Howar, J. (2003). Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnol.Appl.Biochem*, 123-130.

Xie, X., Xu, A., Leal-Ortiz, S., Cao, Y., Garner, C., & Melosh, N. (2013). Nanostraw-Electroporation System for Highly Efficient Intracellular Delivery and Transfection. *ACSNANO*, 4351-4358.

Xu, J., Dolan, M., Medrano, G., Cramer, C., & Weather, P. (2011). Green factory: Plant as bioproduction for recombinant proteins. *Biotechnology advances*, 1320-1334.

Yee, L., & Blanch, H. (1993). Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *E.coli*. *Biotechnology Bioengineering*, 781-790.

