

Caracterización del gen LI de la proteína mayoritaria de la cápside del virus del papiloma humano para su clonación en Hairy Roots de *brassica oleracea* var. *italica* (brócoli)

Juan Manuel Jiménez Antaño *

María del Carmen Montes Horcasitas *

Emma Gloria Ramos Ramírez *

Armando Ariza Castolo **

Josefina Pérez Vargas ***

Gómez-Guzmán Octavio *

Graciano Calva Calva *

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte por neoplasias en países como México. La enfermedad se asocia a una infección previa por el virus del papiloma humano (VPH). Una de las principales características de este virus es la proteína LI que es la mayoritaria de la cápside y puede autoensamblarse para formar partículas semejantes a virus VLP, además de que esta proteína presenta propiedades antigénicas contra ese virus en animales. Con base en esas propiedades, se han desarrollado y comercializado vacunas a base de los VLP contra el VPH, sin embargo los sistemas de producción resultan costosos y el producto es poco accesible para personas marginadas, quienes son la población más afectada por este virus. En este trabajo se presentan los resultados sobre la caracterización del gen LI del HPV con el objetivo de establecer posteriormente un cultivo de raíces transformadas de brócoli que expresen la proteína correspondiente y la ensamblen en los VLP. También se presentan los resultados sobre el establecimiento de cultivos de raíces no transformadas de brócoli silvestre y de raíces transformadas sin el gen.



Acerca de los autores...

* Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

** Departamento de Química, CINVESTAV-IPN.

*** Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.

El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte por neoplasias en países como México (Salas-U. 2006) (Diestro M. D. 2007); la enfermedad se asocia a la infección previa por VPH. Una de las principales características de este virus es la proteína LI, que es la mayoritaria de la cápside y puede autoensamblarse para formar partículas semejantes a virus VLP; además, esta proteína presenta propiedades antigénicas demostradas en animales en experimentación (Carter 2003) (Moniz. M., 2003).

Gracias a estas propiedades, se han podido desarrollar y comercializar vacunas a base de los VLP de VPH (Stanley, 2007) (McIntosh, 2008), sin embargo los sistemas en donde se expresa resultan costosos y poco accesibles para las personas marginadas, las cuales son la población más afectada por este virus. La biotecnología vegetal que se presenta en este trabajo, particularmente el cultivo de raíces transformadas, ofrece una alternativa para su producción, ya que estas raíces pueden propagarse en biorreactor o regenerarse a planta completa con potencial como vacuna comestible. El objetivo aquí es obtener un cultivo de raíces transformadas de brócoli con el gen de la proteína LI del VPH. Hasta el momento, se ha logrado aislar el gen LI mediante restricciones y PCR a partir del constructo pVAXI-LI. También se tienen cultivos control de raíces de brócoli silvestre y raíces de brócoli infectadas con *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de los plásmidos pI6LI y pHPV16 se transformaron cepas de *Escherichia coli* DH5 α para preservarlos y utilizarlos en posteriores ensayos. En este trabajo, se emplea el gen de la proteína LI incluido el constructo pI6LI, que está formado por el plásmido pVAXI y el gen LI. Para caracterizar al gen LI dentro del constructo pI6LI se realizaron digestiones con enzimas de restricción y PCR, empleando dos pares de primers: uno para amplificar el gen completo y otro que amplifica al gen sin la secuencia de localización nuclear, y se inicia a partir del segundo ATG del gen LI. También se utilizaron primers universales My09 y My11, los cuales se utilizaron para amplificar una región conservada de 450 pb dentro del gen LI. Se realizó la caracterización del plásmido pCAMBIA 1105.1 por medio de cortes de restricción, para que posteriormente se transforme una cepa de *A. rhizogenes* LBA 9402.

Respecto a las actividades sobre biotecnología vegetal, se establecieron los cultivos de raíces normales de brócoli usando un medio B5 semisólido para germinar semillas y obtener plántulas, a fin de iniciar el cultivo de las raíces. Así, se obtuvieron cultivos de raíces transformadas con *A. rhizogenes* que se desarrollaron en un medio SH líquido.

Caracterización del gen LI a partir del constructo p16LI mediante enzimas de restricción

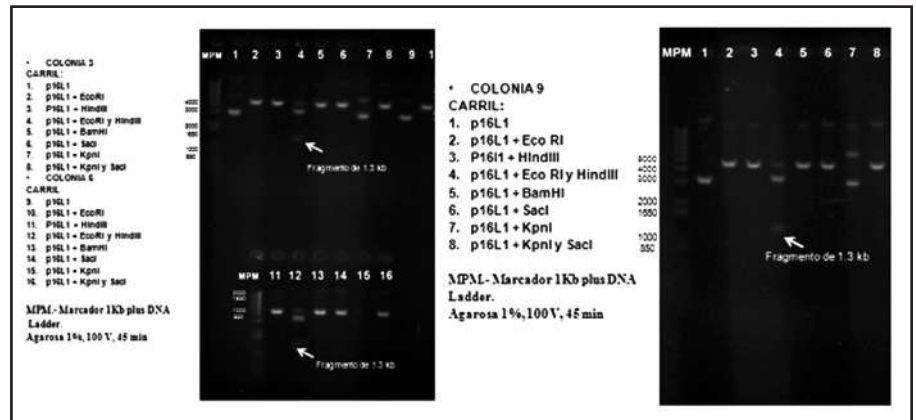


Figura 1. Electroforesis de las reacciones de restricción plasmídica de constructo p16LI para la caracterización del gen LI.

Se aislaron 24 clonas transformadas de *E.coli* p16LI y a 10 de ellas se les extrajo de DNA plasmídico; de estas extracciones, se emplearon tres para realizar la caracterización del gen LI por ensayos con enzimas de restricciones (Figura 1). De acuerdo con el tamaño que mostraron las bandas, en los gels se observó la presencia del LI en la restricción, empleando simultáneamente las enzimas EcoRI y HindIII. La enzima HindIII corta en el extremo 5', que flanquea al gen, mientras que EcoRI corta dentro del gen en la posición 1261. Se puede observar la reproducibilidad en los resultados, resaltando el fragmento correspondiente al gen LI en las restricciones adecuadas que se indican con las flechas.

En otro estudio, se efectuó la restricción con enzimas que cortan dentro del gen LI (Figura 2). Como se observa, se obtuvieron las bandas con los fragmentos esperados (flechas). Con estos resultados, se comprobó que se trata del gen LI, porque los patrones de bandas corresponden a las restricciones de las enzimas que cortan dentro del gen y en el flanco 5' con HindIII.

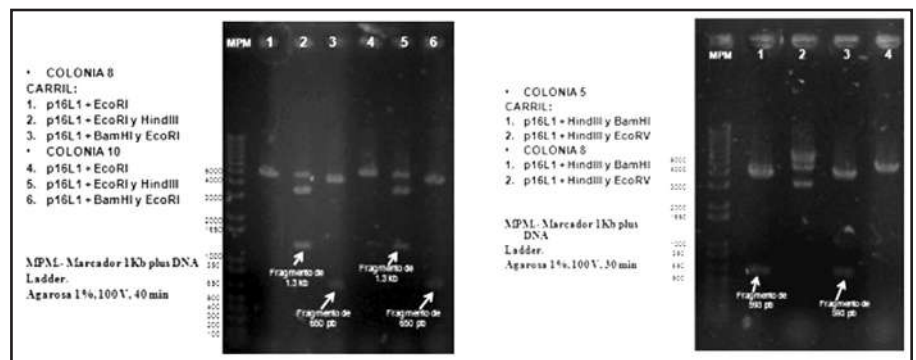


Figura 2. Electroforesis de la restricción plasmídica de p16LI con enzimas de restricción que cortan en el interior de la secuencia del gen LI.

Tabla 1. Primers diseñados para la amplificación del gen LI con y sin la señal de localización nuclear.

OD1LI	TTGACCATGGATGCAGGTGACTTTTATTTAC
OR1LI	GGTAAGATCTTTACAGCTTACGTTTTTTGCG
OD2LIATG2	TTGACCATGGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGT
OR2LINLS-	GGTAAGATCTTCCTAATGTAAATTTTGTTT
My09	CGTCCMARRGGAWACTGAT
My11	GCMCAGGGWCATAAYAATG

AMPLIFICACIÓN DEL GEN LI A PARTIR DEL CONSTRUCTO p16LI

Los oligos o primers (Tabla 1) se diseñaron tomando en cuenta la amplificación de todo el gen (OD1LI y OR1LI), considerando la amplificación a partir del segundo ATG y sin secuencia de localización nuclear (OD2LIATG2 y OR2LINLS-), lo cual, de acuerdo con Maclean, *J. et al.*, 2007 (Maclean, 2007), aumenta la producción de proteína y facilita la clonación en los vectores. También se utilizaron oligos universales para la amplificación de una secuencia conservada de 450 pb dentro del gen LI.

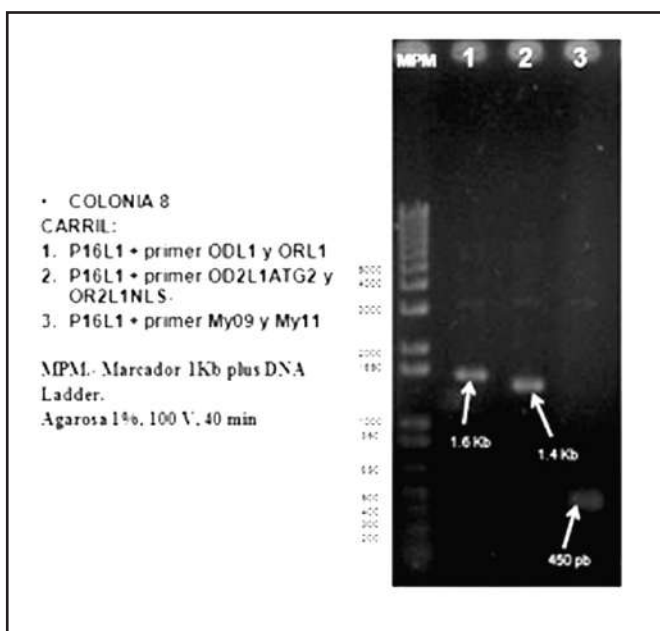


Figura 3. Productos de la PCR de p16LI usando los primeros mostrados en la Tabla 1.

Como puede observarse en la Figura 3, se obtuvieron los fragmentos esperados: de 1.6 kb con los primeros que amplifican todo el gen; los de 1.4 kb par amplifican el gen sin la secuencia de localización nuclear, a partir del segundo ATG, y el de 450 pb, que corresponde a la amplificación empleando los primers My09 y My11. Esto demuestra la presencia del gen LI dentro del constructo p16LI.

CARACTERIZACIÓN DEL VECTOR BINARIO pCAMBIA 1105.1

El plásmido pCAMBIA 1105.1 se utilizó para transformar *Agrobacterium*, con el cual se infectaron plántulas de brócoli para la inducción de raíces transformadas. Este plásmido confiere resistencia bacteriana a la estreptomycin y resistencia de las raíces a la higromicina; su digestión, empleando las diversas enzimas de restricción, produjo los fragmentos con los tamaños esperados (Figura 4).

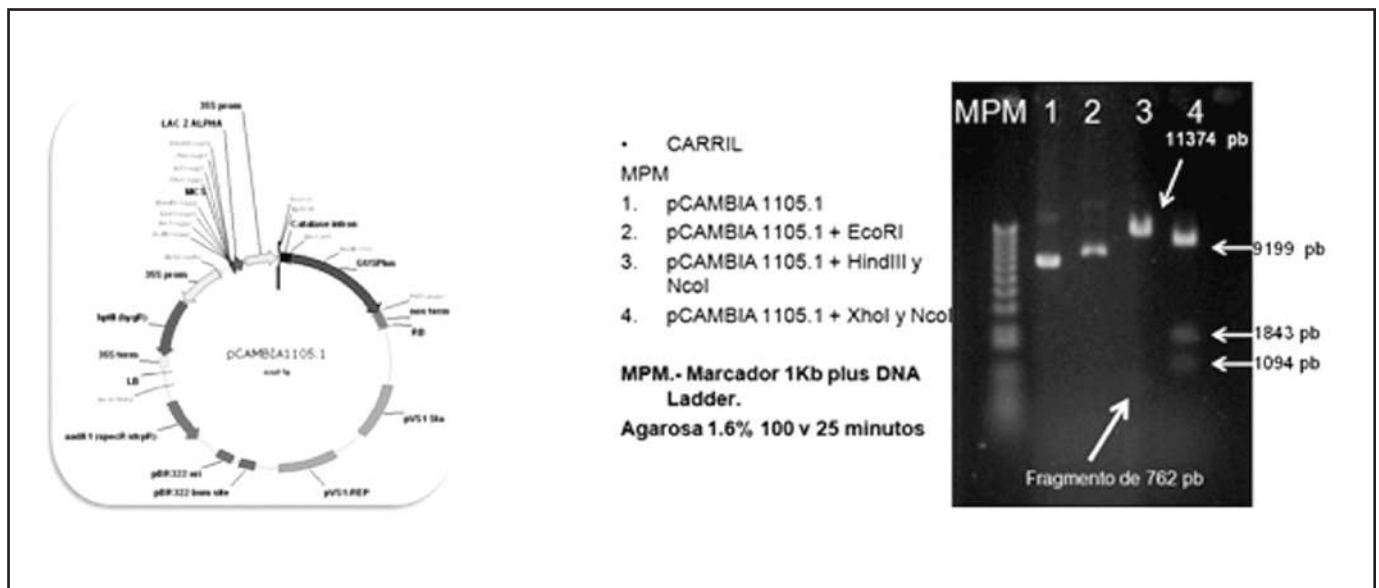


Figura 4. Electroforesis de la restricción plasmídica de pCAMBIA 1105.1 (A) con diversas enzimas de restricción (B).

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE RAÍCES DE BRÓCOLI

Se establecieron cultivos de raíces no transformadas y de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 (Figura 5). Se resalta el sitio de infección para la agrotransformación y se indica la raíz aérea emergente, la cual se transfiere posteriormente a medio con cefotaxima para eliminar a *A. rhizogenes* y poder constituir el cultivo aséptico de raíces de brócoli transformadas. El protocolo fue previamente determinado por el grupo de trabajo del laboratorio de ingeniería metabólica del CINVESTAV y fue reportado por Edgar García López *et al.*, en un trabajo presentado en este congreso.

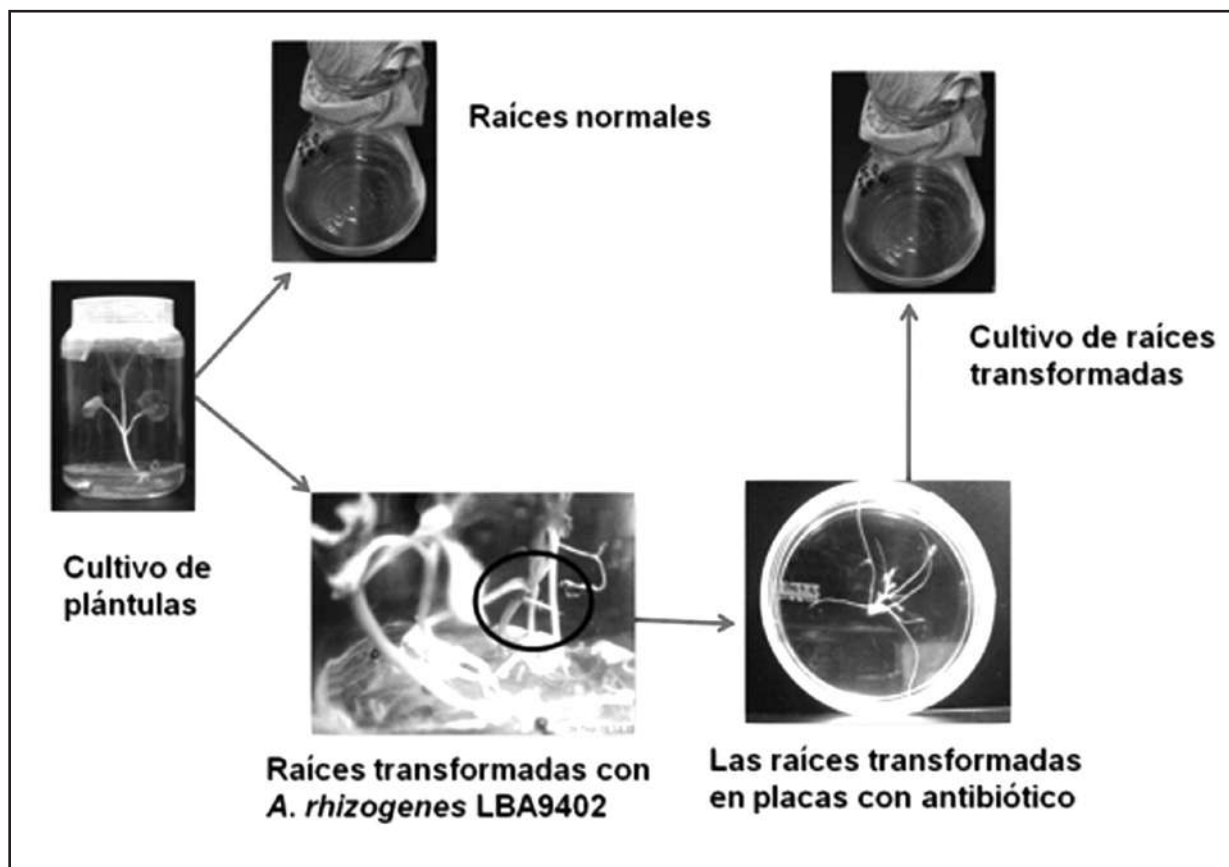


Figura 5. Esquema del protocolo para el establecimiento de cultivos de raíces de brócoli.

Bibliografía...

Carter, J., Wipf, G., Benki, S., Christensen, N. y Galloway D. (2003). "Identification of a Human Papillomavirus Type 16-Specific Epitope on the C-Terminal Arm of the Major Capsid Protein L1" *J. Virol.* **77**(21): 11625-11632.

Diestro M. D., S. M., Gómez N. F. (2007). "Cáncer de cuello uterino: Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH)" *Oncología (Barc.)* **30**(2): 14-31.

McIntosh, J., Sturpe, D. y Khanna, N (2008). "Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention: Practice and policy implications for pharmacists" *J Am Pharm Assoc.* **48**: e1-e17.

Moniz, M., L. M., Hung C., y Wu T. (2003). "HPV DNA VACCINES" *Frontiers in Bioscience* **8**: 55-68.

Salas-U., I., Villalobos, E.A. y Ramírez-V., B. L. (2006). "Prevalencia de Displasia y Cáncer Cervicouterino y factores asociados en el Hospital Central de Chihuahua, México" *CIMEL* **11**(1): 12-15.

Stanley, M. (2007). "Prophylactic HPV vaccines" *J. Clin. Pathol.* **60**: 961-965.

CONCLUSIONES

Los primers diseñados hibridan y amplifican al gen LI en sus sitios correspondientes, obteniéndose como producto de PCR los fragmentos esperados de 1.6 kb, 1.4 kb y 450 pb. También se logró establecer cultivos de raíces normales y de raíces transformadas de brócoli con *A. rhizogenes* LBA9402, las cuales presentaban las características esperadas: raíces pilosas de alta vellosoidad y que muestran un crecimiento con ageotropismo positivo.

Tecnohumor

Tribus urbanas: en busca de una identidad
por: sele

hip-hopero



emo



darketo



punketo



A small, handwritten signature in the bottom right corner of the page.

Hacia el 2010



Mural de José Clemente Orozco, Palacio de Gobierno, Guadalajara, Jal.

Año del Bicentenario de la Independencia de México

Honor a los héroes que nos dieron Patria