



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

"Efecto de fitohormonas y modificaciones estructurales del gen *I1* sobre el crecimiento de raíces transformadas de brócoli y su expresión de proteína L1 del HPV16"

Tesis que presenta

M. en C. Juan Manuel Jiménez Antaño

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de Tesis: **Dr. Graciano Calva Calva**

Ciudad de México

Junio, 2018

DECLARACIÓN

"Efecto de fitohormonas y modificaciones estructurales del gen L1 sobre el crecimiento de raíces transformadas de brócoli y su expresión de proteína L1 del HPV16"♣

Yo certifico que el contenido de esta tesis es el resultado de mi propio trabajo, excepto donde se dan las debidas referencias a otros autores como parte complementaria de una parte del trabajo. Esta tesis no ha sido presentada previamente de ninguna forma en este Centro de Investigación y de Estudios Avanzados ni en ninguna otra institución de enseñanza.

JUAN MANUEL JIMÉNEZ ANTAÑO



♣ El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del profesor investigador Dr. Graciano Calva Calva y la asesoría de los profesores investigadores Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez, Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas, Dr. Fernando José Esparza García y Dr. Armando Ariza Castolo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la beca número 203841.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a:

El **CINVESTAV-IPN Unidad Zacatenco en su Departamento de Biotecnología y Bioingeniería**, por el apoyo e interés brindado para el desarrollo de este trabajo; y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Agradezco con mucha sinceridad

Al **Dr. Graciano Calva Calva** por su amistad, interés, paciencia y apoyo para el desarrollo de este trabajo y para mi formación como doctor en ciencias, también por las observaciones y consejos hacia mi formación y hacia mi persona.

A la **Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez** por sus observaciones realizadas al trabajo y por compartirme sus conocimientos que he aplicado en las metodologías llevadas a cabo.

A la **Dra. María Del Carmen Montes Horcasitas** por sus observaciones y sugerencias que me han servido y he aplicado para obtener mejores resultados en el presente trabajo

A la **Dr. Fernando José Esparza García** por la ayuda brindada con sus observaciones y sugerencias para mejorar los resultados presentes en este trabajo

Al **Dr. Armando Ariza Castolo** por sus conocimientos aportados y las sugerencias planteadas que he seguido, obteniendo mejores resultados y observando el trabajo desde otras perspectivas

A la **Dra. América Martínez Calleja**, por su amistad, apoyo y su ayuda con las metodologías de inmunofluorescencia, western-blot y microscopía de fluorescencia

Al auxiliar del Doctor: **Octavio Gómez Guzmán**, por su ayuda en experimentos y metodologías

A los amigos y grupo de trabajo **Cintia, Tania, Berenice, Noemí, Edgar, Enid, Alexis, y Carlos**, gracias por su amistad, sus observaciones y sugerencias

Los estudiantes de tesis y estancia que me ayudaron en el trabajo experimental

A mis compañeros y amigos de biotecnología **Ana Carolina, Roberto, Josué, Bere, Catherine, Apolo, Miguel, Alejandro, Humberto, Gonzalo, Gerardo, Jaime, Francisco, Isaac, Johan, Omar, Valentín, Angy, Tere, Mónica, Azucena, Isabel** por su amistad y apoyo en este trabajo

Agradezco con sinceridad y emoción:

A **Dios** por haberme dado la vida y por darme la familia que tengo

A mi mamá **Marcela Antaño Espiritu** por su confianza, paciencia, cariño y el apoyo que me brindo sin lo cual no habría sido posible llegar a este grado

A mi papá **Alfonso Jiménez Castro** por forjar parte de mi carácter

A mis hermanos **Rufino, Gemma, Alfonso, Víctor, Jesús, Elvia y José Alfredo** por el apoyo emocional, sus consejos y por sus enseñanzas que ayudaron a poder lograr esta meta

Comité tutorial

Director de tesis:

Dr. Graciano Calva Calva

CINVESTAV-IPN DBB

Asesora:

Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez

CINVESTAV-IPN DBB

Asesora:

Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas

CINVESTAV-IPN DBB

Asesor:

Dr. Fernando José Esparza García

CINVESTAV-IPN DBB

Asesor:

Dr. Armando Ariza Castolo

CINVESTAV-IPN DQ

RESUMEN

La estrategia actual para tratar las infecciones por virus del papiloma humano (HPV) incluye el uso de vacunas preventivas a base de la proteína L1. Esta proteína se ha expresado en levaduras, células de insecto, bacterias y plantas completas. Hasta la fecha no se encuentran estudios de producción de proteína L1 en raíces transgénicas. Una de las ventajas de producción de proteínas heterólogas en raíces es que se pueden propagar indefinidamente en medios de cultivo definidos y escalar la producción a biorreactores de uso industrial y comercial. También se pueden realizar modificaciones al medio de cultivo y de condiciones de proceso para aumentar la producción de biomasa y de proteína L1. Así, el objetivo de este estudio fue investigar las condiciones de cultivo que favorecen el crecimiento de raíces de brócoli transformadas con diferentes construcciones de DNA que llevan el gen de la proteína L1 en comparación con la producción de L1 en 4 cepas de *Escherichia coli* (DH5 α , BL21, Rosetta 1, Rosetta 2). Para lograr este objetivo primeramente se obtuvieron líneas de raíces de brócoli transformadas con el gen *l1*, empleando una construcción denominada pCGFPL1 y mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402, se obtuvieron líneas de raíces transformadas. La transformación se demostró por ensayos de β -glucuronidasa y por amplificación del gen *l1* por PCR a partir de DNA genómico de raíces. Las líneas transformadas presentaron el fenotipo de alta vellosidad y crecimiento rápido en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. La investigación sobre el efecto del ácido indolacético (IAA) y cinetina (Kin) sobre el crecimiento de raíces transformadas, revelaron que 1 mg/L de IAA favorece el crecimiento, mientras que 1 mg/L Kin lo inhibe. También se obtuvieron otras construcciones similares a pCGFPL1 con algunas modificaciones al gen *l1*. De éstas, la construcción pCHisL1 adicionó en el amino terminal de la proteína L1, una marca de 6 histidinas para facilitar su purificación. En la construcción pCGFP2ATG se eliminaron los primeros 78 nucleótidos del gen *l1* cambiando el marco de lectura, iniciando a partir del segundo ATG. Finalmente, en la construcción pCGFP Δ NLS se eliminó la secuencia de localización nuclear de *l1*. Estas modificaciones al gen *l1* se realizaron para investigar lo reportado en la literatura que menciona que las regiones eliminadas no son necesarias para la producción de la proteína L1 y que presenta ventajas para optimizar la formación de partículas semejantes a virus (VLP), las cuales son superiores al monómero de L1 para estimular la respuesta inmune. La producción de L1 por cultivos de raíces transformadas evaluada por tinción inmunohistoquímica fue muy baja en comparación con la producción por *Escherichia coli* evaluada por SDS-PAGE, cromatografía de afinidad a níquel y Western-Blot.

ABSTRACT

The current strategy for treating human papillomavirus (HPV) infections includes the use of preventive vaccines based on L1 protein. This protein has been expressed in yeast, insect cells, bacteria and whole plants. To date, no L1 protein production studies have been found on transgenic roots. One of the advantages of producing heterologous proteins in roots is that they can be propagated indefinitely in defined culture media and scaled production to industrial and commercial bioreactors. Modifications to the culture medium and process conditions can also be made to increase the production of biomass and L1 protein. Thus, the objective of this study was to investigate the growth conditions of broccoli roots transformed with different DNA constructs carrying the L1 protein gene compared to L1 production in 4 strains of *Escherichia coli* (DH5 α BL21, Rosetta 1, and Rosetta 2). In order to achieve this objective, root lines of broccoli roots transformed with the *l1* gene were obtained by using a construct called pCGFPL1 and by *Agrobacterium*-mediated transformation method using *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402, transformed root lines were obtained. The transformation was demonstrated by β -glucuronidase assays and by amplification of the *l1* gene by PCR from genomic root DNA. The transformed lines had the phenotype of hairy roots and rapid growth in culture medium without growth regulators. Research on the effect of indole acetic acid (IAA) and kinetin (Kin) on the growth of transformed roots revealed that 1 mg/L IAA promotes growth, whereas 1 mg/L Kin inhibits it. Other constructs similar to pCGFPL1 were also obtained with some modifications to the *l1* gene. Of these, the pCHisL1 construct adds at the carboxyl terminus of the L1 protein a mark of 6 histidine to facilitate its purification. In the pCGFP2ATG construct the first 78 nucleotides of the *l1* gene were removed by changing the reading frame, starting from the second ATG. Finally, in the pCGFP Δ NLS construct, the nuclear localization sequence of *l1* was deleted. These modifications to the *l1* gene were performed to investigate what has been reported in the literature mentioning that the deleted regions are not necessary for the production of the L1 protein and have advantages for optimizing the formation of virus-like particles (VLPs); which are superior to the L1 monomer to stimulate the immune response. The L1 production by transformed root cultures evaluated by immunohistochemical staining was very low compared to the production by *Escherichia coli* evaluated by SDS-PAGE, nickel-affinity chromatography and Western-Blot.

CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	V
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	2
1. CÁNCER CERVICOUTERINO	2
1.1 Tratamiento del cáncer cervicouterino	3
1.2 Vacunas terapéuticas contra el cáncer cervicouterino.....	3
1.3 Vacunas profilácticas contra el HPV	5
1.3.1 Vacuna Cervarix, Gardasil y Gardasil 9	6
2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	8
2.1 Tropismo del HPV	8
2.2 Proteínas del HPV	9
2.3 La proteína L1	12
2.3.1 Monómero L1	14
2.3.2 Enlaces disulfuro	16
2.3.3 Interacción pentámero-pentámero	17
2.3.4 Vueltas (<i>Loops</i>) de superficie y epítopes	18
2.3.5 Autoensamblaje de L1	19
2.3.6 Importancia de L1 en la captación del HPV por las células	21
3 PLANTAS COMO BIORREACTORES	23
3.1 Las plantas como productoras de proteínas terapéuticas	24
3.2 Brassica oleracea var. italica (Brócoli) como modelo de expresión.....	26
3.3 Ventajas y desventajas de producción de vacunas por modelos vegetales	27
4 CULTIVOS DE RAICES TRANSFORMADAS	29
4.1 Inducción de raíces pilosas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	29
4.2 Vector binario pCAMBIA	30
4.3 Escalamiento de los cultivos de raíces pilosas	31
4.3.1 Reactor de tanque agitado.....	32
4.3.2 Biorreactor airlift	32
4.3.3 Reactor de columna de burbujeo	33
4.3.4 Biorreactor de líquidos dispersados.....	34
5 MEDIO DE CULTIVO	35
5.1 Componentes inorgánicos del medio.....	36
5.2 Captación de los nutrientes inorgánicos	37
5.3 Reguladores de crecimiento.....	38
5.3.1 Auxinas.....	38
5.3.2 Citocininas	39
5.3.3 Giberelinas.....	40
5.3.4 Utilización combinada de reguladores de crecimiento.....	40
III. JUSTIFICACION.....	43
IV. HIPOTESIS	44

V.	OBJETIVO GENERAL	44
5.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS	44
VI.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	45
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
7.1	Preparación de las construcciones	46
7.2	Desinfestación y germinación de semillas de brócoli.....	51
7.3	Inducción de raíces transformadas	51
7.4	Establecimiento de cultivos de raíces transformadas y no transformadas.....	51
7.5	Protocolo de transformación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	52
7.6	Ensayo de β -glucuronidasa.....	53
7.7	Extracción de DNA genómico	54
7.8	Localización del sitio de acumulación de la proteína L1 mediante tinción inmunohistoquímica	55
7.9	Detección de L1 mediante Western blot	56
7.10	Efecto de Reguladores de crecimiento	57
7.11	Efecto de Reguladores de crecimiento sobre líneas de raíces transformadas con pCAMBIA	58
7.12	Efecto de Reguladores de crecimiento sobre explantes de raíces transformadas con pCAMHisL1 ..	58
VIII.	RESULTADOS.....	59
8.1	Caracterización por restricción de pCAMBIA 1305.1, pCGFPL1 Δ GUS y pCGFP.....	59
8.2	Confirmación de la presencia del gen l1 en las clonas de <i>E. coli</i> pCGFPL1.....	61
8.3	Confirmación de la presencia del gen eGFP en las clonas de <i>E. coli</i> pPROEX-GFP	62
8.4	Confirmación de la obtención de las construcciones pPROEX-GFPNLS y pPROEX-GFPL1	63
8.5	Confirmación de la obtención de las construcciones pCGFP Δ NLS.....	64
8.6	Obtención de la construcción pPROEX-2ATGNOS	65
8.7	Obtención de la construcción pPCGFP2ATG.....	66
8.8	Obtención de la construcción pPROEX-GFP2ATG	68
8.9	PCR colony de cepas de <i>A. rhizogenes</i> LBA9402 transformadas con pCGFP Δ NLS	70
8.10	Amplificación de L1NOS a partir de DNA genómico de raíces.....	72
8.11	Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el crecimiento y diferenciación de explantes	73
8.11.1	Regeneración de explantes	76
8.11.2	Peso fresco y seco de los explantes de raíces	77
8.11.3	Peso fresco y seco de los explantes de hipocotilos	78
8.11.4	Peso fresco y seco de los explantes de cotiledones	80
8.12	Efecto de IAA y Kin sobre el crecimiento de raíces transformadas con pCAMBIA.....	81
8.13	Ensayo de β -glucuronidasa.....	83
8.14	Localización del sitio de acumulación de la proteína L1.....	84
	Producción de proteína L1 en <i>E. coli</i>	86
8.15	Solubilización de proteína L1 a partir de cuerpos de inclusión	86
8.16	Producción de L1 en <i>E. coli</i> DH5 α , BL21, Rosetta 1 y Rosetta 2.....	87
8.17	Comparación cuantitativa de producción de L1 en las 4 cepas de <i>E. coli</i>	88
8.18	Detección de L1 por Western blot	90
8.19	Proteína L1 obtenida por cromatografía de afinidad a níquel	91
IX.	CONCLUSIONES	92
X.	RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS	93
XI.	REFERENCIAS	94
XII.	ANEXOS.....	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Los tejidos que infecta el HPV depende del tipo de virus.....	9
Tabla 2 Construcciones obtenidas de l1 completo y truncado en 5' 2ATG o 3' ΔNLS en los vectores pPROEX HTb B, pCAMBIA 1105.1 y pCAMBIA 1305.1	48
Tabla 3 Diseño experimental para evaluar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento IAA, Kin y GA ₃ sobre la diferenciación de explantes	57
Tabla 4 Diseño experimental para evaluar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento IAA y Kin, sobre el crecimiento de explantes de raíces.....	58
Tabla 5 Efectos de regeneración de explantes a raíces, callos y brotes.....	76
Tabla 6. Análisis de varianza de peso fresco A) y peso seco B) de explantes raíces	77
Tabla 7. Análisis de varianza de peso fresco A) y peso seco B) de explantes de hipocotilos	79
Tabla 8. Análisis de varianza de peso fresco A) y peso seco B) de explantes de cotiledones.....	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema tridimensional de un VLP constituido por L1 y L2.....	13
Figura 2 Monómero de L1 de papilomavirus (A) y de polioma (B).	15
Figura 3. Interacción entre pentámeros de L1	17
Figura 4. Estrategia experimental.....	45
Figura 5 Reacción de la enzima β-glucuronidasa sobre el X-Gluc.....	53
Figura 6 Caracterización por restricción de pCGFPΔGUS, pCGFP y pCAMBIA 1305.1	60
Figura 7 Digestión de DNA plasmídico de 2 clonas transformadas con pCGFPΔGUS.....	61
Figura 8 Digestión de DNA plasmídico de 6 clonas transformadas con la ligación de pPROEX y eGFP	63
Figura 9 Análisis de restricción de clonas transformadas con pPROEX-GFPNLS	64
Figura 10 Análisis de restricción de clonas que se transformaron con la mezcla de ligación de pCGFP y NLSNOS.....	65
Figura 11 Demostración de la obtención de pPROEX-2ATGNOS por PCR	66
Figura 12 Restricciones de pCGFP2ATG, pCGFPΔGUS y pCGFPΔNLS.....	68
Figura 13 PCR colony de clonas transformadas con la ligación de pPROEX-GFP con 2ATG.....	69
Figura 14 Restricción de pPROEX-GFP2ATG.....	70
Figura 15 Amplificación de l1 sin NLS con CMVdir y BsaI BglII NLS	71
Figura 16 PCR del gen l1 con el terminador NOS en líneas de raíces transformadas.....	73
Figura 17 Efecto de los reguladores de crecimiento de la tabla 3, tercera semana de cultivo.....	75
Figura 18 Peso fresco (A) y peso seco (B) en gramos de biomasa de los explantes de raíces	78
Figura 19 Peso fresco (A) y peso seco (B) en gramos de biomasa de los explantes de hipocotilos	79
Figura 20 Peso fresco (A) y peso seco (B) en gramos de biomasa de los explantes de cotiledones	81
Figura 21 Efecto de reguladores de crecimiento IAA y Kin sobre el crecimiento de raíces transformadas	82
Figura 22 Ensayo de β-glucuronidasa	83
Figura 23 Raíces pilosas con crecimiento rápido en medio sin reguladores de crecimiento	84
Figura 24 Tinción inmunohistoquímica de raíces transformadas.....	85
Figura 25 Solubilización de cuerpos de inclusión con SDS.....	87
Figura 26 Producción de proteína L1 en DH5α, BL21, Rosetta 1 y Rosetta 2	88
Figura 27 Cuantificación de L1 por densitometría.....	89
Figura 28 Detección de L1 por Western blot	90
Figura 29 Cromatografía de afinidad a níquel.....	91

I. INTRODUCCION

El cáncer cervicouterino en México es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres (Castle 2016; Granados-García et al. 2014). El desarrollo de la enfermedad está asociado a infección previa por el virus del papiloma humano (HPV). La proteína L1 es el componente principal y antigénico de la cápside del HPV (Chen et al. 2001; Garcea and Chen 2007; Ishii et al. 2003) y tiene la capacidad de autoensamblarse en cápsides vacías, conocidas como partículas semejantes a virus (VLP), cuando se expresan en células de mamíferos, insectos, o levaduras. Estos VLP tienen características idénticas a las que presenta el virus infeccioso completo observado por microscopia electrónica y comprobado por inmunoensayos (Carter et al. 2003; Moniz et al. 2003; Monroy-García et al. 2014). La inyección parenteral de estos VLP induce títulos altos de anticuerpos neutralizantes detectados en sueros en modelos animales (Moniz et al. 2003). Por las propiedades antigénicas que presentan las proteínas de la cápside del HPV ha sido posible desarrollar vacunas usando sistemas de expresión como levaduras y células de insecto. La proteína L1 y los VLP también se han expresado en otros sistemas como bacterias y plantas completas, sin embargo, actualmente no se han producido en cultivos de raíces. Estos cultivos comparados con la expresión en plantas completas presentan la ventaja que pueden propagarse indefinidamente en medio de cultivo y posteriormente escalarse a biorreactor, de esta forma se pueden realizar modificaciones a los componentes del medio y a las condiciones de proceso, para buscar incrementar la producción de biomasa, que se encuentra relacionada con la producción de proteínas, y también tratar de incrementar la formación de VLP que son más antigénicos que la proteína L1 como monómero. En este trabajo se cumplió el objetivo de encontrar condiciones de cultivo que favorecieron el incremento de biomasa de raíces de brócoli transformadas. Estas condiciones fueron la adición de reguladores de crecimiento el IAA a una concentración de 1 mg/L, también se encontró que la adición de Kin a 1 mg/L inhibe el crecimiento de raíces transformadas. Las auxinas como el IAA promueven la elongación celular (George et al. 2008b), y las citocininas como Kin promueve la división celular. En este trabajo se obtuvo la construcción con la secuencia del gen *l1* sin el primer ATG porque en estudios previos (Webb et al. 2005) se ha observado que de esta forma se aumenta la eficiencia de formación de VLP *In vitro*, también se obtuvo la construcción pCGFP Δ NLS porque en algunos sistemas como *E. coli* la proteína es degradada por el sistema SsrA (Lenzi et al. 2008), además de que se pretendía evaluar si hay diferencia en expresar la proteína en el citoplasma en lugar del núcleo porque esta secuencia no es necesaria para el ensamblaje de VLP y probablemente se podría incrementar la producción (Maclean et al. 2007; Varsani et al. 2003).

II. ANTECEDENTES

1. CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino es uno de los principales problemas de salud pública porque es una de las enfermedades neoplásicas más frecuentes en el grupo de mujeres de 25 a 64 años a nivel mundial (Burk et al. 2013; Newton and Mould 2017; Rodríguez Lundes et al. 2009) y se ha estimado que anualmente se diagnostican 500 mil casos y 250 mil muertes, cerca del 80% ocurren en países en desarrollo (Castellsagué 2008; Dutta et al. 2010; Ji and Zheng 2010; Luque et al. 2016; Monroy-García et al. 2014; Zur Hausen 1996), en México tiene una tasa de mortalidad de 9.5 por 100 mil mujeres, en Estados Unidos los costos estimados desde el diagnóstico hasta el tratamiento es de aproximadamente 6 billones de dólares cada año (Barva Evia 2009). La infección persistente por algunos virus de papiloma humano (HPV) oncogénicos, principalmente el 16 y 18 que se encuentran en el 70% de los casos, se ha establecido como causa necesaria de la mayoría de las lesiones epiteliales malignas y premalignas del cérvix y lesiones neoplásicas en otros sitios de infección de este virus (Castellsagué 2008; Dutta et al. 2010; Ji and Zheng 2010; Lowy 2016; Zur Hausen 1996). Para la progresión del cáncer cervicouterino desde cambios morfológicos de bajo grado a lesiones de alto grado, se requiere primeramente la adquisición de HPV, la persistencia de la infección del HPV, progresión de la infección persistente a precáncer cervicouterino y finalmente cáncer invasivo (Meijer et al. 2009). Sin embargo, no todas las mujeres infectadas con HPV desarrollan cáncer, lo que indica que otros factores están involucrados en la carcinogénesis cervical (Ji and Zheng 2010; Szalmás and Kónya 2009).

Para el desarrollo de cáncer cervicouterino se requieren factores tanto intrínsecos como extrínsecos de la célula. Los factores intrínsecos para la carcinogénesis son: integración del genoma viral en el genoma de la célula infectada lo cual se ha relacionado con la progresión de lesiones de bajo grado a lesiones de alto grado, inactivación de genes supresores de tumores como p53 y Rb por oncoproteínas del HPV particularmente E6 y E7, modificación de la función de reguladores del ciclo celular, síntesis de DNA de la célula infectada y apoptosis (Dutta et al. 2010; Jayshree

et al. 2009). Algunos elementos extrínsecos a la célula son: factores que contribuyen a la inmunotolerancia, de los cuales se puede mencionar la enzima inmunoreguladora indolamina 2,3-deoxigenasa expresada en células presentadoras de antígenos, bajo número de células T Natural Killer, linfocitos T citotóxicos inactivos (anérgicos), células T regulatorias, un microambiente regulatorio que consiste en una gran cantidad de IL-10, factor de crecimiento transformante β (TGF β) e IL-2 reducidas (Jayshree et al. 2009).

1.1 Tratamiento del cáncer cervicouterino

Una vez efectuado el diagnóstico por citología, colposcopia y biopsia, se pueden emplear terapias por escisión dependiendo del grado y avance de la enfermedad (Serman 2002).

El tratamiento para las displasias es la conización que consiste en la extirpación de porciones de tejido dañado en forma cónica del tejido, la crioterapia o congelación del tejido, la electrocirugía en el cual se destruye el tejido mediante calor, la extirpación electro quirúrgica, cirugía láser (Rodríguez Lundes et al. 2009) estos procedimientos tiene un rango de eficacia cercano al 90%, pero se asocia con morbilidad elevada y expansión de la lesión, además de que se trata de métodos dolorosos y mutilantes (Barva Evia 2009) en lesiones avanzadas también se suele utilizar radioterapia, quimioterapia y radioterapia con quimioterapia combinadas (Solís C 2006). El tratamiento del carcinoma cervicouterino en etapa invasora es limitado. La exenteración pélvica se acompaña de elevada morbilidad y mortalidad (Álvarez-Fernández et al. 2001).

1.2 Vacunas terapéuticas contra el cáncer cervicouterino

Estas vacunas se utilizan para tratar las alteraciones causadas por el cáncer producido por el HPV. La mayoría de estas vacunas terapéuticas que actualmente se encuentran en evaluación, han sido diseñadas para inducir linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos contra los epítopes de las proteínas E6 y E7 del HPV16. Se emplean las proteínas

completas E6 o E7, así como proteínas recombinantes o sus genes clonados en vectores virales como Vaccinia o adenovirus, o péptidos específicos para HLA (Berumen Campos and Valdespino Gómez 2006; Trimble 2014).

Están en curso ensayos clínicos orientados a demostrar la inmunogenicidad de una vacuna terapéutica en base a DNA para la displasia anal, consistente en un plásmido encapsulado, conteniendo las secuencias de E7 del HPV16 y múltiples epítopes de HLA-A2 (antígeno de células tumorales que es reconocido por linfocitos T). También está siendo estudiado el uso potencial de células dendríticas que portan antígenos de HPV (Trimble 2014; Villa 2006).

Se han realizado diversos estudios para el desarrollo de las vacunas que permitan controlar y erradicar la enfermedad causada por HPV en personas ya infectadas por este virus ya que las vacunas profilácticas no tienen efecto en su tratamiento. Por ejemplo, en ratones se han empleado vacunas sintéticas de péptidos largos que han ayudado en la eliminación de tumores establecidos por HPV16. Estas vacunas consisten en 13 péptidos largos que cubren los antígenos E6 y E7 del HPV16. En pacientes con cáncer cervicouterino avanzado, la vacuna con la solución de péptidos es segura e inmunogénica (Welters 2008).

Proteínas de shock térmico (HSP), incluyendo calreticulina (CRT), HSP70 y gp96, han demostrado actuar como potentes inmunoadyuvantes, al incrementar la inmunidad antígeno específica contra tumores. También se ha observado que el dominio N de CRT (NCRT) o C-terminal medio de HSP70 (hsp) asociado con E7 de HPV16 es capaz de inducir una potente actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL) específica de antígeno, demostrado en modelos animales (Liu et al. 2008; Talebi et al. 2017).

Existen líneas de investigación las cuales evalúan nuevas moléculas para el tratamiento de infecciones ya establecidas por HPV y lesiones asociadas, sin embargo, hasta el momento los estudios no son concluyentes (Castellsagué 2008).

Algunos nuevos inmunomoduladores han demostrado ser efectivos en el tratamiento de condilomas y las preparaciones están en fase de desarrollo para adaptarse al tratamiento de infecciones de la mucosa superficial (Castellsagué 2008).

El silenciamiento selectivo de la expresión de genes usando RNA pequeño de interferencia (siRNA) ha sido investigado como un método terapéutico potencial para curar el cáncer. Estudios recientes han demostrado que el RNA de interferencia (RNAi) puede ser usado para reducir la expresión de E6 y E7 y con eso restaurar la función normal de Rb y P53 e inhibir la angiogénesis. Se ha demostrado que marcando el transcrito completo de E6-E7 con una sola secuencia de siRNA se silencia la expresión de los dos oncogenes (Dutta et al. 2010).

1.3 Vacunas profilácticas contra el HPV

Una vacuna profiláctica es aquella que previene la infección de algún microorganismo, induciendo inmunidad protectora al estar en contacto con una estructura antigénica del microorganismo. En el caso de las vacunas profilácticas contra HPV el objetivo es prevenir la infección primaria o persistente del HPV y, en consecuencia, prevenir las lesiones preinvasoras y el cáncer cervicouterino, esencialmente a través de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra epítopes de las proteínas de la cápside (L1 y L2) de los HPV (Berumen Campos and Valdespino Gómez 2006). Los inmunógenos para la producción de estas vacunas incluyen péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, VLP, VLP quiméricos y vectores virales que expresan L1 (Villa 2006).

Las vacunas contra el HPV16 y HPV18 son altamente efectivas en la prevención de las infecciones tipo específicas por HPV y las lesiones cervicouterinas relacionadas (Liu et al. 2010). Se ha identificado al HPV como la causa necesaria para el desarrollo de cáncer cervicouterino (Castellsagué 2008) mediante estudios en virología, moleculares, clínicos y epidemiológicos, con lo que actualmente se puede afirmar que el cáncer cervicouterino es el resultado final de una infección viral y la vacunación es una estrategia que se considera como la prevención primaria del cáncer y otras enfermedades causadas por HPV (Castellsagué 2008)

Los estudios epidemiológicos y clínicos que han incorporado técnicas de biología molecular altamente sensibles en las muestras biológicas apropiadas, detectan HPV oncogénicos o de alto riesgo en prácticamente el 100% de los casos de cáncer cervicouterino. Asimismo, el DNA viral es detectado en la mayoría (70-90%) de las lesiones precursoras o lesiones intraepiteliales de alto grado (CIN II-III) y, en una pequeña fracción (20-50%), en las lesiones de bajo grado (CIN I), finalmente en las lesiones citológicas de naturaleza desconocida la detección del HPV es cercano al 50%. Entre los casos de infección por HPV, la prevalencia acumulativa de 4 tipos (HPV16, 18, 45 y 31) se encuentran en aproximadamente el 80% de los casos. Sin embargo, esta información no es interesante para definir la composición antigénica tipo específica de las vacunas contra el HPV para la prevención del cáncer cervicouterino debido a las diferencias de distribución mundial de los diferentes tipos de HPV (Castellsagué 2008).

El desarrollo de las vacunas profilácticas, es una nueva opción para la prevención de HPV. Dos vacunas profilácticas de primera generación, Cervarix y Gardasil, ya se encuentran en una fase avanzada de implementación a nivel mundial, y ambas vacunas han demostrado ser seguras, inmunogénicas y eficaces para la prevención de lesiones neoplásicas cervicouterinas; la vacuna gardasil también previene la formación de verrugas vaginales, vulvares y genitales (Castellsagué 2008), las vacunas de segunda generación protegen contra el HPV16, 18 y 5 o 7 variedades de HPV carcinogénicos (Castle 2016), también existen la vacuna Gardasil 9, que es una vacuna nonavelente aprobada por la FDA (Printz 2015).

1.3.1 Vacuna Cervarix, Gardasil y Gardasil 9

Actualmente, han sido desarrolladas dos vacunas profilácticas de primera generación contra el HPV. Primeramente se dio a conocer el fármaco Gardasil™, también conocido como Silgard, y es una vacuna de VLP tetravalente actuando contra el HPV16, 18, 11 y 6. Otra vacuna profiláctica es Cervarix™, que es una vacuna bivalente de VLP para HPV16 y 18. Ambas vacunas consisten en VLP, su producción es por tecnología recombinante, no contienen ningún producto biológico vivo o DNA, por lo que no es infeccioso. Gardasil ha estado en uso desde el 2006 (Liu et al. 2014; McIntosh et al.

2003; Stanley 2007). Estas vacunas profilácticas protegen contra la infección persistente y la asociada con lesiones genitales de alto grado. Por otro lado, esta vacuna no es útil en mujeres que ya tuvieron infección con HPV de los tipos presentes en la vacuna (Welters 2008).

Las dos vacunas contra el HPV disponibles en la actualidad son prácticamente 100% efectivas para evitar el contagio de las dos cepas del HPV que causan la mayoría de los casos de cáncer de cuello de útero. Sin embargo, no son vacunas terapéuticas, puesto que no se pueden usar para tratar infecciones ya existentes y por lo tanto no reemplazan los programas de detección y tratamiento. Otra desventaja es el precio de la vacuna contra el HPV que se usa hoy en EE.UU. (360 dólares para el régimen necesario de tres dosis, lo que la convierte en la vacuna infantil más cara del mundo) tendría que bajar considerablemente para que los países de Latinoamérica y el Caribe puedan tener acceso a este producto. Al precio actual de 360 dólares, el coste de la vacunación contra el HPV durante sólo cinco años (cinco cohortes distintas de nacimiento de niñas de 12 años) alcanzaría los 4.7×10^6 dólares. Incluso si el precio disminuyera hasta los 50 dólares, o a 25, los costes seguirían siendo elevados: 6×10^6 dólares y 3×10^6 dólares, respectivamente (OMS 2008).

Existe también una vacuna nonavalente de segunda generación llamada Gardasil 9, la cual incluye las variedades de HPV en la vacuna gardasil, además de 5 variedades adicionales que son 31, 33, 45, 52, y 58, las cuales están involucradas en 20% de los casos de cáncer cervicouterino (Printz 2015)

2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma humano tiene un DNA de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases. Existen más de 160 genotipos de HPV conocidos, 60 de los cuales se han localizado infectando epitelio mucoso donde pueden causar tanto lesiones benignas (verrugas) como malignas (cáncer de cérvix y otros sitios). El HPV es altamente transmisible y es considerado la infección de transmisión sexual más común (Burk et al. 2013; Castellsagué 2008).

Actualmente se encuentra bien establecido y aceptado que el cáncer cervicouterino y sus lesiones precáncerosas aparecen de la infección persistente en el cérvix por genotipos de HPV de alto riesgo asociados a cáncer (von Knebel Doeberitz and Vinokurova 2009). Los más importantes de estos genotipos son el HPV16 y HPV18, los cuales se han encontrado en el 70% de los casos de cáncer cervicouterino invasivo con variaciones menores de este porcentaje entre los continentes, mientras que los HPV6 y 11 son los genotipos más comunes encontrados en la verrugas genitales (Castellsagué 2008; Meijer et al. 2009).

2.1 Tropismo del HPV

Estos virus presentan un tropismo característico (Tabla 1). Algunos son cutáneos y son aislados frecuentemente de verrugas cutáneas y plantares, en lesiones cutáneas en pacientes con epidermoplastia verruciforme, en lesiones cutáneas en pacientes inmunodeprimidos después de un trasplante y en algunos tumores epiteliales. Otro grupo de HPV son mucosos los cuales se han identificado en lesiones benignas y malignas en la región anogenital tanto en hombres como en mujeres. En algunas ocasiones, estos tipos virales son aislados en tejidos y lesiones de la cavidad oral, orofaringe, laringe y esófago. Un tercer grupo de HPV son aislados indiferentemente en tejidos y lesiones cutáneas y mucosas y su asociación con lesiones malignas se encuentra poco estudiado (Castellsagué 2008).

Tabla 1. Los tejidos que infecta el HPV depende del tipo de virus, en esta tabla se muestra algunos tipos de HPV que infectan epitelio, mucosas, y algunos que infectan epitelio y mucosas

Tropismo por Epitelio	1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 y 65
Tropismo por Mucosa	6, 11, 13, 44, 55, 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67, 18, 39, 45, 59, 68, 70, 26, 51, 69, 30, 53, 56, 66, 32, 42, 34, 64, 73, 54
Tropismo Por Epitelio y Mucosa	2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62 y 72

Tomado de referencia (Castellsagué 2008)

La expresión clínica más conocida de la infección viral son los condilomas o verrugas genitales, asociadas en aproximadamente el 90% de los casos de infecciones por el HPV 6 y 11 y, más raramente, con HPV 42 y 16. Estos genotipos virales pueden ser transmitidos de la madre al hijo en el momento del parto y puede causar papilomatosis de laringe, una complicación extraña pero con pronóstico reincidente y difícil de tratar. Las lesiones neoplásicas cervicouterinas (CIN), vulvar (VIN), vaginal (VaIN), de pene (PIN) y anal (AIN) están asociadas ocasionalmente con HPV benignos o de bajo riesgo tales como el HPV 6 y 11, pero más frecuentemente con los HPV de alto riesgo conocidos como oncogénicos o carcinogénicos como los HPV16, 18, 45 y 31. Más de 35 tipos de HPV han sido aislados de lesiones neoplásicas de la región anogenital (Castellsagué 2008).

2.2 Proteínas del HPV

El genoma del HPV es una molécula de DNA de doble cadena circular cerrada que tiene 8 kb (Ball 1998). El genoma del HPV de tipo 16, está dividido en región codificante que comprende ocho genes transcritos en un mRNA policistrónico y una región no codificante. La región no codificante o reguladora (LCR) contiene el sitio donde se inicia la replicación y transcripción del DNA viral, elementos reguladores de la transcripción como una región promotora (P97), una secuencia intensificadora que

controla la transcripción de los genes virales, y un sitio de unión para la proteína E2 (Ball 1998; López and Ancízar Aristizábal 2006).

La región codificante está dividida a su vez en dos regiones de expresión: temprana y tardía. Los primeros genes (*e1*, *e2*, *e4*, *e5*, *e6* y *e7*) están relacionados con la modulación de los procesos de transformación celular, replicación y transcripción viral. La región de expresión tardía contiene los genes *I1* y *I2* que codifican para las dos proteínas estructurales de la cápside (López and Ancízar Aristizábal 2006). E1 y E2 son proteínas reguladoras.

La proteína E1, se une en forma específica al sitio de origen de la replicación contenido en la región reguladora viral. Esta unión presenta baja afinidad, pero cuando se une la proteína E2 se incrementa la afinidad de E1 por el sitio de inicio de replicación. Las mutaciones del gen *e1* aumentan la transcripción viral y la capacidad de transformación e inmortalización de las células, por esta razón se ha asociado la participación de E1 con la supresión de la acción del promotor p97 sobre la expresión de los oncogenes *e6* y *e7* (Ball 1998). La proteína E1 es una 3' → 5' helicasa hexamérica dependiente de ATP, lo que la hace la única proteína del HPV con actividad enzimática (López Saavedra and Lizano Soberón 2006; Rivera Z et al. 2006).

La proteína E2, tiene extremos o dominios con diferentes funciones. El dominio carboxilo-terminal se une a la región iniciadora de la replicación en la región larga de control o LCR del DNA viral. El dominio amino terminal, representa el sitio que activa la transcripción del DNA viral, reclutando los factores celulares y estimulando la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para activar la maquinaria de transcripción viral. La proteína E2 en su total longitud, actúa como estimuladora de la replicación y transcripción del DNA viral (Ball 1998).

Los fragmentos de proteína E2 actúan como represores de la transcripción viral, compitiendo con la proteína E2 completa para su unión con la LCR, impidiendo la acción estimuladora de la transcripción del DNA viral. El predominio de esta función

represora explicaría por qué está reducida la expresión y replicación viral en los estratos inferiores de los epitelios (Ball 1998).

E2 forma un complejo proteico con E1. Para que esto se lleve a cabo es necesario que E2 sea fósforilada por una cinasa en los residuos de serina 298 y 301. Además, E2 reprime al promotor P97 (HPV16) o P105 (HPV18), ubicado cerca de la región promotora encargada de la transcripción de las proteínas E6 y E7, reduciendo de esta manera la síntesis de estas proteínas. También se ha demostrado que E2 activa directamente la síntesis de la proteína P53 lo que lleva a detener el ciclo celular en G1 y apoptosis (Rivera Z et al. 2006).

La proteína E4, produce un colapso de la red citoplasmática de filamentos de queratina, lo que permite que el virus sea transferido a otro sitio del tejido (Ball 1998).

La proteína E5, es abundante en la luz de los sacos de Golgi de las células infectadas. Esta localización es la misma de los receptores del factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento derivado de plaquetas. La oncoproteína E5 impide la regulación de estos receptores, ya que interfiere con su eliminación lisosomal. E5 proporciona un ambiente celular favorable para la replicación del DNA viral (Ball 1998). Las proteínas E5, E6 y E7 son conocidas como las proteínas oncogénicas del HPV16.

Las proteínas E6 y E7, bloquean la acción reguladora de proteínas supresoras de tumores que actúan durante la división celular. Los genes *e6* y *e7* se transcriben a partir de una región promotora p97 y p103 respectivamente. La proteína E1 y posiblemente la E2 pueden interactuar con estos lugares específicos del LCR y modular la actividad del promotor suprimiendo la expresión de los oncogenes *e6* y *e7* (Ball 1998).

E6 y E7 son consideradas proteínas clave en la oncogénesis de cuello uterino, también participan en la inmortalización de queratinocitos primarios y presentan actividad de inducción de tumores, tienen la capacidad de formar complejos estables con diferentes proteínas celulares y alteran total o parcialmente sus funciones normales (López and Ancízar Aristizábal 2006).

Las oncoproteínas se unen a proteínas reguladoras del ciclo celular, p53 y pRB, e interfieren en los puntos G1/S y G2/M, induciendo diferentes cambios como alteraciones cromosómicas (López and Ancízar Aristizábal 2006).

El dímero de proteína E1-E4 es el que más se expresa en epitelios infectados por HPV siendo aproximadamente el 30% del contenido proteico celular, se sintetiza como proteína mixta, formada por regiones génicas E1 y E4. Forma complejos hexaméricos, capaces de unirse a la red de citoqueratina de la célula, a través de su región N-terminal produciendo su desestabilización. También produce alteración en el potencial de membrana mitocondrial. La región C-terminal puede unirse a la proteína del gen DEAD-box, alterando su función de tipo helicasa, ATPasa en la modificación de RNA y estabilización de ribosomas. Su región intermedia que son los aminoácidos 17 a 45 detiene el ciclo celular en G2, a través de la unión a ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas y por bloqueo de E7. Por estos mecanismos, la célula pierde soporte estructural por la alteración del citoesqueleto, produciendo daño mitocondrial y del metabolismo energético, además de apoptosis. Es posible que durante esta etapa de amplificación del genoma viral, la inhibición de las oncoproteínas E6 y E7, el daño al citoesqueleto, el trastorno energético mitocondrial y la apoptosis permitirían una mayor diseminación de la progenie viral, siempre que las proteínas de la cápside viral (L1 y L2) hayan sido sintetizadas, formando con el DNA viral nuevos viriones infectantes (Rivera Z et al. 2006).

Un evento central para la transformación de las células infectadas es la integración del genoma viral al de la célula huésped. Durante este proceso se altera el ORF e2, perdiéndose el efecto inhibitorio sobre el promotor P97 o P105, que mantenía bloqueada la expresión de las proteínas E6 y E7, las que son ahora sintetizadas sin restricción por medio de factores de transcripción (Rivera Z et al. 2006).

2.3 La proteína L1

Los genes tardíos codifican para la proteína L1 y L2 que son los péptidos que conforman la cápside viral (Figura 1). La proteína L1 es la principal proteína estructural de la cápside del HPV, es el principal antígeno para el desarrollo de vacunas

profilácticas. L1 puede autoensamblarse en partículas semejantes a virus (VLP), los cuales son altamente inmunogénicos (Benítez-Bribiesca 2006; Consuegra Mayor et al. 2004). La proteína L2 es importante para el ensamblaje del virus infeccioso (Carter et al. 2003).

La proteína L1 es el componente principal de la cápside del HPV16 y está compuesta por 505 aminoácidos. Algunos aminoácidos importantes son las cisteínas C175, C185, y C428, porque son requeridas para el ensamblaje normal de las cápsides de L1 a través de trimerización y dimerización por enlaces disulfuro en los capsómeros entre cisteínas, y C161, C229, y C379, porque son probablemente necesarios para la integridad de la cápside (Ishii et al. 2003).

La proteína L1 se autoensambla en cápsides vacías (Figura 1) conocidas como partículas semejantes a virus (VLP) cuando se expresan en células de mamíferos, células de insectos, levaduras o bacterias. Estos VLP tienen características idénticas a las que presenta el virus infeccioso completo, observado tanto por microscopia electrónica como por ensayos inmunológicos (Carter et al. 2003; Moniz et al. 2003). El VLP está compuesto de 72 pentámeros de L1, llamados capsómeros. Sesenta de estas subunidades capsómeros están en posición hexavalente, interactuando con seis capsómeros vecinos, con los 12 capsómeros restantes en posición pentavalente.

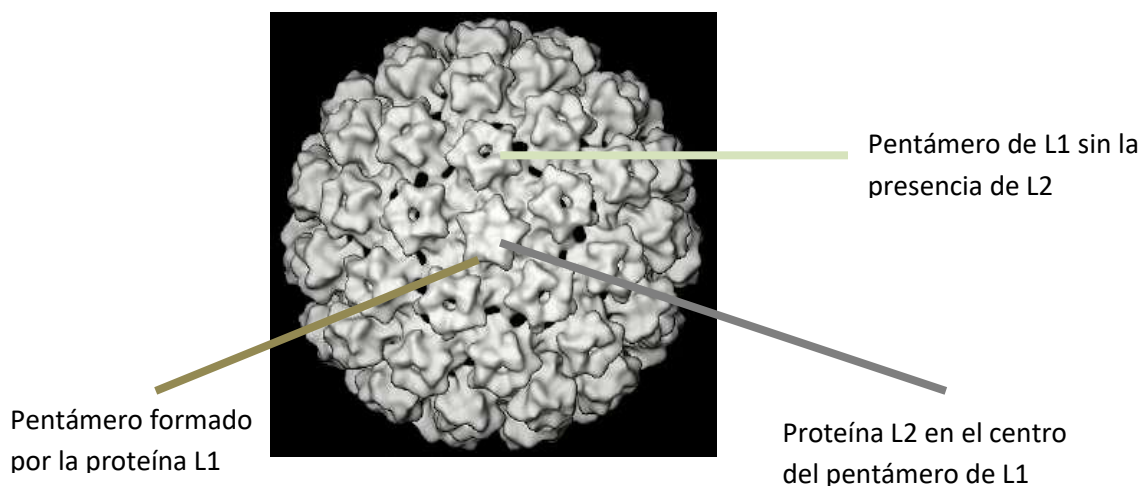


Figura 1 Esquema tridimensional de un VLP constituido por L1 y L2. Modificada de Moniz (2003)

La inyección parenteral de estos VLP, induce títulos altos de anticuerpos neutralizantes en sueros y protección en inducción experimental de la infección con virus activos en varios modelos animales para HPV, los VLP no presenta genoma, por lo que no hay riesgo de infección o desarrollo de cáncer. Protección de infección experimental por el virus del papiloma del conejo cola de algodón (CRPV) o virus del papiloma oral canino (COPV) siguiendo de una transferencia pasiva de IgG de animales inmunizados a animales no sometidos previamente a experimentación ha sido demostrado en conejos y perros respectivamente (Moniz et al. 2003).

Los VLP formados por la proteína L1 del HPV presentan epítopes lineales y conformacionales, la conformación del epítope es responsable para la actividad de los anticuerpos neutralizantes. La identificación de tales epítopes ha sido realizada principalmente por medición de la reactividad de los anticuerpos monoclonales (mAbs) a los VLP tanto después de mutagénesis sitio-dirigida de L1 como después de la inserción de péptidos externos con los diferentes loops hipervariables de la proteína L1.

Estudios de unión de mAbs con VLP sugieren que la conformación de la superficie del loop (Figura 2) tiene un papel importante en determinar el tipo específico de mAbs neutralizante para diferentes tipos de HPV (Bishop et al. 2007).

2.3.1 Monómero L1

En núcleo de la proteína L1 está compuesto de los aminoácidos 20-382 y tiene la apariencia de una estructura β -barril con 8 cadenas antiparalelas, en dos hojas distintas compuestas por las cadenas CHEF y BIDG, esta organización es similar a la encontrada en las estructuras del virus polio (Figura 2), y se asemejan a los plegamientos de las proteínas de la cápside de los picornavirus como el rinovirus y el virus de la polio.

Dentro de este núcleo se localizan tres dominios loop (HI, DE y FG) sobre la superficie exterior del pentámero y la partícula ensamblada. La región C-terminal del núcleo está compuesta de los residuos 383-457 que se plegan en α -hélice y largas estructuras enrolladas que forman las proyecciones laterales desde el núcleo, formando el centro del pentámero. Los 30 residuos restantes de la región C-terminal (476-505) están

desordenados y probablemente se extienden hacia el espacio interior del pentámero o la partícula donde los residuos básicos de esta región pueden interactuar con el DNA viral.

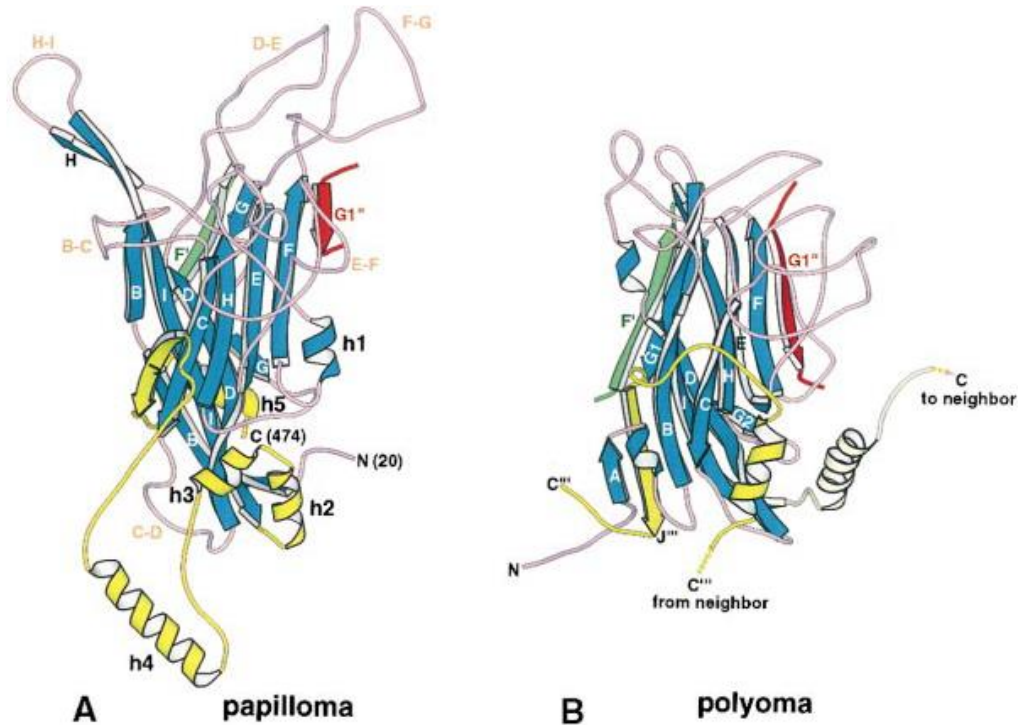


Figura 2 Monómero de L1 de papilomavirus (A) y de polioma (B). Tomada de (Chen et al. 2000)

Deleciones en la región C-terminal de hasta 30 residuos, así como también la fusión de secuencias adicionales a la región C-terminal aún permite la formación de pentámeros y con eso se da soporte al modelo de que este tramo de residuos en la misma región C-terminal es orientado y plegado independientemente. Los contactos entre el monómero L1 con el pentámero es extenso. Por ejemplo, la cadena G de la hoja BIDG de un monómero interactúa con la hoja CHEF de su vecino. Los loops de superficie también se entrelazan, con el loop HI de un monómero insertándose entre los loops FG y EF del vecino de la izquierda. La fusión de GST en la región amino terminal no afecta la estructura, nuevamente enfatizando el plegamiento robusto del monómero L1 y la oligomerización a la formación de pentámeros (Garcea and Chen 2007).

2.3.2 Enlaces disulfuro

La formación de enlaces disulfuro es crítica para el ensamblaje estable de la cápside del virus del papiloma. L1 forma viriones de HPV aislados de lesiones de la piel (Doorbar and Gallimore 1987). Sapp (Sapp et al. 1995) demostró que el ditioneitol (DTT) puede desensamblar los VLP en capsómeros. Sin embargo, (Li et al. 1998) trató viriones purificados de BPV con DTT y no los desensambló pero observó un cambio conformacional lo que resultó en la expansión de la cápside en aproximadamente un 10% del diámetro. Esta expansión permitió la entrada de proteasas y nucleasas lo que llevó a la destrucción del virión. El ensamblaje de pentámeros *In vitro* a partir de pentámeros de HPV11 se promueve por la oxidación de residuos de cisteína, iniciado por diálisis con un buffer con DTT que estabiliza los pentámeros (Li et al. 1998). Existen estudios que demuestran que la proteína L1 se puede ensamblar en partículas en un medio con alta salinidad y bajo pH en presencia de DTT (Chen et al. 2001) lo cual sugiere que el ensamblaje de L1 en cápsides vacías no depende de enlaces disulfuro, como en el caso del ensamblaje del virión (Garcea and Chen 2007).

Los residuos de cisteína específicos para los enlaces disulfuro son Cys 424 (HPV11) Cys 427 (HPV33) y Cys 176 (HPV33) (Li et al. 1998; Sapp et al. 1998). En VLP cerca del 50% de las moléculas L1 son unidas en trímeros con enlaces disulfuro (Sapp et al. 1998) en los viriones en cambio, las uniones de L1 son casi completamente enlaces disulfuro. Existen diferencias entre serotipos, se ha observado que L1 de HPV16 puede dimerizar y trimerizar y BPV puede tener más enlaces entrecruzados. La adición de DNA celular a un VLP recombinante en el caso de HPV33 incrementa la formación de enlaces disulfuro entrecruzados a un 100%, lo cual indica que el ácido nucleico en el virión probablemente induce la formación de la cápside que es estructuralmente distinta al VLP (Fligge et al. 2001; Garcea and Chen 2007)

2.3.3 Interacción pentámero-pentámero

Todos los contactos entre las proteínas L1 que forman un pentámero son idénticos. Estos enlaces se llevan a cabo por interacciones hélice-hélice entre las proyecciones laterales C-terminal (Figura 3).

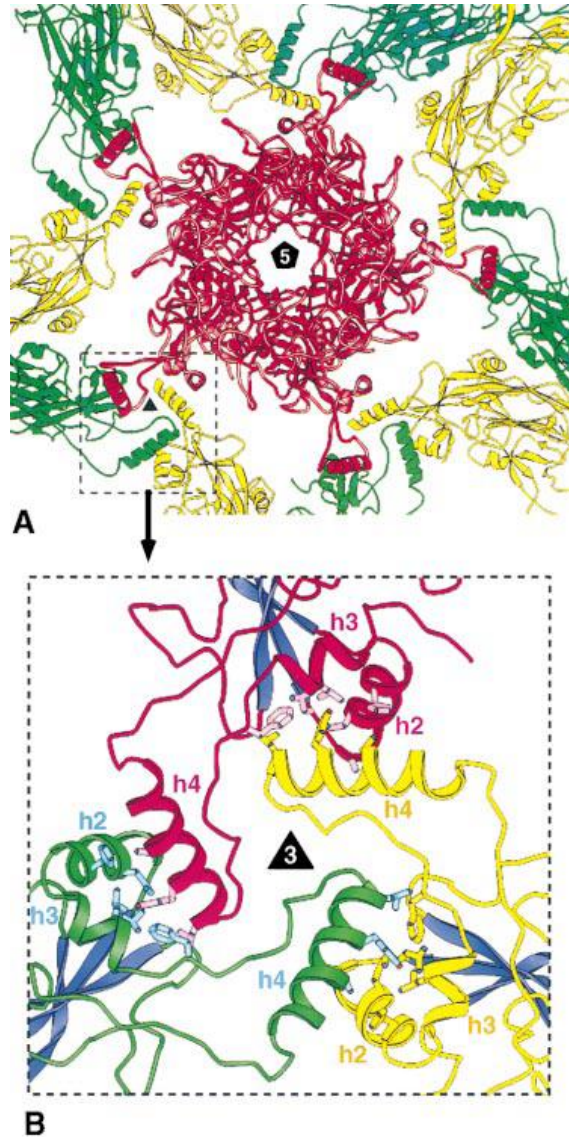


Figura 3. Interacción entre pentámeros de L1, las proyecciones laterales formadas por hélices alfa interactúan con otras hélices alfa de dos pentámeros vecinos para formar los VLP. Tomada de (Chen et al. 2000).

Las 4 hélices de cada pentámero se proyectan hacia afuera para interactuar con 2 y 3 hélices de un pentámero vecino, mediante fuertes interacciones hidrofóbicas.

El resto de la cadena de C-terminal después del residuo 474 regresa a L1 de donde este provino. De esta forma los contactos estructurales aparecen como tres hélices proyectándose desde cada L1 en un pentámero y con las proyecciones de las hélices de los pentámeros vecinos forman tres ejes simétricos. Los enlaces disulfuro entre los pentámeros son importantes para el completo ensamblaje o desensamblaje. A diferencia de los virus polio, el calcio no es utilizado para estabilizar el virión de papiloma. Los enlaces disulfuro no son completamente oxidados hasta la lisis celular. Por otro lado, a la entrada del virus en la célula, los enlaces disulfuro deben reducirse, permitiendo el ataque proteolítico al virión u otro mecanismo que pueda facilitar el desensamblaje (Garcea and Chen 2007).

2.3.4 Vueltas (Loops) de superficie y epítopes

El alineamiento de secuencias de L1 de 49 diferentes serotipos de HPV revela que las regiones hipervariables se encuentran en la cara externa del pentámero (Chen et al. 2000). Esta hipervariabilidad probablemente representa evolución de serotipos inmunológicamente dirigida, y tal vez algún componente para la adaptación específica a tejidos. Se han descrito dos mecanismos de neutralización mediada por anticuerpos para los virus de papiloma: inhibición estérica de la unión a la célula e inhibición de la descapsidación. Epítopes identificados por medio de neutralización con anticuerpos monoclonales para HPV16 (V5, E70) y HPV11 (B2, F1, G5) pueden ser mapeados directamente en la superficie de los dominios de las vueltas de superficie (Loops) sobre un capsómero (Chen et al. 2000). Variantes con cambios mínimos en las secuencias dentro de un mismo serotipo, que aún no resulta en un nuevo serotipo distinto, también puede ser mapeado en la superficie del dominio del loop (Chen et al. 2000). De esta forma, la mayor parte de los sitios de reconocimiento de anticuerpos hacia el virus del papiloma (excepto una clase distinta dirigida contra la proteína L2) pueden ser organizados con base a estructuras y secuencias de las vueltas de superficie de capsómeros de L1. Existen epítopes para neutralización, contenidos dentro de las

estructuras del pentámero, lo cual es consistente con la observación que los capsómeros no ensamblados pueden inducir anticuerpos neutralizantes y protegen contra la infección del virus del papiloma en modelos animales (Rose et al. 1998; Yuan et al. 2001). La superficie de los loops también genera estructuras como bolsillos o cañones sobre la superficie del capsómero que pueden ser utilizados como receptores a sitios de unión. Estructuras similares a cañón son usadas de esta forma por virus polioma (Stehle and Harrison 1996; Stehle et al. 1994).

2.3.5 Autoensamblaje de L1

Tanto VP1 y L1 tienen la propiedad de autoensamblarse *In vitro* (Chen et al. 2000; Li et al. 1997; Salunke et al. 1986). Cuando se expresan de forma recombinante en bacterias, tanto L1 como VP1 son purificadas como capsómeros pentaméricos. Estos capsómeros purificados pueden ensamblarse *In vitro* mediante la adición de calcio o una alta fuerza iónica (VP1) o la oxidación de enlaces disulfuro (L1). La estructura del ensamblaje final depende de otras condiciones de buffer tales como el pH, pero en buffers fisiológicos tanto de pH como de fuerza iónica, se pueden obtener las cápsides semejantes a la del virus (Salunke et al. 1989). También es posible obtener ensamblajes que forman estructuras menos complejas (una cápside con 12 pentámeros) con pH 5 y una alta fuerza iónica (Chen et al. 2000). Las características de autoensamblaje *In vitro* han sido utilizadas como un ensayo para investigar la contribución de las secuencias y residuos en la formación de la cápside. Por ejemplo, con la eliminación del dominio carboxilo terminal (63 residuos de VP1) se forman capsómeros incapaces de ensamblarse (Garcea et al. 1987), de esta forma se demostró la función esencial de esta región en los enlaces entre los capsómeros. En L1, la mutación de residuos específicos de cisteína suprime el ensamblaje *In vitro*, y de esta manera se demostró su importancia (Li et al. 1997). Las propiedades específicas de autoensamblaje de los pentámeros de L1 y VP1 también sugieren un evento de nucleación común y robusto para el ensamblaje. El capsómero pentavalente tiene los contactos de unión más extensos con los pentámeros vecinos, lo cual puede sugerir que el pentámero puede ser el favorable punto de nucleación para la adición de más capsómeros el núcleo con “cinco alrededor de uno” (Stehle and Harrison 1996). La

siguiente adición de pentámeros podría ser entonces colocada en posiciones hexavalente o pentavalente mediante requerimientos de enlaces locales (Berger et al. 1994), para la minimización de energía requerida. Para probar esta hipótesis, Casini, 2004 llevó a cabo el ensamblaje *In vitro* de pentámeros de L1 recombinantes mediante formación del enlace disulfuro por oxidación, y seguido de una ligera dispersión para determinar el tamaño y cinética de formación del producto (Casini et al. 2004). Los pentámeros se ensamblan en estructuras semejantes a cápsides en función de la concentración de proteína. Sin embargo, el ensamblaje fue de segundo orden con un tamaño de nucleación de dos pentámeros. Aunque se ha aislado de las condiciones *In vivo*, donde las chaperonas y la encapsidación del ácido nucleico viral puede influir en gran medida en el ensamblaje de la cápside, parece ser que el autoensamblaje de capsómeros *In vitro* no puede ser explicado por un núcleo con cinco alrededor de uno (Garcea and Chen 2007).

La expresión recombinante de L1 y VP1 en células eucariotas (levaduras, células de insecto sf9) conducen el autoensamblaje de la cápside dentro de las células (Hagensee et al. 1993; Neeper et al. 1996; Rose et al. 1993). Las estructuras ensambladas o partículas semejantes a virus (VLP) son formadas solo en el compartimiento nuclear, lo cual sugiere una regulación fundamental del sitio de ensamblaje de la cápside (Maclean et al. 2007; Montross et al. 1991). El ensamblaje del DNA viral ocurre en el núcleo donde se replica el genoma, y por lo tanto el ensamblaje de la cápside debería solo ocurrir en este compartimiento. Al contrario del ensamblaje *In vitro* formado con proteínas purificadas, estos VLP son muy uniformes en tamaño, y mediante microscopía electrónica aparecen como auténticos viriones. Los VLP intactos pueden ser purificados de estos sistemas de expresión para su uso como reactivos de vacunas. Para la regulación del ensamblaje *In vivo* en la infección del virus polio en células de ratón en cultivos de tejidos, la proteína VP1 se asocia con proteínas chaperonas celulares hsc70 por 30-60 min después de la traducción, aproximadamente el tiempo requerido para la importación nuclear (Cripe et al. 1995). En sistemas de expresión recombinante (*E. coli*, baculovirus-células de insecto) VP1 es purificada asociada con DnaK o algún otro homólogo de hsc70 (Cripe et al. 1995). Ensamblaje de VP1 mediado

por chaperonas y dependiente de energía ha sido realizado *In vitro* bajo condiciones diferentes de ensamblaje, utilizando componentes de proteína purificada (Chromy et al. 2003). Esta reacción produce ensamblajes más uniformes y más similares a la cápside del virus comparadas con el ensamblaje con solo adición de calcio. Sin embargo, por la falta de un sistema de cultivo celular *In vitro* se desconoce la chaperona acompañante de L1. Posiblemente una reacción análoga puede ser postulada para L1 como por VP1, y L1 se puede ensamblar *In vitro* por chaperonas hsc70. Sin embargo, L2 aparece directamente asociada con hsc70 en queratinocitos y en células cultivadas (Florin et al. 2004). Esta asociación causa una relocalización de hsc70 al dominio nuclear POD (agregados proteicos nucleares) donde puede ocurrir el ensamblaje del virión. El ensamblaje del virión desplaza hsc70 de L2. De esta forma, L2 mas que L1 puede funcionar como un cofactor de chaperona en el ensamblaje del papiloma al contrario de VP1 de los virus polioma (Garcea and Chen 2007).

2.3.6 Importancia de L1 en la captación del HPV por las células

La proteína L1 tiene carga negativa entre los HPV con tropismo cutáneo de los géneros papilomavirus (PV) beta y gama, mientras que los HPV alfa tienen carga positiva a un pH de 7.4. La secuencia lineal de la proteína de la cápside L1 del HPV5 tiene un punto isoeléctrico (pI) de 6.59 y una carga de -2.74 a un pH de 7.4, mientras que el HPV16 tiene un pI de 7.95 con una carga de +2.98. Esta información es importante porque con este parámetro podemos saber que mientras el HPV16 puede interaccionar con la heparina con una carga altamente negativa, algunos otros virus del papiloma como el HPV5 no interaccionan, por lo que los compuestos como el heparán sulfato pueden servir como receptores celulares para el HPV16 pero no para el HPV5. Se ha estudiado *In vitro* la captación de HPV5 (beta) y HPV16 (alfa) mediante el uso de ensayos de pseudoviriones (PsV). La captación de PsV de HPV5 no se inhibe con heparina en células C33A y solo se detecta una inhibición menor en células HaCaT. La captación de PsV de HPV16 es significativamente más inhibida por heparina en células HaCaT y completamente bloqueada en células C33A (Mistry et al. 2008).

La infección eficiente de las células por HPV y pseudoviriones requieren de la interacción con proteoglicanos de la superficie de la célula con preferencia aparente de especies que tienen heparán sulfato (HS) en sus cadenas laterales. Para identificar las interacciones virus/célula, se han realizado análisis de mutaciones puntuales de la proteína L1 del HPV16 teniendo como blanco residuos de aminoácidos expuestos en la superficie. Reemplazos de residuos de lisina 278, 356 o 361 por alanina reducen la unión a la célula y la infectividad de pseudoviriones. Varias combinaciones de estos cambios de aminoácidos también disminuyen la adhesión e infectividad, con una infectividad residual de menos del 5% para la triple mutación, lo cual sugiere que estos residuos de lisina cooperan en la unión con el HS. Cambios único, doble o triple no disminuyen la infectividad, lo cual demuestra que la interacción es dependiente de la distribución de la carga más que la especificidad de la secuencia. Los residuos de lisina se encuentran localizados dentro de un estructura bolsillo de la superficie del capsómero, el cual ha sido propuesto anteriormente como el receptor relacionado con el sitio de unión (Knappe et al. 2007).

3 PLANTAS COMO BIORREACTORES

Las plantas se han convertido en un modelo atractivo para la expresión de proteínas. Se espera que las plantas como biorreactores produzcan más de 20 kg de proteína terapéutica por hectárea en cultivos de tabaco, maíz, soya y alfalfa. Comparado con el uso convencional de biorreactores y células de mamífero o microorganismos, el costo de producción de una proteína bajo las condiciones de buenas prácticas de manufacturación se reduce en aproximadamente una décima parte. Varias investigaciones han demostrado que las plantas pueden funcionar como un biorreactor sencillo y económico para la producción a gran escala de proteínas recombinantes (Larrick and Thomas 2001; Maclean et al. 2007). Las plantas transgénicas genéticamente manipuladas tienen algunas ventajas como fuentes de producción de proteínas comparadas con tejidos/fluidos provenientes de animales o humanos, microorganismos recombinantes, líneas celulares de animales transfectados o animales transgénicos. Primeramente, el costo de producción de material crudo en una escala agrícola es bajo y en algunos casos, existe la posibilidad de utilizar directamente el material vegetal comestible. Por otro lado, el uso de plantas ofrece reducción de los costos de capitalización en relación con los métodos de fermentación. También, los niveles de producción pueden ser rápidamente escalados. Contrario a las bacterias, las plantas pueden producir proteínas multiméricas, tales como anticuerpos, con su correcto ensamblaje (Larrick and Thomas 2001; Maclean et al. 2007). Las proteínas de las plantas se han considerado como seguras, porque las plantas no actúan como hospederos de los patógenos humanos como algunos virus o priones. Dependiendo del promotor utilizado, las proteínas transgénicas pueden ser acumuladas en diferentes partes específicas (por ejemplo, las semillas) o en organelos específicos de la célula vegetal (como en cloroplastos). Se han producido y acumulado proteínas transgénicas en semillas de maíz, soya, tabaco o cebada. Las proteínas producidas en semillas presentan una gran estabilidad, por ejemplo, las enzimas y anticuerpos expresados en semillas y almacenados por más de tres años en refrigeración retienen su completa actividad enzimática o de unión. Actualmente, se han reportado el uso exitoso de plantas tropicales, tales como yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y plátano. Con esto se

abre la posibilidad de entregar vacunas orales y fármacos recombinantes directamente a consumidores de países menos desarrollados. Se han logrado grandes avances en la expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos (Larrick and Thomas 2001; Maclean et al. 2007). Se ha utilizado recombinación homóloga para la introducción de genes foráneos en regiones entre los genes funcionales de los cloroplastos. Con esto se evitan los efectos de posición de la transformación nuclear, y el silenciamiento génico no es un problema (Larrick and Thomas 2001). (Staub et al. 2000), demostraron que los cloroplastos de plantas de tabaco pueden procesar y completamente ensamblar la somatotropina humana con su enlace disulfuro con un rendimiento del 7% de la proteína total soluble (TSP) y una forma oligomérica de la toxina B del cólera con rendimientos del 4-5% TSP. Daniell et al., (2001), expresaron hasta 10,000 copias de genes foráneos (por célula en cloroplastos de tabaco, lo cual resultó en una acumulación de la proteína foránea en hoja hasta del 4.1% de la TSP. En otro estudio, la expresión de los genes del operón de cry2Aa2 de *Bacillus thuringiensis* en cloroplastos de tabaco resultó en la acumulación de la proteína foránea en hoja hasta en un 47% de la TSP (De Cosa et al. 2001). Así mismo, Maclean et al, (2007), reportó que la expresión de un gen optimizado y dirigido para su expresión en cloroplastos de plantas de tabaco produjo acumuló la proteína L1 del HPV16 con un rendimiento de 11% de la TSP.

3.1 Las plantas como productoras de proteínas terapéuticas

Las proteínas recombinantes producidas en plantas más estudiadas han sido los anticuerpos monoclonales para la inmunoterapia pasiva, y antígenos para el uso de vacunas orales. Aunque también se han producido una gran cantidad de proteínas importantes en plantas transgénicas, un número limitado de estos productos terapéuticos se encuentran en las clínicas. Algunos productos que se encuentran en ensayos clínicos son anticuerpos, vacunas orales y una lipasa pancreática. El producto que se encuentra en fases más avanzadas es un anti-*Streptococcus mutans* IgA secretora (SIgA) que es un planticuerpo que se encuentra en ensayos clínicos de fase II para la prevención de caries dental. Hasta el momento, las plantas ofrecen la única alternativa de producción a gran escala, como un sistema comercialmente viable para

la producción de esta forma única de anticuerpo. SIgA es la clase de anticuerpo más abundante producida por el cuerpo (más del 60% del total de inmunoglobulinas) y es secretada a la superficie de la mucosa para conferir protección local contra toxinas y patógenos. SIgA está formada por cuatro cadenas proteicas diferentes: cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras que forman la región hipervariable de unión a antígeno; la cadena J que dimeriza dos moléculas de IgA (SIgA tiene cuatro sitios de unión a antígeno); y el componente secretor que es derivado del receptor de polioinmunoglobulinas de las células del epitelio mucoso. Anteriormente, no era posible obtener cantidades suficientes para esta clase de inmunoglobulinas. Los estudios clínicos iniciales demostraron que la aplicación tópica del planticuerpo anti-*S. mutans* SIgA es segura (no produce respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón ni toxicidad local o sistémica) y previene la colonización de *S. mutans*, el principal causante de la caries dental humana. En los ensayos clínicos de fase I/II, el análisis inicial de los datos indica que el planticuerpo reduce significativamente los niveles de *S. mutans*. Más ensayos confirmatorios han sido diseñados para optimizar el régimen de tratamiento. Con esta disponibilidad de grandes cantidades de planticuerpos SIgA se tienen nuevas oportunidades terapéuticas para tratar problemas del sistema inmune asociado a mucosas. Dentro de esto se incluye terapias para patógenos intestinales tales como el virus de hepatitis, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* enterotoxigénica y cólera, patógenos respiratorios (como rinovirus e influenza), y enfermedades de transmisión sexual genitourinarias (por ejemplo, el virus del herpes simple). Otros planticuerpos usualmente de la clase IgG, se encuentran en desarrollo (Larrick and Thomas 2001). Avidina bioactiva y β -glucuronidasa son las primeras proteínas recombinantes derivadas de plantas que se producen comercialmente (desarrolladas por Prodigene Inc., College Station, Texas) y comprado por Sigma Chemical company. Otras dos proteínas requeridas en grandes cantidades son lactoferrina por su uso nutracéutico y colágeno por su uso cosmeceútico, fueron recientemente producidas en plantas transgénicas. La hirudina, un anticoagulante, ha sido producido por SemBioSys Genetics Inc. utilizando tecnología de fusión a oleosinas, lo cual permite la extracción utilizando cuerpos oleosos de canola (Larrick and Thomas 2001).

Las vacunas comestibles producidas en plantas transgénicas tienen el potencial de revolucionar la vacunación, principalmente en los países menos desarrollados. Numerosas vacunas proteicas han sido producidas en plantas y han demostrado ser tanto inmunogénicas como protectoras contra retos de patógenos. Las primeras pruebas en humanos han sido reportadas de vacunas orales producidas en plantas contra bacterias y virus. Con esto se ha demostrado una modesta inducción de niveles de anticuerpos protectores en suero y heces. También se han preparado vacunas en plantas del virus respiratorio sincitial, parvovirus canino, sarampión, virus de la gastroenteritis transmisible, y la vacuna mejorada del virus de hepatitis B. Wigdorovitz *et al* (Wigdorovitz *et al.* 1999) obtuvieron alfalfa transgénica que expresa la proteína estructural VP1 del virus de la enfermedad de las pezuñas (*Apthae epizooticae*). Ratones, inmunizados de forma parenteral utilizando extractos de hojas o alimentados con hojas frescas cosechadas de plantas transgénicas, desarrollaron una respuesta inmune protectora específica de virus. Estos estudios demuestran la posibilidad de utilizar esta tecnología para los países en desarrollo, donde las vacunas se necesitan con urgencia (Larrick and Thomas 2001).

3.2 *Brassica oleracea var. italica* (Brócoli) como modelo de expresión.

El modelo vegetal *Brassica* como sistema de expresión presenta varias características que lo hacen adecuado para utilizarse en la obtención de VLP a partir de raíces de esta planta, entre estas características podemos mencionar las siguientes:

Los miembros de la familia *Brassica* son encontrados en temperaturas de climas de todo el mundo, predominantemente en el hemisferio norte. El hombre les ha dado muchos usos como alimento, especies aromáticas y medicinales, extracción de aceites, como plantas decorativas y como fertilizantes biológicos (Navrátilová 2004).

El género *Brassica*, como brócoli y coliflor, contienen cantidades sustanciales de isotiocianatos (la mayoría en su forma de sus precursores glucosinolatos) algunos de

los cuales son muy potentes inductores de enzimas de fase 2, las cuales son de desintoxicación y protegen contra carcinogénesis, mutagénesis y otras formas de toxicidad como electrófilos y formas reactivas del oxígeno. Los glucosinolatos e isotiocianatos pueden ser extraídos eficientemente de las plantas. En los extractos de cultivos de brócoli se puede encontrar glucorafanina o sulforafanina como principales inductores de enzimas; estos extractos pueden reducir la incidencia, multiplicidad y porcentaje de desarrollo de tumores mamarios en ratas tratadas con dimetilbenz(a) antraceno (Fahey et al. 1997).

El sulforano del brócoli induce varias enzimas de fase 2 tanto en células como en tejido de ratón, bloquea el 7,12-dimetilbenz(a) antraceno (DMBA) inhibiendo la formación de tumores mamarios en ratas, e inhibiendo la formación de nódulos neoplásicos en cultivos de glándulas mamarias de ratón. El sulforafano de isotiocianato se ha aislado a partir de un liofilizado homogéneo acuoso de brócoli extraído con acetonitrilo y fue identificado como el principal y muy potente inductor de enzimas de fase 2 (Fahey et al. 1997).

Las características anticáncerígenas que presenta el brócoli, hacen a esta planta como una de las más adecuadas al ayudar a prevenir la carcinogénesis producida por el virus del papiloma humano, y la producción recombinante de proteínas del HPV ayudan al sistema inmune para inducir una respuesta adecuada contra este virus

3.3 Ventajas y desventajas de producción de vacunas por modelos vegetales

Aunque los sistemas de expresión como los baculovirus y las levaduras son sistemas de elección para la producción de VLP presentan la limitación de tener un alto costo de producción (Maclean et al. 2007). El uso de plantas para la producción a gran escala de proteínas heterólogas podría ser una alternativa al costo elevado que presentan otros sistemas para la producción de proteínas sobre una escala agrícola.

La producción de vacunas para humanos y animales en plantas, puede disminuir los costos de producción del material crudo muy significativamente, especialmente para las vacunas orales (Maclean et al. 2007).

Los cultivos de células bacterianas, levaduras y de mamífero requieren cuidados especiales lo que consume tiempo y dinero a diferencia de los modelos de expresión en plantas donde se necesitan condiciones agrícolas de bajo costo. Por otro lado en estas mismas condiciones las plantas tiene la desventaja de crecimiento lento a diferencia de los tiempos de duplicación de las células bacterianas y de levadura que necesitan solo minutos u horas para su duplicación (Pujol et al. 2007).

De las principales ventajas de los sistemas de expresión en plantas de proteínas farmacéuticas y veterinarias se pueden mencionar los bajos costos de cultivo, alta producción de biomasa, tiempo relativamente rápido de producción de proteína, bajo capital y costos de operación y excelente escalabilidad con relativamente alto rendimiento de proteína (Monroy-García et al. 2014; Pujol et al. 2007). Las plantas realizan modificaciones postraduccionales de proteínas de células eucariotas por lo que cuando se utiliza un modelo de clonación eucarionte la proteína que producen los vegetales es activa a diferencia de las proteínas que son producidas por los microorganismos que por lo general son insolubles y no funcionales necesitando otro proceso especial de modificación después de que se ha obtenido; por otro lado en los sistemas vegetales los riesgos de contaminación por patógenos humanos y endotoxinas es muy bajo (Pujol et al. 2007).

4 CULTIVOS DE RAICES TRANSFORMADAS

4.1 Inducción de raíces pilosas por *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes modifica genéticamente células de las plantas dicotiledóneas por infección y transferencia de un fragmento de DNA (T-DNA) contenido en un plásmido inductor de raíces (Ri) característico de esta especie bacteriana, transformando a las células infectadas en productoras de opinas, que le sirven de nutrientes, y promoviendo su diferenciación a tejido radicular. El plásmido (Ri) de *Agrobacterium rhizogenes* presenta varias similitudes al plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens*, incluyendo una organización muy parecida de los operones Vir. Una diferencia notable es la ausencia de virE1 y virE2 en el plásmido Ri y el resto del genoma en algunas cepas de *A. rhizogenes*. Las proteínas GALL codificadas por el plásmido Ri pueden remplazar virE1 y virE2 y los genes GALLS son esenciales para la virulencia de cepas de *A. rhizogenes* que carecen de virE1 y VirE2 (Hodges et al. 2004). Las raíces pilosas resultan de la transferencia e integración de los genes localizados en el T-DNA del plásmido Ri al genoma de la célula de la planta y de su expresión en el sitio de infección (Peláez et al. 2017; Zhou et al. 2007). Estas raíces son tejidos que pueden ser propagados ilimitadamente en medio de cultivo sintético, presentando un crecimiento rápido, estabilidad genética y bioquímica, y crecimiento en un medio libre de hormonas. Los cultivos de raíces pilosas han servido como un sistema modelo para el estudio del metabolismo y fisiología de la planta y por otro lado son una alternativa a los cultivos en suspensión de células vegetales para la producción de compuestos terapéuticos y químicos (Shanks and Morgan 1999). Los rendimientos específicos para varios productos naturales son más altos en cultivos de células vegetales y de raíces pilosas que en la planta completa. También se pueden generar nuevos compuestos por biotransformación y por la introducción de genes heterólogos en las raíces pilosas (Shanks and Morgan 1999). Los cultivos de raíces pilosas también sirven para regenerar a planta transgénica completa, aunque se ha observado en muchos casos que la regeneración no se logra.

Sin embargo, injertos de plántulas con raíces transgénicas pueden ser establecidas en condiciones de invernadero (Shanks and Morgan 1999).

Por otro lado se han realizado estudios en el ambiente extracelular empleándose como estrategia el empleo de auxinas (Vanhala et al. 1998) e inductores lo que ha resultado en incremento de los niveles de producción de metabolitos secundarios. El ácido jasmónico se ha utilizado en bioprocesos para incrementar la producción de metabolitos secundarios (Mukundan et al. 1998; Shanks and Morgan 1999).

Otro campo de aplicación del cultivo de raíces pilosas es la fitorremediación, en este tipo de tecnología las raíces de la planta tienen el papel central de remoción de contaminantes. Los cultivos de raíces pilosas han sido un sistema modelo para el estudio de los procesos de transformación y destino de los contaminantes sin la interferencia de microorganismos. Se han utilizado cultivos de raíces pilosas de plantas hiperacumuladoras para estudiar la captación de metales pesados, por ejemplo, la remoción de bifenilos policlorados de un medio de cultivo empleando raíces de *Solanum nigrum* (Shanks and Morgan 1999) o la hiperacumulación de cobre en raíces transformadas de tabaco (Pérez-Palacios et al. 2017).

4.2 Vector binario pCAMBIA

El vector pCAMBIA, es un vector binario que presenta las regiones conservadas de los bordes derecho e izquierdo para la transferencia del T-DNA provenientes de *Agrobacterium*. Este plásmido en este trabajo se obtuvo de la casa CAMBIA, actúa de manera conjunta con el plásmido silvestre de *Agrobacterium rhizogenes* el cual funciona tanto como vector de transfección así como plásmido vir-auxiliar para la transferencia del T-DNA de pCAMBIA a la planta. *A. rhizogenes* también contiene su propio T-DNA por lo que en las raíces transformadas se pueden encontrar líneas transformadas únicamente con el T-DNA de *A. rhizogenes* y transformadas con el T-DNA de pCAMBIA u otro plásmido binario introducido en la misma bacteria. El plásmido pCAMBIA es un vector de transfección que integra promotores virales fuertes que se pueden expresar en células vegetales, como los son los promotores 35S del virus del

mosaico de la coliflor (CMV), que incrementan la expresión del gen heterólogo (García 2009).

Por otro lado, el gen GUSplus contenida en este vector y que codifica para la enzima β -glucuronidasa es útil para evaluar la transformación de las plantas transformadas ya que permite discriminar entre plantas transformadas y no transformadas al encontrarse entre uno de sus productos de reacción al dicloro-dibromoindigo que es un compuesto altamente coloreado e insoluble y que confiere una coloración azul cuando hay actividad de β -glucuronidasa (García 2009; Jefferson 1987; Karcher 2002). Este gen que no se encuentra en el T-DNA de *A. rhizogenes* representa una forma de discriminar entre las raíces transformadas con el T-DNA de *A. rhizogenes* silvestre con el T-DNA de pCAMBIA. Por otro lado también hay en el plásmido pCAMBIA genes que permiten hacer selección de transformantes tanto en planta, con resistencia a higromicina (hptII), como en bacteria por la resistencia a estreptomycin (aadA1) o kanamicina (aphA1). También incluye secuencias para la replicación del plásmido en *E. coli* (pBR322 ori) y otras bacterias, en este caso *Agrobacterium* (pVS1-REP) (García 2009).

4.3 Escalamiento de los cultivos de raíces pilosas

En los cultivos de raíces pilosas, el aumento de biomasa se lleva a cabo debido a dos características de crecimiento, la formación de raíces laterales en diferentes segmentos de la raíz así como también la elongación de la raíz principal. Comparado con un cultivo de células en suspensión, el crecimiento de las raíces pilosas en medio líquido produce una masa de raíces compacta que resulta en inhibición de flujo de fluidos y se limita la disponibilidad de oxígeno (Bordonaro and Curtis 2000; Choi et al. 2006). Por esa razón, las características morfológicas de las raíces pilosas y el suministro de oxígeno son los factores más importantes para el diseño y optimización de las condiciones de cultivo de raíces pilosas. Para escalar el cultivo con éxito, se debe tomar en cuenta el tipo de reactor y evaluación del rendimiento del reactor para minimizar los problemas relacionados con el escalamiento. En el caso de los cultivos

en matraz Erlenmeyer, es difícil modificar el ambiente de cultivo con estos matraces y se utilizan solo para cultivos de pequeña escala debido a las limitaciones de aporte de aire. Un biorreactor equipado con fuente de aire, pH, temperatura, es utilizado principalmente para el cultivo de raíces pilosas a gran escala. Se han diseñado varias configuraciones de biorreactor para el cultivo de raíces pilosas tales como, tanque agitado, airlift, de burbujeo en columna, dispersor de líquidos (Choi et al. 2006).

4.3.1 Reactor de tanque agitado

Este tipo de biorreactor, regula la aireación y circulación del medio, empleando impulsores o turbinas; es ampliamente empleado para microorganismos, fermentaciones y cultivos de células vegetales. La temperatura, el pH, cantidad de oxígeno disuelto, y concentración de nutrientes pueden ser mejor controladas en este reactor más que en otro tipo de reactores. En general, los impulsores utilizados en estos reactores producen un efecto más alto comparado con los otros tipos. Para los cultivos de raíces pilosas, los impulsores deben ser operados con potencia inicial y velocidad restringida para minimizar el esfuerzo de corte. Se han desarrollado estrategias para mejorar el rendimiento de los impulsores por medio de la modificación de la geometría interna de los reactores. Se ha reportado que el cultivo de raíces pilosas de *Swertia chirata* en un biorreactor de tanque agitado de 2 L solo tiene éxito cuando se equipa con una malla de acero inoxidable dentro del recipiente de cultivo para la inmovilización de las raíces (Choi et al. 2006; Keil et al. 2000) y que en cultivos de raíces pilosas de *Panax ginseng*, el crecimiento de las raíces en un biorreactor de tanque agitado equipado con malla de acero inoxidable es tres veces más alto que un cultivo en matraz (Choi et al. 2006; Jeong et al. 2003).

4.3.2 Biorreactor airlift

En los biorreactores airlift, tanto la circulación del líquido como la aireación se derivan de un suministro externo de aire. Este reactor es ventajoso para el cultivo de células vegetales y órganos que son sensibles al esfuerzo de corte. Las raíces pilosas requieren de un porcentaje de aspersion de oxígeno bajo de 0.05-0.4 vol de aire/vol de líquido/min. Se circula aire húmedo a través de una red de vidrio que funciona como un

aireador. Esto es utilizado para el mezclado y la oxigenación. Aunque se han utilizado con éxito reactores airlift para diferentes cultivos de raíces pilosas, existen desventajas asociadas con este tipo de reactores. Dentro de estas se pueden mencionar las zonas muertas en el cultivo debido al mezclado insuficiente y la distribución de nutrientes no uniforme causado por la alta densidad de biomasa. Estas limitaciones pueden tener un impacto negativo sobre el crecimiento de las raíces pilosas, y por esa razón se requieren de modificaciones de diseño (Srivastava and Srivastava 2007). Por ejemplo, se han modificado biorreactores airlift adicionando mallas de acero a para el anclaje exitoso de raíces transformadas de *Brassica oleracea* var. *italica* (García López et al., 2013) y de *Trigonella foenum-graecum* (Peraza-Luna et al. 2001) como modelo para la producción de proteínas terapéuticas y de metabolitos secundarios respectivamente. También se han diseñado nuevos reactores airlift equipados para hacer más fácil la inoculación del tejido, distribución, y la cosecha durante los estudios de cinéticas de raíces pilosas de *Solanum chrysotrichum* (Caspeta et al. 2005; Srivastava and Srivastava 2007).

4.3.3 Reactor de columna de burbujeo

Como en los biorreactores airlift, en un reactor de columna de burbujeo las burbujas crean menos esfuerzo de corte, por eso resulta útil para el crecimiento de estructuras organizadas como las raíces pilosas (Kim et al. 2002; Srivastava and Srivastava 2007). En este caso, el porcentaje de burbujeo necesita incrementarse gradualmente con el crecimiento de las raíces pilosas. Además, la división de la columna de burbujeo, así como la instalación de múltiples aspersores incrementan la transferencia de masa. Se han realizado estudios de producción de metabolitos secundarios a partir de raíces pilosas en reactores de columna de burbujeo como (Buitelaar et al. 1991) que produjo tiofeno con raíces pilosas de *Tagetes patula*, (Sim and Chang 1993) propusieron un reactor de columna de burbujeo de dos fases para incrementar la producción de shikonina de raíces pilosas de *Lithospermum erythrorhizon*. (Suresh et al. 2004) estudiaron el incremento de la producción de betalaina por raíces pilosas de *Beta vulgaris* crecidas en un reactor de columna de burbujeo de 3 litros (Srivastava and Srivastava 2007).

4.3.4 Biorreactor de líquidos dispersados

Estos reactores utilizados para cultivos de raíces pilosas pueden ser clasificados tanto de fase líquida como de fase gaseosa. El reactor de líquidos dispersados es ventajoso por el suficiente suministro de oxígeno a las raíces y por un ambiente de bajo esfuerzo de corte comparado con los reactores en los cuales las raíces se encuentran sumergidas en el medio líquido (McKelvey et al. 1993). En el reactor de líquidos dispersados, las raíces están expuestas en un ambiente con aire, o mezcla de gases, y los nutrientes líquidos, los cuales están dispersados en forma de aerosol o niebla en la parte superior del lecho de raíces. El líquido pulverizado y en forma de niebla es drenado desde el fondo del biorreactor hacia un reservorio y es recirculado. El grado de distribución del líquido varía de acuerdo al mecanismo de liberación del líquido en la parte superior de la cámara del reactor. Se han desarrollado varios tipos de reactores de líquido dispersado para el cultivo de raíces pilosas como de niebla o nutrientes en niebla, con goteo, lecho de goteo o cinta de goteo, y goteo de tubo. En estos biorreactores, también se han configurado diferentes tipos de soporte interno para las raíces, tales como cuentas de vidrio, anillos, andamios de alambre de acero, espuma de poliuretano, bandeja de malla horizontal, y malla cilíndrica de acero inoxidable. Choi, Kim et al., encontraron que el crecimiento de raíces pilosas de *Cichorium intybus* en un biorreactor de niebla acústica producen cerca de dos veces más aesculina comparadas con las raíces que crecen en un reactor de columna de burbujeo y biorreactor con rociador de nutrientes. Las raíces pilosas de *Artemisia annua* creciendo en un reactor de niebla de nutrientes produce cerca de tres veces más artemisina que las raíces crecidas en un reactor de columna de burbujeo, sin embargo, la acumulación de biomasa es menor debido a la insuficiente disponibilidad de nutrientes (Choi et al. 2006).

5 MEDIO DE CULTIVO

Un medio de cultivo consiste en una solución que proveen de macro y micro elementos junto con vitaminas, aminoácidos y una fuente de energía, que usualmente es sacarosa, que en conjunto promueven el crecimiento y mantenimiento de un organismo, sus células tejidos u órganos (George et al. 2008e). Los cultivos vegetales para el crecimiento y desarrollo, generalmente, también dependen de la adición de reguladores de crecimiento al medio. Los reguladores de crecimiento vegetales son compuestos, los cuales, a concentraciones muy bajas, son capaces de modificar el crecimiento o la morfogénesis de la planta. Los reguladores de crecimiento frecuentemente necesitan ser alterados de acuerdo a la variedad de la planta, o a diferentes etapas de cultivo, mientras que el medio básico puede estar sin cambiar. Por lo que es preferible que los componentes nutricionales y de regulación sean tratados de forma separada (George et al. 2008e).

El material vegetal puede ser cultivado tanto en medio líquido como en un medio parcialmente solidificado con un agente gelificante. Dependiendo del tipo de cultivo y del objetivo. El medio semisólido, es utilizado para el establecimiento de cultivos de explantes; también se utilizan para el cultivo de callos u órganos de plantas, y para el mantenimiento de cultivos por largos periodos. El agar es el agente gelificante más común, aunque actualmente existen algunos otros compuestos gelificantes. En los cultivos que crecen en medio sólido, solo una superficie del explante, órgano o tejido se encuentra en contacto con el medio. Esto significa que a medida que avanza el crecimiento puede ser que existan gradientes de nutrientes, factores de crecimiento y productos de desecho del metabolismo, entre el medio y el tejido. El intercambio gaseoso en la base del órgano o tejido también puede estar restringida por el medio circundante (George et al. 2008e).

El medio líquido se utiliza esencialmente, para los cultivos en suspensión, y son preferidos para los experimentos críticos acerca de la nutrición, crecimiento y diferenciación celular. También son utilizados en algunos trabajos de micropopagación. Los órganos más pequeños frecuentemente flotan en la superficie del medio líquido y

las células vegetales o protoplastos pueden ser cultivadas en capas superficiales del medio líquido estático, tomando en cuenta que haya suficiente difusión gaseosa. Algunos órganos y tejidos, pequeños y grandes, también crecen bien sin soporte en medio líquido, cuidando que se encuentren con aireación mediante agitación o movimiento. La agitación es importante para evitar los agregados celulares en los cultivos en suspensión que se asientan en el fondo de los frascos. La agitación también es importante porque aumenta la aireación, reduce la polaridad de la planta, los nutrientes se distribuyen de manera homogénea y los exudados tóxicos de la planta se diluyen (George et al. 2008e).

5.1 Componentes inorgánicos del medio

Para un crecimiento saludable y vigoroso, las plantas necesitan tomar del suelo:

- Grandes cantidades de algunos elementos inorgánicos (También llamados macronutrientes para planta): sales de nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S) y,
- Pequeñas cantidades de otros elementos (microelementos o elementos traza): hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), y molibdeno (Mo)

Los elementos mencionados, junto con el carbón (C), oxígeno (O), e hidrógeno (H) son los 17 elementos esenciales. Algunos otros elementos como el cobalto (Co), aluminio (Al), sodio (Na) y el yodo (I), son esenciales o benéficos solo para algunas especies (George et al. 2008a).

El medio que más comúnmente se utiliza es la formulación de Murashige and Skoog (1962). Este medio se desarrolló para el crecimiento óptimo de callos de tabaco y para el desarrollo se tomaron en cuenta varias curvas de dosis-respuesta en la variación de los minerales esenciales. El principal problema cuando se cambia la composición de minerales de un medio es la precipitación, la cual ocurre frecuentemente después de la

esterilización por autoclave debido a la naturaleza endotérmica del proceso (George et al. 2008a).

El medio de cultivo para tejidos vegetales, no solo provee de estos nutrientes inorgánicos, si no que usualmente un carbohidrato (comúnmente la sacarosa) reemplaza el carbón que la planta normalmente fija de la atmosfera mediante la fotosíntesis. Para mejorar el crecimiento, algunos medios también incluyen cantidades traza de algunos compuestos orgánicos, especialmente vitaminas, y reguladores de crecimiento vegetal (George et al. 2008a).

5.2 Captación de los nutrientes inorgánicos

Las plantas absorben los nutrientes orgánicos que requieren del suelo casi completamente en forma iónica. Los nutrientes inorgánicos se incorporan al medio como sales. En soluciones acuosas débiles, como el medio de cultivo, las sales se disocian en cationes y aniones. El calcio, magnesio y potasio se absorben por la célula vegetal en sus formas de cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ ; el nitrógeno se absorbe en la forma de nitrato (NO_3^-) o en forma de amonio (NH_4^+), el fosforo como iones fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- ; y el azufre como el ion sulfato SO_4^{2-} . En los cultivos de tejidos, la captación es generalmente proporcional a la concentración del medio hasta una concentración de dos veces del MS (George et al. 2008a; Williams 1993).

En la planta completa, los nutrientes son tomados tanto por difusión pasiva como por transporte activo. La captación activa es menos dependiente de la concentración iónica a diferencia de la captación pasiva. Sin embargo, los dos sistemas están influenciados por la concentración de otros elementos, pH, temperatura, y el estado fisiológico o bioquímico del tejido vegetal. Estos factores pueden a su vez, ser controlados por las soluciones presentes en las raíces, o pueden dirigir el balance iónico para una solución ideal. Por ejemplo, el Mg^{2+} compite con otros cationes para su captación. Bajo condiciones de altas concentraciones de K^+ o Ca^{2+} , puede resultar en una deficiencia de Mg, y viceversa. La captación activa de fosfato disminuye si el pH de la solución se hace ligeramente alcalina cuando el $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$ se cambia a $(\text{HPO}_4)^{2-}$. El amonio es utilizado más fácilmente que el nitrato a bajas temperaturas y la captación puede ser

incrementada mediante la adición de altas concentraciones de carbohidratos dentro de la célula vegetal. El calcio no se absorbe de forma eficiente y las concentraciones dentro de los tejidos vegetales tienden a ser proporcionales con aquellos que se encuentran en el suelo. Las plantas son relativamente insensibles a la presencia de iones sulfato, pero altas concentraciones del sulfato disuelto pueden disminuir el crecimiento, probablemente a través de la reducción competitiva de la captación de microelementos Zn, Fe y Cu.

Cuando se colocan explante en un medio nutritivo, inician con una pérdida de iones en las células dañadas, especialmente cationes metálicos (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}) en los primeros 1-2 días, de esa forma disminuyen las concentraciones en los tejidos vegetales. Después las células inician una absorción activa y las concentraciones internas se incrementan lentamente. El fosfato y nitrógeno (principalmente amonio) se absorben más rápido que otros iones. En un medio líquido, casi todo el fósforo y el amonio es captado en las primeras dos semanas de cultivo.

5.3 Reguladores de crecimiento

5.3.1 Auxinas

Las auxinas en combinación con las citocininas promueven principalmente, el crecimiento de callos, suspensiones celulares y órganos, también regulan la dirección de la morfogénesis. A nivel celular las auxinas promueven la elongación y división celular. Gracias a esa capacidad de iniciar la división celular están involucradas en la formación de meristemas llevando a establecer un tejido no organizado, o a órganos definidos. En tejidos organizados, las auxinas están involucradas en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad y en la planta completa el efecto más notorio es el mantenimiento de la dominancia apical y mediación del tropismo (George et al. 2008b). Las auxinas y las citocininas son los compuestos más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis en tejidos de plantas y cultivos de órganos; se han descubierto reguladores sintéticos con una actividad biológica igual o mayor que los

equivalentes reguladores de crecimiento naturales. En cultivos de órganos para la formación de raíces se requiere un ajuste en los niveles de auxinas y citocininas, aunque también se ha logrado solo con el tratamiento de solo una auxina; se han desarrollado raíces laterales mediante la acción de auxinas, por ejemplo, en un estudio comparativo de auxinas sobre el crecimiento de raíces de *Panax ginseng* (Kim et al. 2003) encontraron que ácido indolbutírico (IBA) es más efectivo que ácido naftalenacético (NAA) (George et al. 2008b).

Se ha demostrado que el efecto de las auxinas puede ser por la interacción con el IAA endógeno de la planta como por la acción de la misma auxina. Sung en 1979 demostró en cultivos de cereza silvestre, niveles endógenos de IAA son disminuidos por la presencia de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), aunque la disponibilidad del triptófano (precursor de biosíntesis de IAA) se incrementa (Sung 1979). El 2,4-D puede interferir en la síntesis de IAA o acelerar la conjugación/degradación de IAA. Zažímalová 1995 observo que la reducción de concentraciones externas de 2,4-D y NAA resultan en un incremento significativo de las concentraciones internas de IAA libre en cepas de células de tabaco (Zažímalová et al. 1995)

Maeda y Thorpe (1979) encontraron que las auxinas sintéticas basadas en indol pueden proteger al IAA de la destrucción natural compitiendo con ella por la acción de las IAA enzima oxidasa. En explantes de hipocotilo de zanahoria, el 2,4-D y el NAA pueden inducir la formación de callos pero no tienen efecto en la concentración endógena de IAA. Lo que demuestra que en este caso las auxinas sintéticas son capaces de inducir morfogénesis por ellas mismas (George et al. 2008b).

5.3.2 Citocininas

Las citocininas son un grupo de reguladores de crecimiento los cuales pueden tener varios efectos, estimulan la síntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular. La aplicación de citocininas en un único sitio en la planta causa que el órgano tratado se convierta en un receptor activo de los aminoácidos, los cuales después migran a los sitios circundantes. El efecto de las citocininas es más notable en cultivos de tejidos, donde se utilizan frecuentemente con las auxinas y estimulan la división

celular y el control de la morfogénesis. Adicionado a un medio de cultivo para brotes, estos compuestos vencen la dominancia apical y promueven la aparición de yemas laterales (George et al. 2008c).

5.3.3 Giberelinas

Las giberelinas están involucradas en un amplio rango de respuestas al desarrollo de la planta. Promueven la elongación de tallos y hojas de pasto debido a la activación de los meristemas intercalares. Otro papel de las giberelinas es la inducción de enzimas hidrolíticas tales como α -amilasa y proteasas en las semillas de pastos y cereales, facilitando la movilización del endospermo. Otros papeles de las giberelinas en algunas plantas son la inducción de germinación de semillas, crecimiento de tallos de la planta roseta, determinación del sexo, desarrollo del fruto y control de la edad (juventud).

Se conoce poco acerca del papel de las giberelinas en los primeros pasos de transducción de señales. Pero en los pasos más tardíos están involucradas en la transcripción de genes y en la síntesis *de novo* de proteínas (George et al. 2008d).

5.3.4 Utilización combinada de reguladores de crecimiento

Se han utilizado combinación de auxinas y citocininas en la inducción de formación y propagación de cultivos de tejidos; por ejemplo, explantes de *Brassica nigra* en un medio con NAA 0.5 mg/l y 2.0 mg/l bencilaminopurina (BAP) o 2.0 mg/l Kin han producido abundantes raíces pilosas. La mejor respuesta que se ha observado es la combinación de NAA 0.5 mg/l y Kin 2.0 mg/l (Das et al. 2010).

En el caso de *Brassica oleracea* var *italica* se ha encontrado una alta frecuencia de formación de brotes a partir de explantes de hojas obtenidas del medio Murashige and Skoog con benciladenina (BA, 5mg/l) y NAA (0.5 mg/l). El medio solo con BA (2 mg/l) promueven una rápida multiplicación de brotes (Cao and Earle 2003).

La formación de brotes sobre los explantes de hojas es afectada por el tratamiento con reguladores de crecimiento. En un medio de inducción con solo BA, NAA o IAA los explantes no forman brotes, aunque producen varios tipos de raíces y callos. Cuando

las combinaciones de BA con NAA o IAA son incluidas en el medio de inducción se desarrollan brotes, yemas, o brotes con hojas expandidas a partir de los explantes. Una alta frecuencia de formación de brotes se ha obtenido en un medio con 5 mg/l BA combinado con 0.5-2.0 mg/l NAA. También se han producido raíces con múltiples raíces pilosas a partir de explantes de hojas cuando se adiciona NAA al medio de inducción sin importar la concentración de BA utilizada. El número de raíces se incrementa a medida que se incrementaba la concentración de NAA. A una concentración de 2 mg/l o más de NAA las raíces tienden a cubrir los brotes y plántulas. Para la obtención de brotes sin formación excesiva de raíces se puede emplear la combinación de BA 5 mg/l con NAA 0.5 mg/l. La combinación de BA 5 mg/l con IAA 4 mg/l también resulta en una buena inducción de formación de brotes; disminuyendo la concentración de IAA se reduce la frecuencia de formación de brotes (Cao and Earle 2003)

En otro trabajo, Qin 2006, empleando brócoli obtuvo una alta frecuencia de embriogénesis somática y regeneración de brotes. Explantes de cotiledones e hipocotilos de cuatro variedades de brócoli fueron cultivados en medio MS y MS modificado (mMS, suplementado con compuestos orgánicos) con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento. Se evaluó el efecto de genotipos, diferentes explantes, combinación de reguladores de crecimiento, componentes orgánicos y AgNO₃ sobre la inducción de callos y brotes. El medio óptimo para la inducción de callos/brotes y raíces fueron medio mMS con sacarosa 3% (w/v) y agar 0.8% (w/v) suplementado con NAA 0.2 mg/l. El porcentaje de inducción de callos fue arriba del 90% en las cuatro variedades; el porcentaje de inducción de brotes fue 92.5% (Qin et al. 2007).

Auxinas y citocininas son esenciales en la inducción de callos y formación de brotes. Bajos niveles de NAA (0.0, 0.5 y 1 mg/l) se ha utilizado para la formación de callos, combinado con BAP a 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l. cuando se utiliza solo BAP en el medio de inducción, se producen brotes de los explantes, pero el más alto porcentaje de formación de brotes y más brotes por explante se han obtenido cuando se combinan con NAA. La frecuencia más alta de formación de brotes se han obtenido en medio con

BAP 3.0 mg/l combinado con NAA 0.5 mg/l. el número de brotes se incrementa a medida que se aumenta la concentración de BAP de 1.0 a 3.0 mg/l. por otro lado, incrementando la concentración de NAA no se observa una reducción de la frecuencia de formación de brotes pero se promueve la formación de raíces (Qin et al. 2007).

Raíces saludables y fuertes se han obtenido directamente en la base del brote en el medio de enraizamiento (MS con NAA 2 mg/l). Estos resultados muestran que el brócoli tiene una alta habilidad de enraizamiento (Qin et al. 2007)

Las giberelinas han sido empleadas tanto como para aumentar el crecimiento de cultivos de células y raíces como para incrementar la producción de metabolitos secundarios. El GA₃ tiene el efecto de elongación celular demostrado por Davidonis 1990 en cultivos de células de algodón (Davidonis 1990). Aunque también cantidades altas de GA₃ (más de 1 mg/l) inhiben el crecimiento celular.

Ohkawa en 1998 observo que en cultivos de raíces pilosas de *Datura innoxia* obtenidas mediante transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, al emplear ácido giberélico en el medio se incrementaba el pesos fresco de raíces pilosas, también se aumentó la elongación de la raíz y las ramificaciones laterales. También empleo en un cultivo un inhibidor específico de la síntesis de giberelinas (S-3307) con lo cual se inhibió el crecimiento de las raíces pilosas (peso fresco, elongación y ramificaciones laterales) y cuando utilizó el inhibidor y GA₃ en el mismo medio se restauró el crecimiento de las raíces (Ohkawa et al. 1989). Por otro lado Smith en 1997 encontró que Niveles de GA₃ 0.01-0.001 mg/l en el medio de cultivo incrementan la biomasa de raíces pilosas de *Artemisia annua* así como también se aumenta la producción de artemisina. Mediante cinéticas de crecimiento determinó que el uso de GA₃ 0.01 mg/l incrementa en un 24.9% el crecimiento de raíces pilosas de *Artemisia annua* en comparación con los cultivos donde no utilizó GA₃ (Smith et al. 1997).

III. JUSTIFICACION

Las estrategias para tratar las infecciones por HPV son las vacunas preventivas basadas en las propiedades antigénicas de las proteínas de la cápside del HPV. Estas vacunas se preparan a base de partículas semejantes a virus (VLP) formadas por la proteína L1 de la cápside del HPV producida usando sistemas de expresión de levaduras o de células de insecto (Food and Drug Administration 2014). Sin embargo los costos de producción basados en esos sistemas son muy altos y parte de la población afectada por estos tipos de virus no podrá tener acceso a la vacuna (Benítez-Bribiesca 2006, Wang and Rhoden 2013; Bruni et al. 2016). El uso de sistemas vegetales puede ensamblar proteínas multiméricas, por lo que ofrecen la ventaja de producir directamente los VLP siendo estos procesos más económicos que los sistemas bacterianos y animales. Por lo que es necesario encontrar condiciones para incrementar la producción de biomasa (raíces transformadas) relacionada a la proteína L1, ya que las raíces se pueden propagar indefinidamente en medio de cultivo aséptico y escalar a nivel de biorreactores comerciales realizando modificaciones al medio de cultivo y optimizando la secuencia del gen *L1* para aumentar la producción de biomasa y aumentar la producción de la proteína L1. Por ello, en este estudio se investigaron las condiciones de cultivo y modificaciones en el gen *L1* para favorecer el crecimiento de raíces y la producción de la proteína L1 utilizando como modelo raíces transformadas de brócoli.

IV. HIPOTESIS

El uso de fitohormonas de crecimiento y las modificaciones del gen *l1*, incrementan la eficiencia de inducción y de propagación o crecimiento de raíces transformadas y su producción de la proteína transgénica.

V. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de reguladores de crecimiento, y modificaciones de la secuencia del gen *l1*, sobre el crecimiento de raíces transformadas y su producción de los péptidos resultantes de las modificaciones del gen *l1*.

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Modificar el medio de cultivo de raíces transformadas adicionando reguladores de crecimiento para mejorar la producción de biomasa
- Variar la secuencia del gen *l1* para mejorar la producción de proteína en raíces
- Demostrar la producción de L1 en raíces transformadas
- Localizar el sitio de acumulación de L1 en el tejido radical
- Purificar L1 por cromatografía
- Producir L1 en *E. coli* para fines de comparación y control

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

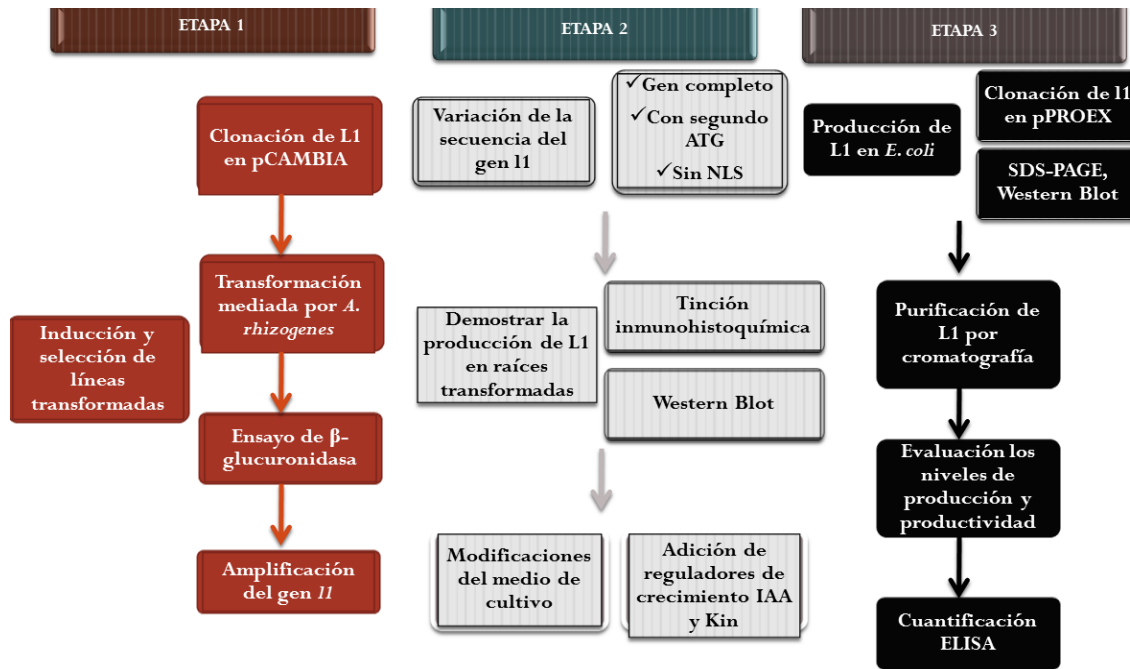


Figura 4. La estrategia experimental se dividió en tres etapas propuestas para el desarrollo del trabajo. En la primera se amplificó el gen *l1*, en la segunda se establecieron los cultivos de raíces transformadas, en la tercera se estudiaron los niveles de producción de los péptidos derivados del gen *l1*.

Se establecieron líneas de raíces transformadas con el gen *l1* completo mediante el método de punción de hipocotilos de plántulas y transferencia de las raíces emergentes del sitio de punción a medio líquido. La prueba de β -glucuronidasa demostró la transformación y se comprobó mediante amplificación del gen *l1* a partir de DNA genómico de raíces. El medio de cultivo se varió adicionando reguladores de crecimiento IAA y Kin a diferentes concentraciones. La producción de L1 se demostró por tinción inmunohistoquímica, además con la fluorescencia se determinó el sitio de almacenamiento de L1 en el tejido radical y la identidad de L1 se realizó por Western blot, L1 se purificó por cromatografía de afinidad a níquel y los niveles de producción y productividad se obtuvieron por densitometría. La comparación por ELISA ya no se llevó a cabo debido a problemas con la bacteria *A. rhizogenes* que se hacía resistente a los antibióticos de selección y por eso no se obtuvieron líneas nuevas de raíces con las modificaciones de *l1*, solo se logró obtener raíces con el gen *l1* completo y con *l1* sin el primer ATG.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos, enzimas y anticuerpos

Los componentes de los medios de cultivo, X-Gluc, reactivos para Bradford, Driselasa® y pectinasa se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). 2-mercaptoetanol, urea, reactivos para hacer geles para proteína se obtuvieron de Tecsiquim (Toluca, ME, MX). Las enzimas de restricción, T4-DNA ligasa, kit de PCR se obtuvieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, UK).

La construcción pVAX1-L1 que contiene el DNA del gen *11* insertado en el vector pVAX1 fue amablemente donado por el Dr. Monroy García A. Los vectores de expresión para plantas pCAMBIA 1105.1 y pCAMBIA 1305.1 que contiene el T-DNA que porta el gen de resistencia a higromicina (*hptII*), el gen reportero GUSPlus, y el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, se obtuvieron de CambiaLabs (Brisbane, Australia).

7.1 Preparación de las construcciones

El gen *11* se amplificó por PCR a partir de pVAX1-L1 en un termociclador (Techne TC-312 USA) empleando los primers que amplifican al gen completo con el primer directo OD1L1 5'- GGCGCCATGGGAATGCAGGTGACTTTTATTT y reverso revpPROEX 5'- AGCCAAGCTTTTACAGCTTACGTTTTTTGCG.

La reacción de amplificación se realizó empleando reactivos de Qiagen (Cat. No. 201233) en un volumen final de 25 μ L con los siguientes componentes:

Quiagen PCR buffer	1x
dNTPmix	0.5 mM
Primer directo	0.5 μ M
Primer reverso	0.5 μ M
Taq DNA polimerasa (Qiagen™)	1 unidad
DNA	200 ng
ddH ₂ O	a 25 μ L

Las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial 94°C 5 minutos

30 ciclos

Desnaturalización 94°C 30 segundos

Alineamiento 55°C 30 segundos

Extensión 72°C 1 minuto

Extensión final 72°C 15 minutos

Para amplificar la región conservada de 450 pb con los primer mY se emplearon las condiciones reportadas por Picconi, et al. (Picconi et al. 2000).

La restricción de los productos de PCR

Buffer 2.1 (NEB) 1X

NcoI 10 unidades

HindIII 10 unidades

DNA 10 µg

ddH₂O a 50 µL

Se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas, posteriormente se purifico por el método de fenol:cloroformo modificado de (Birnboim and Doly 1979). De esta forma se produjo al gen *I1* con sus sitios cohesivos.

La restricción del plásmido pPROEX HTb B

Buffer 3.1 (NEB) 1X

NcoI 50 unidades

DNA 50 µg

ddH₂O a 50 µL

Se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas, posteriormente se purifico por el método de fenol:cloroformo modificado de (Birnboim and Doly 1979), después se realizó la cuantificación del DNA purificado y se prosiguió a la restricción con la enzima HindIII

Buffer 2.1 (NEB) 1X

HindIII 10 unidades

DNA 10 µg

ddH₂O a 20 µL

A 37°C durante 2 horas

Condiciones de ligación del gen *I1* al vector pPROEX HTb B para obtener la construcción pPROEX-L1 se utilizó una relación molecular 1:1 de DNA del vector pPROEX y del gen *I1*

Buffer ligasa (NEB) 1X
 DNA plasmidico 6.5 µg
 DNA gen *I1* 0.8 µg
 Ligasa (NEB) 200 unidades
 ddH₂O a 20 µL
 1 hora a 16°C

Las condiciones de amplificación, restricción-purificación y ligación fueron similares para obtener las construcciones señaladas en la Tabla 2.

Tabla 2 Construcciones obtenidas de *I1* completo y truncado en 5' 2ATG (sin el primer ATG ni los primeros 78 pb) o en 3' ΔNLS (Sin la secuencia de localización nuclear 70 pb), en los vectores pPROEX HTb B, pCAMBIA 1105.1 y pCAMBIA 1305.1

En pPROEX HTb B	En pCAMBIA 1105.1	En pCAMBIA 1305.1
pPROEX-L1	pCAMHPV16L1-en ORF con GusPlus	pCGFP
pPROEX-2ATGNOS	pCAMHisL1-en ORF con GusPlus	pCGFPL1ΔGUS
pPROEX-GFP	pCHisL1	pCGFPL1
pPROEX-GFPL1		PCGFP2ATG
pPROEX-GFP2ATG		pCGFPΔNLS
pPROEX-GFPNLS		

Las construcciones realizadas en pPROEX se realizaron para evaluar las diferencias de producción de proteína en *E. coli*, con base a las variaciones de la secuencia del gen *I1*. Las construcciones en pCAMBIA 1105.1 y 1305.1 se obtuvieron para obtener las variaciones de *I1* que se clonaron en las raíces y evaluar si hay diferencias de producción con base a estas diferencias en la secuencia de *I1* completo y truncado

A continuación se menciona brevemente como se obtuvieron estas construcciones. El orden de presentación fue como se fueron obteniendo debido a que algunas sirvieron para obtener a las subsiguientes.

pCAMHisL1 el gen *I1* se amplificó a partir de la construcción pPROEX-L1 con los primers directo M13ECO31L 5'-CATGGTCTCCCATGGAGCGGATAACAATTC y

reverso OR1L1 5'-GGTAAGATCTTTACAGCTTACGTTTTTTGCG, los productos de PCR se cortaron con las enzimas Bsal (NcoI) y BglII, se purificaron y se ligaron al plásmido pCAMBIA 1105.1 previamente cortado con las enzimas NcoI y BglII

pCHisL1 se amplificó el gen *l1* junto con el promotor 35S a partir de la construcción pCAMHisL1 con los primers directo 35SBsalEcoRI 5'-AAGGTCTCGAATTCAGAAGACCAAAGGGCAAT y reverso OR1L1 5'-GGTAAGATCTTTACAGCTTACGTTTTTTGCG, el terminador NOS se amplificó con los primers directo NOSdirBglII 5'-AATAGATCTGATCGTTCAAACATTTG y reverso NOSrev 5'-ATTGGTCTCAAGCTTCCCGATCTAGTAACA, los productos de PCR fueron cortados con la enzima BglII, purificados y ligados en una relación molar 1:1, el producto de ligación se amplificó con los primers directo 35SBsalEcoRI y reverso NOSrev, los productos de PCR se cortaron con Bsal obteniéndose los sitios cohesivos EcoRI y HindIII y se ligaron al plásmido pCAMBIA 1105.1 previamente cortado con las enzimas EcoRI y HindIII

pCGFP el gen de GFP se amplificó a partir de pEGFP-C1 con los primers directo CMVdir 5'-AAGGTCTCCCATGGATCCGCTAGCGCTA y reverso CMVrev 5'-AAGGTCTCAGATCTAGATCCGGTGGATCCC, el promotor 35S se amplificó con los primers directo 35SBsalEcoRI y reverso NOSrev, los productos de PCR se cortaron con Bsal (NcoI) para GFP y NcoI el promotor 35S, se purificaron y se ligaron, el producto de ligación se amplificó con los primers 35SBsalEcoRI y CMVrev, el nuevo producto de PCR se cortó con las enzimas Bsal (EcoRI) y KpnI y se ligó al plásmido pCAMBIA 1305.1 previamente cortado con las enzimas EcoRI y KpnI

pCGFPL1ΔGUS se amplificó *l1* con NOS a partir de la construcción pCHisL1 con los primers directo KpnIHis 5'-AAGGTACCAGGAAACAGACCATGTCTGTA y NOSrevSpeI 5'-AATACTAGTTTCCCGATCTAGTAACA el producto de PCR fue cortado con las enzimas KpnI y SpeI, se purificó y se ligó en la construcción pCGFP previamente cortado con las enzimas KpnI y SpeI

pCGFPL1 se amplificó L1 con NOS a partir de la construcción pCHisL1 con los primers directo KpnIHis y NOSrevXbaI 5'-AATCTAGATTCCCGATCTAGTAACA, el producto de PCR fue cortado con las enzimas KpnI y XbaI, se purificó y se ligó en la construcción pCGFP previamente cortado con las enzimas KpnI y XbaI

pCGFPΔNLS se amplificó *l1* sin la secuencia de localización nuclear con los primers directo KpnIHis y reverso BsalBglIINLS 5'-

AAGGTCTCAGATCTTAACCTAATGTAAATTTTGG, también se amplificó NOS con los primers NOSdir y NOSrev, los productos de PCR fueron digeridos con BglII, purificados y ligados, el producto de ligación se amplificó con los primers KpnIHis y NOSrev, el nuevo producto de PCR fue cortado con las enzimas KpnI y XbaI se purificó y se ligó en la construcción pCGFP previamente cortada con las enzimas KpnI y XbaI

pPROEX-2ATGNOS se amplificó *11* a partir de pCHisL1 con los primers directo 2ATGNcol 5'- AACCATGGAAATGTCTCTTTGGCTGCCTAGT y NOSrev, el producto de PCR se digirió con las enzimas NcoI y HindIII, se purificó y se ligó en pPROEX HTb B previamente cortado con las enzimas NcoI y HindIII

pCGFP2ATG se amplificó *11* con NOS a partir de la construcción pPROEX-2ATGNOS con los primers KpnIHis y NOSrevXbaI, el producto de PCR fue cortado con las enzimas KpnI y XbaI, se purificó y se ligó en la construcción pCGFP previamente cortado con las enzimas KpnI y XbaI

pPROEX-GFP se obtuvo con la amplificación de eGFP a partir de pEGFP-C1 con los primers CMVdir y CMVrev, el producto de PCR se digirió con las enzimas NcoI y HindIII, se purificó y se ligó en pPROEX-L1 previamente cortado con las enzimas NcoI y HindIII

pPROEX-GFPL1 se realizó PCR con los primers CMVdir y RevpPROEX a partir de pCGFPL1 el producto de PCR se digirió con HindIII, se purificó y se ligó en pPROEX-GFP previamente cortado con HindIII

pPROEX-GFPNLS se realizó PCR con los primers CMVdir y NLSstopRev 5'- AAGGTCTCAAGCTTAACCTAATGTAAATTTTGG a partir de pCGFPL1 el producto de PCR se digirió con HindIII, se purificó y se ligó en pPROEX-GFP previamente cortado con HindIII

pPROEX-GFP2ATG se amplificó el gen *11* con los primers directo GFP 5'- TCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT y reverso OR1-N 5'- GGTACCATGGTTACAGCTTACGTTTTTTT, el producto de PCR se digirió con XhoI y BamHI, se purificó y se ligó en pPROEX-GFPL1 previamente cortado con XhoI y BamHI

La metodología para la desinfestación y germinación de semillas de brócoli, la inducción de raíces transformadas y el establecimiento de cultivos de raíces transformadas se llevaron a cabo de acuerdo a los reportado por (García 2009).

7.2 Desinfestación y germinación de semillas de brócoli

Se hidrataron las semillas por 2 horas en agua destilada. Se lavaron 2 veces con agua estéril y en condiciones de esterilidad, se colocaron las semillas en papel filtro sobre un embudo büchner montado en un matraz kitasato conectado al vacío (los posteriores lavados con agua se realizan de esta forma). Las semillas se colocaron en un frasco con etanol al 70% durante 20 segundos. Después se transfirieron al embudo con papel filtro para lavarlas 3-4 veces con agua estéril. Se colocaron en un frasco con hipoclorito de sodio al 5% (Cloralex *el rendidor*, sin diluir) por 15 minutos con agitación periódica. Se transfirieron al embudo con papel filtro para lavarlas 5-6 veces con agua estéril. Se colocaron en caja de Petri estéril y después se sembraron 5 semillas en frascos con 25 mL de medio sólido MS (Murashige and Skoog 1962). Los frascos fueron colocados en un cuarto de cultivo con temperatura controlada entre 25 y 27°C con iluminación continua de 8400 lux. Las plántulas generadas fueron utilizadas para la inducción de raíces después de dos semanas de edad (García 2009).

7.3 Inducción de raíces transformadas

Los hipocotilos de plántulas de brócoli de 15 días de edad fueron punzadas con una aguja hipodérmica previamente sumergida en una suspensión bacteriana de *A. rhizogenes* con 48 horas de crecimiento, un centímetro por debajo de los cotiledones. Los frascos con las plántulas infectadas fueron puestos a 25-27°C con iluminación constante de 5400-8400 lux por aproximadamente 15 días o hasta la aparición de raíces pilosas en el punto de punción. Algunas plántulas fueron punzadas con agua estéril como controles (García 2009).

7.4 Establecimiento de cultivos de raíces transformadas y no transformadas

Las raíces no transformadas fueron obtenidas a partir de plántulas con 15 días de edad y crecidas en matraces con 25 ml de medio MS con 30 g/L de sacarosa. Las raíces aéreas emergidas de los puntos de punción en plántulas infectadas con *Agrobacterium* fueron cortadas junto con un fragmento del hipocotilo al alcanzar 2-3 cm de longitud y puestas en placas de Petri con medio MS con higromicina (50 µg/ml) y cefotaxima (200 µg/ml).

Cuando estas raíces alcanzaron 10 cm de longitud se depositaron en matraces con medio MS líquido con los mismos antibióticos. Las raíces transformadas se mantuvieron en medio líquido adicionado con 100 µg/mL de cefotaxima y por subcultivos periódicos de 15-20 días, después del tercer subcultivo ya no se puso antibiótico (García 2009).

7.5 Protocolo de transformación de *Agrobacterium rhizogenes*

El método es modificado de (Höfgen and Willmitzer 1988) y (McCormac et al. 1998). Se tomó un cultivo stock de *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 almacenado a -70°C, se atemperizó en baño de hielo y se sembró en medio YMB líquido. Se dejó toda la noche a 28°C con agitación de 200 rpm. Se tomó una alícuota y se sembró en medio YMB sólido sin antibiótico. Cuando se obtuvieron las colonias, a partir de una sola se sembró en LB líquido y se dejó por 24 horas a 28°C con agitación de 200 rpm. Se tomó 1.5 mL en un tubo eppendorf y se centrifugó a 9000 rpm 2 minutos. Se desechó el sobrenadante y al pellet se le añadió 1.5 mL de CaCl₂ 20 mM resuspendiendo las células cuidadosamente con ayuda de una pipeta y se colocaron en hielo durante 15 minutos. Nuevamente se centrifugó a 9000 rpm por 2 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1.5 mL de CaCl₂ 20 mM. Se tomaron 100 µL de esta suspensión y se pasaron a un nuevo tubo al que se le añadieron 5 µL (1 µg) de los plásmidos o las construcciones bajo estudio. Para la transformación de las células la mezcla se sometió a un shock térmico por enfriamiento en nitrógeno líquido durante 2 minutos, luego se pasaron un baño de agua a 37°C por 5 minutos y 5 minutos en hielo. Después se añadieron 250 µL de medio PSI (LB suplementado con 4 mM MgSO₄ y 10 mM de KCl) con glucosa 0.5% y se llevaron a 28°C durante 3 horas. El contenido del tubo se transfirió a 5 mL de medio YMB con los respectivos antibióticos según el gen de resistencia en el plásmido o construcción bajo estudio. Se dejó la mezcla durante 48 horas en una agitadora orbital hasta que se observó crecimiento. Se tomó una alícuota y se sembró en placas con los respectivos antibióticos y se dejaron 48 horas a 28°C. También se realizó la transformación por los métodos tradicionales de shock térmico (Holsters et al. 1978; Weigel and Glazebrook 2006b) y electroporación (Weigel and Glazebrook 2006a) con el sembrado de transformantes en

medio sólido. Estos últimos métodos resultaban en un crecimiento masivo de tipo césped y no se obtuvieron colonias aisladas aún en presencia de antibióticos, por eso se diseñó el método de transformación de *Agrobacterium* previamente descrito

7.6 Ensayo de β -glucuronidasa

Este ensayo se utilizó para seleccionar las raíces transformadas con el vector binario pCAMBIA y sus derivados que llevan el gen reportero GUSPlus, un gen sintético basado en la secuencia del gen *gusA* de *Staphylococcus sp*, que codifica para una β -glucuronidasa que hidroliza residuos de ácido β -glucurónico a partir de la terminación no reductora de la cadena de los mucopolisacáridos glicosaminoglucuronanos (Ernst et al. 1995; Kresse and GlüSsl 2006) y de otros β -D-glucurónidos aromáticos; como el ácido 5-Bromo-4-cloro-1H-indol-3-il β -D-glucopiranosidurónico (X-gluc), el ácido 4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosidurónico (β -NPG) y el ácido 4-Metilumbelliferil- β -D-glucopiranosidurónico (MUG), los cuales son utilizados para ensayos de detección por tinción histoquímica (Stomp 1992) espectrofotométrica (Aich et al. 2001), y fluorométrica (Martin et al. 1992), respectivamente.

En este estudio se utilizó la metodología reportada por (Jefferson 1987). El sustrato para la tinción histoquímica por acción de la β -glucuronidasa en el tejido radicular fue el X-Gluc. Este sustrato es hidrolizado por la enzima para liberar el ácido glucurónico y la aglicona (5-bromo-4 cloro-3-indolil) que en presencia de oxígeno forma el dímero 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo (Figura 5) formando un precipitado azul en el sitio de actividad enzimática (Jefferson 1987; Karcher 2002).

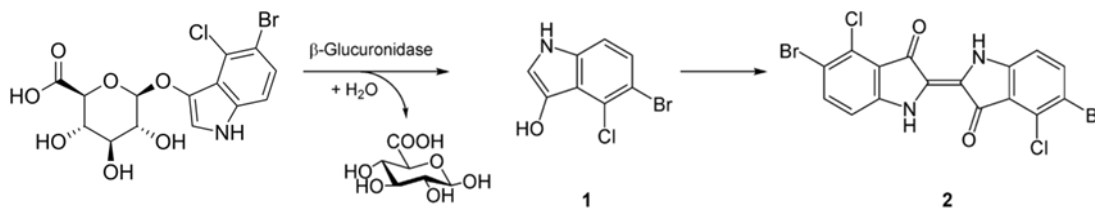


Figura 5 Reacción de la enzima β -glucuronidasa sobre el X-Gluc, se produce el compuesto 5-bromo-4 cloro-3-indolil el cual es dimerizado en presencia de oxígeno formando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, este último compuesto es el que se observa como precipitado azul en el sitio de la actividad enzimática .

Existen muchas variables que pueden afectar la calidad de la localización histoquímica, como los aspectos de preparación y fijación del tejido, así como la reacción misma. La dimerización es estimulada por el oxígeno atmosférico y puede ser incrementada con un catalizador oxidativo, como la mezcla de ferrocianuro de potasio/ferrocianuro. Aunque el catalizador no es necesario para la reacción (Jefferson 1987).

Para el ensayo se tomaron fragmentos de aproximadamente 1 cm de raíces transformadas y de raíces no transformadas. Los fragmentos de raíces se colocan en tubos eppendorf de 600 μ l conteniendo 250 μ l de solución de tñido GUS (100 mM de fosfato de sodio pH 7, 10mM EDTA pH 8, 0.1% Tritón X-100), y 2 mM X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl β -D-glucopyranosiduronic acid). Los tubos abiertos se colocaron en un desecador al vacío por 10 min enseguida se liberó lentamente el vacío y se repitió el proceso 2 veces más. Después de los ciclos de infiltración, los tubos se dejaron por 10 horas a 37°C. La presencia de actividad de GUS se evaluó mediante la observación al microscopio de coloración azul en el tejido (García 2009; Jefferson 1987).

7.7 Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se extrajo de acuerdo al protocolo de (Healey et al. 2014) con algunas modificaciones. Se tomaron 50 mg de peso fresco y se molieron en nitrógeno líquido. La biomasa se transfirió a un tubo eppendorf con 400 μ L de buffer de extracción (8 volúmenes de buffer por cada gramo de muestra), se calentó por 30 minutos a 70°C con agitación en vórtex cada 5 minutos. Se centrifugo a 13200 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a nuevo tubo y se adiciono 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1. La mezcla se agito en vórtex y se centrifugo a 13200 rpm por 5 minutos. La fracción acuosa se transfirió a nuevo tubo y se agregó 3 μ L de RNasa 10 mg/ml. El tubo se calentó a 65°C por 1 hora, se añadió 1 volumen de cloroformo, se resuspendió en vortex y se centrifugo a 13200 rpm por 5 minutos. La fracción acuosa se transfirió a nuevo tubo y se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto, se dejó precipitar a -20°C por 1 hora y se centrifugo 13200 rpm por

5 minutos. Se desechó el etanol y se adicionó etanol al 70%, se puso 10 minutos a -20°C y se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos. Se desechó el etanol y la pastilla se dejó secar durante 15 minutos en vacío, la pastilla de DNA se resuspendió en 100 µL de buffer TE y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Buffer de extracción: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA, 1.5 M NaCl, 2% (w/v) CTAB, 2% de PVPP y 0.3% (v/v) β-mercaptoetanol- este último se adiciona inmediatamente antes de usar el buffer.

7.8 Localización del sitio de acumulación de la proteína L1 mediante tinción inmunohistoquímica

La localización de la proteína L1 en los tejidos, se llevó a cabo usando la metodología reportada por (Pasternak et al. 2015).

Para los cortes transversales: las raíces se fijan en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.2, 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, se lavaron 3 veces con PBS 5 minutos, se colocaron en PBS con sacarosa al 10% pH 7.2 toda la noche y se realizaron cortes transversales en criostato. Los cortes se colocaron en laminillas previamente lavadas con agua desionizada y desengrasados con etanol absoluto e incluidas en gelatina, se secaron a 37°C toda la noche, se congelaron a -20°C durante 2 días, se hidrató con PBS pH 7.2 por 10 minutos, se pusieron en PBS pH 7.2 con SDS 1% 5 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron 3 veces con PBS

Para los tratamientos longitudinales: Las raíces se fijaron en formaldehído al 4% en buffer Pipes (50 mM, pH 7) 30-60 minutos, se lavaron en buffer Pipes y se dejaron toda la noche a 4°C. Se lavaron en Pipes 3 veces por 10 minutos, se trataron con Driselasa (Sigma) al 1% y 0.5% de pectinasa (Sigma), se realizaron 4 lavados en Pipes y un lavado con agua destilada.

Tanto los cortes transversales como los tratamientos longitudinales se colocaron en portaobjetos y se permeabilizaron con PBS con tween al 0.2% 10 minutos, se bloquearon con albumina bovina libre de IgG al 0.2% en PBS por 20 minutos a

temperatura ambiente, se utilizó el anticuerpo primario de ratón CAMVIR-1 (Millipore) anti-L1 a una dilución de 1:300 en PBS-Tween se dejó reaccionar toda la noche a 4°C o 2 horas a 37°C en cámara húmeda, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS-Tween, se adiciono el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC en una dilución de 1:800 en PBS-Tween 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda en oscuridad, se realizaron 3 lavados por 5 minutos con PBS-Tween y 3 minutos con PBS, se adiciono una gota de Fluoroshield (Sigma) y se colocó el cubreobjetos para su visualización al microscopio.

7.9 Detección de L1 mediante Western blot

Se realizó adecuando la metodología reportada previamente por (García 2009), se molieron 500 mg de raíz en nitrógeno líquido y el polvo se transfirió a un tubo falcon con 10 mL de acetona fría con 10% TCA, 1% PVPP, y 0.2% de β -mercaptoetanol, se llevó a 4°C 1 hora y se centrifugo 15 minutos a 7000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en fenol con DTT 20 mM, se desechó la pastilla y el sobrenadante se trató con 5 volúmenes de metanol con acetato de amonio 0.1 mM, se centrifugo a 7000 rpm a 4°C, la pastilla se transfirió a tubo eppendorf y se lavó 3 veces con 1 mL de metanol, en cada lavado se centrifugo a 10000 rpm y se desechó el sobrenadante, se resuspendió en buffer con 0.5% SDS y después se adiciono agua desionizada para llevar el SDS a 0.05%, se cuantifico por el método de Bradford y se cargaron geles de SDS-PAGE (García 2009)

Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida 12% (w/v) con SDS, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond C, GE healthcare), bloqueado toda la noche en PBS con Tween-20 0.1% (v/v) (PBS-T) y leche desnatada a 5%(PBS-T), después se adicionó el anticuerpo primario anti-L1 CAMVIR-1 (Millipore) diluido 1:500 en PBS-T, por 1 hora, después de tres lavados de 10 minutos en PBS-T, se adicionó IgG de ratón anti conejo conjugado a peroxidasa (Millipore) diluido en PBS-T 1:15000 durante 1 hora, después del lavado la señal específica fue detectada usando el sistema ECL Luminata (millipore) (García 2009)

7.10 Efecto de Reguladores de crecimiento

De acuerdo a trabajos de diferenciación de explantes de brócoli con reguladores de crecimiento (Cao and Earle 2003) y (Qin et al. 2007), se realizó un diseño experimental para la evaluación del efecto de reguladores de crecimiento (Tabla 3) empleando la auxina IAA, la citocinina Kin y la giberelina GA₃ para investigar el crecimiento y diferenciación de explantes.

Tabla 3 *Diseño experimental para evaluar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento IAA, Kin y GA₃ sobre la diferenciación de explantes*

Medio MS (3% sacarosa, 1.8 g/l fitagel)		IAA (Auxina) mg/L				
		0	0.05	0.5	5.0	10.0
Kin (CITOCINA) mg/L	0	A	B	C	D	E
	0.05	B	A	E	C	D
	0.5	C	D	A	E	B
	5.0	D	E	B	A	C
	10.0	E	C	D	B	A

GA₃: A = 0, B = 0.05, C = 0.5, D = 5, E = 10 mg/l

Diseño experimental de cuadrados latinos: 25 tratamientos x 3 repeticiones x 3 explantes (Raíz, hipocotilo y cotiledón).

Explantes de raíz	225
Explantes de hipocotilo	225
Explantes de cotiledón	225
Total	675

Se prepararon 2.5 litros de medio de regeneración (MS) para los 25 tratamientos con 4 repeticiones (3 para la matriz experimental y uno extra de 25 mL cada uno).

Soluciones Stock para cada regulador de crecimiento: 1 mg/ml

IAA 1 mg/ml **KIN** 1 mg/ml **GA₃** 1 mg/ml

7.11 Efecto de Reguladores de crecimiento sobre líneas de raíces transformadas con pCAMBIA

Se tomaron 3 explantes de raíces transformadas con pCAMBIA de 5 cm y se colocaron en placas con medio MS con concentraciones de 0, 0.05, 0.25 y 1 mg/L de IAA y de Kin (Tabla 4), cada tratamiento se realizó por triplicado y después de 4 semanas se midió el peso fresco y peso seco.

Tabla 4 *Diseño experimental para evaluar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento IAA y Kin, sobre el crecimiento de explantes de raíces*

Medio MS (3% sacarosa, 1.8 g/L fitagel)		IAA (Auxina) mg/L			
		0	0.05	0.25	1.0
Kin (CITOCININA) mg/L	0	1	2	3	4
	0.05	5	6	7	8
	0.25	9	10	11	12
	1.0	13	14	15	16

7.12 Efecto de Reguladores de crecimiento sobre explantes de raíces transformadas con pCAMHisL1

Se tomaron 3 explantes de raíces transformadas con pCAMHisL1 de 5 cm y se colocaron en placas con medio MS con 1 mg/L de IAA sin Kin, como control se emplearon explantes en medio sin reguladores de crecimiento, tanto el tratamiento con IAA como el control se realizaron por cuatriplicado. Después de 4 semanas se midió el peso fresco

VIII. RESULTADOS

8.1 Caracterización por restricción del plásmido pCAMBIA 1305.1 y las construcciones pCGFPL1ΔGUS y pCGFP

Para caracterización, referencia y control se cortó al vector vacío pCAMBIA 1305.1 (Genbank acc no. AF354045) obteniéndose los fragmentos esperados (Figura 6) de 1600 pb que corresponden a los 2 promotores 35S y el sitio de multiclonación, 2624 pb que corresponde a los genes de resistencia a los antibióticos higromicina (*HygR*) y kanamicina (*KanR*), y 7623 que corresponde al resto del plásmido al cortarlo con EcoRV (carril 5). Cuando se cortó con XhoI se obtuvo la banda de 1094 pb que corresponde al gen de resistencia a higromicina y el fragmento de 10753 que corresponde al resto del plásmido (carril 10). Estas estructuras del plásmido se muestran en el anexo XI

Tomando como base estas características, se digirieron las construcciones pCGFP y pCGFPL1ΔGUS con estas mismas enzimas.

Al cortar pCGFP con EcoRV se obtuvieron los tamaños esperados de 1168 pb que corresponde a los 2 promotores 35S, aunque es más pequeño que el fragmento de pCAMBIA 1305.1 porque no tiene el sitio de multiclonación que es donde se clona eGFP, 1595 pb que corresponde a eGFP, el sitio de multiclonación y el promotor 35S de GUSplus, los tamaños de 2624 pb y 7623 pb son los fragmentos similares a los encontrados en pCAMBIA 1305.1 antes mencionado (carriles 3 y 4), y con la enzima XhoI también se obtuvieron los tamaños esperados de 1094 pb por la liberación del gen de resistencia a higromicina, un fragmento de 2173 pb que corresponde a 2 promotores 35S y a eGFP, y el fragmento de 9743 pb que es más pequeño que el de pCAMBIA 1305.1 debido a que en este caso el promotor 35S de *HygR* se encuentra en el fragmento de 2173 pb con el promotor y el gen eGFP (carriles 8 y 9).

pCGFPL1ΔGUS al cortarlo con EcoRV carril (1 y 2) se obtuvieron los fragmentos esperados de 958 pb que corresponde a eGFP, los fragmentos de 1168 y 2624 pb

tuvieron las mismas características que los encontrados en pCGFP antes mencionado, 9202 pb es más grande que en pCAMBIA y en pCGFP, la diferencia de aproximadamente 1500 pb corresponden al gen *I1* que se encuentra en este fragmento, este patrón de restricción se pueden observar claramente en el carril 1, y aunque en el carril 2 las bandas no se observan bien, si fueron detectadas cuando se observó directamente en el gel; pCGFPL1ΔGUS también se digirió con XhoI y se obtuvieron los tamaños esperados de 1094 y 2173 pb similar en pCGFP, y 10685 pb aunque en este fragmento se encuentra el gen *I1*, es más pequeño que en el fragmento grande de pCAMBIA debido a las características mencionadas en pCGFP y porque también fue eliminado el promotor 35S de GUSPlus (carril 6 y 7). Estos resultados fueron similares a los encontrados en los análisis *in silico* con los programas VectorNTI y Snapgene, que se muestran en la sección anexo I solo los de este último programa

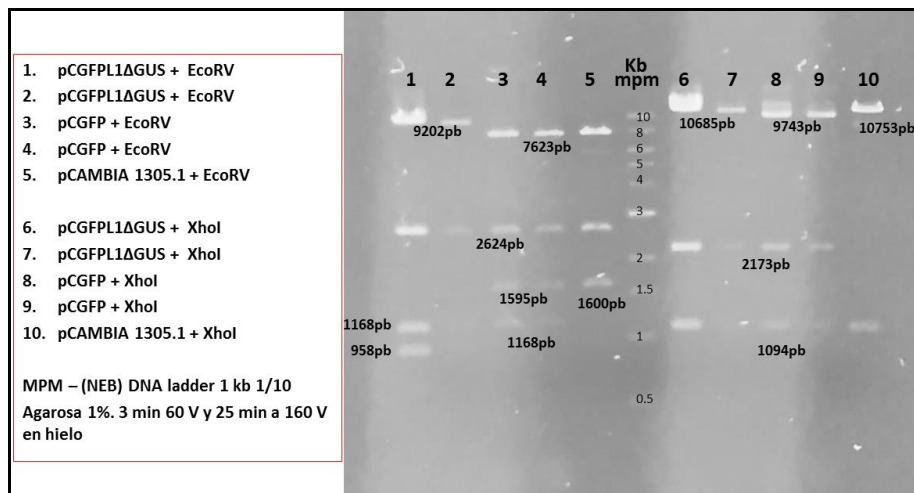


Figura 6 Caracterización por restricción con las enzimas *EcoRV* y *XhoI* de las construcciones *pCGFPL1ΔGUS* (carriles 1,2, 6 y 7), *pCGFP* (carriles 3, 4, 8 y 9) y del vector *pCAMBIA 1305.1* (carriles 5 y 10)

8.2 Confirmación de la presencia del gen *l1* en las clonas de *E. coli* pCGFPL1

La construcción pCGFPL1 se obtuvo a partir de pCGFP (descrita en el resultado previo), entonces para demostrar que las cepas de *E. coli* obtenidas y resistentes a kanamicina estaban transformadas con la construcción pCGFPL1 y no solo con el plásmido pCGFP, se realizó extracción de DNA plasmídico y se llevaron a cabo restricciones con las enzimas BamHI y HindIII. Se obtuvo una clona transformada como se puede observar en la figura 7, porque aunque se analizaron 2 clonas, solo una liberó los fragmentos de los tamaños esperados, que fue la clona 8 al digerirse con BamHI libero un fragmento de tamaño de 1480 pb que corresponde a eGFP y una región del gen *l1* ya que esta enzima corta dentro de la secuencia de este gen, como se puede observar en los carriles 1 y 3, que no se observan en la clona 9 (carriles 2 y 4), también al utilizar la enzima HindIII se obtuvo el fragmento del tamaño esperado de 2006 pb que es el gen de la proteína L1 con el terminador NOS, solo en la clona 8 (carriles 5 y 7), en la clona 9 no hubo liberación de banda. Estos resultados coinciden con el análisis bioinformático que se muestra en el anexo II.

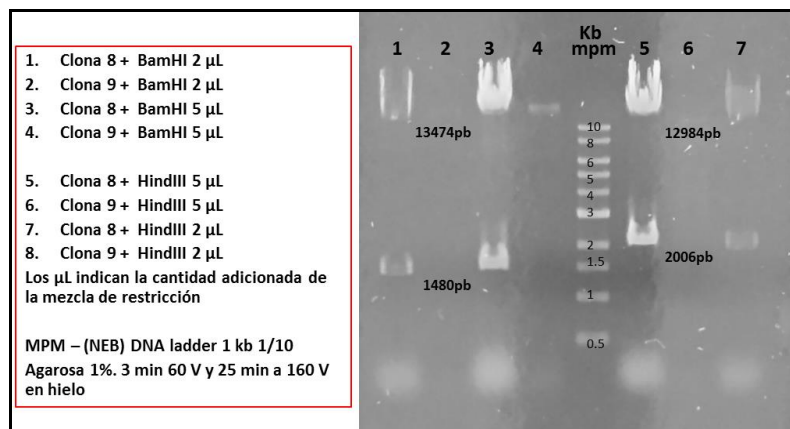


Figura 7 Digestión de DNA plasmídico de 2 clonas transformadas con pCGFPL1, solo una clona esta transformada, demostrado por restricción con BamHI (carriles 1 y 3) y con HindIII (carriles 5 y 7)

8.3 Confirmación de la presencia del gen eGFP en las clonas de *E. coli* pPROEX-GFP

En el plásmido pPROEX HTb B (Invitrogen, ahora ThermoFisher Scientific, acc no. 10711018) se clono *l1* para obtener pPROEX-L1 y a partir de esta última construcción se obtuvo pPROEX-GFP.

El gen de eGFP se clonó en pPROEX, como se ha descrito en la metodología, para demostrar que se obtuvieron clonas transformadas con esta construcción se realizaron restricciones para liberar los fragmentos característicos (Figura 8). Se utilizó la enzima EcoRV y XhoI, de las 6 clonas analizadas solo 1 presentaba los fragmentos de los tamaños esperados 626 pb que corresponde a una región de LacI y el promotor trc, 767 pb que es eGFP, 1114 pb que corresponde al resto de LacI, y 2918 pb que consiste en el resto del plásmido como se puede observar en el carril 2, en este mismo carril hay 1 banda de 3685 pb que corresponde a una digestión incompleta con la enzima XhoI por lo que no se libera el fragmento de eGFP y por eso se ve de ese tamaño aunque la banda es más tenue que la que sí es efectivamente cortada por XhoI. Las demás clonas analizadas solo tenían al plásmido pPROEX-L1 pero no a eGFP, esto es debido a los tamaños de los fragmentos de restricción de 626 y 1114 pb similares a los anteriores, pero sin la banda de 767 pb que corresponde a eGFP, el fragmento mayor de 4548 tiene este tamaño debido a la presencia del gen *l1* que no está presente en pPROEX-GFP por eso el tamaño en este último caso es menor. No se utilizó directamente pPROEX HTb B, por algunos problemas en la caracterización que después se corrigieron, por eso se utilizó pPROEX-L1. El patrón de bandeo fue establecido previamente en el análisis *in silico*, como se puede observar en el anexo III, los resultados aquí mostrados son similares. Los fragmentos de las estructuras de pPROEX HTB b, así como los sitios de restricción se muestran en el anexo XII

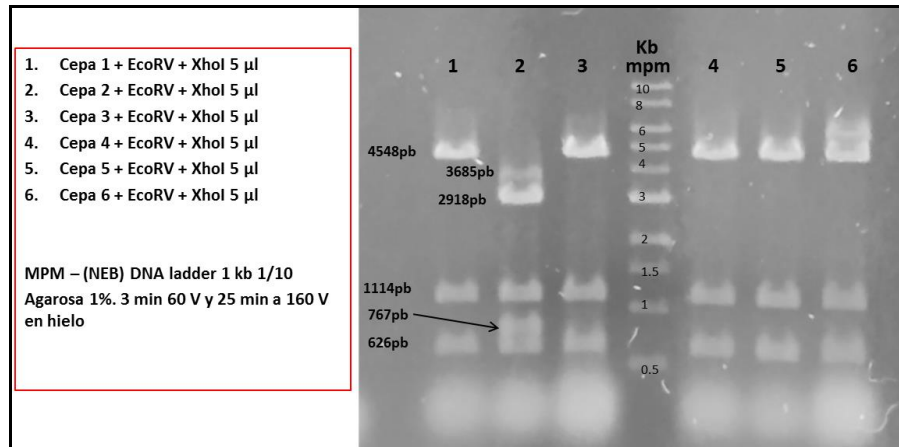


Figura 8 Digestión de DNA plasmídico de 6 clonas transformadas con la ligación de pPROEX y eGFP, solo la clona 2 tiene los fragmentos de los tamaños esperados en el carril 2

8.4 Confirmación de la obtención de las construcciones pPROEX-GFPNLS y pPROEX-GFPL1

A partir de pPROEX-GFP (descrito en el resultado anterior), se clono el gen *I1* completo y truncado sin secuencia de localización nuclear (NLS), para obtener pPROEX-GFPL1 y pPROEX-GFPNLS respectivamente. Se analizaron 4 clonas transformadas (Figura 9), 2 con la ligación de pPROEX-GFP con el gen *I1* sin NLS y 2 con el gen completo, el DNA plasmídico que se extrajo de estas clonas se digirió con la enzima EcoRV, al analizar las clonas transformadas sin NLS solo en 1 se obtuvieron los tamaños de fragmentos de restricción esperados de 626, 1114 pb con las características mencionadas en el resultado previo de las restricciones de pPROEX-GFP, 855 pb que es eGFP con una secuencia al principio del gen *I1*, y 4480 pb que es *I1* sin NLS y el resto del plásmido en el carril 2, y los fragmentos de 626 y 1114 pb (carril 1) corresponden a pPROEX-GFP sin *I1*, como no se utilizó la enzima XhoI como en el resultado de restricción de pPROEX-GFP previamente descrito, se obtuvo en tamaño de 3685 pb donde se encuentra eGFP y el remanente del plásmido. Las 2 clonas que se analizaron con el gen *I1* completo, al cortar con la enzima EcoRV se obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados de 626, 855, 1114 pb similares a los

encontrados y con las mismas características de pPROEX-GFPNLS, el fragmento mayor de 4810 es diferente porque en este caso el gen *I1* es completo con su NLS, por eso el fragmento es más grande que el de pPROEX-GFPNLS (carriles 3 y 4), este resultado nos indica que en ambas clonas se encuentra la construcción pPROEX-GFPL1. El patrón de restricción encontrado en estos resultados es igual al obtenido en el análisis informático que se muestra en el anexo IV

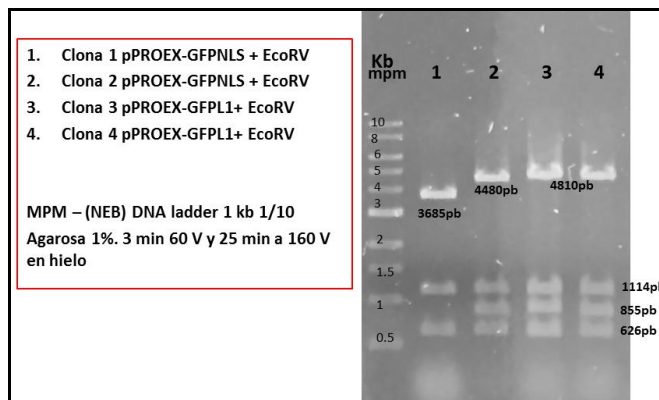


Figura 9 Análisis de restricción con *EcoRV* de DNA plasmídico de clonas transformadas con *pPROEX-GFPNLS* en los carriles 1 y 2 (solo el carril 2 tiene esta construcción, en el carril 1 es *pPROEX-GFP*), y *pPROEX-GFPL1* (carriles 3 y 4)

8.5 Confirmación de la obtención de las construcciones *pCGFPΔNLS*

De *pCGFP* mencionada en un resultado anterior se utilizó para ligar *I1* sin NLS y con el terminador NOS para obtener la construcción *pCGFPΔNLS*. De las clonas transformantes con esta construcción que se obtuvieron al transformar con la ligación de *pCGFP* y *NLSNOS* se les extrajo DNA plasmídico y se cortaron con *HindIII*, de las 6 clonas analizadas solo 1 libero al fragmento donde se encuentra el gen *I1* de 1939 pb que consiste en *L1NOS*, como se puede observar en el carril 3 de la figura 10, las demás clonas que no liberan al fragmento esperado, solo están transformadas con *pCGFP* sin el gen *I1*, al tener un solo sitio de restricción el plásmido solo se linealiza

obteniendo el fragmento de tamaño de 12948 pb que se puede observar en todos los carriles, en el carril 1 y 6 se observan bandas de diferentes tamaños a el esperado, esto es probablemente a las isoformas de los plásmidos que presentan además de la linealizada, la forma enrollada y superenrollada, aunque ya no se realizaron más pruebas para confirmar esto debido a que nos interesaba obtener las características que se observan en el carril 3 y obtener otras construcciones. Estos resultados coinciden con lo observado en el análisis *in sílico* que se muestran en el anexo V.

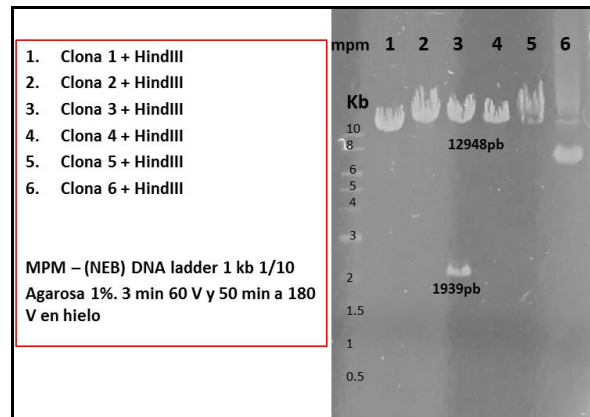


Figura 10 Análisis de restricción con *HindIII* de DNA plasmídico de clonas que se transformaron con la mezcla de ligación de pCGFP y NLSNOS, solo la clona 3 (carril 3) esta transformada, demostrado por la liberación del fragmento de 1939 pb donde se encuentra el gen *l1*

8.6 Obtención de la construcción pPROEX-2ATGNOS

Las 4 clonas transformantes que se obtuvieron al ligar pPROEX con 2ATGNOS fueron analizadas por PCR (carriles 1-4), solo en la clona 1 se amplificó L1NOS, el gen *l1* truncado sin el primer ATG y con el terminador NOS, estas 2 secuencias juntas suman un tamaño de 1892 pb, esto concuerda con el control positivo donde utilizó pCGFPL1, como en esta construcción se encuentra el gen completo con su primer ATG se obtuvo un fragmento más grande de 1970 pb (carriles 5 y 6). También se realizaron restricciones con las enzimas EcoRV y BamHI, se comprobó que solo la clona 1 esta transformada con pPROEX-2ATGNOS al obtenerse los tamaños de 556 pb que

corresponde a los primeros nucleótidos del gen *I1*, 626 y 1114 pb similares a los obtenidos al cortar con EcoRV a pPROEX-GFP, se obtuvo también un fragmento de 4179 pb que corresponde al gen *I1* con NOS y el resto del plásmido, en las otras 3 clonas analizadas se obtuvieron los fragmentos de 626 y 1114 pb, pero no se obtuvo la banda de 556 pb que corresponde a un fragmento de *I1*, y el tamaño del fragmento mayor fue de 2999 pb, lo que nos indica que no está presente *I1* con NOS, sino que solo se trata del vector vacío pPROEX HTb B (carriles 8-10), y esto también fue una comprobación de los resultados negativos obtenidos en la PCR de las clonas 2-4 (carriles 2-4) como se ve en la siguiente figura 11. El análisis *in silico* tanto de la PCR como de las restricciones fueron iguales como se muestra en el anexo VI

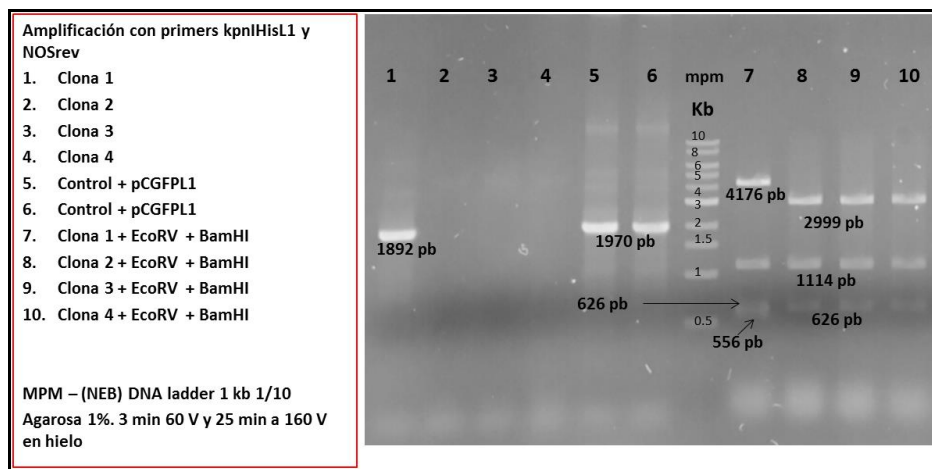


Figura 11 Demostración de la obtención de pPROEX-2ATGNOS por PCR, solo hubo amplificación en la clona 1 (carril 1) y por restricción con EcoRV y BamHI, solo la clona 1 presentó los fragmentos esperados (carril 7)

8.7 Obtención de la construcción pPCGFP2ATG

Se obtuvieron varias clonas transformantes a las cuales se les realizó PCR colony observando que solo 2 amplificaban al gen *I1*. A esas 2 clonas se les extrajo DNA plasmídico y se cortaron con la enzima BamHI, obteniéndose los fragmentos del tamaño esperado en la clona 7 1402 pb que corresponde a eGFP con los primeros nucleótidos de *I1*, y un fragmento grande de 13474 pb que corresponde al resto del gen

l1 y el resto del plásmido (carril 4), la clona 1 liberó el fragmento del tamaño esperado de 1402 pb pero el fragmento grande es de aproximadamente 9000 pb que no corresponde al tamaño de pCGFP (carril 3), esto probablemente se deba al tiempo que se dejó en restricción cuando se preparó el plásmido para ligarse con *l1*, que fue de 6 horas, tal vez la enzima corto de forma inespecífica en otro sitio y por eso el plásmido quedo más pequeño, esta idea está sustentada en el hecho de que la bacteria presenta el gen de resistencia a kanamicina, porque la clona creció en LB con kanamicina y también tiene clonado el gen *l1*, como se observó por PCR, y también por restricción como lo vemos en el carril 3 el fragmento pequeño de 1402 pb corresponde a un corte con BamHI dentro del gen *l1*. Como control se utilizó pCGFPL1 la cual al ser cortada con BamHI libera un fragmento de 1480 pb y la banda del plásmido es de 13474 pb (carril 1), también se utilizó pCGFPΔNLS que se cortó con BamHI y libero el fragmento de 1480 pb y la banda grande de 13407 pb, como se ve en la figura 12. Las diferencias de tamaños de los fragmentos pequeños de pCGFP2ATG que fue de 1402 comparado con los controles de pCGFPL1 y pCGFPΔNLS que fue de 1480 pb se debe a que en esto últimos se trata del gen completo y no de la forma truncada sin los primeros nucleótidos y a partir del segundo ATG como en el caso de pCGFP2ATG, y la diferencia de los fragmentos grandes tanto de pCGFP2ATG como de pCGFPL1 fueron de 13474 los cuales tienen la secuencia completa en el extremo 3', mientras que en pCGFPΔNLS fue de 13407, debido a que en este último caso el gen *l1* esta truncado sin la secuencia de localización nuclear por eso es más pequeño. Estos resultados fueron consistentes en lo encontrado en el análisis bioinformático de las restricciones con BamHI de estas 3 construcciones, como se puede observar en el anexo VII

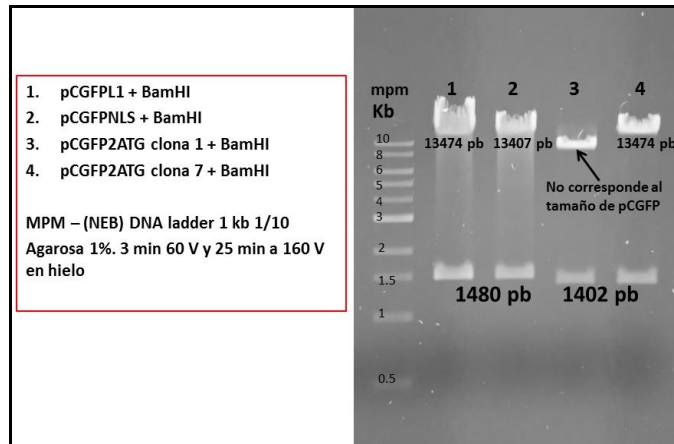


Figura 12 Restricciones con *Bam*HI de DNA plasmídico de pCGFP2ATG (carril 4), pCGFP1 (carril 1) y pCGFPNLS (carril 2), en el carril 3 se esperaba un patrón de banda similar al del carril 4, pero se obtuvo un fragmento grande de tamaño diferente

8.8 Obtención de la construcción pPROEX-GFP2ATG

Se obtuvieron 4 clonas positiva a kanamicina, a las cuales se les realizó *PCR colony* para evidenciar la presencia del gen *I1* sin el primer ATG, todas las clonas dieron positivo a la amplificación (figura 13 carriles 1-4) en contraste con el control negativo donde no estuvo presente la banda (figura 13 carril 5), estos resultados fueron corroborados por restricción con *Eco*RI, y amplificación de *I1* (Figura 14) a partir de DNA plasmídico, el análisis de restricción nos indicó que solo la clona 1 en el carril 1 presento el tamaño de banda esperado 1296 pb, mientras que las demás clonas presentaron el tamaño de *I1* completo, fragmento más grande porque tiene su primer ATG y los primeros 78 pb (carriles 2-4 de la figura 14), las amplificaciones por PCR empleando primers OD2-B que hibridan en el segundo ATG de *I1* y OR1-N (Figura 14 carriles 6-9) fueron similares a los resultados obtenidos en PCR colony (figura 13 carriles 1-4), para demostrar que no se trata de la amplificación de *I1* completo con su primer ATG se realizó amplificación usando los primers OD1L1 que hibridan en el primer ATG y OR1-N, no se esperaba banda de amplificación, similar al resultado de la clona 1 (Figura 14 carril 10) porque al no tener los primeros 78 pb ni el primer ATG entonces el primer OD1L1 no debería hibridar, pero como podemos ver en los carriles

11-13 de esta misma figura si hubo amplificación, por lo que podemos decir que solo la clona 1 esta transformada con pPROEX-GFP2ATG, como no tiene la secuencia del primer ATG, OD1L1 no hibrido y por lo tanto no amplificó, mientras que las demás clonas están trasformadas con pPROEX-GFPL1 porque si tienen la secuencia del primer ATG, OD1L1 si hibrida y por eso podemos ver la banda en el resultado de PCR. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en el análisis *in sílico*, donde se muestran tanto las amplificaciones como las restricciones (anexo VIII) iguales a las mostradas en estos resultados

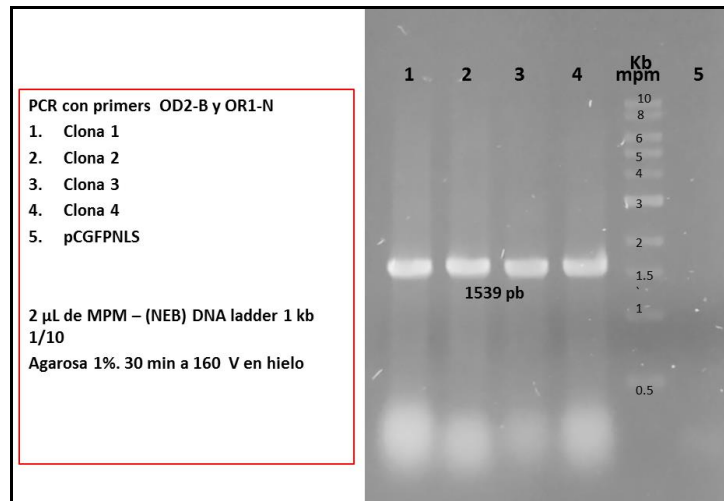


Figura 13 PCR colony de clonas transformadas con la ligación de pPROEX-GFP con 2ATG, se puede observar que en este gel que todas tienen la secuencia del gen *l1* (carriles 1-4), y en el control negativo no hay amplificación (carril 5)

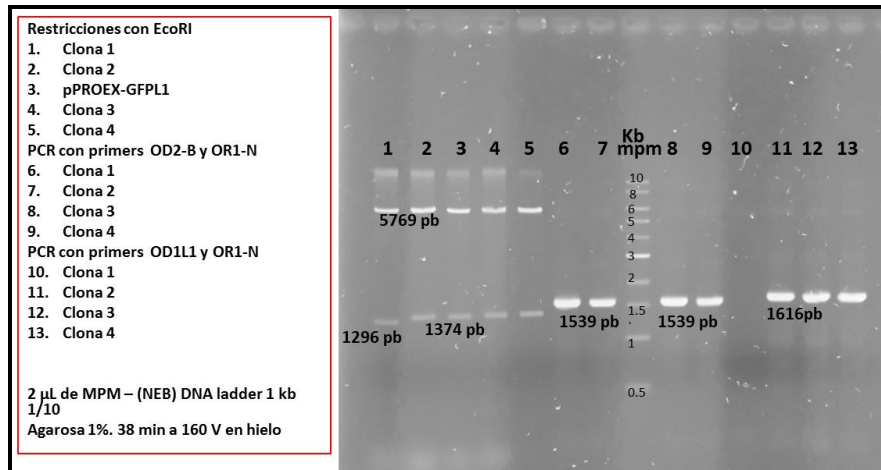


Figura 14 Restricción de pPROEX-GFP2ATG, solo en la clona 1 se obtuvo la banda del tamaño esperado, y se confirmó por PCR al usar primers que toman en cuenta el primer ATG que esta construcción no tiene, por eso no hay amplificación en el carril 10

8.9 PCR colony de cepas de *A. rhizogenes* LBA9402 transformadas con pCGFP Δ NLS

Se transformaron cepas de *A. rhizogenes* con la construcción pCGFP Δ NLS, se realizó PCR colony empleando primers directo OD1L1 y reverso BsaI BglII NLS obteniéndose el fragmento del tamaño esperado de 1553 pb como se puede ver en el carril 1, en el carril 2 se cargó el control negativo que no presento el fragmento amplificado, en el carril 3 se cargó una amplificación empleando el primer reverso OR1-N que hibrida en NLS de 11, como esta construcción no presenta la NLS entonces no hay hibridación y por lo tanto no hay amplificación, en el carril 4 se realizó una amplificación con primers que hibridan en eGFP CMVdir y el reverso BsaI BglII NLS, en este caso se esperaba una banda de 2444 pb, pero no se observa, esto puede deberse a que es difícil obtener la amplificación de fragmentos grandes tomando en cuenta que no se extrajo el DNA, si no que se usó DNA de colonias bacterianas, y aun cuando se utiliza DNA plasmídico purificado de *E. coli*, como se puede observar en el carril 7 la banda es tenue aunque se utilizó DNA plasmídico y puro, la ausencia de bandas puede deberse a lo que ha sido reportado por (Xu and Li 2008) que el aislamiento de vectores binarios de

Agrobacterium pueden ser de bajo rendimiento o baja calidad de pureza, en estos casos se recomienda clonar el DNA plasmídico extraído de *Agrobacterium* y después clonarlo en *E. coli* para extraerlo de esta bacteria y realizar las metodologías que no resultaron positivas al analizarlas en *Agrobacterium*. En el carril 5 es control negativo de CMVdir y BsaIBglIINLS, el carril 6 es un control negativo de los primers KpnIHisL1 y OR1-N, en el carril 7 es el control positivo de amplificación con los primers CMVdir y OR1-N a partir de la construcción pCGFPL1, el carril 8 es control negativo de amplificación de los primer CMVdir y OR1-N (Figura 15). Los resultados son similares a los obtenidos en el análisis informático que se pueden ver en el anexo IX

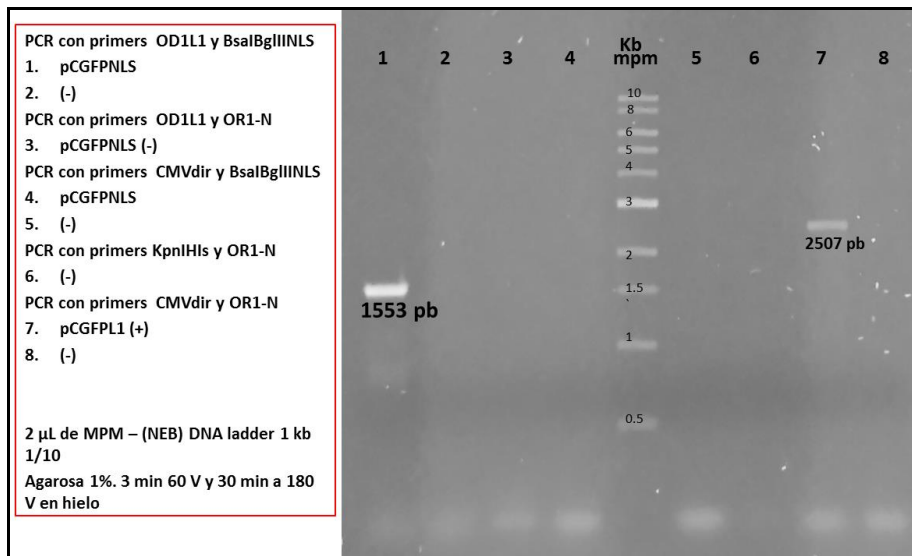


Figura 15 Amplificación de *II* sin NLS (carril 1) y controles negativos (carril 2 y 3), amplificaciones con CMVdir y BsaIBglIINLS no hubo amplificación (carril 4), control positivo de CMVdir y Or1-N (carril 7)

8.10 Amplificación de L1NOS a partir de DNA genómico de raíces

Se obtuvieron raíces transformadas con el gen *l1* completo y truncado sin los primeros 78 pb (2ATG), por medio de transformación con *A. rhizogenes*, las cuales presentan un crecimiento rápido en medio libre de reguladores de crecimiento y conservan el fenotipo de raíces pilosas aún después de subcultivar y tener nuevas generaciones de raíces transformadas como se ha reportado en otros trabajos (Hodges et al. 2004; Shanks and Morgan 1999; Zhou et al. 2007), de estas raíces se extrajo DNA genómico y se amplificó el gen *l1* con el terminador NOS por PCR, obteniéndose los fragmentos del tamaño esperado de 1800 pb que es el gen *l1* sin los primeros 78 pb, es decir a partir de 2ATG y con el terminador NOS, en 2 líneas analizadas la línea transformada con pCGFPL1 (Figura 16, carril 1) y la línea transformada con pCGFP2ATGL1 (Figura 16, carril 2) como control negativo se utilizó el vector vacío pCAMBIA 1305.1 que no tiene *l1*, como se puede observar en el carril 3 no hay amplificación de este gen, y como control positivo DNA plasmídico extraído de *E. coli* de pCGFPL1 que presenta *l1* y el terminador NOS obteniéndose el fragmento esperado de 1800 pb (carril 4). Aunque la construcción pCGFPL1 tiene el gen *l1* completo y pCGFP2ATG tiene el gen truncado sin los primeros 78 pb, en la PCR se obtuvo el fragmento de PCR del mismo tamaño debido a que el primer directo OD2B hibrida en el segundo ATG y no se toman en cuenta los primeros 78 pb, por eso tanto en pCGFPL1 como en pCGFP2ATG la banda es de 1800 pb. El resultado es similar al análisis *in silico* donde se puede observar la banda de 1800 pb (anexo X), la otra banda más grande que se observa en este análisis bioinformático es porque tanto L1 como GUSplus tienen terminador NOS, por eso hay posibilidad de obtener la banda de 4930 pb, en este trabajo no se encontró esa banda como se puede ver en los resultados, esto es porque fragmentos mayores a 3 kb es difícil obtenerlos por métodos normales de amplificación, además de que el tiempo de amplificación es de 1 minuto, por eso no se obtiene esa banda de mayor tamaño

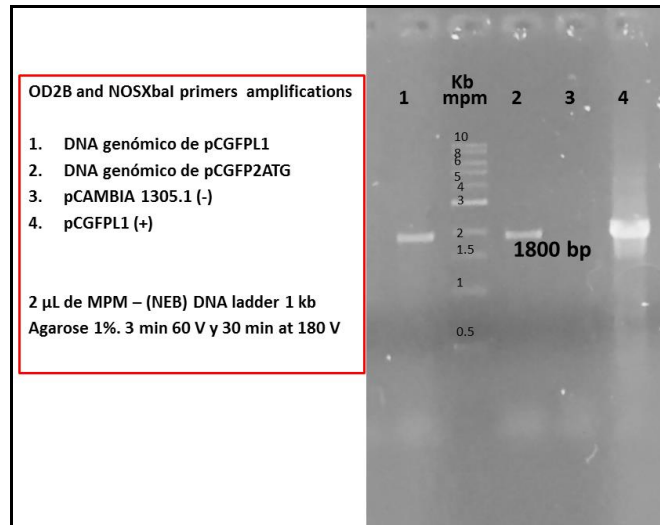


Figura 16 PCR del gen II con el terminador NOS, se obtuvo el fragmento del tamaño esperado en la líneas de raíces analizadas (carril 1 y 2), así como en el control positivo (carril 4), y no se observó en el control negativo (carril 3)

8.11 Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el crecimiento y diferenciación de explantes

Los reguladores de crecimiento incrementaron la elongación, ramificación de las raíces y diferenciación de los explantes (Figura 17) en los tratamientos 2, 6 y 7 en la zona de concentración de 0.05 mg/L de IAA, Kin y GA3, resultados similares para la concentración de auxina han sido reportados en (Kartha et al. 1974; Meurant 2012) en chícharo *Pisum sativum* con 0.18 mg/L de NAA se mejoró la producción de raíces, pero en estos casos a partir de brotes y no de raíces. En el tratamiento 25 con 10 mg/L de IAA y 10 mg/L de Kin se observó el mayor efecto de elongación y ramificación de raíces, siendo estas concentraciones donde se obtuvo una mayor cantidad de biomasa. Este resultado es consistente con lo reportado por (Bálványos et al. 2001) para la auxina IAA, donde se observa que a medida que se incrementa la concentración hasta 5 mg/L se mejora el crecimiento de raíces. Sin embargo, también se obtuvo un resultado contrario para Kin, porque reportan que las concentraciones más altas probadas de esta hormona (2 y 5 mg/L) inhiben el crecimiento de raíces, esto puede deberse a que en este trabajo se utilizaron raíces no transformadas, mientras que

(Bálványos et al. 2001) trabaja con raíces transgénicas, y cuando se trabajó con raíces transformadas con pCAMBIA se encontró el mismo comportamiento con estas hormonas.

Las raíces de los tratamientos con 5 y 10 mg/L de Kin se empezaban a poner café igual que las raíces de los tratamientos con 5 y 10 mg/L de IAA. También se observó un mayor crecimiento de las raíces gruesa generadas a partir de los cotiledones de los tratamientos 3, 4, 9, 10, 13, 15 y 25, estos resultados concuerdan con (Cao and Earle 2003) donde se reporta que las concentraciones más altas de auxina favorecen la producción de raíces de hojas de brócoli, mientras que el aumento de citocinina favorece la producción de brotes, los cotiledones del tratamiento 25 se transformaron casi en su totalidad en raíces.

Los hipocotilos con mayor producción de callos fueron los del tratamiento 8 en 0.5 mg/L de IAA, 0.05 mg/L de Kin y 10 mg/L de GA₃, los resultados son cercanos (en el diseño experimental) a los encontrados en (Clare and Collin 1974; Meurant 2012) para la producción de callos a partir de explantes de col de Bruselas *Brassica oleracea* con 2 mg/L de IAA, 0.5 mg/L de Kin y 1 mg/L de IBA, aunque las cantidades para producción de callos a partir de tallos son más parecidos a los reportados en (Meurant 2012; Tilquin 1979) para tapioca *Manihot esculenta* con 0.07 mg/L de 6BA, 0.24 mg/L de NAA y 0.65 mg/L de GA₃.

También se observó la producción de brotes en hipocotilos de los tratamientos 3, 11, 12, 14 y 23, en la zona de 0.5 mg/L de Kin y 0.5 mg/L de IAA, estos resultados son similares a los reportados en (Bajaj and Nietsch 1975; Meurant 2012) con col morada *Brassica oleracea* var. *capitata* con 0.05 mg/L de Kin y 0.1 mg/L de IAA se produjeron también brotes a partir de hipocotilos. También se produjeron brotes en hipocotilos y cotiledones de los tratamientos 7 y 24, en los cotiledones del tratamiento 15 con un 100% de producción de brotes, en hipocotilos y raíces del tratamiento 16, 17, 18 y 22, en la zona de 0.5 mg/L de Kin, estos resultados son parecidos a los reportados en (Meurant 2012; Skirvin and Janick 1976) para geranio *Velargonium spp* donde se produjeron brotes a partir de peciolos con 0.09 mg/L NAA y 10 mg/L de Kin; también hubo producción de brotes en hipocotilos, raíces y cotiledones del tratamiento 21 con

Kin 10 mg/L y 10 mg/L de GA₃ similar a lo reportado en (Meurant 2012; Skirvin and Janick 1976) pero con 0.09 mg/L NAA y sin GA₃.

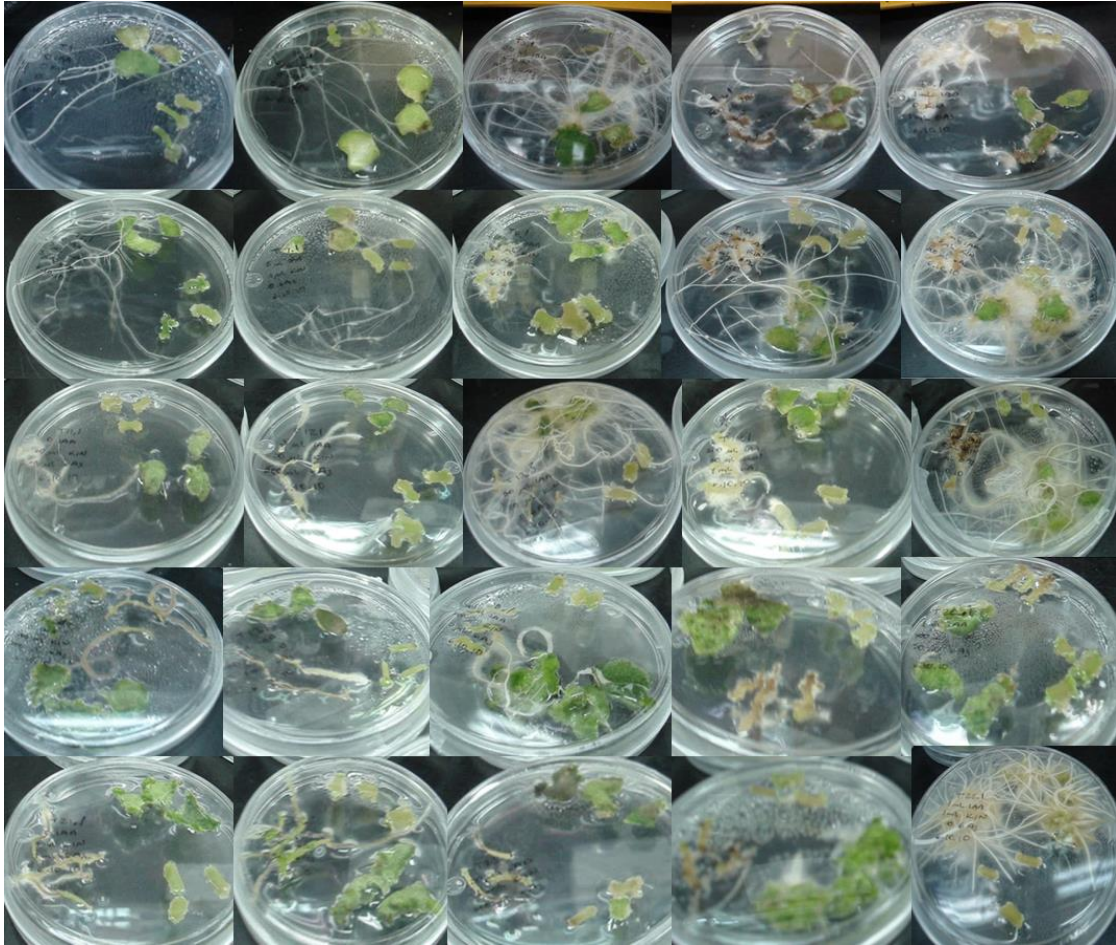


Figura 17 Efecto de los reguladores de crecimiento de la tabla 3, tercera semana de cultivo. Las placas están ordenadas de acuerdo al número de tratamiento del 1 al 25.

8.11.1 Regeneración de explantes

Tabla 5 Efectos de regeneración de explantes a raíces, callos y brotes

A)						B)						C)								
Medio MS (3% sacarosa, 1.8 g/l fitigel)		IAA (Auxina) mg/L					Medio MS (3% sacarosa, 1.8 g/l fitigel)		IAA (Auxina) mg/L					Medio MS (3% sacarosa, 1.8 g/l fitigel)		IAA (Auxina) mg/L				
		0	0.05	0.5	5.0	10.0			0	0.05	0.5	5.0	10.0			0	0.05	0.5	5.0	10.0
Kin (CITO CINA) mg/L	0	A	B	C	D	E	Kin (CITO CINA) mg/L	0	A	B	C	D	E	Kin (CITO CINA) mg/L	0	A	B	C	D	E
	0.05	B	A	E	C	D		0.05	B	A	E	C	D		0.05	B	A	E	C	D
	0.5	C	D	A	E	B		0.5	C	D	A	E	B		0.5	C	D	A	E	B
	5.0	D	E	B	A	C		5.0	D	E	B	A	C		5.0	D	E	B	A	C
	10.0	E	C	D	B	A		10.0	E	C	D	B	A		10.0	E	C	D	B	A

GA₃: A = 0, B = 0.05, C = 0.5, D = 5, E = 10 mg/l

Raíz
Callo
Brote

Las principales respuestas de regeneración fueron a raíces, callos y brotes. En la primera tabla (Tabla 5-A) se muestran los tratamientos donde hubo regeneración de raíces a partir de cotiledones, podemos observar que aun en los tratamientos con 0 mg/L de GA3 hubo generación de raíces, lo cual nos indica que este regulador no es necesario y por el contrario puede tener un efecto negativo en concentraciones altas como en el caso de los tratamientos 4, 5 y 14. Los mejores tratamientos fueron a concentraciones altas de IAA y el mejor tratamiento fue el 25 con 10 mg/L de IAA y 10 mg/L de Kin.

En el caso de la regeneración de callos (Tabla 5-B), el efecto se observó en casi todos los tratamientos, principalmente a partir de los hipocotilos, el mejor tratamiento fue el 8 con 0.5 mg/L de IAA, 0.05 de Kin y 10 mg/L de GA3

En la tercera tabla (Tabla 5-C), la regeneración de brotes se ve favorecida por el incremento de concentración de Kin, aunque el mejor tratamiento fue el 15 con 10 mg/L de IAA y 0.5 mg/L de Kin.

Nuestros resultados coinciden con (Cao and Earle 2003) quien encontró que la combinación de BA 5 mg/l con IAA 4 mg/l resulta en una buena inducción de formación de brotes; disminuyendo la concentración de IAA se reduce la frecuencia de formación de brotes y aumentando la concentración de IAA se induce la formación de raíces.

8.11.2 Peso fresco y seco de los explantes de raíces

La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo favoreció la producción de biomasa en las raíces comparada con el control (tratamiento 1 sin reguladores de crecimiento) como se puede observar en la tabla 6 y en la figura 18, sin embargo, es importante resaltar que, como se ha mencionado anteriormente, en algunos tratamientos las raíces se hacían verdes (tratamientos con 5 mg/L y 10 mg/L de Kin), gruesas y con brotes (tratamientos 16, 17, 21 y 22), este resultado de formación de brotes coincide con los resultados de (Cao and Earle 2003) quien encontró una alta frecuencia de formación de brotes en un medio con 5 mg/l BA combinado con 0.5-2.0 mg/l NAA. Y en otros casos las raíces parecían que se inhibía el crecimiento se transformaban en callos (tratamientos con 5 mg/L y 10 mg/L de IAA) y se ponían cafés. En el caso del tratamiento 25 que fue donde se obtuvo la mayor cantidad de biomasa de acuerdo al peso fresco y peso seco, es importante mencionar que el explante en un principio su crecimiento fue inhibido después se transformó en callo y de los callos aparecieron nuevamente raíces gruesas con un mayor crecimiento comparadas con los demás tratamientos. Nuestros resultados coinciden con (Qin et al. 2007) quien llevo un cultivo solo hasta 2 mg/L de NAA pero observo que incrementando la concentración de NAA se promovía la formación de raíces.

Tabla 6. Análisis de varianza de peso fresco A) y peso seco B) de explantes raíces

A)						B)					
Variable dependiente: peso fresco raíces						Variable dependiente: peso seco raíces					
Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Kin	8.130	4	2.033	3.478	.013	kin	.014	4	.003	3.365	.015
IAA	1.733	4	.433	.741	.568	iaa	.003	4	.001	.740	.569
ga3	.901	4	.225	.385	.818	ga3	.000	4	8.023E-5	.080	.988
Error	33.900	58	.584			Error	.058	58	.001		
Total	74.382	71				Total	.167	71			

a. R cuadrado = .239
Scheffe 10-0.05 0.039

a. R cuadrado = .223
Nivel de confianza de 95

El análisis de varianza para el peso fresco de raíces (tabla 6-A) y peso seco de raíces (tabla 6-B) se muestra que solo la cinetina presenta un valor significativo, y el análisis post anova empleando la prueba de Scheffe con una significancia de

0.039 encontramos que el mejor tratamiento para la producción de biomasa es el 25 con 10 mg/L de cinetina.

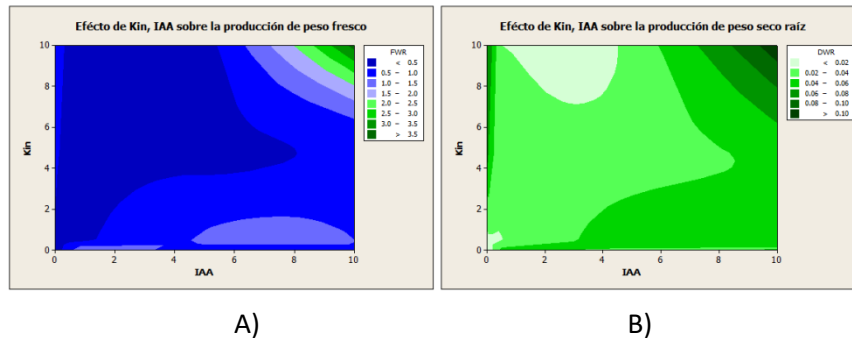


Figura 18 *Peso fresco (A) y peso seco (B) en gramos de biomasa de los explantes de raíces de los 25 tratamientos con sus 3 repeticiones a 3 semanas de cultivo*

En las gráficas de las figuras 18-A y 18-B se muestra las zonas donde se encontró la mayor producción de biomasa que fue el tratamiento 25 con las concentraciones de 10 mg/L de kin y 10 mg/L de IAA.

8.11.3 **Peso fresco y seco de los explantes de hipocotilos**

La mayoría de los explantes de hipocotilos regeneraban a callos en los polos del hipocotilo, este efecto se observó también en los controles, aunque en este caso el inicio de este efecto se notó solo a partir de la tercera semana, mientras que en los otros tratamientos se pudo observar a partir de la primera semana. En algunos tratamientos como el 4 y el 23 los hipocotilos se pusieron de un color oscuro y parecía que se adelgazaban. Estos efectos se reflejaron en el peso final de la biomasa de los explantes de hipocotilos (Tabla 7 y Figura 19). En algunos tratamientos como el 7 y el 11 se observó la generación de brotes, aunque la biomasa en gramos no fue alterada tanto como en los brotes de raíces anteriormente mencionados.

Tabla 7. Análisis de varianza de peso fresco A) y seco B) de explantes de hipocotilos

A)						B)					
Variable dependiente: peso fresco hipocotilos						Variable dependiente: peso seco hipocotilos					
Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
kin	.463	4	.116	1.045	.392	kin	.002	4	.000	.843	.504
iaa	.648	4	.162	1.463	.225	iaa	.002	4	.000	.863	.492
ga3	.610	4	.152	1.376	.253	ga3	.002	4	.001	1.149	.343
Error	6.422	58	.111			Error	.028	58	.000		
Total	40.146	71				Total	.306	71			

a. R cuadrado = .215

a. R cuadrado = .171

Nivel de confianza de 95

En el análisis de varianza de peso fresco (Tabla 7-A) y peso seco (Tabla 7-B) no se encontró efecto significativo de los reguladores de crecimiento sobre la producción de biomasa de hipocotilos, lo cual concuerda con lo observado en el análisis cualitativo donde solo se encontró diferenciación a callos y no hubo crecimiento de los explantes de hipocotilos.

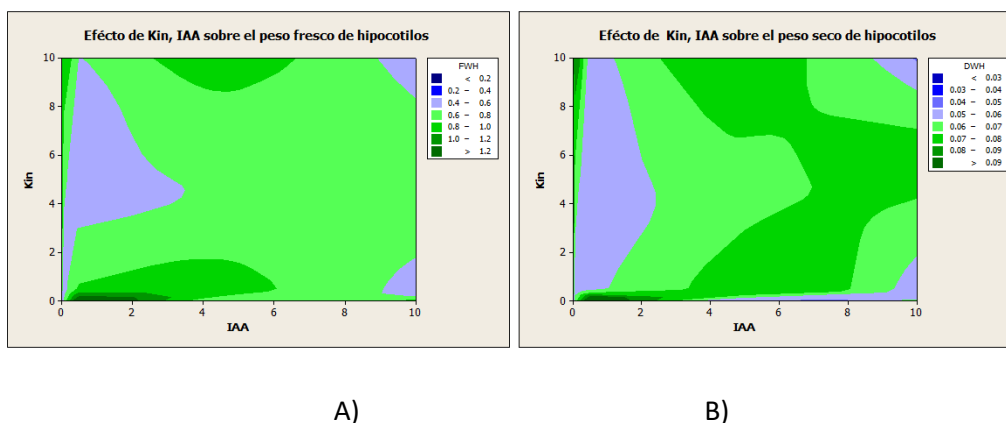


Figura 19 Peso fresco (A) y peso seco (B) en gramos de biomasa de los explantes de hipocotilos de los 25 tratamientos con sus 3 repeticiones a 3 semanas de cultivo

En las gráficas de peso fresco (Figura 19-A) y peso seco (Figura 19-B) de hipocotilos, se puede observar que el tratamiento con mayor producción de biomasa es el mismo tratamiento 8 con 0.5 mg/L de IAA, 0.05 mg/L de Kin y 10 mg/L de GA₃

8.11.4 Peso fresco y seco de los explantes de cotiledones

En explantes de cotiledones fue donde se obtuvo una mayor cantidad de biomasa como se puede observar en la tabla 8 y figura 120, de hasta 9 g (Tratamiento 15) principalmente por la regeneración de raíces que cubrían toda la placa (tratamientos 3, 6, 10, 15) y la generación de brotes (tratamiento 15 y 24). Es importante mencionar que en el caso del tratamiento 25 con 10 mg/L de IAA y 10 mg/L de Kin los cotiledones se transformaron casi en su totalidad en raíces gruesas con crecimiento rápido, además de ser este tratamiento donde se obtuvo una mayor cantidad de biomasa de explantes de raíces lo cual concuerda con los resultados encontrados por (Qin et al. 2007) quien empleo explantes de cotiledones para buscar regeneración a brotes y observo que incrementando la concentración de NAA se promovió la formación de raíces. También coinciden con (Cao and Earle 2003) quien empleo explantes de hoja de brócoli y encontró que la combinación de BA 5 mg/l con IAA 4 mg/l resulta en una buena inducción de formación de brotes; disminuyendo la concentración de IAA se reduce la frecuencia de formación de brotes y aumentando la concentración de IAA se induce la formación de raíces.

Tabla 8. *Análisis de varianza de peso fresco A) y seco B) de explantes de cotiledones*

A)						B)					
Variable dependiente: peso fresco cotiledones						Variable dependiente: peso seco cotiledones					
Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
kin	26.884	4	6.721	1.483	.219	kin	.036	4	.009	1.799	.141
iaa	28.361	4	7.090	1.564	.196	iaa	.023	4	.006	1.140	.347
ga3	14.453	4	3.613	.797	.532	ga3	.014	4	.003	.683	.606
Error	262.901	58	4.533			Error	.290	58	.005		
Total	651.550	71				Total	1.384	71			

a. R cuadrado = .208

a. R cuadrado = .204 (R cuadrado corregida = .039)

Nivel de confianza de 95

En el análisis de varianza de peso fresco (Tabla 8-A) y peso seco (Tabla 8-B) no se encontró efecto significativo de los reguladores de crecimiento sobre la producción de biomasa de cotiledones esto puede deberse a que la mayoría de

estos explantes regenero a nuevos tejidos como raíces y brotes, por lo que los pesos finales se mantuvieron homogéneos.

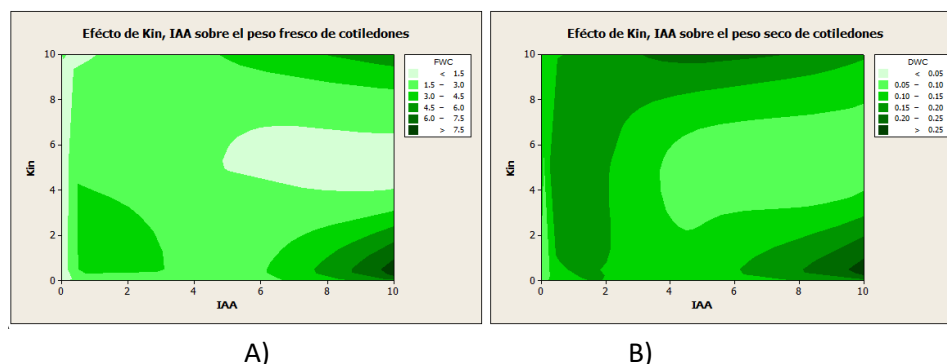


Figura 20 *Peso fresco (A) y peso seco (B) en gramos de biomasa de los explantes de cotiledones de los 25 tratamientos con sus 3 repeticiones a 3 semanas de cultivo*

En las gráficas de peso fresco (Figura 20-A) y peso seco (Figura 20-B) el tratamiento con mayor producción de biomasa como podemos ver en las gráficas fue el tratamiento 15 que fue donde los cotiledones generaron tanto raíces como brotes con 0.5 mg/L de Kin y 10 mg/L de IAA y 0.05 de GA3

8.12 Efecto de IAA y Kin sobre el crecimiento de raíces transformadas con pCAMBIA

La adición de IAA (Figura 21) favorece el crecimiento, mientras que la Kin lo disminuye hasta prácticamente suprimirlo, lo que concuerdan con lo reportado por otros autores como (Bálványos et al. 2001), quien obtuvo el mismo efecto para IAA y Kin en raíces transformadas, y (Cao and Earle 2003) quienes observaron en explantes de hojas que a medida que aumentaba la concentración de IAA aumentaba la regeneración de raíces y si aumentaba la concentración de Bencilaminopurina (BAP) favorecía la formación de brotes e inhibía la formación

de raíces. El análisis de peso fresco demostró que a medida que se aumenta la concentración de IAA se incrementa la cantidad de biomasa hasta obtener un valor de 4 veces mayor al control al utilizar la máxima concentración de IAA que fue de 1 mg/L, mientras que la a medida que se incrementa la concentración de Kin la cantidad de biomasa disminuye hasta 2 veces menos que el control en la máxima concentración de 1 mg/L

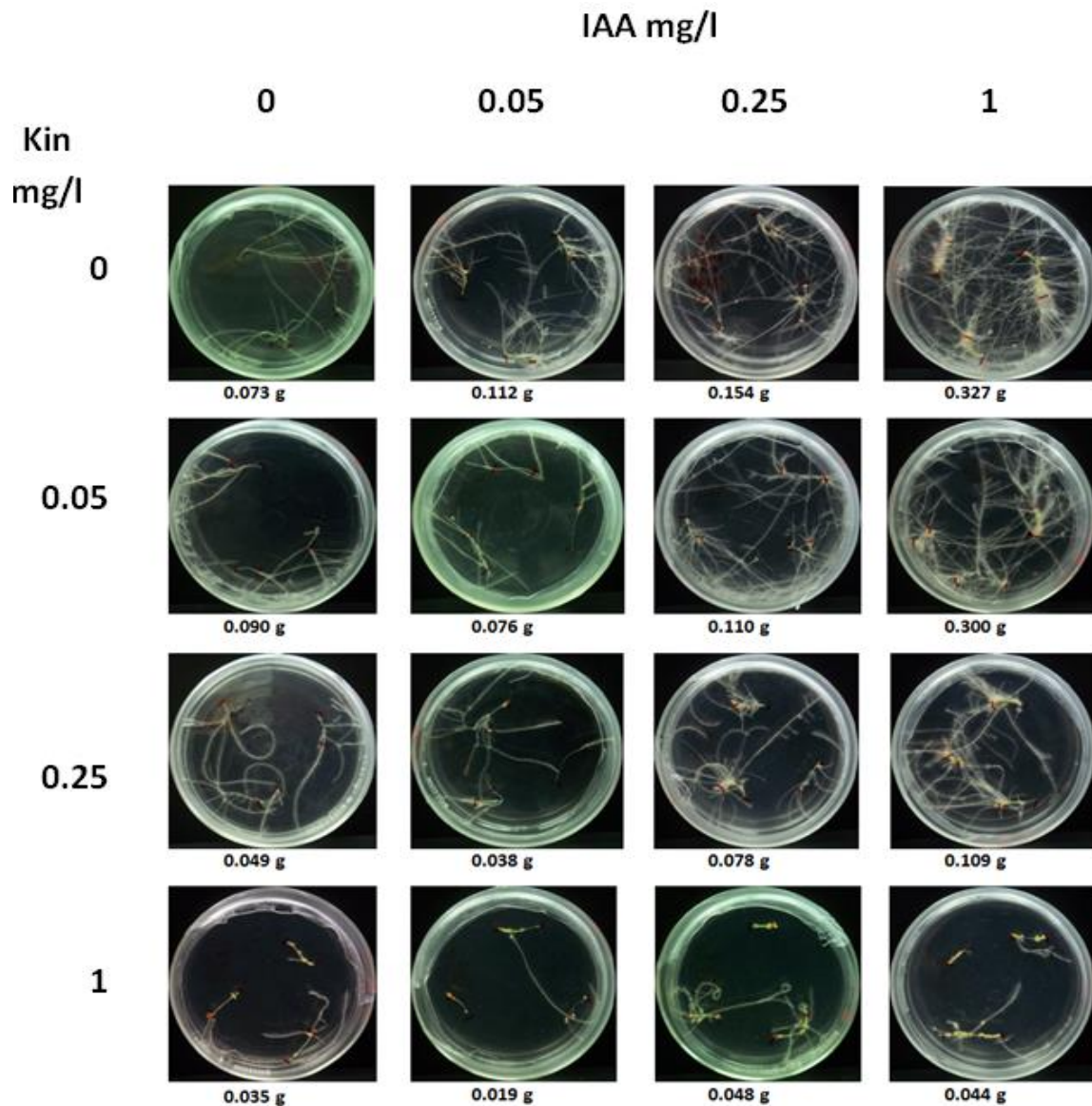


Figura 21 Efecto de reguladores de crecimiento IAA y Kin sobre el crecimiento de raíces transformadas. El IAA favorece el crecimiento mientras que Kin lo inhibe. Se muestra el promedio de peso fresco en gramos de cada uno de los diferentes tratamientos

8.13 Ensayo de β -glucuronidasa

Se han obtenido líneas de raíces de brócoli transformadas con el gen de la proteína L1 del HPV16, mediante el ensayo de β -glucuronidasa nos podemos dar cuenta que *Agrobacterium rhizogenes* ha transferido el T-DNA del plásmido pCAMBIA con el gen *l1* por la observación de la coloración azul en las líneas de raíces probadas en concordancia con el control positivo de raíces transformadas con pCAMBIA y en contraste con el control negativo de raíces no transformadas (Figura 22 y 23) resultados similares a los de (Jefferson 1987; Karcher 2002). También se han obtenido dos líneas de raíces transformadas con el gen de la proteína L1 positivas al ensayo de β -glucuronidasa y con el fenotipo de raíces pilosas con rápido crecimiento en medio libre de reguladores de crecimiento (Figura 23), similares al fenotipo de raíces obtenidas por (Henzi et al. 2000) y por (García 2009).

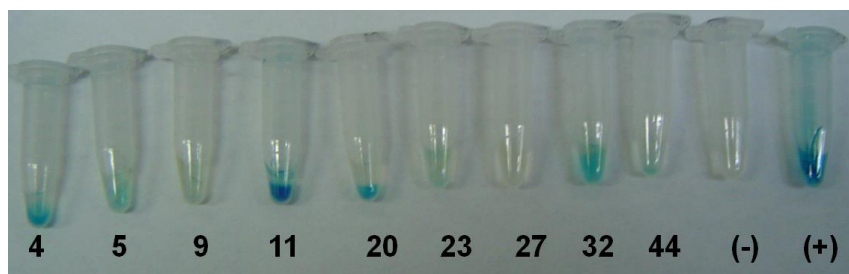


Figura 22 Ensayo de β -glucuronidasa, en la fotografía se muestran 9 líneas positivas y los controles negativo y positivo.

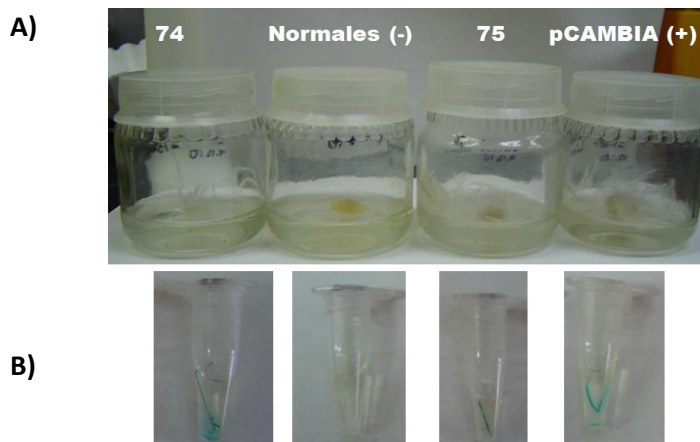


Figura 23 Raíces pilosas con crecimiento rápido en medio sin reguladores de crecimiento líneas 74 y 75 comparadas con raíces normales y raíces transformadas con pCAMBIA 1105.1 (A), la demostración de la transformación se llevó a cabo mediante el ensayo de β -glucuronidasa (B)

8.14 Localización del sitio de acumulación de la proteína L1

Para localizar el sitio de acumulación de la proteína L1 en el tejido radicular se realizaron experimentos de tinción inmunohistoquímica de cortes del tejido radicular de raíces transformadas con el T-DNA de pCAMBIA y de pCAMHisL1 (Figura 24). Se pudo observar la presencia de señales dispersas pero claras de fluorescencia verde en el tejido transformado con el T-DNA de pCAMHisL1 (Figura 24B-24D) en comparación con el tejido transformado con el T-DNA de pCAMBIA (Figura 24A). Estos resultados demuestran que la proteína L1 está en el tejido y que es reconocida por los anticuerpos primario CAMVIR-1, ese anticuerpo también se ha utilizado en otros trabajos para inmunofluorescencia como lo reportado en (Zanotto et al. 2011), a su vez el anticuerpo primario es reconocido por el secundario anti ratón asociado a FITC, y la dispersión de la señal sugiere que la proteína puede estar distribuida en diferentes partes de la célula sin tener un sitio o tejido particular para su acumulación. Por otra parte, la débil señal del control negativo, que es tejido transformado con el T-DNA de pCAMBIA (Figura 24A), se

debe a la autofluorescencia natural de las células vegetales. Porque al realizar fotoblanqueamiento con luz UV se encontró la señal de fluorescencia verde solo en las raíces transformadas (Figura 24E), en contraste con las raíces control no transformadas que no presentaron la fluorescencia verde, solo la azul del colorante de contratinción DAPI (Figura 24F)

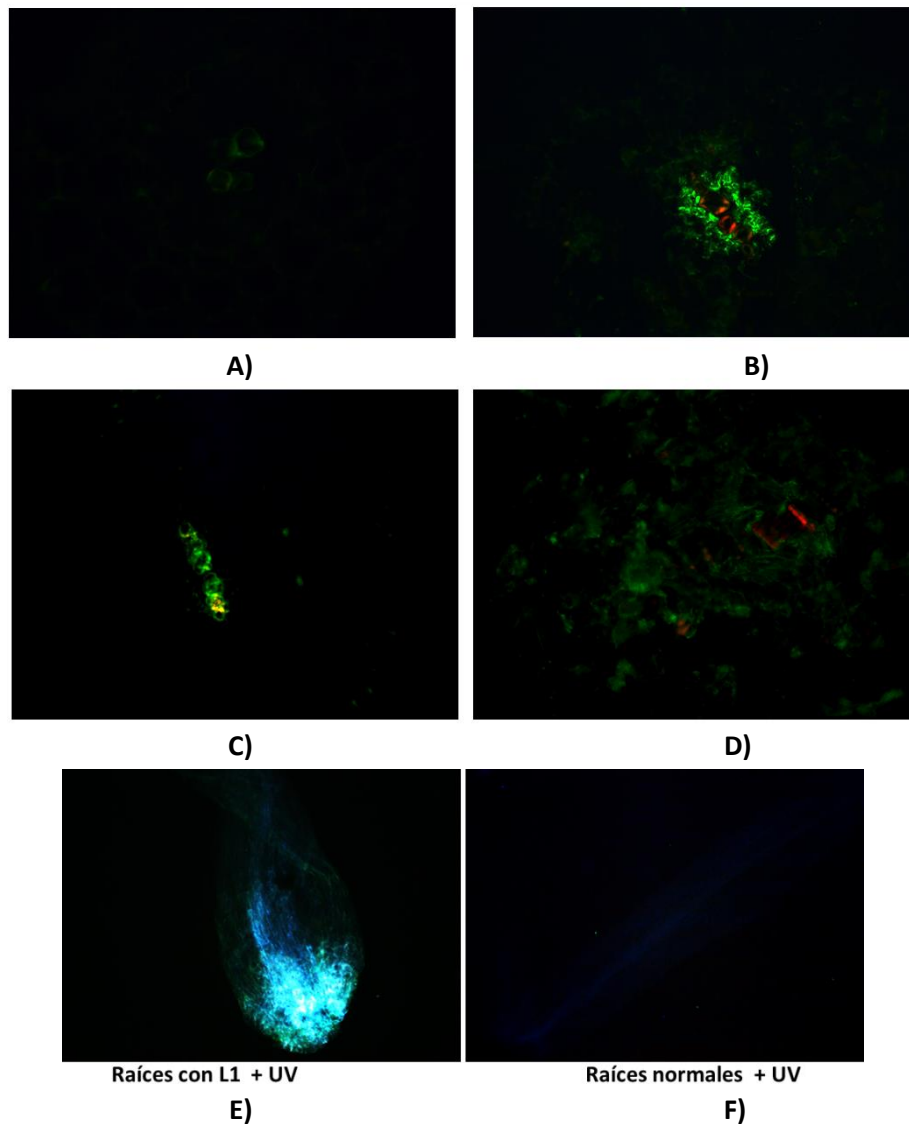


Figura 24 Tinción inmunohistoquímica de raíces transformadas con el T-DNA de pCAMBIA A) y el T-DNA de pCAMHisL1 B) a D). La fluorescencia verde nos demuestra la presencia de la proteína L1 en el tejido. En el control negativo se observa una señal débil por la autofluorescencia del tejido. La autofluorescencia se eliminó con luz UV (E y F)

Producción de proteína L1 en E. coli

8.15 Solubilización de proteína L1 a partir de cuerpos de inclusión

En algunas referencias como (Zhang et al. 1998) se menciona la solubilización de cuerpos de inclusión de L1 con Urea 8 M, en este trabajo se utilizó un buffer con urea 8 M pero no se pudieron solubilizar los cuerpos de inclusión, también se observó que al usar el buffer Laemmli de un extracto proteico si se lograba ver la banda de proteína L1, por esta razón se usó este buffer a media concentración y sin azul de bromofenol lográndose solubilizar estos cuerpos de inclusión como se puede ver la banda de L1 en el gel de SDS page indicado por las flechas. Se evaluó si una precipitación con acetona tenía que ver con la resolubilización y como se puede observar en el carril 1 con acetona y el carril 4 sin acetona y solo resuspendido con agua no se observa claramente la banda de L1. Entonces, enfocándonos en los componentes del buffer Laemmli, los que podrían tener un papel en la solubilización serían el DTT y el SDS, se evaluó entre usar y no el DTT y los resultados fueron similares por lo que se descartó este componente, quedando el SDS como el compuesto responsable de la solubilización. Además se realizó solubilización con diferentes concentraciones de SDS, como se puede mostrar en los tubos, las concentraciones de 0.5, y 0.25% solubilizan los cuerpos de inclusión, mientras concentraciones de 0.1% o menores ya no se solubilizan y se forman los pellets

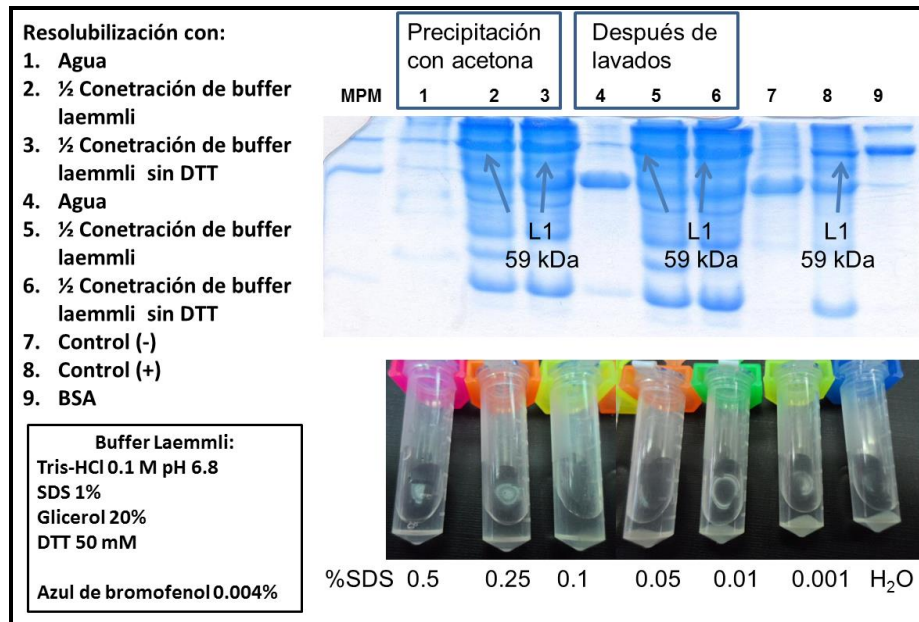


Figura 25 Solubilización de cuerpos de inclusión, demostrado por la aparición de la banda de L1 en geles de SDS-PAGE, y en los tubos se muestra que las concentraciones de 0.25% de SDS o mayores solubilizan los cuerpos de inclusión, mientras que concentraciones de 0.1% o menores ya no solubilizan

8.16 Producción de L1 en *E. coli* DH5 α , BL21, Rosetta 1 y Rosetta 2

Se realizó inducción de producción de proteína L1 en las cepas de *E. coli* DH5 α , BL21, y Rosetta 1 y Rosetta 2, las cepas roseta se emplearon porque se ha reportado en (Gu et al. 2004; Zhao and Chen 2011; Zhao et al. 2005; Zhou et al. 1999) que L1 tiene codones de poco uso para *E. coli*, como controles se utilizaron extractos de proteína de cultivos de las mismas cepas sin inducir, no se observó producción de proteína L1 en las cepas control sin inducir, pero si se produjo en las 4 cepas donde se indujo con IPTG se pudo observar una menor producción en DH5 α , se observó la banda de L1 en BL21 y apareció con mayor intensidad en las cepas Rosetta 1 y 2 (Figura 26 se indicada la banda que corresponde al tamaño de la proteína L1 por las flechas), la razón por la que en las cepas de *E. coli*

Rosetta hubo una mayor producción puede ser porque aunque L1 es de origen viral esta se produce en células eucariotas humanas y como se ha mencionado en los antecedentes Rosetta presenta un plásmido que favorece la producción de proteínas eucariotas a diferencia de DH5 α o BL21 que no presentan este plásmido

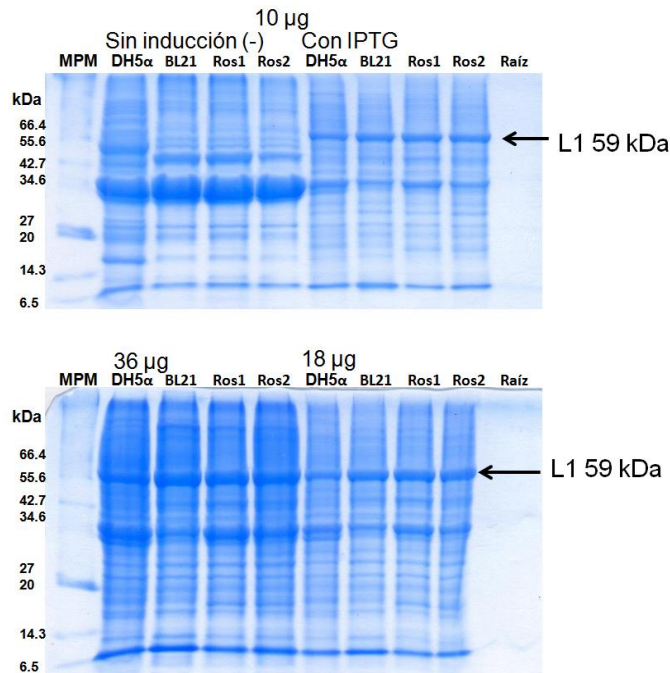
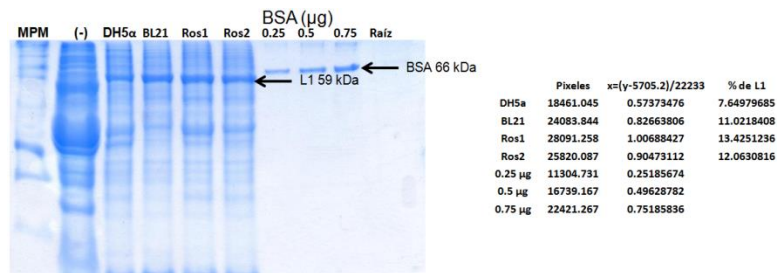


Figura 26 Producción de proteína L1 en DH5 α , BL21, Rosetta 1 y Rosetta 2, no se observó producción en los controles sin IPTG, L1 solo se produce cuando se induce con IPTG en las 4 cepas, las bandas que corresponde a L1 son indicadas por las flechas

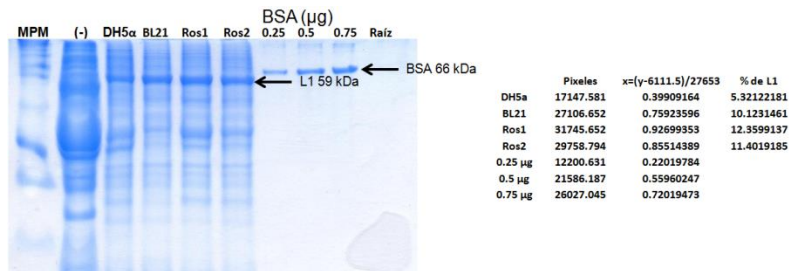
8.17 Comparación cuantitativa de producción de L1 en las 4 cepas de E. coli

Se realizó nuevamente SDS-PAGE para realizar la cuantificación por densitometría, se cargó 7.5 μ g de proteína total de los extractos de las 4 cepas y se cargaron cantidades conocidas de BSA, se midieron los pixeles en cada banda con el programa ImageJ y con los resultados obtenidos se graficó una curva relacionando las cantidades de proteína conocida con los valores de pixeles obtenidos, después se utilizaron los valores de los pixeles de las muestras para

conocer la cantidad de proteína en cada muestra y se encontró que DH5 α presentaba 0.57 μ g de L1 o 7.64% con respecto a proteína total cargada, BL21 0.82 μ g o 11.02%, Rosetta1 1.00 μ g o 13.42% y Rosetta2 0.90 μ g o 12.06% (Figura 27A) y no hubo mucha variación en el duplicado donde se encontró que DH5 α presenta 0.39 μ g o 5.32%, BL21 0.75 o 10.12%, Rosetta1 0.92 μ g o 12.35% y Rosetta2 0.85 μ g o 11.40% (Figura 27B). La mayor producción de proteína L1 es en Rosetta1 y la menor producción es en DH5 α .



A)



B)

Figura 27 Producción de proteína L1 en DH5 α , BL21, Rosetta 1 y Rosetta 2, La mayor producción de proteína L1 es en Rosetta 1 y la menor producción es en DH5 α , no se encontró mucha diferencia en el duplicado (A y B)

8.18 Detección de L1 por Western blot

Se realizó Western blot para la detección de proteína L1 de acuerdo a la metodología previamente descrita. Se extrajo proteína de *E. coli* DH5 α sin transformar, transformada con pPROEX, transformada con pPROEX-L1 sin inducción con IPTG y con IPTG y se analizó tanto los cuerpos de inclusión solubilizados (lisado), como la fracción soluble. Se observaron 3 bandas, un resultado similar al de (Zhang et al. 1998), que también encontró la señal de L1 con 3 bandas al solubilizar sus cuerpos de inclusión con urea 8 M. Solo hay señal en las células inducidas con IPTG y en los cuerpos de inclusión solubilizados, no se encontró en la fracción soluble y en ninguno de los controles que fueron DH5 α , pPROEX vacío, y pPROEX-L1 sin inducir, por lo que este resultado nos indica que la proteína L1 solo se encuentra en los cuerpos de inclusión y como se esperaba solo en células inducidas con IPTG

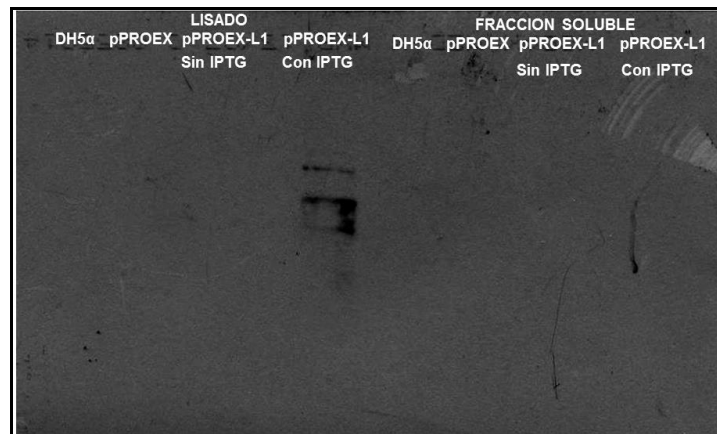


Figura 28 Detección de L1 por Western blot , solo se observaron las bandas de L1 en el carril donde se cargó proteína L1 solubilizada de cuerpos de inclusión

8.19 Proteína L1 obtenida por cromatografía de afinidad a níquel

Se realizó cromatografía de afinidad a níquel y se obtuvo la banda del tamaño esperado de la proteína L1 al eluir con 100 mM de imidazol y también se observan otras bandas más pequeñas, probablemente proteínas unidas débilmente o péptidos de L1 unidos a GroEL como lo sugiere (Chen et al. 2001) que tuvo dificultades para purificar L1 fusionada a glutatión y al analizar los péptidos encontró que la secuencia de GroEL coeluye con L1 porque tienen una fuerte afinidad, tanto (Chen et al. 2001) como (Zhang et al. 1998) sugieren realizar lavados con buffers de baja concentración de sal como ATP-MgCl₂, o NaCl 100 mM antes de eluir la proteína para obtener una banda de L1 más pura y eliminar las proteínas débilmente unidas al níquel. Como fue la estandarización de condiciones de cromatografía también se utilizaron concentraciones más altas de 200, 250 y 500 mM de imidazol

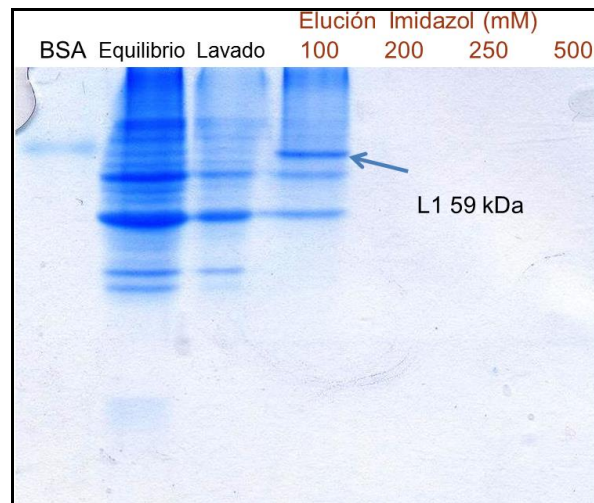


Figura 29 Cromatografía de afinidad a níquel, se puede observar la banda de proteína L1 indicada por la flecha, al eluir con 100 mM de imidazol

IX. CONCLUSIONES

Los factores nutricionales empleados, en este trabajo, específicamente los reguladores de crecimiento IAA y Kin afectaron el crecimiento y elongación de las raíces transformadas. El IAA favoreció el crecimiento, mientras Kin lo inhibió.

Se obtuvieron construcciones con el gen *l1* completo y variaciones con 2ATG y sin la NLS. Las construcciones se clonaron en *A. rhizogenes*, pero no se obtuvieron raíces transformadas con *l1* sin la NLS, solo con el gen *l1* completo y truncado en el segundo ATG.

El efecto de las variaciones en el gen es incierto, pero los resultados sugieren que podrían favorecer el rendimiento del péptido correspondiente y de proteína L1 en los cultivos de raíces transformadas.

Varias líneas de raíces transformadas con el gen *l1* presentaron el fenotipo típico de alta vellosoidad y crecimiento rápido en medio libre de reguladores de crecimiento.

Las raíces transformadas con el gen *l1* producen la proteína L1 según los resultados de tinción inmunohistoquímica. La proteína se detectó en todo el tejido vegetal sin un sitio específico de acumulación.

Se obtuvo proteína L1 a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* cuando se adicionó SDS al buffer de extracción, mientras que la presencia de urea, aún a 8 M, no favoreció la solubilización de la proteína.

La proteína L1 se detectó en los cultivos de *E. coli* por Western blot, y se purificó a partir de estos cultivos por cromatografía de afinidad a níquel.

La mayor producción de proteína L1 en *E. coli* se consiguió con la cepa Rosetta 1, mientras la menor producción fue con la cepa de *E. coli* DH5 α .

X. RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS

Comparación de las diferencias de producción de proteína L1 con las modificaciones del gen en cepas de *E. coli*

Transformación de raíces con las 3 variaciones del gen *l1*, para cuantificación y comparación de producción de proteína L1 en raíces transformadas con las variaciones del gen

Utilizar microscopía confocal para mejorar las imágenes de fluorescencia y microscopía electrónica para observar la producción de VLP

Dirigir la producción a organelos para incrementar la producción de proteína

Evaluar el uso de otros sistemas de expresión como levaduras y sistemas procariontes

Evaluar la generación de respuesta inmune en modelos animales, usando como inmunógeno VLP obtenido de raíces transformadas, si la respuesta es baja se puede fusionar a L1 una proteína inmunógena o algún inductor de citocinas para incrementar la respuesta inmune

XI. REFERENCIAS

- Aich S, Delbaere LT, Chen R (2001) Continuous spectrophotometric assay for beta-glucuronidase
BioTechniques 30:846-850
- Álvarez-Fernández D, Deras-Cabral S, Guerrero-Romero F (2001) Exenteración pélvica con técnica
isquémica. Opción terapéutica en carcinomas pélvicos avanzados o recurrentes Cir Ciruj
69:221-225
- Bajaj YPS, Nietsch P (1975) *In vitro* Propagation of Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)
Journal of Experimental Botany 26:883-890 doi:10.1093/jxb/26.6.883
- Ball E (1998) Virus Papiloma Humano. Biología Molecular, Genética y Mecanismo Oncogénico.
Parte I Dermatol Venez 36:136-141
- Bálványos I, Kursinszki L, Szőke É (2001) The effect of plant growth regulators on biomass
formation and lobeline production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures Plant Growth
Regulation 34:339-345 doi:10.1023/A:1013374524757
- Barva Evia JR (2009) Cáncer cervicouterino: ¿Qué papel etiológico juega la infección con el virus
del papiloma humano? Rev Mex Patol Clin 56:83-104
- Benítez-Bribiesca L (2006) Virus del papiloma humano, cáncer de cérvix y las vacunas Act Med Gpo
Ang 4:51-55
- Berger B, Shor PW, Tucker-Kellogg L, King J (1994) Local rule-based theory of virus shell assembly
Proc Natl Acad Sci USA 91:7732-7736
- Berumen Campos J, Valdespino Gómez VM (2006) Vacunas preventivas y terapéuticas contra el
cáncer del cuello uterino Gamo 5:106-108
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant
plasmid DNA Nucleic Acids Res 7:1513-1523
- Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea R, Christensen N, Zhao R, Chen X (2007) Crystal structures of
four types of human papillomavirus L1 capsid proteins. *Understanding the specificity of
neutralizing monoclonal antibodies* J Biol Chem 282:31803-31811
- Bordonaro JL, Curtis WR (2000) Inhibitory role of root hairs on transport within root culture
bioreactors Biotechnol Bioeng 70:176-186 doi:10.1002/1097-0290(20001020)70:2
- Buitelaar RM, Langenhoff AAM, Heidstra R, Tramper J (1991) Growth and thiophene production by
hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors Enzyme and
Microbial Technology 13:487-494
- Burk RD, Harari A, Chen Z (2013) Human papillomavirus genome variants Virology 445:232-243
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.018
- Cao J, Earle ED (2003) Transgene expression in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) clones
propagated *In vitro* via leaf explants Plant Cell Rep 21:789-796 doi:10.1007/s00299-003-
0589-6
- Carter J, Wipf G, Benki S, Christensen N, 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 77:11625-11632
- Casini GL, Graham D, Heine D, Garcea RL, Wu DT (2004) *In vitro* papillomavirus capsid assembly
analyzed by light scattering Virology 325:320-327
- Caspeta L, Quintero R, Villarreal ML (2005) Novel Airlift Reactor Fitting for Hairy Root Cultures:
Developmental and Performance Studies Biotechnol Progr 21:735-740
doi:10.1021/bp049604n

- Castellsagué X (2008) Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer *Gynecol Oncol* 110:S4-S7
- Castle PE (2016) When Less is More *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 109:djw240-djw240 doi:10.1093/jnci/djw240
- Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL (2001) Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1 *J Mol Biol* 307:173-182
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC (2000) Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16 *Molecular Cell* 5:557-567
- Choi Y-E, Kim Y-S, Paek K-Y (2006) Types And Designs Of Bioreactors For Hairy Root Culture. In: Gupta SD, Ibaraki Y (eds) *Plant Tissue Culture Engineering*, vol 6. Focus on Biotechnology. Springer Netherlands, pp 161-172. doi:10.1007/978-1-4020-3694-1_9
- Chromy LR, Pipas JM, Garcea RL (2003) Chaperone-mediated *In vitro* assembly of Polyomavirus capsids *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10477-10482 doi:10.1073/pnas.1832245100
- Clare MV, Collin HA (1974) The Production of Plantlets from Tissue Cultures of Brussels Sprout (*Brassica oleracea* L. var *gemmifera* D. C.) *Annals of Botany* 38:1067-1076
- Consuegra Mayor CP, Molina Campo D, Egea B. E, Garavito de Egea G (2004) El virus del papiloma humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical *Salud Uninorte* 19:3-13
- Cripe T, Delos S, Estes P, Garcea R (1995) *In vivo* and *In vitro* association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins *J Virol* 69:7807-7813
- Das J, Chandra I, Roy P (2010) *In vitro* Regeneration of Hairy Root from Brassica nigra in Response to Different PGRs *Asian J Plant Sci* 9:271-275
- Davidonis G (1990) Gibberellic acid-induced cell elongation in cotton suspension cultures *J Plant Growth Regul* 9:243-246 doi:10.1007/bf02041970
- Doorbar J, Gallimore PH (1987) Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a *J Virol* 61:2793-2799
- Dutta T, Burgess M, McMillan NAJ, Parekh HS (2010) Dendrosome-based delivery of siRNA against E6 and E7 oncogenes in cervical cancer *Nanomedicine: NBM* 6:463-470
- Ernst S, Langer R, Cooney CL, Sasisekharan R (1995) Enzymatic degradation of glycosaminoglycans *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 30:387-444 doi:10.3109/10409239509083490
- Fahey J, Zhang Y, Talalay P (1997) Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens *Proc Natl Acad Sci* 94:10367-10372
- Fligge C, Schafer F, Selinka H-C, Sapp C, Sapp M (2001) DNA-Induced Structural Changes in the Papillomavirus Capsid *J Virol* 75:7727-7731 doi:10.1128/jvi.75.16.7727-7731.2001
- Florin L et al. (2004) Nuclear Translocation of Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 Requires Hsc70 *J Virol* 78:5546-5553 doi:10.1128/jvi.78.11.5546-5553.2004
- Garcea RL, Chen X (2007) Papillomavirus Structure and Assembly. In: Garcea RL, DiMaio D (eds) *The Papillomaviruses*. Springer US, Boston, MA, pp 69-88. doi:10.1007/978-0-387-36523-7_5
- Garcea RL, Salunke DM, Caspar DLD (1987) Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly *In vitro* *Nature* 329:86-87
- García E (2009) "Establecimiento de cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. *italica* (brócoli) transformadas con el cDNA del gen1 de la hormona del crecimiento humano." Tesis de Maestría.

- George EF, Hall MA, Klerk G-JD (2008a) The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer Netherlands, pp 65-113. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3_3
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD (2008b) Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer Netherlands, pp 175-204. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3_5
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD (2008c) Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer Netherlands, pp 205-226. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3_6
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD (2008d) Plant Growth Regulators III : Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer Netherlands, pp 227-281. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3_7
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD (2008e) Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer Netherlands, pp 1-28. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3_1
- Granados-García V, Flores YN, Pérez R, Rudolph SE, Lazcano-Ponce E, Salmerón J (2014) Cost of the Cervical Cancer Screening Program at the Mexican Social Security Institute Salud Publica de México 56:502
- Gu W, Li M, Zhao WM, Fang NX, Bu S, Frazer IH, Zhao K-N (2004) tRNA^{Ser}(CGA) differentially regulates expression of wild-type and codon-modified papillomavirus L1 genes Nucleic Acids Research 32:4448-4461 doi:10.1093/nar/gkh748
- Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA (1993) Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins J Virol 67:315-322
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ (2014) Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species Plant Methods 10:21-21 doi:10.1186/1746-4811-10-21
- Henzi MX, Christey MC, McNeil DL (2000) Factors that influence *Agrobacterium* rhizogenes-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Plant Cell Reports 19:994-999 doi:10.1007/s002990000221
- Hodges LD, Cuperus J, Ream W (2004) *Agrobacterium rhizogenes* GALLS Protein Substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* Single-Stranded DNA-Binding Protein VirE2 J Bacteriol 186:3065-3077 doi:10.1128/jb.186.10.3065-3077.2004
- Höfgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation Nucleic Acids Research 16:9877
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* Molecular & general genetics : MGG 163:181-187
- Ishii Y, Tanaka K, Kandaa T (2003) Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1-capsids Virology 308:128-136
- Jayshree RS, Sreenivas A, Tessa M, Krishna S (2009) Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis Indian J Med Res 130:286-295
- Jefferson R (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system Plant Mol Biol Rep 5:387-405

- Jeong G-T, Park D-H, Hwang B, Woo J-C (2003) Comparison of growth characteristics of *Panax ginseng* hairy roots in various bioreactors Appl Biochem Biotechnol 107:493-503 doi:10.1385/abab:107:1-3:493
- Ji J, Zheng P-S (2010) Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells Gynecol Oncol 117:103-108
- Karcher S (2002) Blue Plants: Transgenic Plants With The Gus Reporter Gene ABLE 23:29-42
- Kartha KK, Gamborg OL, Constabel F (1974) Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) plants from shoot apical meristems Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 72:172-176 doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0044-328X(74)80127-3
- Keil M, Härtle B, Guillaume A, Psiorz M (2000) Production of Amarogentin in Root Cultures of *Swertia chirata* Planta Med 66:452,457 doi:10.1055/s-2000-8579
- Kim Y-S, Hahn E-J, Yeung E, Paek K-Y (2003) Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer *In vitro* Cell Dev Biol Plant 39:245-249 doi:10.1079/ivp2002397
- Kim YJ, Weathers PJ, Wyslouzil BE (2002) Growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid- and gas-phase reactors Biotechnol Bioeng 80:454-464 doi:10.1002/bit.10389
- Knappe M et al. (2007) Surface-exposed Amino Acid Residues of HPV16 L1 Protein Mediating Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate Journal of Biological Chemistry 282:27913-27922 doi:10.1074/jbc.M705127200
- Kresse H, Glüssl J (2006) Glycosaminoglycan Degradation. In: Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., pp 217-311. doi:10.1002/9780470123065.ch4
- Larrick JW, Thomas DW (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals Curr Opin Biotechnol 12:411-418
- Lenzi P et al. (2008) Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco Transgenic Research 17:1091-1102 doi:10.1007/s11248-008-9186-3
- Li M, Beard P, Estes PA, Lyon MK, Garcea RL (1998) Intercapsomeric Disulfide Bonds in Papillomavirus Assembly and Disassembly J Virol 72:2160-2167
- Li M, Cripe T, Estes P, Lyon M, Rose R, Garcea R (1997) Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly J Virol 71:2988-2995
- Liu B et al. (2008) A novel therapeutic fusion protein vaccine by two different families of heat shock proteins linked with HPV16 E7 generates potent antitumor immunity and antiangiogenesis Vaccine 26:1387-1396
- Liu C, Yang X, Yao Y, Huang W, Sun W, Ma Y (2014) Diverse expression levels of two codon-optimized genes that encode human papilloma virus type 16 major protein L1 in *Hansenula polymorpha* Biotechnol Lett 36:937-945 doi:10.1007/s10529-014-1455-z
- Liu P-H, Hu F-C, Lee P-I, Chow S-N, Huang C-W, Wang J-D (2010) Cost-effectiveness of human papillomavirus vaccination for prevention of cervical cancer in Taiwan BMC Health Serv Res 10:11
- López J, Ancízar Aristizábal F (2006) Integración viral y cáncer de cuello uterino Rev colomb ciencias quim farm 35:5-32
- López Saavedra A, Lizano Soberón M (2006) Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. Rev Inst Nal Cancerol 1:31-55

- Lowy DR (2016) HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions *The Journal of Clinical Investigation* 126:5-11 doi:10.1172/JCI85446
- Luque JS, Tarasenko YN, Reyes-Garcia C, Alfonso ML, Suazo N, Rebing L, Ferris DG (2016) Salud es Vida: a Cervical Cancer Screening Intervention for Rural Latina Immigrant Women *Journal of Cancer Education*:1-10 doi:10.1007/s13187-015-0978-x
- Maclean J et al. (2007) Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization *J Gen Virol* 88:1460–1469
- Martin T, Schmidt R, Altmann T, Frommer WB (1992) Non-destructive assay systems for detection of β -glucuronidase activity in higher plants *Plant Molecular Biology Reporter* 10:37-46 doi:10.1007/bf02669263
- McCormac AC, Elliott MC, Chen DF (1998) A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation *Molecular Biotechnology* 9:155-159 doi:10.1007/bf02760816
- McIntosh J, Sturpe D, Khanna N (2003) Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention: Practice and policy implications for pharmacists *J Am Pharm Assoc* 48:e1-e17
- McKelvey SA, Gehrig JA, Hollar KA, Curtis WR (1993) Growth of Plant Root Cultures in Liquid- and Gas-Dispersed Reactor Environments *Biotechnol Prog* 9:317-322 doi:10.1021/bp00021a011
- Meijer CJLM et al. (2009) Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older *Int J Cancer* 124:516-520
- Meurant G (2012) *Plant Tissue Culture: Methods and Application in Agriculture*. Elsevier Science,
- Mistry N, Wibom C, Evander M (2008) Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism *Virology journal* 5:118
- Moniz M, Ling M, Hung C, Wu T (2003) HPV DNA Vaccines *Front Biosci* 8:55-68
- Monroy-García A et al. (2014) Immunization with an HPV-16 L1-based chimeric virus-like particle containing HPV-16 E6 and E7 epitopes elicits long-lasting prophylactic and therapeutic efficacy in an HPV-16 tumor mice model *Arch Virol* 159:291-305 doi:10.1007/s00705-013-1819-z
- Montross L, Watkins S, Moreland RB, Mamon H, Caspar DL, Garcea RL (1991) Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1 *J Virol* 65:4991-4998
- Mukundan U, Carvalho EB, Curtis WR (1998) Growth and Pigment Production by Hairy Root Cultures of *Beta Vulgaris* L. in a Bubble Column Reactor *Biotechnol Lett* 20:469-474 doi:10.1023/a:1005436128511
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures *Physiologia Plantarum* 15:473-497 doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Navrátilová B (2004) Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae – a review *Hortic Sci* 31:140-157
- Neeper MP, Hofmann KJ, Jansen KU (1996) Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 11 in *Saccharomyces cerevisiae* *Gene* 180:1-6
- Newton CL, Mould TA (2017) Invasive cervical cancer *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 27:7-13 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ogrm.2016.11.002
- Ohkawa H, Kamada H, Sudo H, Harada H (1989) Effects of gibberellic acid on hairy root growth in *Datura innoxia* *J Plant Physiol* 134:633-636

- OMS (2008) Mejor detección, tratamiento y vacunas asequibles para prevenir muertes por cancer cervicouterino Organización Panamericana de la Salud
- Pasternak T, Tietz O, Rapp K, Begheldo M, Nitschke R, Ruperti B, Palme K (2015) Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants *Plant Methods* 11:50 doi:10.1186/s13007-015-0094-2
- Peláez P, Hernandez-Lopez A, Estrada-Navarrete G, Sanchez F (2017) Small RNAs Derived from the T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* in Hairy Roots of *Phaseolus vulgaris* *Frontiers in Plant Science* 8 doi:10.3389/fpls.2017.00096
- Pérez-Palacios P, Agostini E, Ibáñez SG, Talano MA, Rodríguez-Llorente ID, Caviedes MA, Pajuelo E (2017) Removal of copper from aqueous solutions by rhizofiltration using genetically modified hairy roots expressing a bacterial Cu-binding protein *Environmental Technology*:1-20 doi:10.1080/09593330.2017.1281350
- Picconi MA et al. (2000) Variantes moleculares de Virus de Papiloma Humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cervix *Medicina* 60:889-894
- Printz C (2015) FDA approves Gardasil 9 for more types of HPV *Cancer* 121:1156-1157 doi:10.1002/cncr.29374
- Pujol M, Gavilondo J, Ayala M, Rodríguez M, González E, Pérez L (2007) Fighting cancer with plant-expressed pharmaceuticals *Trends Biotechnol* 25:455-459
- Qin Y, Li H-L, Guo Y-D (2007) High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD *Sci Hort* 111:203-208
- Rivera Z R, Delgado D J, Painel P V, Barrero P R, Larraín H A (2006) Mecanismo de infección y transformación neoplásica producida por virus del papiloma humano en epitelio cervical *Rev Chil Obstet Ginecol* 71:135-140
- Rodríguez Lundes O, Pichardo García R, Escamilla Godínez G, Hernández-Valencia M (2009) Estudio de la patología citológica del cérvix *Perinatol Reprod Hum* 23:12-17
- Rose RC, Bonnez W, Reichman RC, Garcea RL (1993) Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: *In vivo* and *In vitro* assembly of viruslike particles *J Virol* 67:1936-1944
- Rose RC, White WI, Li M, Suzich JA, Lane C, Garcea RL (1998) Human Papillomavirus Type 11 Recombinant L1 Capsomeres Induce Virus-Neutralizing Antibodies *J Virol* 72:6151-6154
- Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL (1989) Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1 *Biophysical Journal* 56:887-900
- Salunke DM, Caspar DLD, Garcea RL (1986) Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1 *Cell* 46:895-904
- Sapp M, Fligge C, Petzak I, Harris JR, Streeck RE (1998) Papillomavirus Assembly Requires Trimerization of the Major Capsid Protein by Disulfides between Two Highly Conserved Cysteines *J Virol* 72:6186-6189
- Sapp M, Volpers C, Muller M, Streeck RE (1995) Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles *J Gen Virol* 76:2407-2412 doi:10.1099/0022-1317-76-9-2407
- Serman F (2002) Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento *Rev Chil Obstet Ginecol* 67:318-323
- Shanks JV, Morgan J (1999) Plant 'hairy root' culture *Curr Opin Biotechnol* 10:151-155
- Sim SJ, Chang HN (1993) Increased shikonin production by hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* in two phase bubble column reactor *Biotechnol Lett* 15:145-150 doi:10.1007/bf00133014

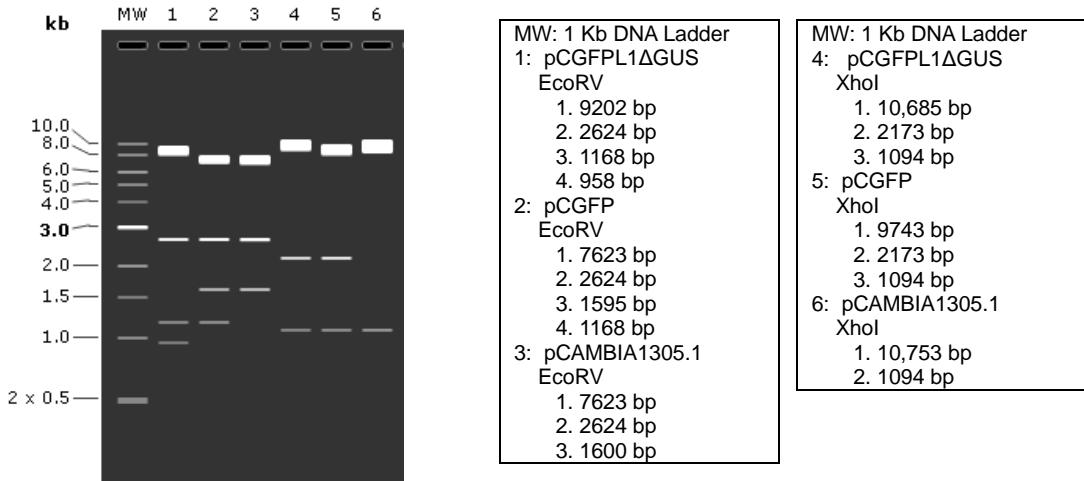
- Skirvin R, Janick J (1976) Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp.[Plant breeding] *Journal-American Society for Horticultural Science* (USA)
- Smith T, Weathers P, Cheatham R (1997) Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: Growth and artemisinin production *In vitro Cell Dev Biol Plant* 33:75-79 doi:10.1007/s11627-997-0044-4
- Solís C J (2006) Manejo del cáncer cervicouterino localmente avanzado *Rev Chil obstet ginecol* 71:349-356
- Srivastava S, Srivastava AK (2007) Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites *Crit Rev Biotechnol* 27:29-43 doi:773237283 [pii]
- 10.1080/07388550601173918 [doi]
- Stanley M (2007) Prophylactic HPV vaccines *J Clin Pathol* 60:961-965
- Staub JM et al. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts *Nat Biotech* 18:333-338
- Stehle T, Harrison SC (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments *Structure* (London, England : 1993) 4:183-194
- Stehle T, Yan Y, Benjamin TL, Harrison SC (1994) Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment *Nature* 369:160-163
- Stomp A-M (1992) 7 - Histochemical Localization of β -Glucuronidase A2 - Gallagher, Sean R. In: *Gus Protocols*. Academic Press, San Diego, pp 103-113. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-274010-7.50013-6
- Sung ZR (1979) Relationship of indole-3-acetic acid and tryptophan concentrations in normal and 5-methyltryptophan-resistant cell lines of wild carrots *Planta* 145:339-345 doi:10.1007/bf00388358
- Suresh B, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar GA (2004) Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments *Process Biochem* 39:2091-2096
- Szalmás A, Kónya J (2009) Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis *Seminars in Cancer Biology* 19:144-152
- Talebi S, Bolhassani A, Sadat SM, Vahabpour R, Agi E, Shahbazi S (2017) Hp91 immunoadjuvant: An HMGB1-derived peptide for development of therapeutic HPV vaccines *Biomedicine & Pharmacotherapy* 85:148-154 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.115
- Tilquin JP (1979) Plant regeneration from stem callus of cassava *Canadian Journal of Botany* 57:1761-1763 doi:10.1139/b79-216
- Trimble CL (2014) HPV Infection–Associated Cancers: Next-Generation Technology for Diagnosis and Treatment *Cancer Immunology Research* 2:937-942 doi:10.1158/2326-6066.cir-14-0152
- Vanhala L, Eeva M, Lapinjoli S, Hiltuner R, Oksman-Caldentey K (1998) Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus* vol 153. vol 3-4. Elsevier, Munich, ALLEMAGNE
- Varsani A, Williamson AL, Rose RC, Jaffer M, Rybicki EP (2003) Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* *Arch Viro* 148:1771-1786 doi:10.1007/s00705-003-0119-4
- Villa L (2006) Vaccines against papillomavirus infections and disease *Salud Publica Mexico* 23:157-159

- von Knebel Doeberitz M, Vinokurova S (2009) Host Factors in HPV-related Carcinogenesis: Cellular Mechanisms Controlling HPV Infections Archives of Medical Research 40:435-442
- Webb E, Cox J, Edwards S (2005) Cervical Cancer-causing Human Papillomaviruses have an Alternative Initiation Site for the L1 Protein Virus Genes 30:31-35 doi:10.1007/s11262-004-4579-8
- Weigel D, Glazebrook J (2006a) Transformation of *Agrobacterium* using electroporation CSH protocols 2006 doi:10.1101/pdb.prot4665
- Weigel D, Glazebrook J (2006b) Transformation of *Agrobacterium* using the freeze-thaw method CSH protocols 2006 doi:10.1101/pdb.prot4666
- Welters M (2008) Induction of Tumor-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine Clin Cancer Res 14:178-187
- Wigdorovitz A et al. (1999) Induction of a Protective Antibody Response to Foot and Mouth Disease Virus in Mice Following Oral or Parenteral Immunization with Alfalfa Transgenic Plants Expressing the Viral Structural Protein VP1 Virology 255:347-353
- Williams R (1993) Mineral nutrition *In vitro* - A mechanistic approach Aust J Bot 41:237-251 doi:doi:10.1071/BT9930237
- Xu R, Li QQ (2008) Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway[®] TOPO vector system Plant Methods 4:4-4 doi:10.1186/1746-4811-4-4
- Yuan H, Estes PA, Chen Y, Newsome J, Olcese VA, Garcea RL, Schlegel R (2001) Immunization with a Pentameric L1 Fusion Protein Protects against Papillomavirus Infection J Virol 75:7848-7853 doi:10.1128/jvi.75.17.7848-7853.2001
- Zanotto C, Pozzi E, Pacchioni S, Bissa M, De Giuli Morghen C, Radaelli A (2011) Construction and characterisation of a recombinant fowlpox virus that expresses the human papilloma virus L1 protein Journal of Translational Medicine 9:190-190 doi:10.1186/1479-5876-9-190
- Zažimalová E, Opatrný Z, Březinová A, Eder J (1995) The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content J Exp Bot 46:1205-1213 doi:10.1093/jxb/46.9.1205
- Zhang W, Carmichael J, Ferguson J, Inglis S, Ashrafian H, Stanley M (1998) Expression of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein in *Escherichia coli*: Denaturation, Renaturation, and Self-Assembly of Virus-like Particles *In vitro* Virology 243:423-431 doi:http://dx.doi.org/10.1006/viro.1998.9050
- Zhao K-N, Chen J (2011) Codon usage roles in human papillomavirus Reviews in Medical Virology 21:397-411 doi:10.1002/rmv.707
- Zhao K-N, Gu W, Fang NX, Saunders NA, Frazer IH (2005) Gene Codon Composition Determines Differentiation-Dependent Expression of a Viral Capsid Gene in Keratinocytes *In vitro* and *In vivo* Molecular and Cellular Biology 25:8643-8655 doi:10.1128/mcb.25.19.8643-8655.2005
- Zhou J, Liu WJ, Peng SW, Sun XY, Frazer I (1999) Papillomavirus Capsid Protein Expression Level Depends on the Match between Codon Usage and tRNA Availability Journal of Virology 73:4972-4982
- Zhou X, Wu Y, Wang X, Liu B, Xu H (2007) Salidroside Production by Hairy Roots of *Rhodiola sachalinensis* Obtained after Transformation with *Agrobacterium rhizogenes* Biol Pharmaceut Bull 30:439-442
- Zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections: a major cause of human cancers Biochem Biophys:F55-F78

XII. ANEXOS

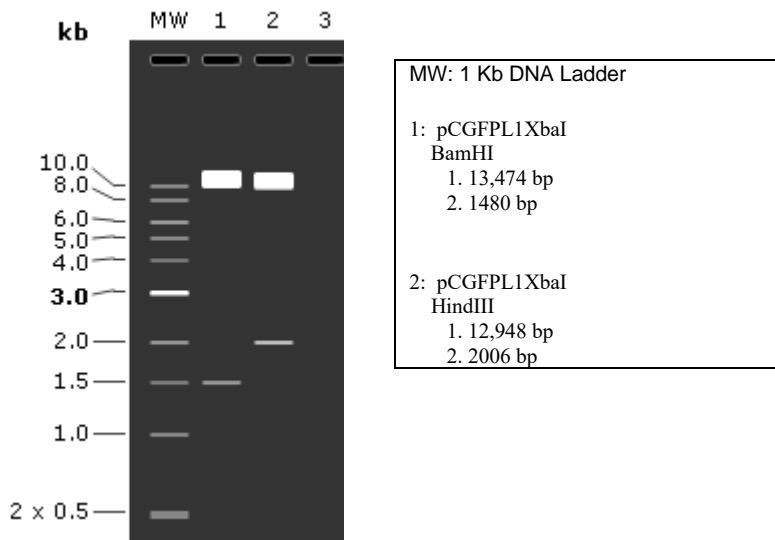
Anexo I

Análisis *in silico* de restricciones de pCAMBIA 1305.1, pCGFP y pCGFPL1ΔGUS, se muestra el mapa de restricción así como la tabla con los tamaños esperados al cortar con EcoRV y XhoI. El orden de los plásmidos es con base a como se muestran en el resultado 8.1



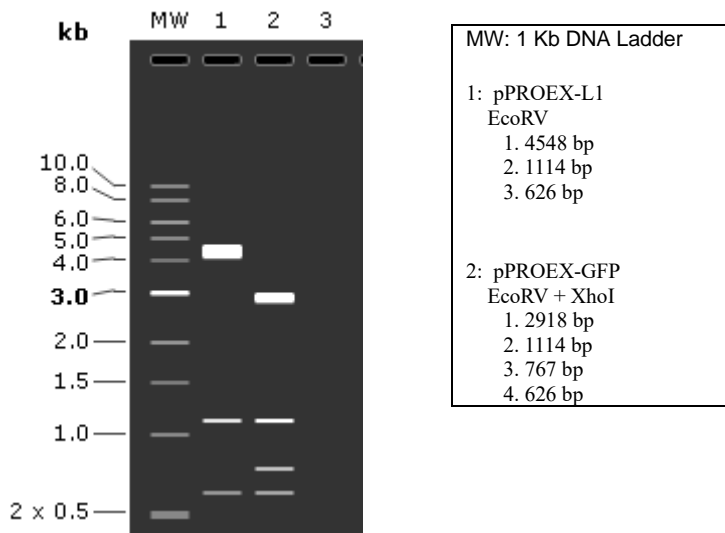
Anexo II

Análisis *in silico* de restricciones de pCGFPL1 con BamHI y HindIII



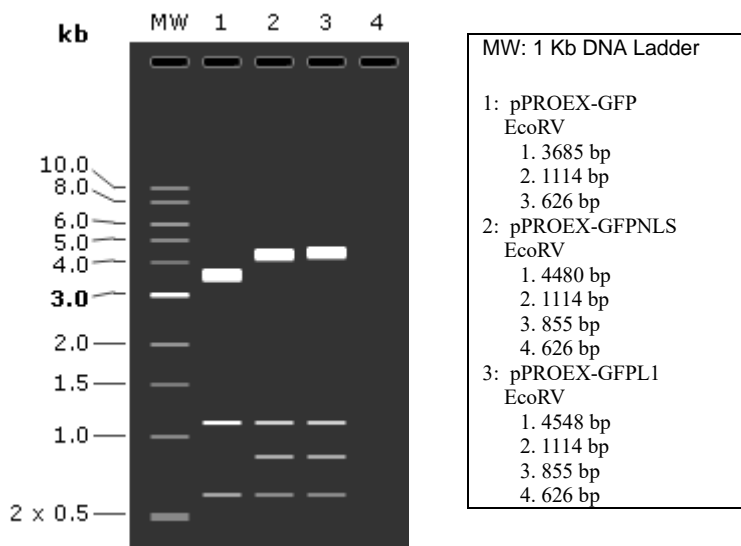
Anexo III

Análisis *in silico* de restricciones de pPROEX-L1 y pPROEX-GFP con EcoRV y XhoI



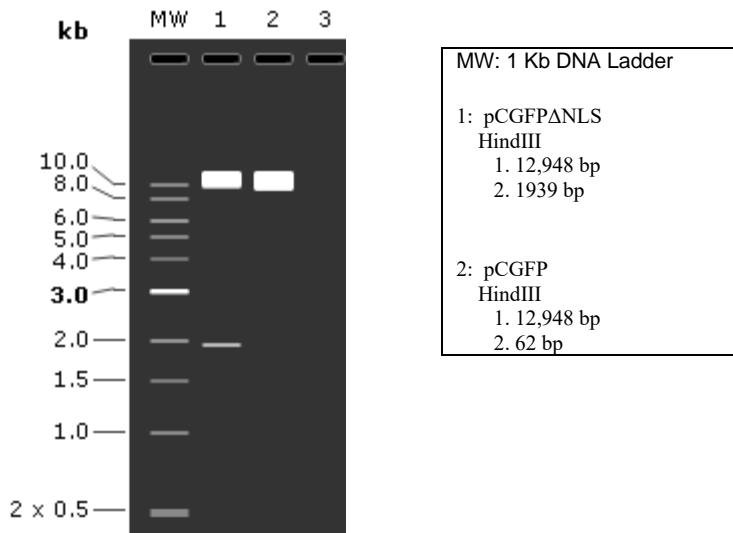
Anexo IV

Análisis *in silico* de restricciones de pPROEX-GFPNLS y pPROEX-GFPL1 con EcoRV



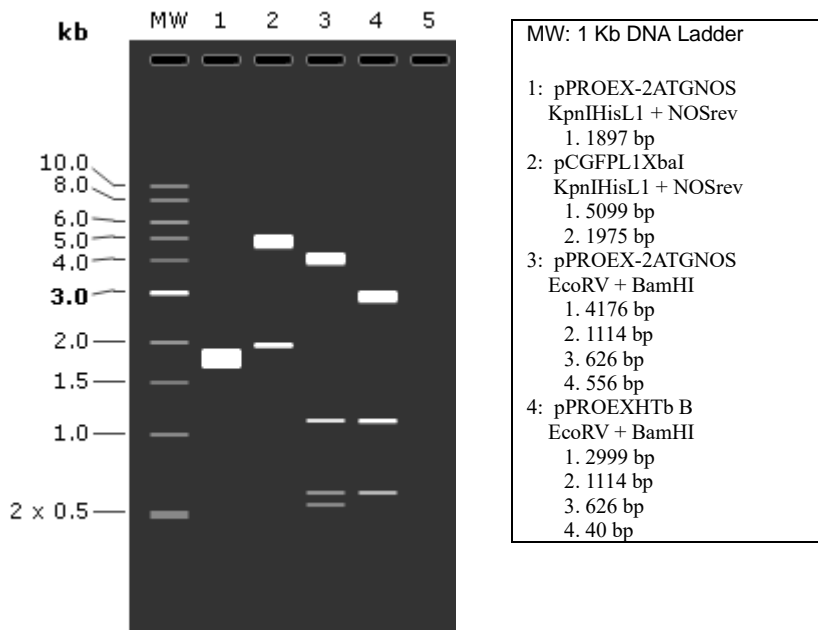
Anexo V

Análisis bioinformático de restricciones de pCGFP Δ NLS y pCGFP con HindIII



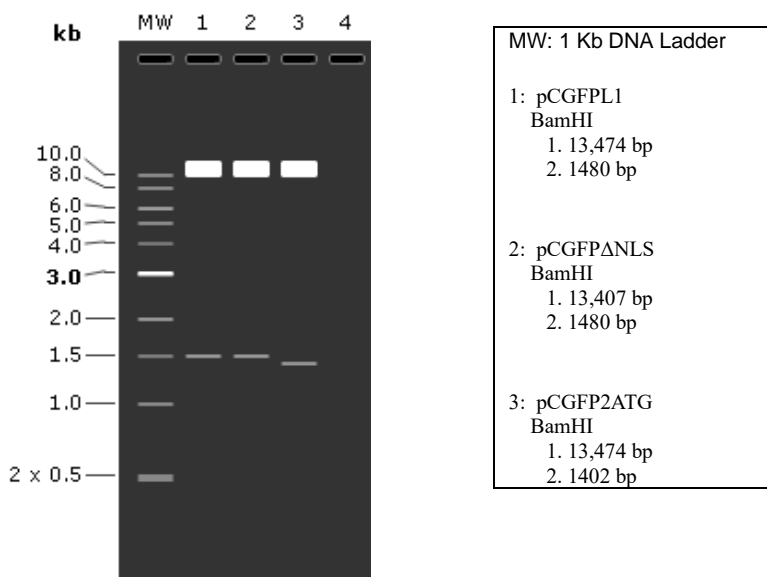
Anexo VI

Análisis bioinformático de amplificaciones de *l1* a partir de la construcción pPROEX-2ATGNOS y PCGPL1, también restricción de pPROEX-2ATGNOS y pPROEX HTb B con EcoRV y BamHI



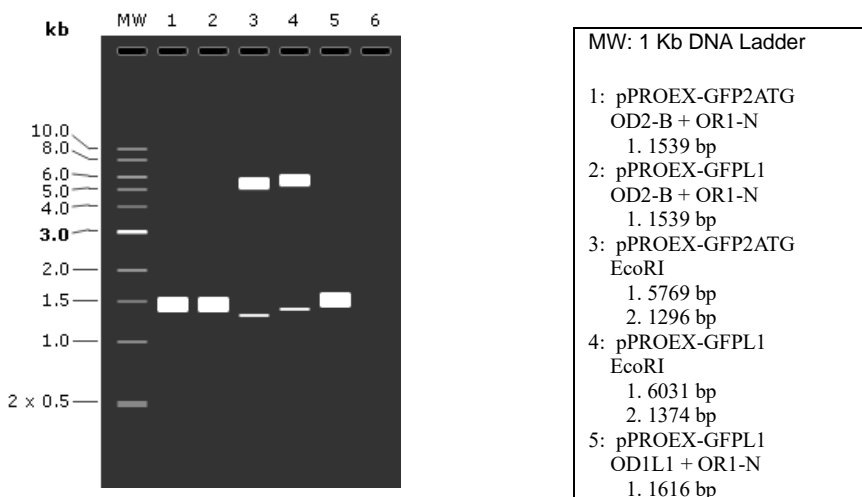
Anexo VII

Análisis bioinformático de restricciones con BamHI de pCGFPL1, pCGFPΔNLS y pCGFP2ATG



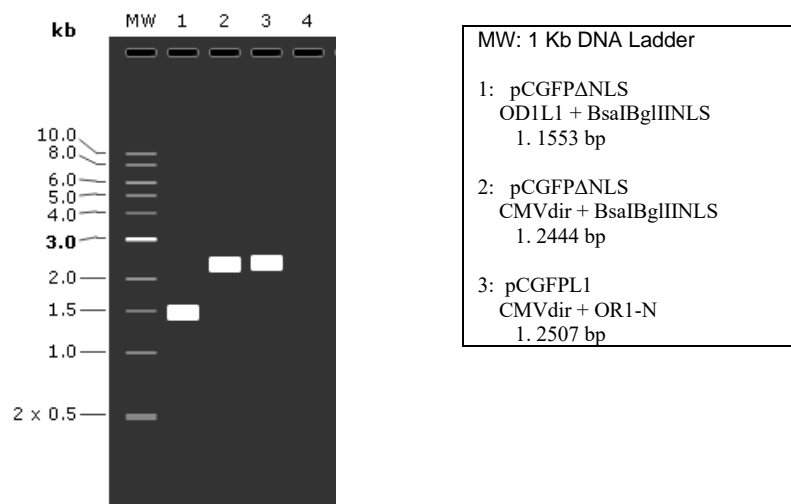
Anexo VIII

Análisis *in silico* de amplificaciones de pPROEX-GFP2ATG y pPROEX-GFPL1 con los primers OD2-B, OR1-N, y OD1L1, restricciones de estas construcciones con BamHI. No se muestran los controles negativos de amplificación, pCGFPΔNLS porque el primer OR1-N no hibrida, tampoco el primer OR1-N hibrida en pPROEX-GFP2ATG



Anexo IX

Análisis bioinformático de amplificaciones de pCGFP Δ NLS y pCGFPL1 a partir de colonias de *A. rhizogenes* transformadas con estas construcciones, empleando los primers OD1L1, BsaIBgIIINLS, CMVdir y OR1-N



Anexo X

Análisis *in silico* de las amplificaciones del gen *l1* con los primers OD2-B y NOSrev a partir de DNA genómico transformado con las construcciones pCGFPL1 y pCGFP2ATG

