

Resolución de Sistemas de Ecuaciones Lineales y Secuencias de Instrucción Basadas en un Contexto de Soluciones Químicas

Análisis por Western Blot y Huella Peptídica de la Hormona de Crecimiento Humano Expresada Heterológamente en Raíces Transformadas de Brócoli

Expresión del Fragmento 6xHis-hGH1 en Cultivos de *E. Coli* por Fermentación en Lote

Cambios en la Composición de Ácidos Grasos de *C. laxus* en un Sistema de Fitorremediación con Petróleo Crudo

Raíces Transformadas de Brócoli con el Gen I1 del HPV y Efecto de IAA/KIN sobre el Crecimiento de Raíces Transgénicas



Información para los autores

La revista **TECNOCULTURA** es un órgano de difusión del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec (TESE); su publicación es cuatrimestral, el objetivo principal es la divulgación del pensamiento y los avances científicos, tecnológicos y humanísticos, ya sea que se generen en las diferentes áreas académicas del TESE o de origen externo, pero que puedan ser de interés general.

La información podrá presentarse en forma de artículo, ensayo, reportaje, reseña, traducción o monografía, incluyendo trabajos de divulgación. Los artículos deben ser producto de investigaciones de elevado nivel académico, contribuir al conocimiento en su materia y ser inéditos en español. Igualmente, las conferencias o presentaciones deberán adaptarse para su edición escrita. En todos los casos, se buscará que su contenido sea ameno y novedoso.

Se recomienda una extensión máxima de 10 cuartillas a doble espacio, incluyendo cuadros, notas y bibliografía. Deberá entregarse un archivo electrónico y una copia impresa, en tamaño carta, en letra Times New Roman de 12 puntos, con márgenes de 2.5 cm. por lado. De preferencia utilizar Microsoft Word, guardando el documento con la extensión .doc. Los materiales serán evaluados por el Consejo Editorial de la revista.

El lenguaje debe ser accesible a estudiantes de licenciatura, sin perjuicio de la información científica o académica contenida en el artículo. Cuando sea necesario el uso de tecnicismos, deberá explicarse su significado con la amplitud necesaria. Se recomienda la inclusión de recuadros que aclaren el significado de conceptos de difícil comprensión.

Dentro de lo posible, se evitará el uso de fórmulas y ecuaciones. Los artículos pueden tener subtítulos o incisos y un resumen introductorio, no mayor de cinco líneas, que atraiga el interés del lector .

Para las citas o referencias bibliográficas que aparezcan en el texto, se utilizará el sistema Harvard; deben ir entre paréntesis, indicando el apellido del autor, fecha de publicación y número de página(s). Ejemplo: (Sánchez Vázquez. 1991: 114-122). Dichas referencias bibliográficas se mencionarán completas al final del documento. Se debe revisar cuidadosamente que no existan omisiones ni inconsistencias entre las obras citadas y la bibliografía. Las obras de un mismo autor, se enlistarán en orden descendente por fecha de publicación (2004. 1999. 1987. etcétera). No deben integrarse notas o citas mediante alguna instrucción del procesador de palabras que las incorpore automáticamente al pie de texto o al final de la página.

Deberán incluirse por separado los archivos correspondientes a las ilustraciones o fotografías que acompañen el artículo, indicando debidamente el lugar donde habrán de insertarse. El formato será TIFF o JPG con una resolución de 300 ppp. Las gráficas, esquemas, figuras, cuadros y similares se deben elaborar en computadora a línea, sin pantallas, o dibujos en tinta china sobre papel albanene, con buena calidad (no fotocopias). Los autores recibirán las pruebas de planas de sus artículos, con la debida anticipación para su visto bueno.

Para fines de registro, se solicita anexar una hoja que contenga datos del autor como nombre, grado académico, institución de procedencia, domicilio, teléfono, dirección electrónica y fax.

Los trabajos que se propongan para ser publicados en **TECNOCULTURA** deben enviarse a:

Editor **TECNOCULTURA**

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec
Unidad de Relaciones Públicas y Difusión
Av. Tecnológico s/n, esq. Av. Carlos Hank González (Av. Central) Col. Valle de Anáhuac,
Ecatepec de Morelos.
Estado de México. c.P. 5521 O
Tel. 5000 2314
correo electrónico: difusion@tese.edu.mx



La Química, la Biología y la Bioquímica, se perfilan para ser las ciencias sobre las que la humanidad fincará sus esperanzas para encontrar la solución a muchos de los grandes problemas que la aquejan, como son el hambre, las enfermedades y la contaminación del ambiente.

Los medios de comunicación dan cuenta de la necesidad de intervenir en los procesos de desarrollo de los cultivos para generar alimentos más resistentes, abundantes y accesibles para todos. De igual forma, muestran los embates de agentes nocivos como los virus causantes de la influenza (AH1N1), el de SIDA, o el Ébola, este último sumamente agresivo y mortal, dado que aún no existe un tratamiento que lo controle. Y ni qué decir de la batalla, que por momentos se antoja perdida, para evitar, mitigar o remediar los efectos de la gran cantidad de sustancias y elementos con los que contaminamos el aire, el agua y el suelo.

Podemos congratularnos por los significativos avances que hemos alcanzado en el conocimiento de estas materias, pero ante la dimensión de los problemas, también en claro lo mucho que falta por recorrer, sobre todo cuando al estudio de dichas ciencias agregamos un factor que quizá otras no conciben como un agravante: la variabilidad, resultado de la acción directa e indirecta de las condiciones de vida y del uso o desuso; el ejemplo más claro de ello lo tenemos en la mutación de virus y bacterias, cuyos cambios inadvertidos en muchas ocasiones por los hombres de ciencia, convierten en obsoletos o inocuos los medicamentos que en su momento fueron la panacea contra determinadas enfermedades.

Las condiciones variables también las encontramos en el medio ambiente, pues ya sea por fenómenos naturales o a causa de la actividad humana, como un derrame de hidrocarburos, tan sólo como un ejemplo, el agua, el suelo y los seres que los habitan sufren alteraciones que, dependiendo del grado de afectación puede llevar a consecuencias devastadoras, por lo que nuevamente se hace necesario investigar, analizar y ensayar acciones que en lo deseable, puedan revertir dichos daños.

Lo mismo ocurre en materia de alimentos donde, igualmente como ejemplo, aún no existe un consenso fundamentado sobre la conveniencia o viabilidad de los alimentos genéticamente modificados o transgénicos como salida para combatir el hambre en el mundo.

Es aquí donde ante semejantes desafíos, las instituciones de educación superior juegan un papel esencial en el desarrollo de conocimientos derivados de la investigación, la experimentación y, en general, de la aplicación de metodologías y técnicas innovadoras, que permitan ir dando solución a ese cúmulo de complejos problemas.

No obstante, la clave de ello está en la actitud que asuman los jóvenes científicos, pues tienen frente a sí, el reto de construir una química, una biología o una bioquímica, que no busque someter a la Naturaleza, sino que procure una coexistencia pacífica y responsable, donde los conocimientos científicos sustituyan el azar, la cooperación reemplace la destructiva competencia y que, ante todo, respete el derecho a la vida de todos los seres que coexistimos en este Planeta.

Directorio



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO

Tecnológico de Estudios
Superiores de Ecatepec



SUBCOMITÉ EDITORIAL:

Sergio Mancilla Guzmán
Armando Alcalde Martínez
Judith Cervantes Ruiz
Carlos Cerra Del Valle
Verónica Martínez Martínez
Lizbet Guadalupe Soto Navarrete
Daniel Cedillo Román
Esther Acevedo Arcos
José Juan León Rebollo

Corrección de estilo
Rafael Ortiz Hernández

Diseño:
Mara Brisa López Vargas

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR Y SUPERIOR
TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC



Tecnocultura, revista de divulgación del conocimiento científico, tecnológico y humanístico del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Año 12, No. 34, mayo-agosto 2014. Número de autorización del Comité Editorial de la Administración Pública Estatal CE: 205/05/10/12-01. Edita y distribuye la Unidad de Relaciones Públicas y Difusión, domicilio: Av. Tecnológico s/n, Col. Valle de Anáhuac, C.P. 55210, Ecatepec, Estado de México. Teléfono 50 00 23 14. Correo electrónico: leon_rebollo@tese.edu.mx.

Número de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del Título ante el Instituto Nacional del Derecho de Autor de la Secretaría de Educación Pública: 04-2006-090109555900-102, ISSN: 1870-7157. Certificados de Título y de Contenido en trámite. Se imprimen 2000 ejemplares. Se autoriza la reproducción total o parcial del material publicado en *Tecnocultura*, siempre y cuando cite la fuente. Los artículos son responsabilidad de los autores.

Contenido

Resolución de Sistemas de Ecuaciones Lineales y Secuencias de Instrucción Basadas en un Contexto de Soluciones Químicas

José Luis González Bucio, Cesar Cristóbal Escalante, José Manuel Carrión, Graciano Calva Calva
Josefina Pérez Vargas

6



Análisis por Western Blot y Huella Peptídica de la Hormona de Crecimiento Humano Expresada Heterológamente en Raíces Transformadas de Brócoli

Edgar García-López; Emma Gloria Ramos-Ramírez; María del Carmen Montes-Horcasitas; Armando Ariza-Castolo; Josefina Pérez-Vargas; Octavio Gómez-Guzmán; Graciano Calva-Calva

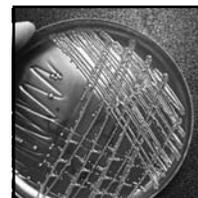
14



Expresión del Fragmento 6xHis-hGH1 en Cultivos de *E. Coli* por Fermentación en Lote

Tania María Ascencio Carbajal, María Teresa Ponce Noyola, María del Carmen Montes Horcasitas, Armando Ariza Castolo, Octavio Gómez Guzmán, Josefina Pérez Vargas, Graciano Calva Calva

20



Cambios en la Composición de Ácidos Grasos de *C. laxus* en un Sistema de Fitorremediación con Petróleo Crudo

Noemí Araceli Rivera Casado, María del C. Montes Horcasitas, Refugio Rodríguez Vázquez, Fernando J. Esparza García, Octavio Gómez Guzmán, Armando Ariza Castolo, Josefina Pérez Vargas, Graciano Calva Calva

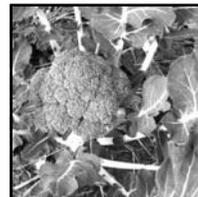
27



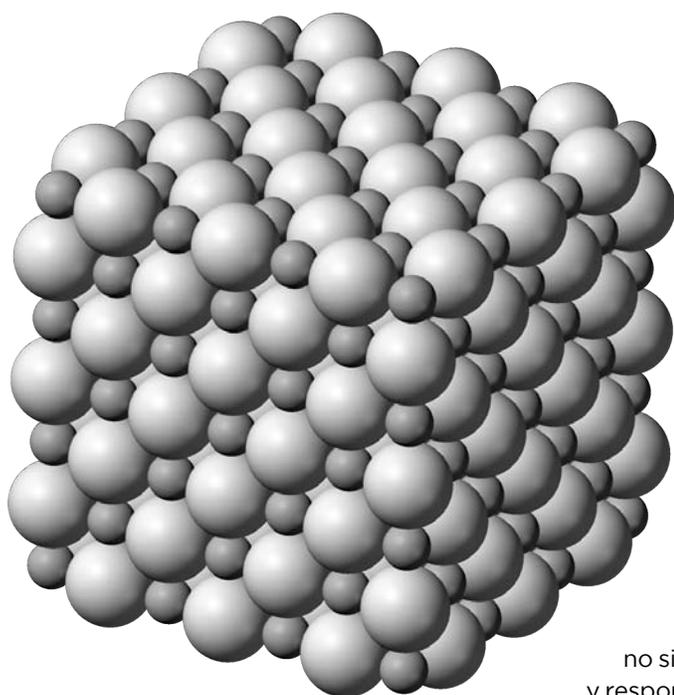
Raíces Transformadas de Brócoli con el Gen I1 del HPV y Efecto de IAA/KIN sobre el Crecimiento de Raíces Transgénicas

Juan Manuel Jiménez Antaño, María del Carmen Montes Horcasitas, Emma Gloria Ramos Ramírez, Fernando José Esparza García, Armando Ariza Castolo, Josefina Pérez Vargas, Octavio Gómez Guzmán, Graciano Calva Calva

34



Resolución de Sistemas de Ecuaciones Lineales y Secuencias de Instrucción Basadas en un Contexto de Soluciones Químicas



José Luis González Bucio¹, Cesar Cristóbal Escalante,
José Manuel Carrión¹, Graciano Calva Calva²
Josefina Pérez Vargas³

Resumen

Uno de los objetivos de la enseñanza de la Química, es analizar las reacciones de elementos y compuestos; pero cuando se ponen en contacto dos sustancias, no siempre hay una reacción, por lo que es pertinente plantearse y responder preguntas como las siguientes: ¿cuándo reaccionan dos sustancias?, ¿qué resultados se obtienen al reaccionar dos sustancias?, ¿cómo determinar los resultados de una reacción?, ¿cómo saber cuándo es posible que reaccionen dos sustancias?

Los estudiantes deben aprender a dar respuesta a éstas y otras preguntas semejantes. Una forma de contestar interrogantes de este tipo, implica analizar las características de los elementos que constituyen las sustancias que se ponen en contacto, utilizar los conceptos de ion, átomo y molécula, aplicar leyes y propiedades derivadas de la química. Por ejemplo, la ley de la conservación de la materia, la ley de las proporciones múltiples, el modelo atómico, entre otras. Analizar los reactivos (sustancias que se ponen a reaccionar) y los productos (los resultados de la reacción), lleva a considerar lo que se denomina el “balanceo de reacciones químicas” (Brown, 2004). Este análisis descansa en la ley de conservación de la materia y en la de

Acerca de los autores...

¹ División de Ciencias e Ingeniería, Universidad de Quintana Roo. Chetumal, Quintana Roo.

² Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. San Pedro Zacatenco, México D. F. CP 07360

³ División de Ingeniería Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Ecatepec de Morelos, Edo de México.

las proporciones múltiples y definidas. Una de sus consecuencias se puede expresar así: “la cantidad de materia que reacciona debe ser igual a la cantidad de materia que resulta” (Garritz y Chamizo, 1994); por tanto, el número de átomos de los elementos que reaccionan debe ser igual al número de átomos que aparecen en las sustancias resultantes. Balancear una reacción química es un proceso que puede realizarse de varias formas. El método del tanteo, Redox y el uso de los Sistemas de Ecuaciones Lineales (SEL) son los más utilizados. Para ello se debe tener en cuenta que algunas mezclas de reactivos químicos nos pueden dar más de dos productos y esto dificulta utilizar el método de tanteo, por lo que es necesario usar los SEL para representar relaciones entre las cantidades de elementos en los reactivos y en los productos.



Introducción

Uno de los objetivos de todo sistema educativo es que los estudiantes desarrollen conocimientos y habilidades en el aula, que más tarde puedan aplicar en un contexto laboral, esto es, que ellos transfieran lo aprendido en el aula a situaciones que se les presenten en la vida real.

Sin embargo, propiciar que los alumnos desarrollen e integren conocimientos en disciplinas como la física, química, biología y matemáticas (como en otras áreas), no es fácil. Los maestros deben diseñar y aplicar estrategias de enseñanza adecuadas, de manera que en cada actividad los estudiantes aprendan e incorporen otras características esenciales de los conceptos y de sus relaciones, además de ejercitar habilidades para utilizarlos.

Este trabajo expone el proceso de diseño y planeación que se siguió para elaborar una secuencia de instrucción, cuyo objetivo es desarrollar la habilidad de los estudiantes para usar los SEL en el balanceo de ecuaciones químicas.

Dicha secuencia de instrucción pretende integrar los conocimientos químicos y los matemáticos sobre los SEL, a fin de que el educando analice y verifique las condiciones para que una reacción química pueda ser balanceada, o permita decidir la posibilidad de que la reacción se lleve a cabo o no.

En el presente estudio se aplicaron conceptos que han sido desarrollados dentro de las perspectivas Modelo-Modelación sobre aprendizaje de las matemáticas (Lesh & Doer, 2003). También se tomaron aspectos sobre la Trayectoria Hipotética de Aprendizaje (THA) de Simon (2004), y el Proceso de

Análisis Didáctico, Gómez (2012) para el diseño instruccional. A continuación se describen estas aportaciones.

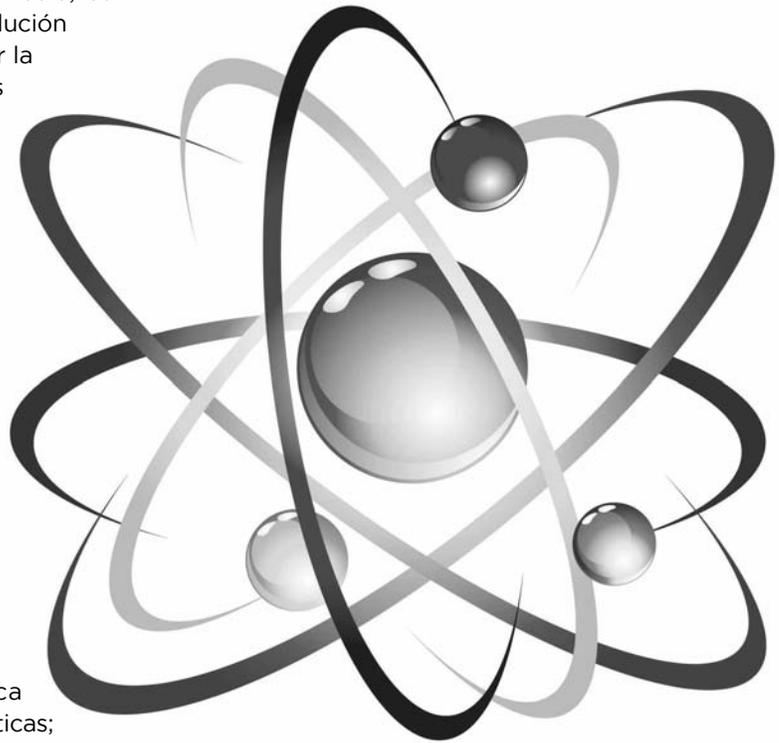
Metodología

Criterios para el diseño de la secuencia

Los criterios para el diseño de la secuencia se derivaron de un análisis didáctico (Gómez, 2012) partiendo de los objetivos asociados a esta unidad, considerando los conceptos y procesos químicos y matemáticos asociados a ellos.

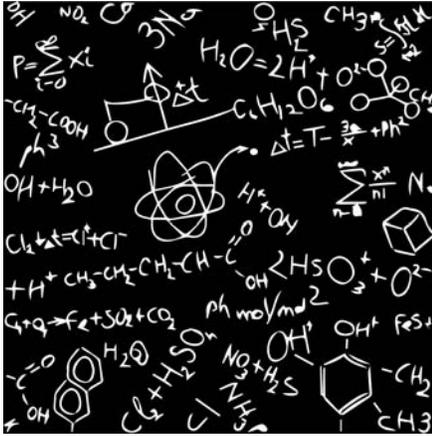
El análisis del contenido (Gómez, 2012) nos llevó a considerar los conceptos y leyes de la química que están asociados con el balanceo de reacciones químicas, por un lado y, por otro, los conocimientos y conceptos asociados con la resolución de los SEL. Así, los educandos deben interpretar la reacción química, es decir, aplicar los conceptos básicos de átomo, molécula, ion, tabla periódica y propiedades de las reacciones químicas.

Inicialmente deben conocer cómo balancear una reacción química con el método de tanteo y al observar el grado de complejidad de dicha reacción, proceder a balancear la reacción química, utilizando los SEL. Las actividades deberán partir de reacciones químicas que utilicen los SEL, con pocas incógnitas y ecuaciones (2x2, 2x3, 3x2, 3x3, etcétera) e ir incrementando su complejidad, para que el alumno pueda distinguir cuándo existe una reacción química con los SEL $n \times m$, de n ecuaciones con m incógnitas, e ir desde las reacciones químicas más sencillas hasta las más complejas. Deberán entonces analizar correctamente si la reacción química formará más de un producto y con esas características; al diseñar los SEL, podrán determinar si existe solución, si tienen infinitud de soluciones o no existe solución alguna.



A partir del Análisis Cognitivo (Gómez, 2012) se considera que la secuencia de actividades debe propiciar que el estudiante recuerde y aplique las definiciones de átomo, molécula e ion. Por ello se planteó que en las primeras actividades, el estudiante identifique los átomos y moléculas de una reacción química. Posteriormente, que efectúe el conteo de átomos en los reactivos y la cantidad de átomos en los productos, con el fin de mantener balanceada la reacción química, como lo establece la Ley de la conservación de la materia. En ese momento se pedirá a los estudiantes que investiguen y recuerden los métodos para resolver un SEL. A continuación, las actividades deben propiciar que los estudiantes utilicen los SEL para balancear las reacciones químicas. También en estas últimas actividades, las reacciones químicas deben llevar un SEL que tenga solución única, otro que tenga infinitud de soluciones y uno más que no tenga solución.

Para el Análisis de Instrucción, se derivó un conjunto de criterios que guiarán al análisis, diseño y selección de actividades:



- a) Las actividades iniciales deberán mostrar al estudiante los principios clave utilizados para balancear la reacción química y establecer los SEL asociados con ese proceso. De igual forma, deberán conocer primeramente cómo balancear una reacción química con el método de tanteo y al conocer el grado de complejidad de dicha reacción, habrán de establecer los SEL para su solución.
- b) Una vez que ya han estudiado los SEL, estarán en condiciones de resolver los SEL $n \times m$ con el uso de cualquier método de solución.
- c) Las actividades deberán partir de reacciones químicas que utilicen SEL con pocas incógnitas y ecuaciones (2x2, 2x3, 3x2, 3x3, etcétera) e ir las incrementando en su grado de dificultad.

El Análisis de Actuación (Gómez, 2012) implica analizar los trabajos realizados por los estudiantes. Se evalúan los resultados obtenidos respecto a los conocimientos desarrollados en las diferentes actividades y tareas, observando el nivel de desempeño y su evolución, y se identifican las dificultades que tuvieron durante el aprendizaje de los conceptos involucrados.

Actividades de la Secuencia Didáctica

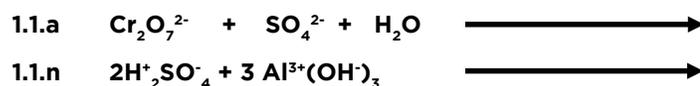
La secuencia constó de cinco actividades. Cada una se desarrolló durante dos horas en el aula. Se aplicó a un grupo de 20 alumnos del tercer semestre de la carrera de Ingeniería Ambiental de la División de Ciencias e Ingeniería de la Universidad de Quintana Roo, que tomaron la asignatura de Química Analítica, en el ciclo de otoño del 2013.

Descripción de la Secuencia Didáctica

La secuencia contiene el siguiente conjunto de problemas:

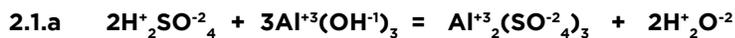
Actividad 1. De manera individual los alumnos comenzaron a identificar las moléculas, átomos e iones en una reacción química para tener el conocimiento de qué y cuáles son los números del coeficiente, subíndice y superíndice, encontrados en la reacción y que intervienen en el balanceo de la ecuación química.

También en esta actividad, el propósito fue identificar el nivel de comprensión de los conceptos básicos de química que están relacionados con el balanceo de reacciones, e identificar también su nivel de comprensión y manejo de los conceptos y métodos para resolver Sistemas de Ecuaciones Lineales (SEL). Por ejemplo:

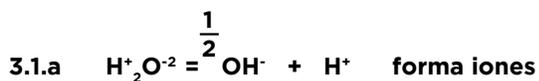


Actividad 2. El objetivo fue determinar el nivel de conocimientos de los estudiantes sobre la reacción química, utilizando conceptos de la actividad anterior. Aquí analizaron la reacción de las moléculas de los reactivos y la formación de moléculas, iones y/o átomos en los productos. Cuando reaccionan sustancias, es necesario contar y comparar el número de átomos de los reactivos y de los formados en los productos. Por ello, es necesario

verificar que se cumpla la Ley de la Conservación de la Materia, pues la cantidad de materia de los reactivos debe ser la misma que se forma en los productos. Por ejemplo:



Actividad 3. Su propósito fue determinar el nivel de conocimientos de los estudiantes sobre la composición definida de un compuesto. En esta actividad se describe la Ley de Composición Definida, y describe cuándo un compuesto contiene siempre los mismos elementos en la misma proporción de masas. Cuando dos elementos se combinan para generar un determinado compuesto, lo hacen siempre en la misma relación de masas. Se debe conocer las propiedades de la reacción, cuándo se formarán compuestos con moléculas diatómicas y cuándo con moléculas no biatómicas. Por ejemplo:



Actividad 4. La intención de esta actividad fue conocer la Ley de las Proporciones Múltiples, el nivel de conocimiento de los estudiantes sobre los conceptos de reacción de moléculas y la capacidad para identificar la reacción química de acuerdo con las propiedades particulares de cada expresión química. Por ejemplo:



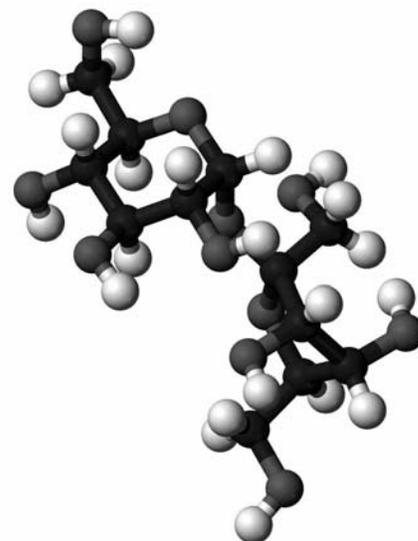
Actividad 5. El propósito de esta actividad fue la aplicación del nivel de conocimientos adquiridos por los estudiantes respecto a los conceptos anteriores y la capacidad para resolver cualquier expresión química propuesta. El conjunto de problemas que se presenta en esta actividad, les permite realizar la reacción química y el balanceo adecuado, usando el planteamiento de un sistema de ecuaciones lineales (SEL). Por ejemplo:



$$\frac{x + y}{a} = \frac{z + w}{b}$$

Resultados

Las actividades de instrucción se presentaron en cinco sesiones, involucrando varias preguntas sobre el tema del balanceo estequiométrico en las reacciones químicas y la utilización de los SEL para su solución. Con base en los datos generados en la metodología, presentamos los siguientes resultados:



En el ejercicio 1.1.a de la primera actividad, solamente tres alumnos de 20 (3/20) contestaron correctamente, e identificaron las moléculas presentes que se señalaron en esta sesión. Los 17 alumnos que tuvieron dificultades para ello, se debió a que confundieron los iones complejos con las moléculas.

Quienes identificaron las moléculas tenían bien cimentado el conocimiento de los conceptos, sabían que las cargas de cada elemento constitutivo de cada expresión debía estar cargado y que cada uno de los átomos se encontraba con cargas neutralizadas, para poder definirlo como molécula. En el caso 1.1.b y 1.1.c, 10 de 20 alumnos contestaron correctamente; aquí fue más fácil identificar las estructuras químicas, ya que en estos ejercicios las especies químicas fueron moléculas, y observaron que no existían cargas totales positivas o negativas como sucedió en el ejercicio 1.1.a.

Cuando se discutió la actividad 1, los 13 alumnos que contestaron incorrectamente se percataron que debían balancear las cargas de las especies señaladas en el inciso 1.1.m. Cuando intercambiaron opiniones, se dieron cuenta que los índices de cada especie son muy importantes para saber si se trataba de una molécula, un átomo o ion.

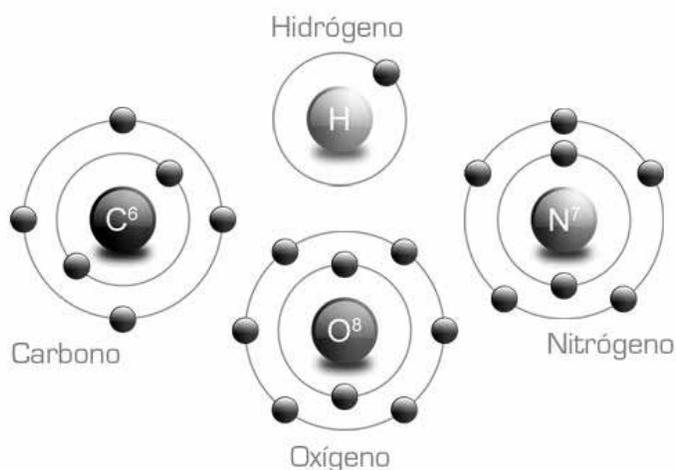
Conforme fueron realizando los ejercicios de la actividad 1, desarrollaron sus conocimientos y entendieron los conceptos básicos de la química, tales como: qué es un ion, un átomo y una molécula, guiándose con la tabla periódica.

En la actividad 2, para el inciso 2.1.a, nueve de 20 alumnos identificaron las expresiones propuestas; percibieron que existía un desequilibrio o no balanceo estequiométrico de los reactivos iniciales con respecto a los productos finales. Cuando percibieron dicho desequilibrio, procedieron al conteo de los átomos componentes de cada molécula existente, tanto en los reactivos como en los productos, y encontraron que no eran las mismas cantidades de átomos, debido a lo cual supusieron que ponderalmente no se cumplía con la Ley de la Conservación de la Materia. Entonces analizaron si las especies reaccionantes eran moléculas o iones.

Asimismo, nueve de 20 alumnos observaron que las expresiones presentaban superíndices y subíndices, comentando que éstos definían si las expresiones eran moléculas, iones o átomos, quedando más claros los conceptos de estas expresiones.

Para el inciso 2.1.e, 11 de 20 alumnos pudieron efectuar la reacción correspondiente, e inclusive verificaron la cantidad de moléculas existentes en los reactivos y los productos; también corroboraron la cantidad de átomos e iones presentes en la reacción química y lograron efectuar la reacción correspondiente con el respectivo balanceo de los componentes de los reactivos y de los productos; además, verificaron las cantidades de masa de cada componente de la reacción y con ello la comprobaron lo señalado por la Ley de la Conservación de las Masas.

En la actividad 3, respecto a los ejercicios del inciso 3.1.a, 12 de 20 alumnos contestaron correctamente, argumentando que algunas moléculas se pudieron ionizar, y que además de ello, algunas moléculas se pudieron disociar, como ocurrió con la formación

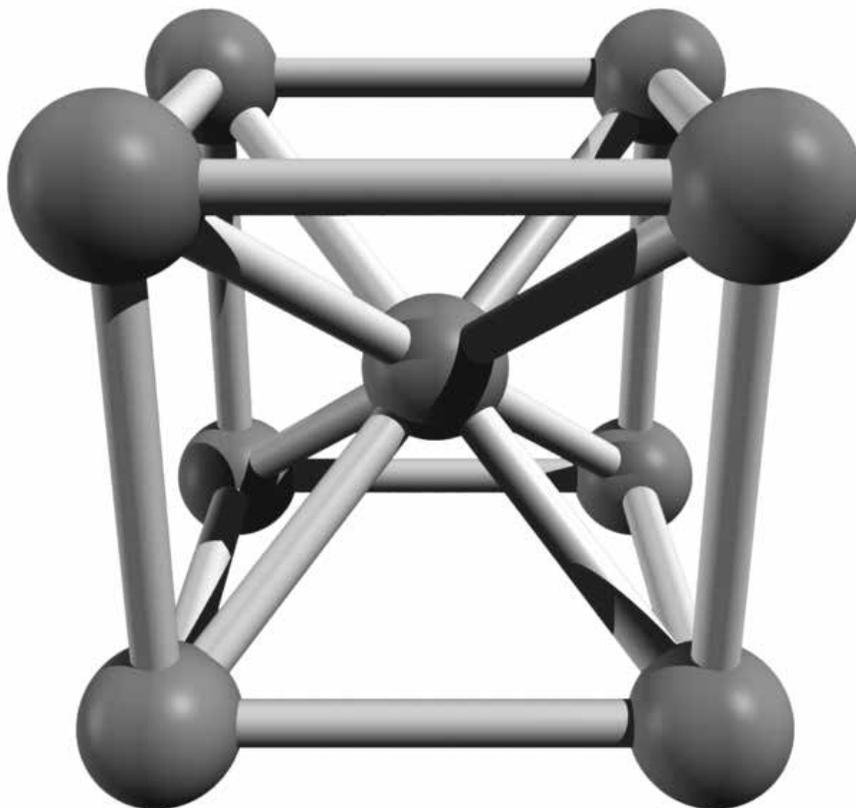


de moléculas diatómicas referida en el problema 1. A pesar de no ser una actividad difícil, igual número de alumnos no tenía claro que las moléculas pueden formar productos ionizables o productos disociables.

Con la actividad 4, en el inciso 4.1.a, 13 de 20 alumnos verificaron la Ley de las Proporciones Múltiples, al actuar los reactivos y obtener productos, confirmando la presencia de compuestos químicos en el reactivo y su reacción para formar los productos correspondientes.

Para los problemas del inciso 4.1.e, ocho de 20 alumnos contestaron correctamente, aunque el grado de complejidad fue mayor; para la mayoría de los alumnos fue complicado, en razón de que debían conocer el tipo de especies químicas que se combinan y que pudieran formar. Para resolver el balanceo de las reacciones químicas, efectuaron un SEL y obtuvieron los valores de las variables mediante los siguientes métodos: eliminación, sustitución, e igualación, apoyándose con el programa Excel, y también aplicaron el método de matrices de Gauss Jordán. (Ver anexo Gauss Jordán).

Para la actividad 5, en los problemas se utilizaron dos o más reactivos para formar productos más complejos, lo cual requirió poseer los conocimientos conceptuales y la comprensión de las cuatro sesiones anteriores. Para balancear una reacción química, primero requirieron utilizar un SEL y, posteriormente, un segundo SEL les ayudó a conocer las cantidades de sustancias que pueden mezclarse. En el inciso 5.1.a, 13 de 20 los alumnos pudieron resolver esa actividad, y para siete de 20 fue difícil el razonamiento realizado. Aquí primeramente balancearon la reacción química de manera correcta y obtuvieron los valores A, B, C, D, E, utilizando varios métodos que implicaron los SEL, y observaron que era un sistema 6x6. También, se diseñó un segundo SEL que implicó el análisis estequiométrico de la reacción química, en el cual propusieron que $(x + y) = a$, y que $(z + w) = b$. Con este criterio, establecieron un sistema de ecuaciones lineales y fundamentaron que tenía muchas soluciones, donde las variables x, y, z, w, son las masas que pudieran ser mezclables estequiométricamente para mantener su equilibrio químico.



Conclusiones

En general, la mitad del grupo de Química Analítica (10/20) pudo experimentar resultados satisfactorios con las actividades de la Secuencia Didáctica. Se observó que los alumnos retomaron los conceptos químicos y matemáticos, y cuando ya tenían todo el conocimiento, se dieron cuenta que lo podían aplicar a diferentes situaciones, por lo que comenzaron a experimentar con otros problemas hasta obtener la solución a la que se pretendía llegar, como los balanceos de reacciones químicas y las mezclas de compuestos químicos.

Se observó que progresivamente fueron adquiriendo conocimientos a partir de cada actividad desarrollada, mejorando su aprendizaje. En esta última actividad, fue posible comprobar que los alumnos primeramente observaron, analizaron, razonaron, preguntaron, debatieron y entendieron, para finalmente llegar a una conclusión, luego de discutir sus resultados.

Bibliografía

A. Garritz, J.A. Chamizo. (1994). *Química*. Addison-Wesley Iberoamericana E.U.A p. 770.

Brown, T.L.; Lemay, H.E.; Bursten, B.E.; Burdge, J.R. (2004). *Química, la Ciencia Central*. 9ª Ed., Pearson, México.

Gómez, Pedro (2002). "Análisis didáctico y diseño curricular en matemáticas". *Revista EMA*, 7(3), pp. 251-292.

Lesh, R. & Doerr, H. M. (2003). *Beyond constructivism. Models and modeling perspectives on mathematics problem solving, learning, and teaching*. Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum.

Lesh, R. Yoon, C. (2004). "Evolving Communities of Mind -In Which Development Involves Several Interacting and Simultaneously Developing Strands". *Mathematical Thinking and Learning*, 6(2), 205-226.

Simon, M. A. (2004) "Explicating the Role of Mathematical Tasks in Conceptual Learning: An Elaboration of the Hypothetical Learning Trajectory". *Mathematical Thinking and Learning*, 6(2), 91-104.



Análisis por Western Blot y Huella Peptídica de la Hormona de Crecimiento Humano Expresada Heterológamente en Raíces Transformadas de Brócoli

Edgar García-López^a; Emma Gloria Ramos-Ramírez^a; María del Carmen Montes-Horcasitas^a; Armando Ariza-Castolo^b; Josefina Pérez-Vargas^c; Octavio Gómez-Guzmán^a; Graciano Calva-Calva^a.

Resumen

En este trabajo, se presentan resultados sobre el estudio de la expresión heteróloga de la proteína hormona del crecimiento humano (hGH1) por cultivos de raíces transformadas de brócoli. La identificación de la hGH1 expresada heterológamente se logró por análisis de Western Blot, que permitió observar la proteína como una sola banda en la autorradiografía, sugiriendo su integridad. Por otro lado, la determinación de su huella peptídica por espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó a partir de los péptidos resultantes de la digestión trípica de la hGH1 heteróloga, que hizo factible la identificación de algunos de estos péptidos y correlacionarlos sin ambigüedad con la secuencia de somatotropina reportada en la base de datos de Swissprot.

Acerca de los autores...

^a Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y

^b Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

^c Ingeniería Bioquímica del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

Introducción

La creciente necesidad de moléculas con actividad terapéutica y de diagnóstico, especialmente proteínas o péptidos de distinta complejidad, ha fomentado el desarrollo de estrategias de obtención utilizando sistemas de expresión heteróloga. Los organismos que se han utilizado con este fin comprenden microorganismos, insectos, animales y plantas, incluyendo el cultivo de sus células, tejidos y órganos [1]. Evidentemente la actividad biológica de una proteína heteróloga depende de su parecido con la nativa, por lo que es un aspecto crítico en la selección del sistema de expresión. En este sentido, los sistemas vegetales son capaces de plegar y ensamblar correctamente proteínas complejas, como aquellas eucarióticas que requieren modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones y formación de estructuras casi idénticas a las proteínas nativas [2].

De entre los cultivos de células, tejidos y órganos vegetales, el de raíces transformadas o hairy roots ofrecen gran potencial para la producción de compuestos biológicamente activos, tanto metabolitos como proteínas, al poder introducir secuencias de DNA de interés, utilizando vectores binarios y/o desarmados [3]. Estas raíces transformadas son estructuras neoplásicas generadas por la movilización y expresión de DNA desde la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* al genoma de las células de una planta [4]. Tienen un crecimiento acelerado comparado con el de raíces no transformadas, son genéticamente homogéneas y morfológicamente estables [5].

Entre las características interesantes para utilizarlos en el establecimiento de bioprocesos para producción de compuestos biológicamente activos están su fácil manipulación y su capacidad para sintetizar compuestos foráneos de interés [3], además de que poseen buena estabilidad de producción de proteínas heterólogas a largo plazo [6]. Por otro lado, los sistemas de raíces transformadas tienen varias ventajas sobre el uso de plantas transgénicas completas para la obtención de proteínas heterólogas. Entre ellas están el mejor control sobre el proceso de producción, ya que se trata de un proceso cerrado, evitando la posible diseminación del transgén al ambiente; además, presentan ciclos de producción más cortos y las proteínas pueden ser excretadas al medio de cultivo facilitando su extracción y purificación [7].

La *Brassica oleracea* var *italica* (brócoli) es una planta de alto valor nutricional y previamente se ha demostrado que puede ser utilizada como modelo para establecer cultivos de raíces transformadas para la producción de proteínas heterólogas [8]. Así, con la finalidad de investigar la similitud

estructural de estas proteínas con las nativas, en el presente trabajo se reportan los resultados sobre el análisis por Western Blot y MALDI-TOF de la hormona del crecimiento humano (hGH1) expresada por una línea de cultivos de raíces transformadas de brócoli previamente establecida [9, 10] en comparación con una proteína comercial.



Metodología

Determinación del contenido de hGH1

El contenido de hGH1 se realizó por medio de

inmunoensayo, utilizando el “Human HGH Immunoassay Kit” de Biosource (Camarillo, California, USA).

Western Blot

Los extractos de proteína soluble y las fracciones semipurificadas por filtración tangencial (< 50 kD) y cromatografía de afinidad (>60% pureza de hGH1) fueron resueltas por electroforesis en geles de 15% de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las muestras resueltas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride) en una cámara de electrotransferencia a 275 mA por 75 minutos. Los sitios no específicos en la membrana se bloquearon por exposición toda la noche en una solución de leche descremada al 5% en buffer PBS-T (solución salina fosfatos 0.05% Tween). La membrana se lavó varias veces con buffer PBS-T y se incubó por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal de ratón antihormona de crecimiento humano (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA) diluido 1:200 en PBS-T. Después de tres lavados con PBS-T, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Pennsylvania, USA) diluido 1:15,000 en PBS-T por 45 min. Después de lavados con buffer PBS-T, se procedió a la detección de la proteína blanco por quimioluminiscencia en placas de rayos X. La detección se realizó a diversos tiempos de exposición.



Digestión triptica y extracción de péptidos

Se cortaron las bandas de geles resueltos por SDS-PAGE, se lavaron dos veces con agua desionizada y se añadió acetonitrilo hasta cubrir las bandas para deshidratar el gel; esta operación se repitió dos veces. Se retiró el acetonitrilo y se añadió NH_4HCO_3 25 mM. Se incubó 5 minutos y sin retirar el sobrenadante se añadió acetonitrilo 1:1. Se incubó por 15 minutos y se llevó a sequedad en centrifuga de vacío. El residuo se lavó con una solución a 56°C de 10 mM de Ditiotreitolo en NH_4HCO_3 25 mM para la reducción de los péptidos. La muestra llegó a temperatura ambiente, se eliminó la solución de DTT y se añadió acetonitrilo, que luego se retiró inmediatamente para incubar con Iodoacetamida 55mM en 25 mM NH_4HCO_3 durante 15 minutos en oscuridad para la alquilación de los péptidos.

Para la digestión se añadió tripsina 12.5 ng/ml, disuelta en 25 mM de NH_4HCO_3 , hasta cubrir las bandas y se incubó en hielo 45 min. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y se añadió NH_4HCO_3 25 mM hasta cubrir las bandas y se incubó toda la noche a 37°C.

Para la extracción de los péptidos se cubrieron las bandas con 50% acetonitrilo, 0.5% ácido trifluoroacético y se sonicó 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante en otro tubo. Esta operación se repitió tres veces, recuperando todos los sobrenadantes de cada extracción conjunta. Finalmente se llevó a sequedad estas extracciones en centrifuga de vacío y se resuspendió en 10 μL de 50% acetonitrilo en 0.1% de ácido trifluoroacético para su posterior análisis por MALDI-TOF.

Resultados

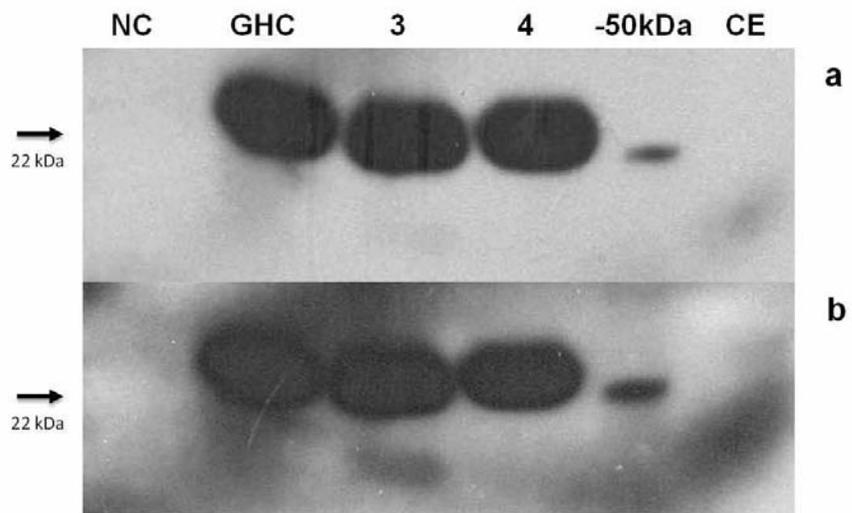
Las muestras de proteína soluble y fracciones purificadas de los extractos proteicos de cultivos de raíces de brócoli transformadas con el gen de la proteína hGH1 fueron analizadas por Western Blot en comparación con una hGH comercial y extractos de raíces no transformadas (Fig.1) para confirmar su presencia y determinar la



integridad de la proteína heteróloga más allá de la detección por inmunoensayo. En la membrana se observaron señales con peso molecular similar al de la hGH comercial (22 kDa) en las muestras de extractos purificadas, sin embargo no se apreció señal en la muestra correspondiente al extracto crudo aún a tiempos de exposición prolongados (Fig. 1b), muy posiblemente debido a que la concentración específica de hGH1 en esta muestra fue muy baja (0.72 Qg/ml); no obstante, después de una concentración de la muestra mediante filtración tangencial, la señal pudo ser detectada (Fig.1 carril -50kDa). Debe observarse que a tiempos de exposición largos de la membrana a la placa fotográfica se observaron manchas putativas de aproximadamente 14 kDa que podrían ser fondo debido a los anticuerpos aún unidos de manera inespecífica o fragmentos proteicos diluidos de menor peso molecular (Fig. 1b).

Figura 1

Análisis de Western Blot a diferentes tiempos de exposición. a) 4 minutos de exposición, b) 10 minutos de exposición. Carril NC: extracto de proteína total soluble de raíces no transformadas (control negativo). Carril GHC, hGH1 comercial (Pfizer NY, NY, USA). Carriles 3 y 4, muestras purificadas de cultivos de raíces transformadas. Carril -50kDa, fracción de menos de 50 kDa obtenida por filtración tangencial. Carril CE, extracto crudo de proteína. Los carriles GHC, 3 y 4 se cargaron con 0.5 Qg de la proteína hGH1; el carril -50 kDa contenía 40 ng de hGH1.



Por otro lado, el espectro MALDI-TOF de la banda correspondiente a la hGH1 (22 kDa) digerida con tripsina, mostró patrones de fraccionamiento similares a los de hGH1 comercial, interpretados como péptidos y sus correspondientes secuencias en la Tabla 1. La composición de aminoácidos de algunos de los fragmentos mayores (8-23 aminoácidos) mostraron una correlación positiva con la secuencia reportada para la hGH1 nativa o somatotropina: 99% para 3 péptidos de 9-12 aa, 98% para uno de 13 aa, y 92% para uno de 8 aa. Estos resultados confirman con un 99% de probabilidad que la estructura primaria de la proteína producida por las raíces transformadas es igual a la hGH nativa.



Proteína identificada	Péptidos identificados
Somatotropina (hGH1)	hGH1 de referencia QEFEEAYIPKEQK (85% conf.) LFDNAMLRL (7% conf.) DMDKVETFLR (2% conf.)
Somatotropina (hGH1)	Banda de 22 kDa carril 3 DMDKVETFLR (99% conf.) FPTIPLSLRFDNAMLRL (99% conf.) LHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK (99% conf.) SNLELLR (32% conf.)
Somatotropina (hGH1)	Banda de 22 kDa carril 4 FDTNSHNDDALLKNYGLLYCFR-KDMDKVETFLR (98% conf.) LFDNAMLRL (92% conf.) SNLELLR (79% conf.)

Tabla 1

Muestras analizadas y correspondientes a péptidos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF de bandas purificadas de cultivos de raíces transformadas de brócoli.

Discusión

En el análisis por Western Blot, la ausencia de señal en la muestra correspondiente al extracto crudo de proteína del cultivo BRGHE18 (carril CE Fig. 1) sugiere que la cantidad de hGH1 (0.72 Qg/ml) no fue suficiente para ser detectada bajo las condiciones experimentales aplicadas, sin embargo la muestra concentrada y fraccionada simultáneamente por filtración tangencial en el carril -50 kDa sí mostró la señal correspondiente a la proteína hGH1. Adicionalmente, la detección positiva en las muestras purificadas por filtración y las fracciones concentradas por cromatografía de afinidad, demuestran la expresión de la hGH1 por estos cultivos. Por otro lado, la presencia de señales de menor peso molecular en la membrana de Western Blot puede indicar que la proteína heteróloga se fragmenta durante el proceso de extracción y purificación. Resultados similares han sido reportados para proteínas heterólogas en sistemas vegetales, por ejemplo en plantas transgénicas de soya, células en suspensión de tabaco, semillas de maíz [11, 12] y en cultivos de células en suspensión de arroz [13]. Estos fragmentos de la proteína pueden ser generados durante el procedimiento de purificación o debidos también a la actividad proteolítica in planta [12]. Estas situaciones han sido ya abordadas y reconocidas como factores importantes que afectan la estabilidad de las proteínas y su expresión en sistemas vegetales. Debe mencionarse que, aunque en el sistema de raíces transformadas de brócoli no se ha encontrado actividad proteolítica significativa, el rendimiento total de la proteína hGH1 podría ser mejorado implementando estrategias para prevenir su degradación, como la co-expresión con inhibidores de proteasas [14, 15] o la adición directa de inhibidores de proteasas al medio de cultivo [12]. Por otro lado, el análisis de la huella peptídica de la muestras purificadas permitió correlacionar sin ambigüedad la proteína heteróloga con la somatotropina mediante



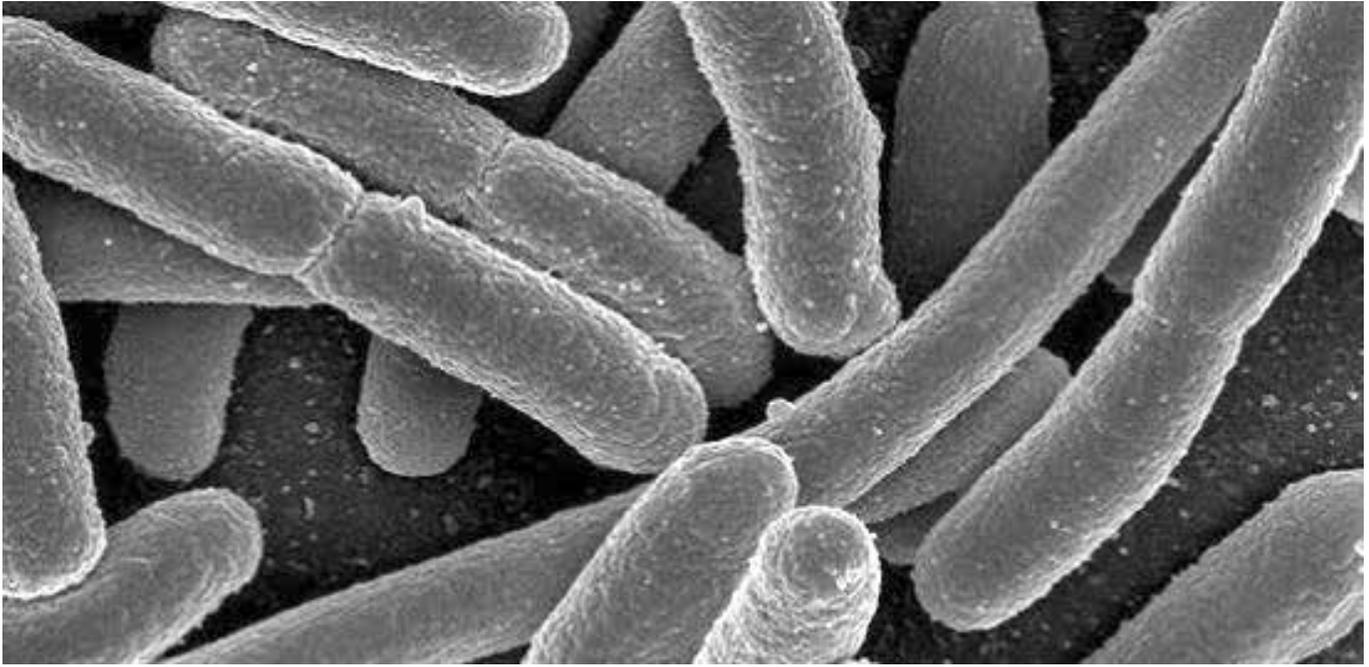
una comparación contra la base de datos de Swissprot, sugiriendo sólidamente que los cultivos de raíces transformadas están expresando de manera correcta la hGH1 a nivel de estructura primaria.

Conclusiones

Las fracciones proteicas y muestras purificadas corresponden a la hGH1 expresada heterológamente por los cultivos de raíces transformadas de brócoli. Esta conclusión es soportada por la identificación positiva en inmunoensayo, mediante el reconocimiento y detección de peso molecular en el análisis de Western Blot, y por los patrones de fraccionamiento y secuencia peptídica similar a la de hGH1 observados en el análisis por MALDI-TOF.

Referencias

- Schmidt FR. "Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry". *Appl Microbiol Biotechnol*. 65:363-372, 2004.
- Doran P. "Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures". *Trends in Biotechnology*. 24: 426-432, 2006.
- Hu Z., Du M. "Hairy root and its application in plant genetic engineering". *Journal of Integrative Plant Biology*. 48: 121-127. 2006.
- Tzfira T., Citovsky V. "Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology". *Current Opinion in Biotechnology*. 17: 147-154, 2006.
- Twyman R. "Host Plants, Systems and Expression Strategies for Molecular Farming". En: Rainer Fischer y Stephan Schillberg (eds) *Molecular Farming*. 191-216, 2004.
- Sharp M, Doran P. "Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures". *Biotechnol. Prog.* 17: 979-992, 2001.
- Guillon S. *et al.*, "Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era". *Trends in Biotechnology*. 24: 403-409. 2006.
- García E., Calva G., *et al.*, "Inducción de raíces transformadas de Brassica oleracea var. italica (Brócoli) útiles para la producción de proteínas heterólogas con actividad terapéutica". *Tecnocultura* 19: 26-34. ISSN 1870-7157, 2008.
- García E., Calva G. *et al.*, a. Variabilidad de la expresión de la hormona de crecimiento humano en cultivos de raíces transformadas de Brassica oleracea var. italica. XVII National congress of Biochemical Engineering, VI International congress of Biochemical Engineering, VIII Biomedicine and Molecular Biotechnology Meeting. Acapulco, Guerrero, México. Trabajo: BML488FRE20100216. 2010.
- García E., Calva G. *et al.*, b. Expression of the human growth hormone in hairy roots cultures of Brassica oleracea var. italica. XV International Scientific Congress CNIC'2010. Organized by the National Center for Scientific Research. Havana, Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 41 (Número Especial): PNA050 ISSN 0253-5688. 2010.
- Staub J. *et al.*, "High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts". *Nat Biotechnol*. 18: 330-338, 2000.
- Russell D. *et al.*, "Host limits to accurate human growth hormone production in multiple plant systems". *Biotechnol Bioeng*. 89:775-782, 2005.
- Kim T. *et al.*, "Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture". *Plant Cell Rep*. 27:885-891, 2008.
- Kim T. *et al.*, "Reduced protease activity in transformed rice cell suspension cultures expressing a proteinase inhibitor". *Protein Expr. Purif*. 53:270-274, 2007.
- Xu Z. *et al.*, "Inhibition of endogenous trypsin- and chymotrypsin-like activities in transgenic lettuce expressing heterogeneous proteinase inhibitor SaPIN2a". *Planta* 218, 623-629, 2004.



Expresión del Fragmento 6xHis-hGH1 en Cultivos de *E. Coli* por Fermentación en Lote

Tania María Ascencio Carbajal^a, María Teresa Ponce Noyola^a, María del Carmen Montes Horcasitas^a, Armando Ariza Castolo^a, Octavio Gómez Guzmán^a, Josefina Pérez Vargas^b, Graciano Calva Calva^a

Resumen

La hormona de crecimiento humano (hGH1), es una proteína producida en la glándula pituitaria y exhibe extensos efectos fisiológicos en el cuerpo humano, sus aplicaciones pueden ser tanto terapéuticas como estéticas. Comercialmente se produce en cultivos de células de mamífero y en *Escherichia coli* (*E. coli*.) La finalidad del trabajo, como parte de un

Acerca de los autores...

^a Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN.

^b División Ingeniería Bioquímica, Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.

proyecto global, fue establecer un sistema control de expresión de la hGH1 en *E. coli*, que pueda ser utilizado como comparativo contra otros sistemas de expresión dentro del grupo de trabajo, tanto microbianos como lo es *Bacillus thuringiensis* (1) y sistemas vegetales como los cultivos de raíces transformadas (4, 2).

Primero se obtuvo el gen de la hGH1, mediante PCR a partir del vector pBS-hGH1. El producto de restricción se insertó en el vector de expresión bacteriano pProEx HTb entre los sitios de restricción EcoRI y XhoI. Dicho vector presenta la ventaja de incluir una marca de seis Histidinas en el extremo amino terminal a la secuencia codificante para la proteína heteróloga, plásmido denominado "pEOhGHis". El plásmido pEOhGHis se clonó en *E. coli* DH5 α mediante choque térmico para obtener la cepa *E. coli* pEOhGHis. Se realizó una fermentación en lote para determinar la cantidad de proteína total específica producida (1.16ng/QL), la cual se dio de manera asociada al crecimiento y potenciada por la adición del inductor IPTG. Se identificó el fragmento 6xHis-hGH1 con un tamaño de 29.5 kDa.

Introducción

Una de las estrategias comúnmente utilizadas para favorecer la recuperación y purificación de proteínas heterólogas, es el uso de una marca de histidinas en la proteína, lo que a la vez puede facilitar su detección, y generalmente sin afectar su estructura ni actividad biológica (7,3). El vector pProEX HTb (Invitrogene, EUA), es un vector de expresión bacteriana inducible, que incluye una la secuencia para una marca de 6 Histidinas que se añaden a la proteína clonada en el extremo amino terminal.

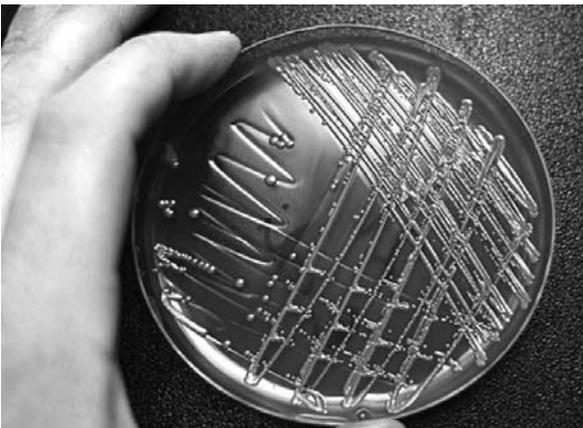
La marca de 6XHis resulta ser uno de los sistemas de adición de marcas a proteínas más económico y por su secuencia pequeña disminuye la probabilidad de producir efectos negativos en la estructura y expresión de la proteína (9); ello lo hace un método bastante atractivo para la purificación de proteínas heterólogas, además de que es fácilmente escalable (10). La proteína de interés, es la hormona del crecimiento humana isoforma 1 (hGH1), también conocida como somatotropina. Es un polipéptido de cadena única de 22 kDa, conformada por 191 aminoácidos, estabilizada por dos puentes disulfuro, desempeña un papel importante en el metabolismo, la síntesis de proteínas y la proliferación celular (8). *E. coli* ha sido el microorganismo de producción comercial de la hGH desde los años 80. En sistemas bacterianos, la proteína no es producida en su estructura funcional, ya que no se realiza la formación de puentes de disulfuro, con lo que se afecta el plegamiento; para ello se desarrollan alternativas que buscan favorecer la recuperación, purificación y el plegamiento *in vitro* de las proteínas heterólogas a partir de sistemas procariotas (6).

Metodología

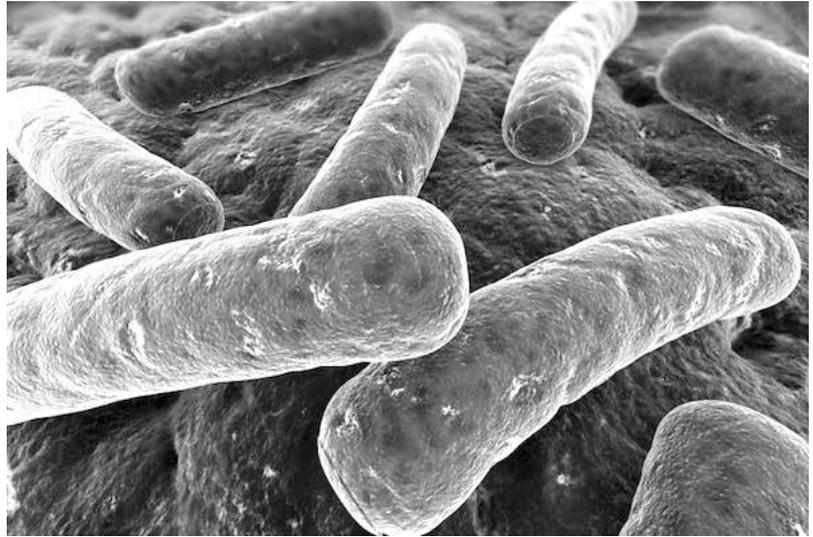
Se extrajo el gen de hGH1, a partir del plásmido pBluescript-hGH (pBS-hGH1) mediante amplificación por PCR. Para ello, se diseñaron los siguientes oligos: directo:

5'-ATAGAATTCTCAAGGCCCAACTCCCCG-3' y reverso:
5'-CGGCTCGAG GGATGCACTTAATTTTAT-3'

que amplifican un fragmento de 833 pb a una temperatura de 58 °C.



Se añadieron secuencias para enzimas de corte EcoRI en el 5' y XhoI en el 3', con las cuales posteriormente se digirió el amplificado. El producto de restricción se ligó en el vector de expresión bacteriano pProEx HbTM previamente digerido con las mismas enzimas, siguiendo el protocolo de T4 DNA Ligasa (15224-041, Invitrogene, EUA) en una relación inserto:vector 3:1; el plásmido resultante se denominó "pEOhGHis". La mezcla de ligación se corrió en un gel de agarosa para identificar la banda de interés de 5534 pb, que corresponde a la unión del gen de hGH1 al vector pProEX HTb; finalmente, se clonó por choque térmico en *E.coli* DH5 α utilizando 2QL de la mezcla de ligación y las clonas transformantes se analizaron por digestión enzimática y PCR.



Para la fermentación en lote, se empleó un birreactor Applikon de 3L, el cual está equipado con sensor de temperatura integrado, una hélice tipo Rushton de seis paletas para el mezclado y un difusor de aire tipo "L", electrodo de pH (Z001023510, Aplisens) y de oxígeno disuelto (Z71202API0, Applikon). Se suministró aire pasado a través de un filtro estéril de 45Qm (Midisart 2000, Sartorius, Alemania). Se ajustaron los parámetros de control de manera automática y manual cuando fue necesario desde la computadora mediante el software BioXpert versión 1.15. La temperatura se mantuvo constante a 37 °C mediante circulación de agua a través de la chaqueta. La velocidad de agitación se controló manualmente para lograr una saturación de oxígeno en el reactor superior al 20%, ésta varió entre 400 y 900 rpm. El flujo de aire se inició en 1 vvm y se aumentó a 1,5 vvm cuando se requirió para mantener la demanda de oxígeno por encima del 20%. Para el control de la espuma, se adicionaron gotas de una suspensión 1:1 v/v de antiespumante (Mazu-DF 7911, Mazer, México) cuando fue necesario. El volumen de operación del reactor fue de 1.5 L y se utilizó medio de cultivo LB. Los reactivos fueron obtenidos de Becton, Dickinson and Company (EUA). El medio fue preparado y esterilizado junto con el reactor en autoclave a 121 °C por 15 minutos; posteriormente se adicionó en condiciones de esterilidad, el inóculo y ampicilina para una concentración de 100 Qg/mL. El inóculo se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, con 135 mL de medio, y fue inoculado con una asada de un cultivo de agar inclinado y se incubó a 37 °C con agitación por 12 horas. El bioreactor se inoculó con el cultivo de 150 mL de 12 horas y la primer muestra fue tomada. La toma de muestra se llevo a cabo cada hora por 11 horas. Cuando la densidad óptica del cultivo fue de 0.7, se añadió el inductor (IPTG a una concentración final de 0.6 mM). Se realizaron las determinaciones de densidad óptica a 600 nm, en peso seco, SDS-PAGE (5) y ensayos tipo Elisa (KAQ1081, Invitrogene, EUA) para detectar la aparición y cuantificar la proteína hGH1.

Resultados

La descripción gráfica de la estrategia para la construcción del vector pEOhGHis, se muestra en la Figura 1, donde se observa que el gen hGH1 se encuentra inserto en el vector pBS-hGH1 entre los sitios EcoRI y XhoI y es clonado en el vector pProEX dentro de esos mismos sitios.

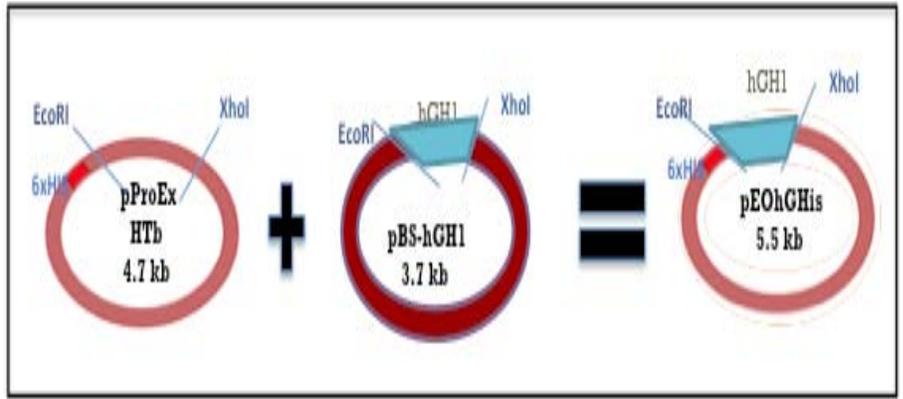


Figura 1

Esquema de la construcción del vector pEOhGHIs.

Primeramente se amplificó exitosamente por PCR el gen hGH1, partiendo del vector pBS-hGH1, como lo muestra la Figura 2, se obtuvo un producto de 833 pb, correspondientes al gen de hGH1 incluyendo las secuencias de las enzimas EcoRI y XhoI.

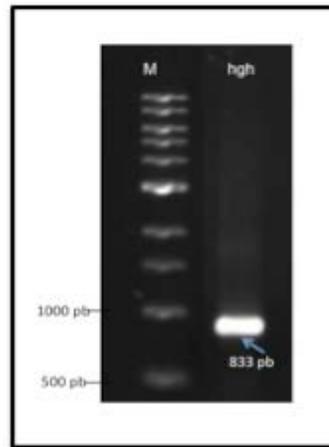


Figura 2

Amplificación por PCR del cDNA de hGH1. M, marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb, Biolabs), hgh: amplificado del gen hGH1 a partir del vector pBS-hGH. Gel de agarosa 1%, corrimiento a 100V por 45 minutos.

Una vez amplificado el gen y digerido con las enzimas EcoRI y XhoI tanto el producto de PCR como el vector pProEX HTb, se realizó la ligación entre ambos. De la mezcla de ligación, se identificó la banda que correspondería al tamaño del vector esperado de 5.5 kb, que se muestra en la Figura 3; las demás bandas que aparecen en el gel pertenecen a la ligación del gen entre sí mismo.

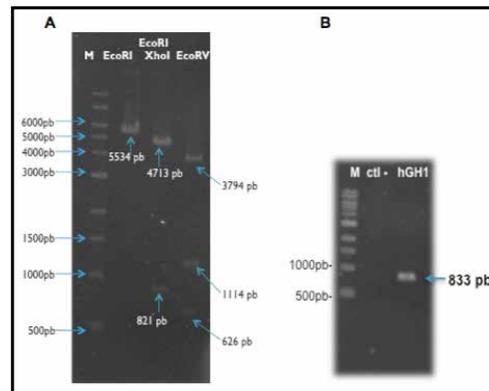


Figura 3

Mezcla de ligación para obtener el vector pEOhGHIs. M, marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb, Biolabs), 3:1 mezcla de ligación en proporción inserto: vector 3 a 1. Gel de agarosa 1%, corrimiento a 100V por 60 minutos.

Las clonas resultantes luego de la transformación se aislaron y analizaron para verificar la presencia del vector de interés, los resultados de la caracterización del vector pEOhGHis se muestran en la Figura 4.

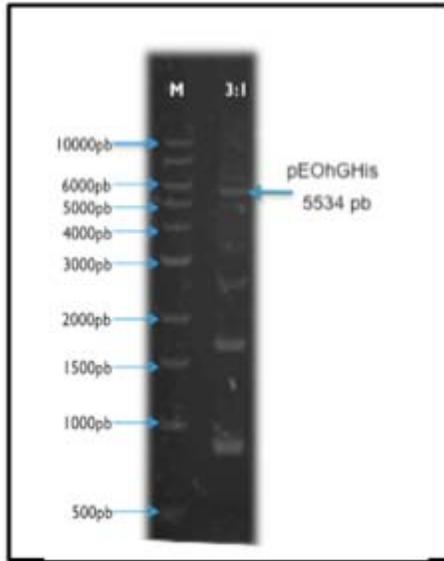
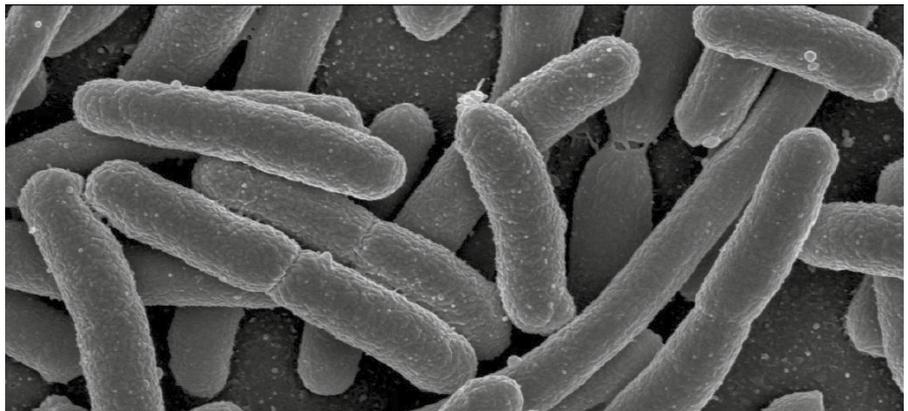


Figura 4

Caracterización del vector pEOhGHis por restricción y PCR. A. Corte del vector pEOhGHis con las enzimas EcoRI, EcoRV y liberación del fragmento hGH1 con EcoRI y XhoI. M, marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb). Gel de agarosa 1%, corrimiento 100V, por 60 minutos B. Amplificación por PCR del gen hGH a partir del vector pEOhGHis, Ctrl-, control negativo el vector pProEX HTb. Gel de agarosa 1%, corrimiento a 100V por 25 minutos.

Como se observa en la Figura 4.A, se obtuvieron los fragmentos esperados para la construcción del vector pEOhGHis. Linealizado con la enzima EcoRI, se obtuvo una banda de 5534 pb, la enzima EcoRV corta en tres sitios diferentes del vector, por ello, se obtienen los fragmentos de 626 pb, 1114 pb y 3794pb, y para la liberación del gen de hGH se utilizó EcoRI y XhoI, dando como resultado 4713 pb que corresponden al resto del plásmido y 821 pb correspondientes al gen de hGH1 (el cambio en el tamaño del gen de 833pb a 821pb es debido a que luego del corte con las enzimas se pierden algunas bases unidas a la secuencia). Con los anteriores resultados y la Figura 4.B, se comprueba que la secuencia inserta en el vector pEOhGHis es en efecto el gen de la hGH1.

Ya que el vector pPEOhGHis es un vector inducible, se esperó que el cultivo en la fermentación, llegara a una densidad óptica de 0.7 para añadir el inductor IPTG y ello diera lugar a la síntesis de la proteína hGH1. El tiempo de adición del inductor se encuentra señalado en la Figura 5 por una flecha roja a las 3.5 horas. La mayor acumulación de biomasa fue entre las 6 y 7 horas con 1.95 g/L, después de este tiempo empieza el decaimiento celular.



Como se muestra en la Figura 5, mediante los datos de peso seco y densidad óptica se pudo graficar el perfil de crecimiento de la cepa pEOhGHis, identificando las fases de adaptación (0-2h), crecimiento exponencial (2-5 h), desaceleración (5-7 h) y la estacionaria (7-11 h) características del crecimiento microbiano.

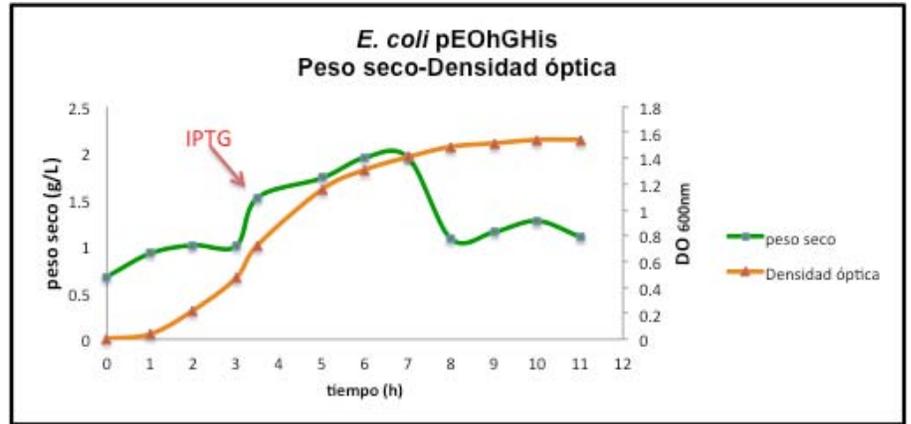


Figura 5

Gráfica con los resultados de peso seco y densidad óptica de la fermentación en lote de la cepa E. coli pEOhGHis.

La producción de hGH se determinó a partir de cada muestra y como se aprecia en la Figura 6, la síntesis de la proteína se inicia durante la fase de crecimiento exponencial, mas se dispara al añadir el inductor al cultivo, la máxima cantidad de proteína hGH1 detectada fueron 1.16 ng/QL de cultivo acumulados al final de la fermentación. Si bien es un valor bajo de producción, es una cantidad suficiente para ser utilizado como un control positivo y de comparación dentro del grupo de trabajo.

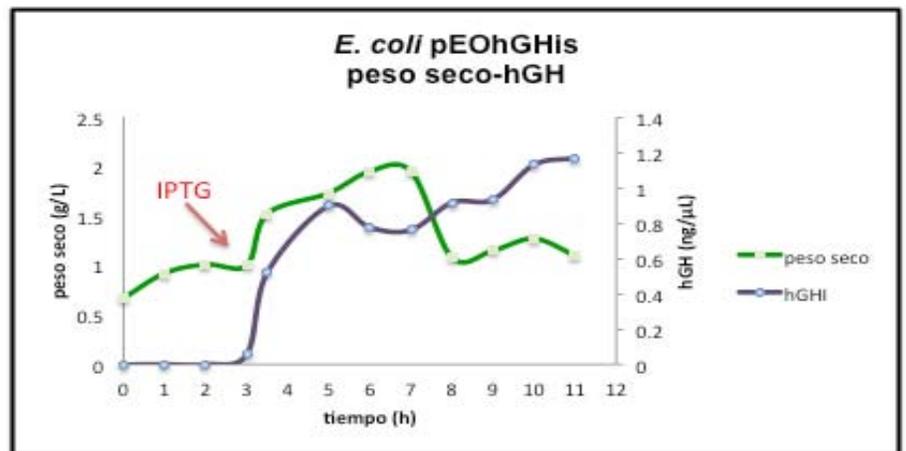


Figura 6

Gráfica con los resultados de peso seco y cuantificación de hGH de la fermentación en lote de la cepa E. coli pEOhGHis.

Se logró detectar mediante el análisis SDS-PAGE la banda correspondiente a la proteína hGH1 ligada a los seis residuos de Histidina, con un tamaño aproximado de 29.5 kDa, como se muestra en la Figura 7, con una banda destacada con una flecha; se observa que aumenta de tamaño en los distintos carriles, es decir, que hay mayor acumulación de dicha proteína respecto al tiempo, lo cual coincide con los datos de la cuantificación de hGH; además,

no se aprecia la banda de la proteína en el control negativo (vector pProEX HTb ni en una muestra del tiempo 1 (antes de la inducción), con lo cual puede deducirse que efectivamente, la banda señalada corresponde a la de la proteína hGH1- ligada a los seis residuos de Histidina.

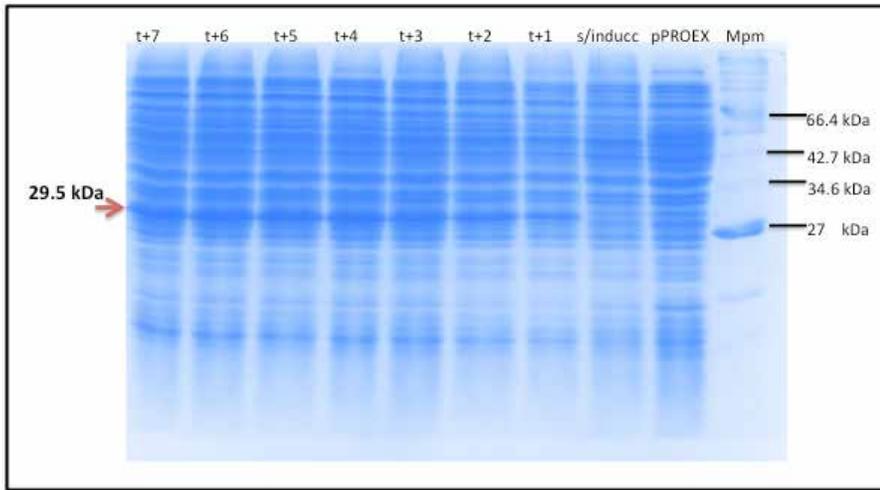


Figura 7

Gel de poliacrilamida con las muestras de proteína de *E. coli* pEOhGHis. Mpm marcador de proteínas de amplio rango 2-212 kDa (New England, Biolabs), pProEX es el control negativo, s/inducc es la muestra del tiempo1 aún sin inductor; t+1 a t+7 son las muestras después de la inducción. Corrimiento a 80V por una hora y luego 100V por tres horas en una fuente de poder (Enduro power supply, 250V, Labnet, USA).

Conclusiones

- Los primers diseñados para amplificar el de hGH1 funcionan correctamente, proporcionando un producto de 833 pb.
- El plásmido pEOhGHis incluye el gen de hGH1 ligado a la secuencia de 6 Histidinas (6xHis-hGH1) y se encuentra clonado en *E. coli*.
- La cepa de *E. coli* que contiene el plásmido pEOhGHis es resistente a la ampicilina y produce la proteína hGH1 de manera asociada al crecimiento y con ayuda del inductor.
- El tamaño del péptido 6xHis-hGH1 es de 29.5 kDa.

Referencias

Ascencio Carbajal T., "Evaluación de *Bacillus thuringiensis* 4D22 como posible modelo de expresión de proteínas heterólogas", Tesis de maestría en curso, CINVESTAV-IPN, 2013.

Cabral Quezada C., "Establecimiento de cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. itálica (brócoli) transformadas con el cDNA del gen de la hormona del crecimiento humano unido a una marca de 6xHis". Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, 2012.

Garbec V., Menart V., "Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography", *J. Biochem Biophys Methods*, Vol. 49, No. 1-3, p. 335-360, 2001.

García López E., "Establecimiento de cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. itálica (brócoli) transformadas con el cDNA del gen1 de la hormona de crecimiento humano. Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, 2009.

Laemmli UK., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*. Vol. 227, No. 5259, p.680-685,1970.

Liu H, Bravata D. M., "Systematic review: the safety and efficacy of grow hormone in the healthy elderly", *Ann Intern Med*, Vol. 146, No. 2, p. 104-115, 2007.

Peti W, Page R., "Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost", *Protein Expr Purif*, Vol. 51 No. 1, p. 1-10, 2007.

Tritos NA, Mantzoros CS. Recombinant human growth hormone: old and novel uses. *Am J Med*. 1998;105:44-57

Waugh D.S., "Making the most affinity tags", *Trends Biotechnol*, Vol. 23, No. 6, p. 316-320, 2005.

Waertens B., Block H., "Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review", *Methods Enzymol*, Vol. 463, p. 439-473, 2009.



Cambios en la Composición de Ácidos Grasos de *C. laxus* en un Sistema de Fitorremediación con Petróleo Crudo

Noemí Araceli Rivera Casado^a, María del C. Montes Horcasitas^a, Refugio Rodríguez Vázquez^a, Fernando J. Esparza García^a, Octavio Gómez Guzmán^a, Armando Ariza Castolob, Josefina Pérez Vargas^c, Graciano Calva Calva^a

Resumen

En este trabajo, se estudió el efecto de hidrocarburos poliaromáticos (HPA) sobre el perfil de ácidos grasos de *Cyperus laxus* cultivado tanto en condiciones de invernadero como en cultivos *in vitro*. Para el sistema en invernadero, *C. laxus* fue cultivado en suelos intemperizados e impactados con petróleo crudo con concentraciones de hasta 340, 000 mg/Kg de hidrocarburo totales (HTP), mientras que en sistemas *in vitro* se utilizó fenantreno como HPA modelo (0-280 mM) incorporado en un medio semisólido de cultivo vegetal. El perfil de ácido graso fue específico para cada órgano vegetal y estuvo relacionado con el tipo de HPA presente en el sitio. Para ambos sistemas, en las plantas crecidas en ausencia de hidrocarburo se identificaron

Acerca de los autores...

^a Departamento de Biotecnología, CINVESTAV, IPN.

^b Departamento de Química, CINVESTAV, IPN.

^c Posgrado en Ingeniería Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

ácidos grasos comunes de C14-C24 saturados e insaturados. Sin embargo, en presencia de hidrocarburos se identificaron ácidos grasos impares (C15, C17, C21, C23), cadenas hidrocarbonadas con posición y número de insaturaciones poco comunes (C20:3n6, C20:4) así como un aumento en la concentración de C22:2 y C24:0 en tejido de B y hoja. Estos resultados demuestran que la presencia de HPA afecta drásticamente la composición de ácido graso de *C. laxus*, lo que podría estar sugiriendo que el proceso de de remoción de HPA en un sistema de fitorremediación conlleva a un cambio de la composición lipídica de célula vegetal.

Introducción

Las actividades antropogénicas aunadas a los cambios hidrológicos del sitio han ocasionado la contaminación por petróleo crudo de grandes extensiones de suelo en el estado de Tabasco. Estudios previos revelaron que en dichos suelos prevalecía la presencia de hidrocarburos poliaromáticos (HPA), los cuales han sido catalogados como compuestos tóxicos y carcinogénicos, debido a su bajo nivel de biodisponibilidad y biodegradabilidad [1]. Para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos se han reportado diversas tecnologías [2], sin embargo se observó que específicamente en los sitios de interés había una implementación natural de organismos vegetales que podría estar hablando de sistemas de fitorremediación. Aunque el mecanismo de remoción depende de la capacidad metabólica de cada especie vegetal, no se tiene suficiente información acerca de la interacción entre los compuestos estructurales de la planta y los compuestos xenobióticos durante el proceso de fitorremoción. Hasta el momento algunos autores mencionan que HPA del tipo antraceno y fenantreno pueden traslocarse al tejido vegetal por simple difusión, sin embargo esto conlleva cambios en ciertas propiedades fisicoquímicas tanto del compuesto como del tejido vegetal [3-4]. Por lo anterior, se han realizaron evaluaciones sobre el perfil de compuestos fenólicos e HPA en el tejido vegetal de una de las especies pioneras del sitio contaminado: *Cyperus laxus* y fueron detectadas conjugaciones entre HPA-fenoles sugiriendo un interacción química y enzimática entre el xenobiótico y los metabolitos vegetales, de acuerdo con lo señalado por Rivera Casado, *et al.*, (2010). Continuando bajo esta línea, en el presente trabajo, se demostró que la presencia PHEN como hidrocarburo modelo, afecta drásticamente la composición lipídica de los órganos de *C. laxus* sugiriendo que la remoción de HPA en un sistema de fitorremediación depende de los cambios en la composición de lípidos en la célula.

Metodología

Materia vegetal. Para el cultivo *in vitro*, se colectaron y desinfectaron semillas de *C. laxus* desarrolladas en sistemas de invernadero y crecidas en suelo contaminado con 16,000 ppm (S163), 140,000 ppm (SSR) ppm, y 340,000 ppm (S205) de HTP. Las semillas se germinaron en un medio MS adicionado con sacarosa a 30g/L. De igual forma, se colectaron plantas crecidas directamente de los sistemas de invernadero y se obtuvieron los extractos lipídicos de los tres principales órganos de la planta.

Sistemas *in vitro* adicionados con PHEN. Se preparó y esterilizó por filtración una solución stock de PHEN en acetona. Se incorporó en caliente a 25 mL de medio MS previamente esterilizado, obteniendo concentraciones finales de 0, 5, 15, 30 y 50g/L (0, 28, 84, 168, 280 mM). El PHEN residual se obtuvo mediante extracciones con acetato de etilo/agua (1:1), que posteriormente se





llevó a sequedad y se resuspendió en una mezcla de acetato de etilo:hexano (1:1). La concentración de PHEN se cuantificó por HPLC en una columna PRODIGY ODS2.

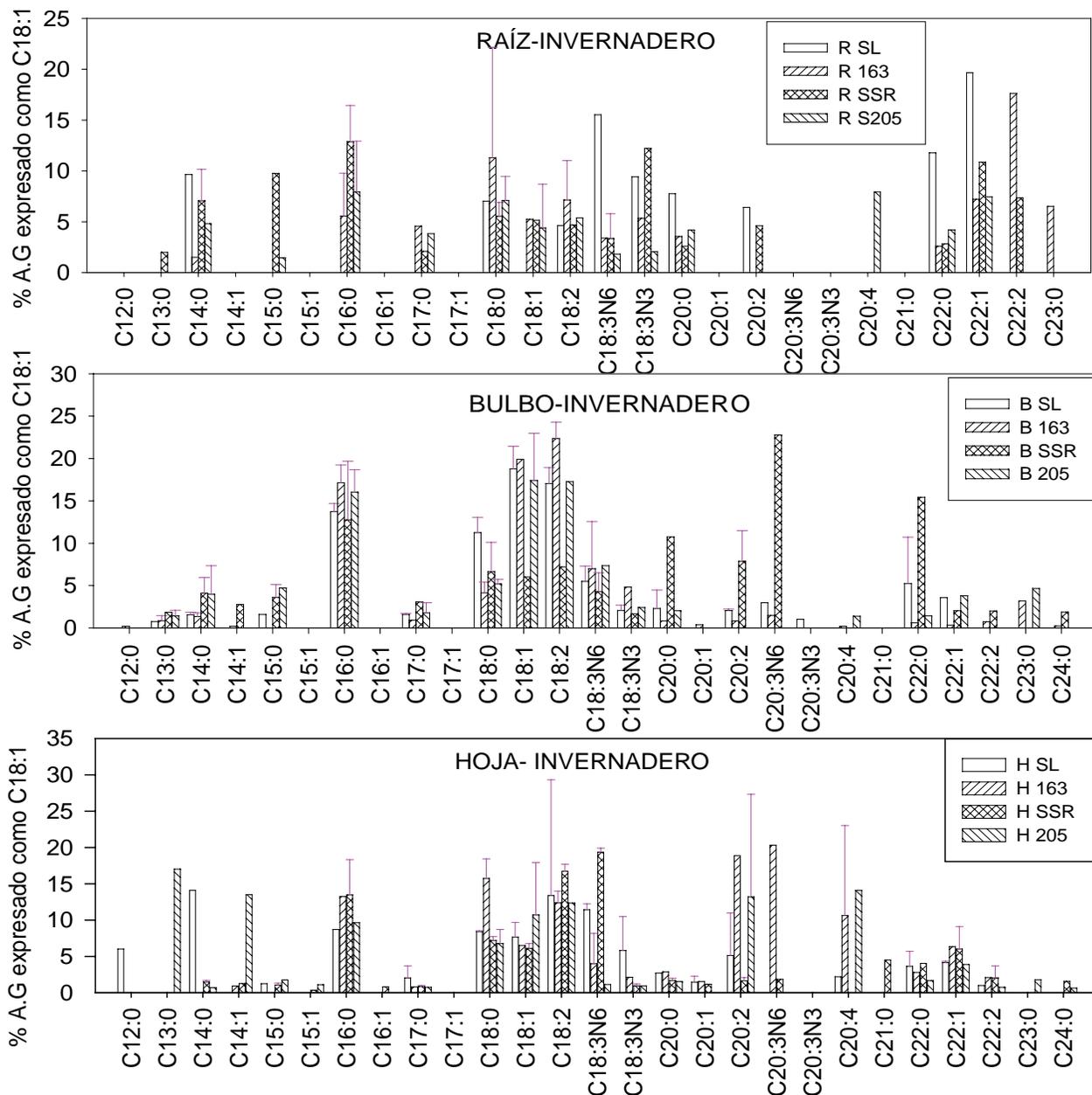
Extracción de compuestos lipídicos. A partir de tejido de raíz (R), bulbo (B) y hoja (H) de *C. laxus* se realizaron extracciones (3x) con cloroformo:metanol (1:1). Se realizó la transesterificación directa propuesta por Burjua, *et al.*, 2007., La identificación y cuantificación de ácidos grasos se llevó a cabo por CG y GC/MS mediante la comparación con los tiempos de retención con el estándar SUPELCO 37 FAME MIX.

Resultados

Perfil de ácidos grasos en órganos de *C. laxus* crecidos en suelos contaminados con petróleo crudo bajo condiciones de invernadero.

Se identificaron ácidos grasos de cadena par de C12:0 a C24:0 en los extractos de los órganos de *C. laxus* crecidos bajo las diferentes concentraciones de TPH (163, SSR, 205) y en el suelo control no contaminado (SL, Figura 1). Interesantemente, también se identificaron ácidos grasos de cadena impar, tales como C13:0, C15:0, C17:0 y C21:0 específicamente en los extractos de órganos de plantas crecidas en suelos contaminados. La presencia de los hidrocarburos en el suelo genera una disminución en la concentración de algunos ácidos grasos presentes en el tejido, tales como C18:3n6, C18:3n3, C20:0, C22:0 y C22:1 en R; C18:0 en B y C14:0, C17:0, C18:3n3 en hoja. Mientras que la concentración de otros ácidos grasos no se ve afectada, tal es el caso de C18:0, C18:1, C18:2 en R; C16:0, C18:1, C18:2, C18:3n6, C18:3n3, C22:1 en B y C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1, C22:2 en H. Sin embargo, se favorece la síntesis de ciertos ácidos grasos cuando la planta se encuentra creciendo en suelo contaminado, por ejemplo C15:0, C17:0, C20:4, C22:2, C23:0 en R; C14:0, C15:0, C20:2, C20:3n6; C22:2, C23:0, C24:0 en B y C20:3n6, C20:4, C21:0, C23:0, C24:0 en H. Para esta última observación, es importante





considerar que no todos los cambios se observan para todas las plantas que crecieron en los diferentes suelos, más bien ciertos comportamientos se observaron para aquellos suelos donde se tenía la concentración de THP más alta. Por ejemplo, la presencia de C15:0 se observó únicamente en los extractos de las raíces crecidas en el suelo SSR y S205, mientras que C17:0 para el mismo extracto de órgano únicamente se observó en las plantas crecidas en suelo S163 y SSR.

Estos resultados sugieren que los cambios en el perfil de ácido graso en el tejido de *C. laxus* pudieran estar relacionados tanto con el tipo de hidrocarburo presente en el suelo como del metabolismo intrínseco de cada órgano vegetal como respuesta a cambios en el ambiente. De ello, la presencia de ácidos grasos de cadena impar en extractos de R y H pudiera estar implicando la participación de rutas bioquímicas alternas en los plástidos, tal como la biosíntesis a partir de aminoácidos en lugar de la ruta reportada a través de

Figura 1

Perfil de ácido graso en tejido de raíz (R), bulbo (B) y hoja (H) de *Cyperus laxus* crecido en suelos intemperizados e impactados con petróleo crudo con 16,000 ppm (S163), 140,000 ppm (SSR) ppm, 340,000 ppm (S205) de hidrocarburos totales del petróleo en relación con plantas cultivadas en suelos no contaminados (SL).

acetil-CoA durante condiciones de estrés en plantas [5-6]. Por otro lado, la presencia de ácidos grasos de cadenas largas pares o impares en los extractos de tejido de plantas expuestas a hidrocarburo tales como C20-C24, los cuales son componentes o precursores de estructuras celulares como membrana, cutícula, suberina o ceras en la célula vegetal. Algunos autores sugieren cambios importantes, tanto bioquímicos como fisiológicos ya sea a nivel celular, de órgano y de organismo completo como respuesta a la presencia de HPA en un sistema de fitorremediación [5, 7-8].

Perfil de ácidos grasos en órganos de *C. laxus* cultivados in vitro y sometidos a PHEN. Dadas las observaciones en los sistemas de fitorremediación en invernadero, se establecieron sistemas de cultivo *in vitro* de *C. laxus* utilizando PHEN como hidrocarburo modelo. La sobrevivencia de las plantas y el contenido de clorofila se vieron afectados entre los 7 y 14 días de cultivo en presencia de PHEN (Figura 2). La clorosis fue evidente después de siete días a concentraciones de 168 mM y 281 mM del PAH; a los 14 días para 84 mM de PHEN, y a los 21 días con 28 mM PHEN. Se reportó un comportamiento similar para *Arabidopsis* [9] expuesta a 0.05 mM de PHEN, donde la clorosis fue evidente a partir de las 6 horas de haber sometido la planta al PAH, lo cual pudiera estar relacionado con el aumento de especies reactivas de oxígeno en el tejido como consecuencia de la presencia del xenobiótico en el medio, ya que se ha reportado que la toxicidad del PAH disminuye la actividad del metabolismo vegetal dañado a nivel de membrana celular, lo que reduce el transporte de nutrientes y metabolitos a la célula.

Interesantemente, *C. laxus* no presentó cambios fenológicos antes de 21 días de tratamiento a concentraciones de PHEN mil veces superiores a las reportadas con *Arabidopsis*, lo que sugiere que esta *Cyperaceae* posee características metabólicas específicas que le permiten sobrevivir a la presencia de este tipo de hidrocarburos recalcitrantes. Estas diferencias metabólicas pudieran estar relacionadas con la cantidad de HPA y el tipo de órgano donde fue adsorbido el xenobiótico en el tejido vegetal (Tabla 1). Aunque de manera general, se

Órgano	PHEN (mM)				
	0	28	84	168	280
Raíz	n.d.	5.619 ± 4.54	17.620 ± 10.39	29.165 ± 16.44	24.1 ± 5.7
Bulbo	n.d.	3.015 ± 2.95	2.275 ± 2.04	3.93 ± 0.127	4.9 ± 4.3
Hoja	n.d.	3.385 ± 0.93	2.172 ± 1.63	4.200 ± 0.3960	7.5 ± 0.3
Total/g planta	n.d.	4.001 ± 2.52	7.355 ± 4.686	12.431 ± 5.654	12.166 ± 3.433
Remanente	----	67 ± 14.1	60 ± 16.9	30.5 ± 2.1	89.6 ± 2.2
Remoción (%)	----	33	40	69.5	10.4

Tabla 1

Concentración de PHEN (mM/g) en órganos de *Cyperus* después de 21 días de cultivo.

observó una mayor acumulación de PHEN en tejido de R y H conforme se incrementó la concentración de HPA en el medio, fue notable que la máxima acumulación en R se alcanzó cuando se tuvo una concentración de 169 mM de PHEN en el medio, mientras que la acumulación en H se incrementa a 280

mM de PHEN. No obstante, aunque los valores de hidrocarburo residual no mostraron ninguna relación respecto a la cantidad de PHEN adicionado al medio, se observó que los datos más elevados de acumulación y de remoción se obtuvieron a una concentración de 168 mM.

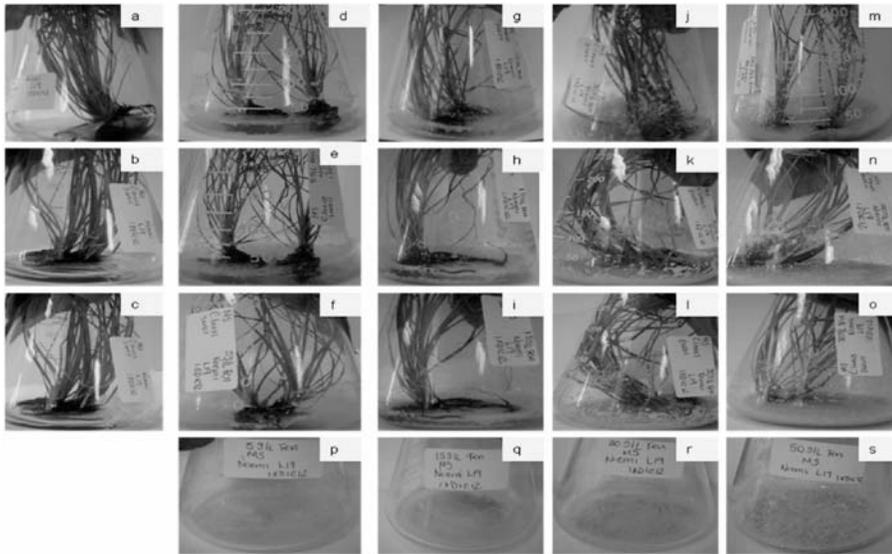


Figura 2

Cultivo in vitro de *Cyperus* a los 7, 14 y 21 días en medio MS bajo 0 (a, b, c), 28 (d, e, f), 84 (g, h, i), 168 (j, k, l) y 280 (m, n, o) mM de PHEN. Los controles abióticos en medio MS + PHEN (p, q, r y s). Para el experimento, se trasplantaron organismos de un año de cultivo en medio MS y fueron colocados en un medio con PHEN. Después de 21 días, se realizaron extractos de la fracción lipídica de cada órgano vegetal y se evaluó el PHEN residual.

Efecto del PHEN sobre el perfil de ácidos grasos en cultivos in vitro de *C. laxus*. Con base en los resultados anteriores, los cambios fisiológicos de *C. laxus* dada la presencia de PHEN están íntimamente relacionados con cambios en el metabolismo vegetal, por lo que en esta sección se evaluaron los cambios en el perfil de ácido graso de los diversos órganos de *C. laxus* por la presencia de PHEN como HPA, modelo en un sistema aséptico (Figura 3). Se identificaron ácidos grasos de cadena par, C14:0 a C24:0 saturados y hasta con tres insaturaciones, así como de cadenas impares de C13:0 a C23:0 saturados y con una insaturación.

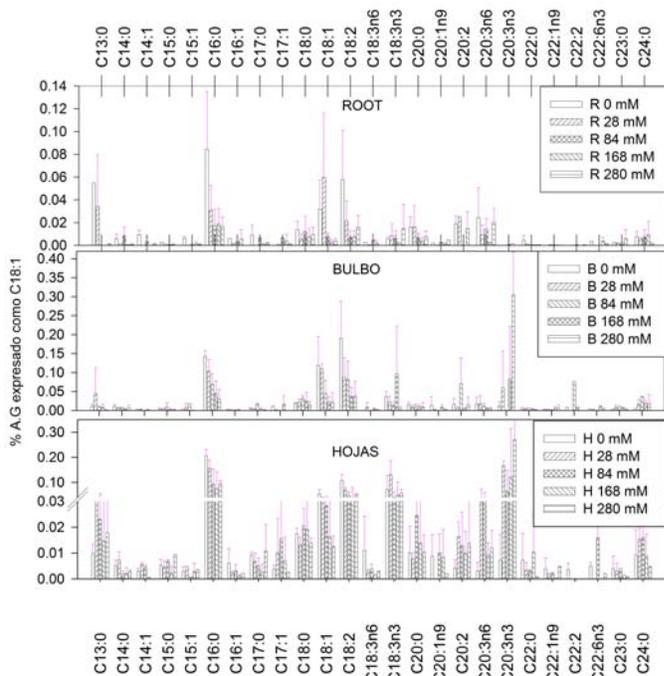


Figura 3

Perfil de ácidos grasos en raíz (R), bulbo (B) y hoja (H) de *Cyperus laxus* cultivado in vitro en medio MS adicionado con 0-280 mM de PHEN

Fue notable la gran variabilidad de los resultados, dado que se consideraron los valores promedio de la respuesta de los extractos de tejido de individuos diferentes sometidos al mismo tratamiento. Este comportamiento se fundamenta en la variabilidad genética en plantas, aunado a la variabilidad reportada específicamente para la familia *Cyperaceae* [10]. Por otro lado, dada la versatilidad metabólica de las plantas, se conoce que la respuesta de cada individuo dependerá de la concentración del hidrocarburo, de la disponibilidad del mismo al tejido y del metabolismo de cada especie vegetal [3-4].

Efecto del PHEN en el perfil de ácido graso de cultivos *in vitro* de *C. laxus*.

Los resultados evidenciaron una disminución en la cantidad de ácidos grasos comunes en los diferentes órganos cuando se expuso la planta a las diferentes concentraciones de PHEN en el medio. Tal es el caso de tejido R, donde la concentración de C16:0, C18:1, C18:2 y C20:0 disminuía mientras se incrementó la concentración de PHEN. De igual forma en el B, se observó una disminución de C16:0, C18:1, C18:2, C18:3n3 (a excepción de B 168mM) y un aumento en C24:0 conforme se incrementó la concentración de PHEN. Y en el caso de H, se observó una tendencia a la disminución de C16:0, C18:1 y C18:2 con un aumento de C20:2. Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de PHEN repercute en la biosíntesis de ácidos grasos no-plastídicos, lo que involucra la elongación de cadenas mayores a C18 y un mayor número de insaturaciones (>3). Adicionalmente, de manera análoga a lo observado en plantas crecidas en invernadero, los tratamientos *in vitro* con PHEN, mostraron un incremento en la concentración de ácidos grasos de cadenas largas C20-C24, específicamente C20:3 en extractos de B y hoja. Estos resultados podrían sugerir que bajo la presencia de HPA en el medio, *C. laxus* es capaz de dirigir flujos metabólicos a la producción de estructuras celulares como membrana, cutina, suberina y ceras con el objeto de salvaguardar la integridad vegetal, repercutiendo a nivel bioquímico y fisiológico. Estos cambios metabólicos comúnmente son autorregulados a través de nódulos flexibles o puntos de bifurcación involucrados en la compleja arquitectura bioquímica de la planta [11].

Conclusiones

El perfil de ácidos grasos en plantas tanto de sistemas de fitorremediación en invernadero como *in vitro* se vio afectado drásticamente, mostrando un incremento en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, sugiriendo que la remoción del hidrocarburo por el sistema vegetal está directamente relacionado con cambios en la composición lipídica de la planta. La acumulación de PHEN en *C. laxus* depende del tipo de órgano que en este caso se observó mayormente en raíz y hoja.

Referencias

Semple, K.T., K.J. Doick, K.C. Jones, P. Burauel, A. Craven, and H. Harms, "Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediments is complicated". *Environ Sci & Tech*. 38: p. 228A-231A. 2004

Tang, J., X. Lu, Q. Sun, and W. Zhu, "Aging Effect of Petroleum Hydrocarbons in Soil under different Attenuation Conditions." *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 149: p. 109-117. 2012

Coleman, J.O.D., M.M.A. Blake-Kalff, and T.G.E. Davies, "Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation". *Trends in Plant Science*. 2: p. 144-151.1997

Pilon-Smits, E., "Phytoremediation". *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: p. 15-39. 2005

Kolattudkudy, P.E., "Biosynthesis of cuticular lipids". *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 21: p. 163-192.1970

Kroumova, A.B., Z. Xie, and G.J. Wagner, "A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry*. 91: p. 11437-11441. 1994

Kunst, L. and A.L. Samuels, "Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax". *Progress in Lipid Research*. 42: p. 51-80. 2003

Lessire, R., M.-A. Hartmann-Bouillon, and C. Cassagne, "Very long chain fatty acids: occurrence and biosynthesis in membrane fractions from etiolated maize coleptiles". *Phytochem*. 21(1): p. 55-59. 1982

Alkio, M., T.M. Tabuchi, X. Wang, and A. Colón-Carmona, "Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms". *Journal of Experimental Botany*. 56(421): p. 2983-2994. 2005

Roalson, E.H., "A Synopsis of Chromosome Number Variation in the *Cyperaceae*". *Bot Rev*. 74: p. 209-393. 2008

Stephanopoulos, G.N., A.A. Aristidou, and J. Nielsen, *Metabolic Engineering. Principles and Methodologies*, San Diego, California: *Academic Press*. 725. 1998



Raíces Transformadas de Brócoli con el Gen I1 del HPV y Efecto de IAA/KIN sobre el Crecimiento de Raíces Transgénicas

Acerca de los autores...

^a Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, y

^b Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

^c Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. División Ingeniería Bioquímica, Posgrado en Ingeniería Bioquímica.

Juan Manuel Jiménez Antaño^a, María del Carmen Montes Horcasitas^a, Emma Gloria Ramos Ramírez^a, Fernando José Esparza García^a, Armando Ariza Castolo^b, Josefina Pérez Vargas^c, Octavio Gómez Guzmán^a, Graciano Calva Calva^a



Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de la transformación de raíces de brócoli con el gen *l1* del HPV16; la comprobación de la transformación se llevó a cabo mediante tinción histoquímica con la prueba de β -glucuronidasa donde la coloración azul indicó el resultado positivo de la integración del gen *l1* al genoma de las raíces y este resultado se complementó por amplificación por PCR del gen *l1* en donde obtuvimos la banda del tamaño esperado de 1.6 kb. También evaluamos el efecto de los reguladores ácido indol acético (IAA) y cinetina (Kin) sobre el crecimiento de raíces transformadas con pCAMBIA 1105, encontrando que se obtuvo un incremento de biomasa de raíces con base en el peso fresco y seco a concentraciones de 1 mg/L de IAA, y que el Kin disminuye el crecimiento hasta inhibirlo a 1 mg/L. En el análisis cuantitativo encontramos que el IAA a 1 mg/L incrementa el crecimiento cuatro veces, mientras que el crecimiento con Kin fue dos veces menor, comparado con el control de las que fueron raíces en medio sin reguladores de crecimiento.

Introducción

La biotecnología vegetal, particularmente el cultivo de raíces transformadas, es una alternativa viable para la producción de proteínas heterólogas [1]. Estas raíces son genéticamente estables y pueden propagarse indefinidamente en cultivos *in vitro* a nivel de matrás o biorreactores o regenerarse a plantas completas. No obstante, en los sistemas *in vitro* se puede manipular más fácilmente la composición del medio de cultivo para estudiar el efecto de los parámetros nutricionales y de proceso sobre la acumulación del producto transgénico [2]. Así, en este trabajo, se pretende mostrar el uso de cultivos de raíces transformadas de *Brassica oleracea* como modelo de expresión de la proteína L1 del virus del papiloma humano 16 (VPH16). Esta planta presenta ciclos de vida cortos, es fácil de manipular y cultivar *in vitro*. El HPV16 es el causante principal del cáncer cervicouterino en México [3]. La proteína L1 es el componente principal y antigénico de su cápside [4-6] y tiene la capacidad de autoensamblarse en cápsides vacías, conocidas como partículas semejantes a virus (VLPs). Por estas propiedades antigénicas se han desarrollado vacunas usando sistemas de expresión como levaduras, virus-células de insecto, y plantas completas.

Con la finalidad de establecer un método de producción alternativo, en estudios previos hemos reportado el establecimiento de cultivos de raíces transformadas con el gen *l1*. Al respecto se reportan los resultados del efecto de varios reguladores del crecimiento vegetal sobre el crecimiento y la generación de líneas transformadas con el gen *l1* pero truncado en la señal de localización nuclear presente en el gen silvestre completo, porque se ha reportado que de esta forma se aumenta la eficiencia de formación de VLP *in vitro* [7]. Se modificó el medio de cultivo para buscar promover la elongación celular mediante auxinas (IAA) [8] y la división celular con citocininas (Kin).

Metodología

Construcción del plásmido pCAMHPV16L1

Se obtuvo mediante la clonación del gen *l1* completo en pCAMBIA 1105.1. Se amplificó el gen *l1* y después se digirió con NcoI y BglIII. Con estas mismas enzimas se cortó al plásmido pCAMBIA 1105.1 obteniéndose así sitios cohesivos complementarios; después se realizó la ligación de *l1* en pCAMBIA.

Estas construcciones se clonaron en *Agrobacterium rhizogenes* mediante electroporación que después se utilizó para la transformación de plántulas de brócoli.

Ensayo de β -glucuronidasa

Cortes de raíces de 1 cm se colocan en tubos Eppendorf de 600 Ql conteniendo 250 Ql de solución de tñido GUS (100 mM de fosfato de sodio pH 7, 10mM EDTA pH 8, 0.1% Tritón X-100, 2 mM X-Gluc). Los tubos abiertos se colocaron en un desecador al vacío por 10 minutos; en seguida se liberó lentamente el vacío y se repitió el proceso dos veces más. Después de los ciclos de infiltración, los tubos se incubaron por 10 horas a 37 °C.

Evaluación del efecto de IAA y Kin

Se realizó un diseño experimental factorial 2⁴ (tabla 1) con dos factores a cuatro niveles, siendo los factores el ácido indol acético (IAA) y la citocinina (Kin) a las concentraciones de 0, 0.05, 0.25, y 1.0 mg/L. El experimento se realizó empleando explantes de raíces de 1 cm en medio MS con 3% de sacarosa. Las variables de respuesta para la producción de biomasa fueron peso fresco y peso seco.

Medio MS (3% sacarosa, 1.8 g/L fitagel)		IAA (Auxina) mg/L			
		0	0.05	0.25	1.0
Kin (CITOCINA) 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

Resultados

Establecimiento de raíces transformadas y confirmación de transformación

Se han obtenido líneas de raíces de brócoli transformadas con el gen *ll* completo (Figura 1). Mediante el ensayo de β -glucuronidasa se confirmó que *Agrobacterium rhizogenes* transfirió exitosamente el T-DNA del plásmido pCAMBIA con el gen *ll* 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 1), resultados similares a los de [9, 10]. También

Tabla 1

Diseño experimental para evaluar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento

la transformación se comprobó por la amplificación del gen *II* usando como templado DNA genómico de raíces transformadas, obteniendo la banda del tamaño esperado de 1.6 kb (Figura 1-B carril 1), la cual fue similar al tamaño de la banda del control positivo (Figura 1-B carril 2) en el que se utilizó DNA plasmídico como templado de una construcción previamente caracterizada, y como control se utilizó amplificación de DNA genómico de raíces no transformadas (Figura 1-B carril 3)

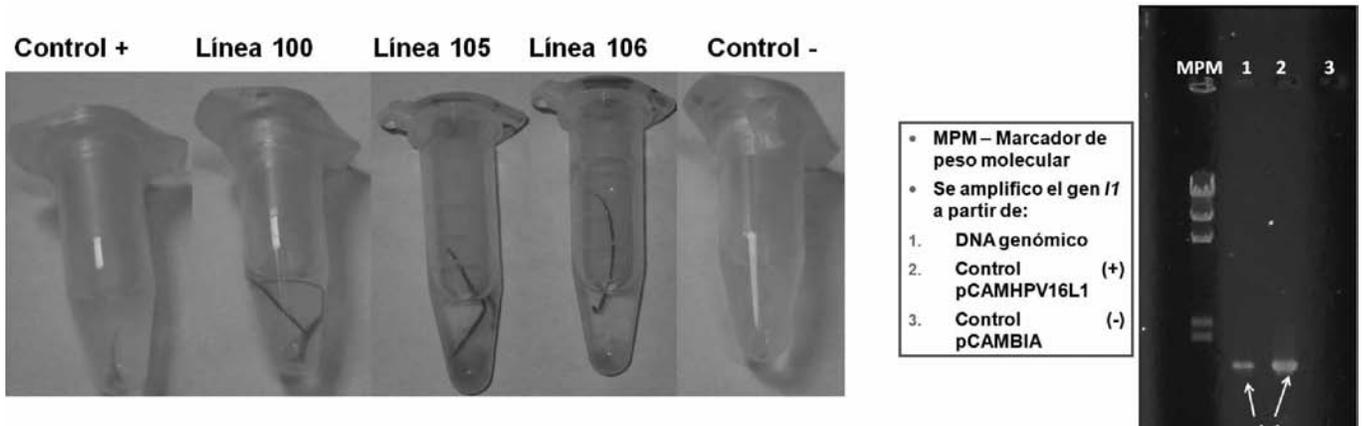


Figura 1

Prueba de β -glucuronidasa A). Se obtuvieron líneas de raíces transformadas con el gen *II* completo (100, 105 y 106) positivas a la tinción histoquímica de β -glucuronidasa el resultado positivo similar al control que son raíces transformadas con pCAMBIA y en contraste con el control negativo que son raíces no transformadas. La transformación también se comprobó por la amplificación del gen *II* B) carril 1



Efecto de IAA/Kin sobre el crecimiento de las raíces transformadas

Después de tres semanas de cultivo (Figura 2) se encontró que el mejor tratamiento para el crecimiento de raíces fue el 4 con 1 mg/L de IAA y 0 mg/L de Kin. Debe observarse que mientras 1 mg/L de IAA favorece el incremento, con 0.25 mg/L de Kin se disminuye, y con 1 mg/L se inhibe completamente.

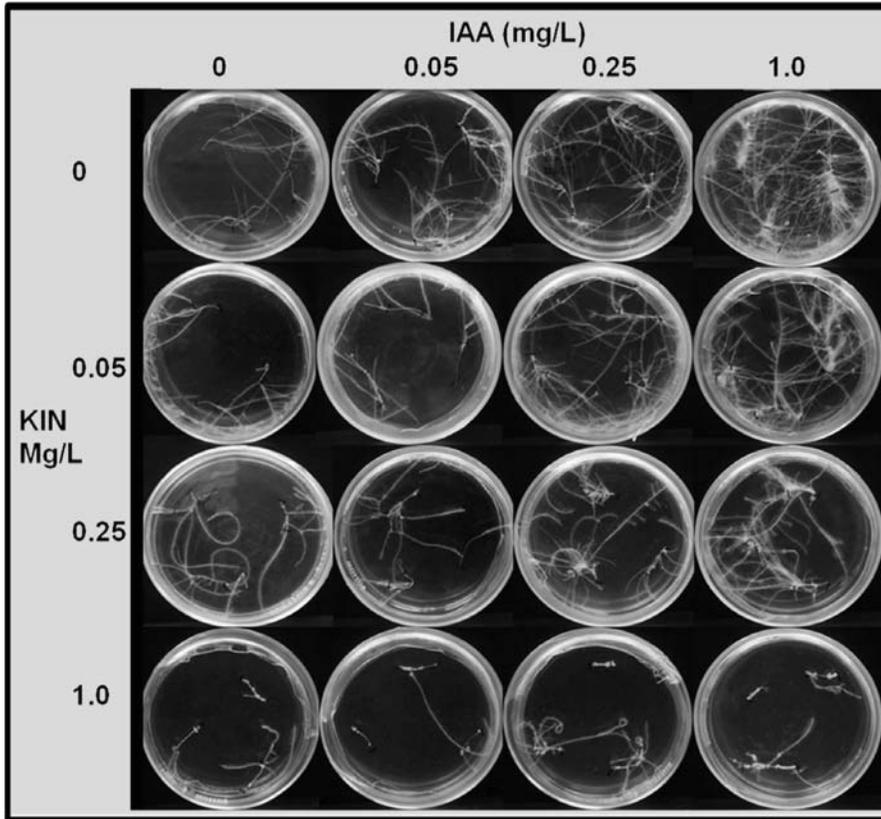


Figura 2

Efecto de reguladores de crecimiento. El tratamiento con 1 mg/L de IAA fue donde se observó una mayor elongación y ramificación de raíces transformadas.

Análisis cuantitativo del efecto de los reguladores de crecimiento

En el análisis de varianza empleando como variables de respuesta el peso fresco y el peso seco, con un nivel de confianza de 95%, se encontró que los valores para IAA, Kin y la interacción de IAA con Kin son significativos.

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

Los tratamientos con mayor producción de biomasa fueron los que se encontraban en la región de las concentraciones mayores de IAA (Figuras 3 y 4) mientras que los tratamientos con las concentraciones más altas de Kin fue en los que hubo poco crecimiento o su inhibición.

Figura 3

Gráfica de dispersión de peso fresco. La mayor producción de biomasa está en las concentraciones más altas de IAA, y las concentraciones altas de Kin inhiben el crecimiento de las raíces.

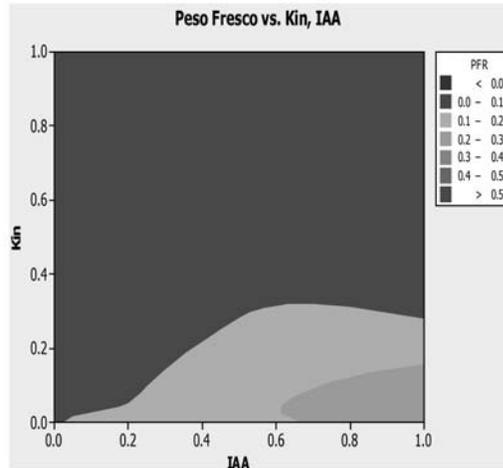
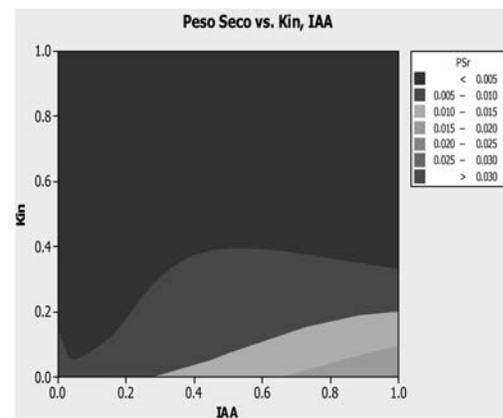


Figura 4

Gráfica de dispersión de peso seco. Se observó el mismo efecto que en el peso fresco, un mejor crecimiento con IAA e inhibición con valores altos para Kin.



Conclusiones

Se obtuvieron líneas de raíces transformadas de brócoli con pCAMBIA 1105.1 y con la construcción pCAMHPV16L1, demostrado mediante la tinción histoquímica de glucuronidasa y por amplificación por PCR del gen *l1*.

Los reguladores de crecimiento afectan la producción de biomasa de raíces transformadas; la utilización de IAA a una concentración de 1 mg/L favorece el incremento de biomasa y las concentraciones utilizadas de Kin disminuyen e inhiben el crecimiento.

Referencias

Sunil Kumar, G.B., et al., "Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots". *Plant Science*, 2006. 170(5): p. 918-925.

Wu, C.H., et al., "Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*". *Journal of Plant Biology*, 2006. 49(3): p. 193-199.

Rodríguez, O., et al., "Estudio de la patología citológica del cérvix". *Perinatol Reprod Hum*, 2009. 23(1): p. 12-17.

Ishii, Y., K. Tanaka, and T. Kanda, "Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1-capsids". *Virology*, 2003. 308(1): p. 128-136.

Garcea, R.L. and X. Chen, *5 Papillomavirus Structure and Assembly*, 2007. p. 69-88.

Chen, X.S., et al., Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J. Mol. Biol.*, 2001. 307(1): p. 173-182.

Webb, E., J. Cox, and S. Edwards, "Cervical Cancer-causing Human Papillomaviruses

have an Alternative Initiation Site for the L1 Protein". *Virus Genes*, 2005. 30(1): p. 31-35.

George, E.F., M.A. Hall, and G.-J.D. Klerk, *Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors, in Plant Propagation by Tissue Culture*, E.F. George, M.A. Hall, and G.-J.D. Klerk, Editors. 2008, Springer Netherlands. p. 175-204.

Jefferson, R., "Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system". *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1987. 5(4): p. 387-405.

Karcher, S., "Blue Plants: Transgenic Plants With The Gus Reporter Gene". *ABLE*, 2002. 23: p. 29-42.



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO



GENTE QUE TRABAJA Y LOGRA
enGRANDE

