



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## Desarrollo de plantas transgénicas de lechuga que expresan una proteína multiepitópica (C4V5) del VIH que es inmunogénica por vía oral.

Dania O. Govea-Alonso<sup>(A)</sup>, Néstor Rubio-Infante<sup>(A)</sup>, Erik E. Gómez-Cardona<sup>(A)</sup>, Leticia Moreno-Fierros<sup>(B)</sup>, Sergio Rosales-Mendoza<sup>(A)</sup>

(A) Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

(B) Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalneptla, México. e-mail: rosales.s@fcq.uaslp.mx

*Palabras clave: SIDA, inmunización oral, respuesta humoral.*

**Introducción.** La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un problema importante de salud pública a nivel mundial. A la fecha se han probado numerosos enfoques a fin de desarrollar una vacuna eficaz, los cuales han tenido un éxito limitado. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevas moléculas con la capacidad de inducir inmunidad contra el HIV. Las evidencias inmunológicas sugieren que una vacuna efectiva contra el HIV debe inducir tanto respuestas humorales como de células T citotóxicas contra el virus (1). Este proyecto describe el desarrollo y caracterización de plantas de lechuga transgénicas, las cuales expresan una proteína multiepitópo C4V5, basada en secuencias de la proteína gp120.

**Metodología.** El polipéptido C4V5 comprende el dominio C4 de gp120, así como 6 secuencias del asa V3 que corresponden a variantes de distintos aislados. Se pretende que esta configuración permita inducir una respuesta humoral de un espectro mayor a la inducida por antígenos que solo incluyen una variante. Se obtuvo un gen sintético codificante de C4V5 basado en codones optimizados y se siguió el protocolo estándar para la generación de un vector de expresión y la transformación de lechuga mediada por *A. tumefaciens* (2). Se analizó la presencia del transgén en el genoma nuclear de plantas de lechuga mediante PCR empleando iniciadores específicos del gen *nptII*. Se confirmó la presencia de la proteína heteróloga mediante Western blot a partir de un extracto de proteínas totales de hojas de lechuga y empleando un antisuero obtenido en conejos inmunizados con C4V5 producida en *E. coli*. La inmunogenicidad de estas proteínas recombinantes fue evaluada en ratones Balb/c bajo un esquema de inmunización de cuatro dosis semanales de proteína soluble purificada o bien hojas liofilizadas que fueron pulverizadas y resuspendidas en agua antes de su administración oral. Los grupos de experimentación de acuerdo al tratamiento recibido fueron: GRUPO I (1 mL de PBS), GRUPO II (100 mg de lechuga WT), GRUPO III (100 mg de lechuga transgénica) y GRUPO IV (1 µg de C4V5 pura); los animales fueron sacrificados una semana después de la última inmunización y la presencia de anticuerpos anti-C4V5 en suero e intestino fue evaluada mediante ELISA.

**Resultados.** El gen C4V5 se clonó exitosamente en el vector binario pBI121, río abajo del promotor CaMV35S. El vector contiene un casete de expresión para el gen *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina. Después de tres meses de cultivo *in vitro*, se obtuvieron numerosos brotes resistentes a kanamicina. Estas líneas se emplearon para regenerar plantas completas que fueron exitosamente transformadas y cultivadas en condiciones *ex vitro*. De 10 líneas que fueron analizadas por PCR, se detectó el amplicón esperado de 600 pb en 8 de ellas, lo que sugiere la integración del casete de expresión en el genoma de la lechuga.

El Western blot reveló la presencia de la proteína heteróloga. Los ensayos de inmunización indican que existen niveles significativos de anticuerpos anti-C4V5 en los animales inmunizados con lechuga transgénica (grupo III) respecto a los controles negativos (grupos I y II). La inmunogenicidad por vía oral de la lechuga productora de C4V5 representa un resultado importante que plantea la perspectiva de caracterizar a mayor grado la respuesta inmune inducida frente a la proteína heteróloga. Esto incluirá el potencial de neutralizar distintos aislados del VIH.

**Conclusiones.** Las células de lechuga son capaces de producir la proteína multiepitópica C4V5 conservando sus determinantes antigénicos y es inmunogénica por vía oral. Estas líneas de lechuga serán la base de estudios posteriores que tendrán el objetivo de desarrollar modelos de inmunización de bajo costo contra el VIH.

**Agradecimiento.** Este trabajo se realizó con fondos otorgados por CONACYT (102109), PROMEP (103.5/10/5460) y PIFI.

### Bibliografía.

1. Girard MP, Osmanov SK, Kieny MP (2006) A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine*, 24:4062-4081.
2. Curtis IS, Power JB, Blackhall NW, de Laat AMM, Davey MR (1994) Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Exp Bot*, 45:1441-1449.