

para los niveles de ARNm de p27^{Kip1} en las células resistentes. La respuesta de las células transfectadas al IFN- α_{2b} fue evaluada mediante un ensayo anti-proliferativo, con la utilización de las líneas NCI-H82 y H82R como controles (Figura). Se obtuvo que las células NCI-H82 son muy sensibles: concentraciones tan bajas como 7,5 UI/mL de IFN- α_{2b} producen 30% de inhibición. Sin embargo, en el caso de las células transfectadas y H82R hubo muy poca variación, con niveles de crecimiento relativo entre 77 y 97%. El análisis estadístico de estos resultados mostró diferencias significativas entre la línea NCI-H82 y las células H82R y las transfectadas con el gen E7. En teoría se pudiera explicar la ausencia de respuesta de las células transfectadas, si se toma como base un reporte previo [2] que indica que la capacidad de E7 de superar ciertas formas de detención del ciclo celular en G0/G1, se debe en parte a su unión al inhibidor p27^{Kip1}, lo que trae como consecuencia que p27^{Kip1} no pueda inhibir la actividad quinasa asociada a la ciclina E/Cdk2. Los VPH han sido identificados como agentes causales de diversas lesiones epiteliales proliferativas como el condiloma acuminado y las verrugas comunes. Estos virus han emergido rápidamente como la enfermedad viral de transmisión sexual de mayor prevalencia en la actualidad. Según estimados, uno de cada tres individuos sexualmente activos está infectado con algún tipo de VPH. Aproximadamente un millón de casos nuevos son diagnosticados cada año. También se

ha señalado, como factor etiológico del cáncer de cérvix, que aproximadamente 90-95% de los pacientes con cánceres cervicales invasivos contienen ADN de VPH. Por otra parte, los IFN han sido aprobados para la terapia de diversas enfermedades. Sin embargo, estudios clínicos demostraron que con frecuencia hay recurrencia o ausencia de respuesta. Los mecanismos de resistencia no se conocen, aunque la presencia de las proteínas de los VPH y sus interacciones con las moléculas de señalización celular pudieran estar involucrados en esta resistencia.

En este trabajo se establecen, por primera vez, las bases moleculares de la resistencia de tipos oncogénicos de los VPH al tratamiento con IFN- α_{2b} . La posible vinculación de la presencia de oncoproteínas con la resistencia al tratamiento, permitiría establecer una racionalidad en la terapia con el IFN- α_{2b} . El clínico sabría antes del comienzo del tratamiento y teniendo en cuenta los resultados de las pruebas de detección de VPH, si el paciente responderá o no al mismo. Esto mejoraría la calidad de vida del paciente, pues le evitaría someterse a protocolos con poca probabilidad de éxito y obligaría a diseñar nuevos protocolos que aumenten la eficacia del tratamiento, mediante la inclusión de nuevos fármacos cuya actividad combinada resulte más efectiva que el IFN- α_{2b} solo. De este modo, aumentaría el número de pacientes curados y, por lo tanto, la eficiencia del sistema nacional de salud.

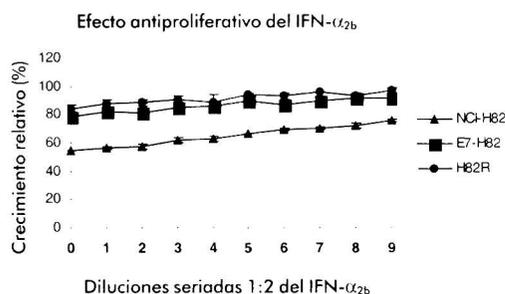


Figura. La transfección del gen E7 del VPH 16 en la línea celular NCI-H82 induce resistencia al efecto antiproliferativo del IFN- α_{2b} . Se utilizó un rango de concentraciones de IFN- α_{2b} (Heber Biotec, Cuba) de 7,5 UI/mL a 4 000 UI/mL. Se utilizaron diluciones seriadas 1:2 y se determinó la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico. Los datos son presentados como por cientos de células no tratadas. Los puntos representan la media de las mediciones de tres ensayos diferentes y las barras representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto a las células NCI-H82.

Desarrollo de una nueva metodología para la caracterización estructural de la N-glicosilación de proteínas naturales o recombinantes

✉ José A Cremata, Omar Quintero, Raquel Montesino, Rossana García

Laboratorio de Glicoproteínas. División de Bioindustrias.
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, AP 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.
Fax: (53-7) 21 8070; E-mail: glycolab@cigb.edu.cu

Introducción

Se describe una metodología nueva, sencilla y sensible para el análisis y caracterización estructural de oligosacáridos N-enlazados de glicoproteínas naturales o recombinantes. Esta metodología está incluida en las llamadas técnicas de perfil de mapeo bidimensional de oligosacáridos neutros y sialilados, mediante el empleo del ácido 8-amino-1,3,6-naftalen trisulfónico (ANTS) como agente derivatizante fluorescente.

✉ Autor de correspondencia

Como principales virtudes de esta metodología se destacan:

1. Se requieren sólo picomoles de oligosacárido para su caracterización, lo que representa microgramos de la glicoproteína de interés a diferencia de los métodos tradicionales (RMN), que utilizan cantidades superiores en dos ordenes de magnitud.
2. Permite prescindir, en muchos casos, del uso de métodos físico-químicos de análisis muy especializados y

caros como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear protónica de alta frecuencia.

3. Se pudiera incluir como método de análisis de la glicosilación lote a lote en procesos productivos de glicoproteínas recombinantes.

Descripción del resultado e importancia

La metodología propuesta incluye los siguientes pasos:

1. Reacción de aminación reductiva con ANTS de los oligosacáridos liberados por hidrólisis enzimática con la endoglicosidasa PNGasa F.
2. Separación simultánea o consecutiva en columna de aminoadsorción (NH₂-HPLC) y/o mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) (FACE).
3. Representación bidimensional de los valores de tiempo de retención relativo con respecto a una referencia interna, Man₇GlcNAc₂, (HPLC) e índice de migración relativo con respecto a una serie de maltooligosacáridos (FACE).
4. A partir del procedimiento anterior, se construye un mapa bidimensional donde se incluyen compuestos de referencia previamente reportados en la literatura o caracterizados por métodos adecuados, y las muestras problema son caracterizadas por su localización en este mapa (Figura y Tabla).
5. En el caso necesario, se diseñarían experimentos adicionales de digestión con exoglicosidasas específicas o de interacción lectina-oligosacárido para obtener información complementaria sobre la estructura, lo que eliminaría posibles ambigüedades en la asignación inicial.

El resultado que se describe incluye:

- Caracterización de la glicosilación de proteínas modelo reportadas en la literatura (α 1-antitripsina, IgG2a y orosomucoide o glicoproteína ácida α 1).
- Caracterización de la glicosilación de seis proteínas recombinantes expresadas en la levadura *Pichia pastoris* (dextranasa, α -amilasa, invertasa, Mucor rennina, antígeno de la garrapata Bm86 y subunidad catalítica de la enteroquinasa bovina).
- Caracterización de la glicosilación de anticuerpos monoclonales de diferentes orígenes (IOR R3 de ascitis de ratón y obtenido en biorreactores).
- Caracterización de la glicosilación de un panel europeo de sueros estándares de pacientes con artritis reumatoide y muestras de pacientes cubanos.
- Caracterización de la glicosilación de la eritropoyetina humana recombinante expresada en células CHO.

Importancia del resultado

Esta metodología permite, de forma sencilla y económica y al alcance de cualquier laboratorio de bioquímica o biología molecular, la caracterización de la N-glicosilación de glicoproteínas naturales o recombinantes. Esta caracterización se torna más imprescindible cada día, debido a que se está introduciendo como medida regulativa para glicoproteínas de interés médico-farmacéutico, a partir del reconocimiento científico del papel decisivo que pueden jugar los residuos de oligosacáridos covalentemente enlazados a las proteínas, tanto en sus características físico-químicas como en su actividad biológica. Un ejemplo ilustrativo de esto lo constituye la hormona eritropoyetina, que cuan-

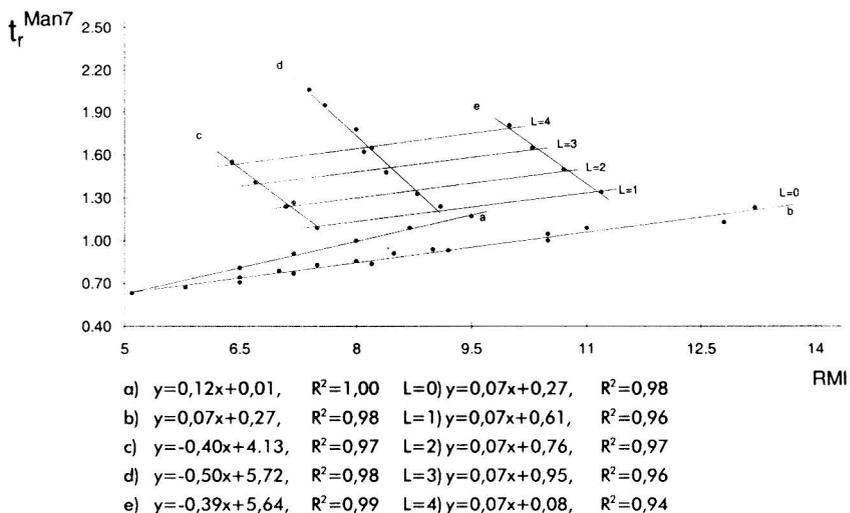


Figura. Representación gráfica de los valores de tiempo de retención relativo (t_r^{Man7}) e índice de migración relativo (RMI) de los compuestos de referencia. Las estructuras incluidas en este gráfico pertenecen a las familias siguientes: a) oligomanósidos desde Man₅GlcNAc₂ hasta Man₉GlcNAc₂; b) complejos asialilados del tipo diantenarios, triantenarios y tetraantenarios; c) diantenas sialiladas; d) triantenas sialiladas y e) tetraantenas sialiladas. Las líneas L representan familias de compuestos de diferente número de antenas pero con similar carga total efectiva dada por la contribución de ácidos siálicos con enlaces α 2,3 o α 2,6. Debajo del gráfico aparecen las ecuaciones que representan a cada recta con sus valores correspondientes de R². Los valores de coeficientes de correlación son mayores o iguales a 0,97 para las ecuaciones a-e y mayores o iguales a 0,94 para las L=0-4. Las pendientes de las ecuaciones a y b resultaron positivas mientras que las de las ecuaciones c-e fueron negativas debido a la contribución negativa de los ácidos siálicos enlazados a los terminales no-reductores de los oligosacáridos. En caso de análisis de muestras problema se introducen los datos de t_r^{Man7} y RMI, y según su ubicación en el mapa así será la estructura propuesta. Cuando la coincidencia no es total entonces para la proposición de estructura se tiene en cuenta la contribución de cada monosacárido a los valores de tiempo de retención en HPLC y migración electroforética (Tabla).

do es glicosilada en forma incorrecta es perfectamente reconocida *in vitro* por los receptores celulares, sin embargo, su actividad *in vivo* es prácticamente despreciable por presentar un tiempo de vida medio de circulación muy pequeño.

La caracterización de la glicosilación por métodos físico-químicos, además de requerir un equipamiento muy costoso como el de la resonancia magnética nuclear de alta frecuencia, necesita cantidades de muestra que pueden alcanzar las decenas o centenas de miligramos de glicoproteína. Este último aspecto se convierte en una limitación importante por el alto valor de estos productos.

1. Quintero O, Montesino R, Cremata JA. Two-dimensional mapping of 8-amine-1,3,6-naphthalene trisulfonic acid derivatives of N-linked neutral and sialyloligosaccharides. *Anal Biochem* 1998;256: 23-32.

2. Montesino R, García R, Quintero O, Cremata JA. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 1998;14:197-207.

Tabla. Contribución a los valores de RMI y t_r^{Man7} de los monosacáridos más abundantes de los oligosacáridos N-enlazados a glicoproteínas.

Monosacárido	$\Delta RMI^{(a)}$	$\Delta t_r^{Man7(b)}$	$r^{(c)}$ ($\Delta t_r^{Man7}/\Delta RMI$)
Manosa	0,7	0,09	0,12
Galactosa	1,0	0,08	0,08
Fucosa	0,5	0,04	0,08
N-acetil glucosamina	0,7	0,06	0,09
Ácido siálico (α 2,3)	-0,4	0,17	-0,40
Ácido siálico (α 2,6)	-0,7	0,32	-0,43

^(a) El error experimental en el valor de RMI es menor de 2%.

^(b) El error experimental en el valor de t_r^{Man7} es menor de 2%.

^(c) r - Calculado como el cociente de los valores de tiempo de retención relativo e índice de migración relativo. Este parámetro refleja el comportamiento de los diferentes tipos de monosacáridos dependiendo de su naturaleza diferenciándose claramente entre oligosacáridos neutros y sialilados. Observe que entre los monosacáridos neutros la manosa se diferencia ligeramente del resto. Con respecto a la contribución de los ácidos siálicos, a pesar de la contribución diferenciada en cuanto a la configuración del enlace (α 2,3 o α 2,6) en términos de ΔRMI y Δt_r^{Man7} , el cociente "r" para ambos es prácticamente el mismo.

El desarrollo y la introducción de los métodos de perfil para la caracterización de la glicosilación de proteínas naturales o recombinantes resuelve este problema y permite, a su vez, una mejor caracterización del producto, incluso por lote de producción, en aquellos casos que lo requieran.

Desde el punto de vista del aporte científico, esta metodología tiene ventajas sobre otras descritas, entre las que se encuentran:

1. Permite analizar, en un único sistema, tanto oligosacáridos neutros como cargados (sialilados, fosfatados, sulfatados, etc.), lo cual representa una limitación para otros métodos.
2. Presenta la mayor resolución reportada hasta el momento para los oligosacáridos cargados.
3. Constituye el primer reporte de agrupación de las estructuras de oligosacáridos de *N*-glicosilación en

familias de homología, en dependencia de la estructura y grado de ramificación (series homólogas).

4. El método tiene carácter predictivo (dado por lo descrito en el punto anterior y por la contribución de cada monosacárido a los valores de tiempo de retención relativo e índice de migración relativo), lo que facilita el diseño de experimentos con exoglicosidasas específicas en los casos de estructuras no reportadas.
5. El tipo de derivado fluorescente que se utiliza también puede ser analizado por espectrometría de masas con ionización por electronebulización. Esta propiedad permite realizar análisis con esta técnica para corroborar los resultados en casos de ambigüedad.

Agradecimientos

Los autores agradecen la valiosa colaboración del Lic. Lorenzo Vega, del Instituto de Investigaciones del Transporte, y de la técnica Marlén Mata, del CIGB.

3. Cremata JA, Montesino R, Quintero O, García R. Glycosylation profiling of heterologous proteins. En: Higgins DR, Cregg J, editores. *Methods in Molecular Biology*, Pichia Protocols. Vol 103. Totowa (NJ): Humana Press Inc.; 1998. p.95-105.

Identificación y caracterización molecular de geminivirus bipartitos en Cuba

Yamila Martínez Zubiaur,¹ Pedro L Ramos González,² Rudy Peral,² Yenne Marrero,¹ Madelaine Quiñones,¹ Ramón G Guevara,³ Carmen de Blas Beorlegui,⁴ Orlene Guerra Peraza,² Esther L Peralta,¹ ✉ Pedro Oramas Frenes,² Rafael Rivera Bustamante³

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. AP 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Fax: 64 63897; E-mail: jesus@censa.cu ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

AP 6162, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 21 7080, 33 6008; Email: virplant@cigb.edu.cu

³Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, México.

⁴Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, España.

Introducción

Los geminivirus, en particular los miembros del género *Begomovirus*, son considerados el problema fitosanitario principal del cultivo del tomate en las regiones tropicales y subtropicales, y ocasionan pérdidas cuantiosas. Cuba no escapa a esta situación emergente y se han descrito porcentajes elevados de infección viral en las áreas comerciales del país desde finales de 1989.

Los objetivos de este trabajo han estado encaminados a realizar la identificación molecular de los geminivirus presentes en las plantaciones cubanas de tomate, y desarrollar los métodos moleculares para el diagnóstico rápido y preciso de geminivirus en las áreas de producción.

Se identificaron por primera vez en Cuba dos geminivirus bipartitos nuevos, los cuales fueron denominados virus "Habana" del tomate (HTV) y virus "Taíno" del moteado del tomate (TTMoV). Ambos virus poseen dos componentes genómicos (ADN-A y ADN-B) con secuencias diferentes, a excepción de la región común, en la cual se encuentran sitios y estructuras moleculares involucradas en la replicación y transcripción virales. El análisis de los marcos abiertos de lectura demostró que los virus caracterizados están filogenéticamente relacionados con los del género *Begomovirus* del nuevo mundo.

La caracterización biológica y molecular de estos virus ha derivado en la obtención de diagnosticadores empleados en la actualidad para la determinación de los agentes etiológicos causantes de epifítias en cultivos de interés económico para el país.

Resultados y Discusión

El presente trabajo recoge los resultados de identificación molecular de dos geminivirus bipartitos nuevos presentes en las plantaciones cubanas de tomate. Se describen dos procedimientos para el aislamiento y la clonación de estos patógenos: 1) la clonación de genomas totales a partir de fragmentos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), y 2) la clonación a partir del intermediario replicativo geminiviral. A través de la secuenciación de los genomas clonados, se identificaron dos geminivirus bipartitos (HTV y TTMoV) diferentes a los descritos previamente en la literatura. La infectividad de ambos virus fue comprobada mediante la transferencia de sus genomas a plantas hospederas por medio de la agroinoculación y la biobalística.

Las comparaciones de las secuencias de los diferentes polipéptidos codificados por cada componente viral con las de otros geminivirus, demostraron que tanto TTMoV como HTV están relacionados filogenéticamente con otros virus aislados de la cuenca del Caribe, América del Sur y la Florida.

La caracterización molecular y biológica de ambos virus permite profundizar en el conocimiento de la etiología de la principal epifítia que afecta los rendimientos de las plantaciones cubanas de tomate. Además, constituye un paso fundamental en el establecimiento de un diagnóstico certero y de una vía de seguimiento de la propagación de la enfermedad hacia otros cultivos con potencialidad como hos-