

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis inmunológico de epítopos relevantes del
virus sincicial respiratorio producidos en plantas**

Tesis que presenta

Luzmila Martínez González

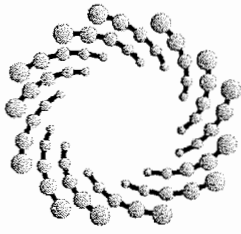
Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Marzo de 2016



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

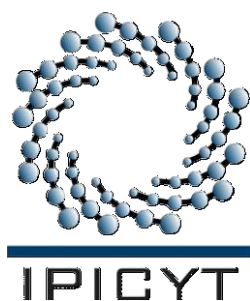
La tesis "**Análisis inmunológico de epítomos relevantes del virus sincicial respiratorio producidos en plantas**" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Luzmila Martínez González** y aprobada el **ocho de marzo del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Director de la tesis

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel
Miembro del Comité Tutorial

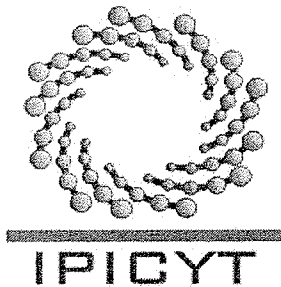
Dra. Leticia Moreno Fierros
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Ángel G. Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro: 090335) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. y se contó con el apoyo del proyecto de Ciencia Básica CONACYT 37048-B y 56980, 154790 y de la CAED proyecto de reconversión de cultivos.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 083 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de marzo del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel	Sinodal externo	UASLP
Dra. Leticia Moreno Fierros	Sinodal externo	UNAM

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Luzmila Martínez González

sobre la Tesis intitulada:

Análisis inmunológico de epítomos relevantes del virus sincicial respiratorio producidos en plantas

que se desarrolló bajo la dirección de:

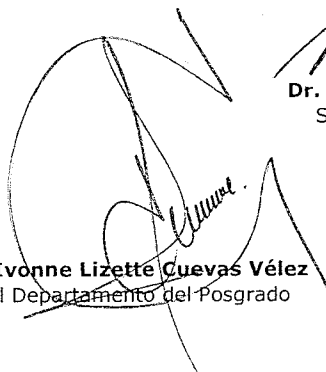
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

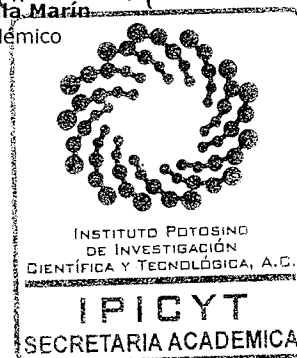
A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de marzo de 2016.



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



A mis padres Luzmila González y Jorge Martínez por ser mi pilar y mi guía y por darme la oportunidad cambiar mis estrellas

A Arturo porque sin importar que tan lejos decida volar, siempre estará a mi lado

A mis hermanos Norma, Laura, César y Jorge por su apoyo incondicional y a mis sobrinos Luís, Eduardo, Sofía, Erick, Ana, César, Karen y Tadeo porque sin personas que creen que somos capaces de lograr grandes cosas no podríamos lograrlas nunca

A mi Abuela por escuchar paciente cada uno de mis disparatados sueños y creer que sería capaz de lograrlos

Y sobre todo A mi hija Victoria...

Porque gran parte de lo que soy, lo soy por y para ustedes...

Gracias

Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Dr. Ángel Alpuche Solís por su tiempo, su paciencia y su apoyo en la realización de este trabajo. Por la confianza que depositó en mí, sus consejos y su guía tanto en el trabajo como en la vida.

Al Dr. Daniel Noyola, al Dr. Rubén López Revilla y a la Dra. Leticia Moreno por sus consejos y aportaciones para mejorar mi trabajo.

A Azucena que ha compartido conmigo los triunfos y los fracasos, las alegrías y las penas durante tantos años que me ha escuchado, aconsejado y ayudado.

A la técnica QFB. Rosalba Castillo Collazo por su amistad, ayuda y apoyo en la realización de este trabajo.

A los compañeros y amigos del laboratorio 1 de “Biología Molecular de Plantas” por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias (Benita, Sergio, Ruth, Omar, Mayra, Karla, Tere, Vero, Lula, Mariana, Pablo, Bernardo, Anita, Rosy, Chava...).

.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por la infraestructura para la realización de este trabajo.

Al laboratorio LAMBAMA por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada.

CONTENIDO

	Página
Carátula	i
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen de grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Lista de tablas	xii
Lista de figuras	xiii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Enfermedades respiratorias	2
1.2. Virus sincicial respiratorio	2
1.2.1. Epidemiología	2
1.2.2. Clasificación y estructura	3
1.2.3. Características de las proteínas G y F	4
1.2.4. Patogenia	5
1.2.5. Inmunología	6
1.2.6. Medidas profilácticas y terapéuticas	6
1.2.6.1. Terapia antiviral	6
1.2.6.2. Profilaxis pasiva	6
1.3. Vacunas	7
1.3.1. Vacunas de nueva generación	8
1.3.2. Vacunas de péptidos recombinantes	8
1.3.3. Vacunas contra VSR	9

1.4. Plantas transgénicas para la producción de proteínas heterólogas	11
1.4.1. Vacunas producidas en plantas	11
1.4.2. Trabajos preliminares de vacunas contra VSR producidas en plantas	15
1.5. Transformación genética de plantas	15
1.5.1. Transformación nuclear vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
1.5.2. Biobalística	16
1.5.2.1. Transformación de cloroplastos	17
1.6. Características de las plantas utilizadas	17
1.6.1. Lechuga	17
1.6.2. Tabaco	18
II. JUSTIFICACIÓN	20
III. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo general	23
2.2. Objetivos específicos	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. Construcciones genéticas	25
4.2. Transformación genética de plantas	27
4.2.1. Transformación nuclear vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
4.2.1.1. Obtención de hojas cotiledonarias	27
4.2.1.2. Transformación genética	27
4.2.2. Transformación genética de cloroplastos por el método de biobalística	28
4.2.2.1. Obtención del explante	28
4.2.2.2. Recubrimiento de partículas de oro con el ADN de interés	28
4.2.2.3. Obtención de plantas transplastómicas	29
4.2.3. Obtención de la generación estable (T2) de lechuga y	29

tabaco	
4.3. Análisis de transformantes	29
4.3.1. Extracción de ADN	29
4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
4.3.3. Southern blot	31
4.3.4. Extracción de proteínas	31
4.3.5. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	32
4.3.6. Western blot	32
4.4. Ensayos de inmunización	33
4.4.1. Inmunización oral de ratones Balb/c	33
4.4.2. Obtención de las muestras	33
4.4.3. Determinación de los niveles de anticuerpos	34
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1. Obtención de plantas transgénicas de lechuga con el gen sintético VSRsn	36
5.1.1. Obtención de plantas transgénicas para el gen VSRsn	37
5.1.1.1. Obtención de generación estable (T2)	38
5.1.2. Análisis de transformantes de la generación T2	39
5.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
5.1.2.2. Souther blot	40
5.1.2.3. SDS-PAGE	41
5.1.2.4. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	42
5.1.2.5. Western blot	43
5.1.3. Ensayos de inmunogenicidad por vía oral en ratones Balb/c de la proteína de VSRsn producida en lechuga	43
5.1.3.1. Determinación de los niveles de anticuerpos en suero	45
5.1.3.2. Determinación de los niveles de anticuerpos en lavado traqueopulmonares	46
5.1.3.3. Determinación de los isotipos IgG1 e IgG2a	47

5.2.Transformación genética de cloroplastos de tabaco con el gen VSRsc	51
5.2.1. Obtención de plantas transplastómicas de tabaco con el gen VSRsc	51
5.2.1.1. Obtención de plantas de la generación T2	52
5.2.2. Análisis de transformantes de la generación T2	53
5.2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	53
5.2.2.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	54
5.2.2.3. Southern blot	54
5.3.Transformación genética de plantas de lechuga y tabaco con los genes VSRsnΔG y VSRscΔG	57
5.3.1. Genes VSRsnΔG y VSRscΔG	57
5.3.2. Transformación de plantas	57
5.3.3. Análisis de transformantes	57
5.3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
VI. CONCLUSIONES	60
VII. REFERENCIAS	62
VIII. ANEXO I. PUBLICACIONES	71
8.1. Antigenic peptides derived from F and G proteins of respiratory syncytial virus, produced on lettuce plants as an alternative to produce prophylactic proteins	72
8.2. Oral immunization with a lettuce-derived <i>Escherichia coli</i> heat-labile toxin B subunit induces neutralizing antibodies in mice.	74
8.3. Expression of an <i>Escherichia coli</i> antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants	75
8.4. Expression of a multi-epitope DPT fusion protein in transplastomic tobacco	76
8.5. Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in	77

lettuce as a plant-based vaccine against plague

IX. ANEXO II. PROTOCOLOS	78
9.1. Reactivos generales	79
9.2. Antibióticos	80
9.3. Reguladores de crecimiento	81
9.4. Medios de cultivo bacterianos	82
9.5. Medios de cultivo para plantas	83
9.6. Protocolos generales	85
9.7. Protocolos para la transformación genética de plantas	87
9.8. Extracción de ADN vegetal	90
9.9. Southern Blot	91
9.10. SDS-PAGE	94
9.11. Western Blot	96

Lista de tablas

Título	Página
1. Estrategias de desarrollo de vacunas contra VSR	10
2. Vacunas, anticuerpos y proteínas terapéuticas producidas en plantas que se encuentran en estudios clínicos o en el mercado	13
3. Construcciones utilizadas para la transformación genética	25
4. Oligonucleótidos utilizados en las diferentes reacciones de amplificación	30
5. Protocolos de PCR para las amplificaciones de los diferentes genes	30

Lista de figuras

Título	Página
1. Principales causas de hospitalización por enfermedades de las vías respiratorias	3
2. Estructura del virus sincicial respiratorio	4
3. Desarrollo de vacunas desde 1798 y su crecimiento exponencial hasta el 2010	8
4. Representación esquemática de la construcción pBIVSRsn	26
5. Representación esquemática de la construcción pKCZVSRsc	27
6. Esquema de inmunización de ratones Balb/c	33
7. Representación esquemática de la transformación de plantas vía <i>Agrobacterium</i> y regeneración de plantas de lechuga	37
8. Análisis de la generación T0 de lechuga transgénica	38
9. Plántulas de lechuga transgénica con el gen VSRsn (T2)	39
10. Detección por PCR del gen VSRsn en plantas transgénicas	40
11. Análisis tipo Southern blot para confirmar el patrón de integración del gen VSRsn en el genoma de lechuga	41
12. Análisis de SDS-PAGE de los extractos solubles de las plantas transgénicas	41
13. Análisis de ELISA para las plantas transgénicas de lechuga de generación T2	43
14. Análisis de Western blot del extracto soluble de lechugas transgénicas	43
15. Respuesta anti-VSR en suero (IgG)	46
16. Respuesta anti-VSR en lavados traqueopulmonares (IgG)	47
17. Isotipos IgG1 e IgG2a en suero	49
18. Isotipos IgG1 e IgG2a en lavados traqueopulmonares	50
19. Representación esquemática de la transformación de cloroplastos de tabaco	52
20. Germinación de semillas de tabaco transplastómico (generación T2)	52

21. Detección por PCR de el gel VSRsc en tabacos transplastómicos	53
22. Análisis de ELISA para las plantas transplastómicas de tabaco de generación T2	54
23. Análisis de Southern blot para confirmar la integración del gen VSRsc al genoma del cloroplasto de tabaco	55
24. Análisis de PCR para los genes VSRsn Δ G y VSRsc Δ G	58

RESUMEN

Análisis inmunológico de epítomos relevantes del virus sincicial respiratorio producidos en plantas

Las enfermedades infecciosas respiratorias, representan un área importante en el desarrollo de vacunas, debido a los altos costos de hospitalización que generan. El virus sincicial respiratorio (VSR) es el principal patógeno de estas enfermedades en niños y uno de los principales en ancianos. Aunque el VSR se ha estudiado por más de 40 años, no hay una vacuna eficaz contra él. La tendencia actual para el desarrollo de vacunas acelulares es su producción por métodos recombinantes. Una alternativa para la producción de proteínas recombinantes de valor farmacéutico es su expresión en plantas y los polipéptidos antigénicos son un sistema atractivo para la producción de vacunas. El presente trabajo se centra en la expresión de polipéptidos antigénicos con epítomos relevantes del VSR en plantas como un primer paso para el desarrollo de una vacuna comestible. Las proteínas F y G de la envoltura del VSR podrían ser blancos para el desarrollo de vacunas. Se construyeron vectores con secuencias para epítomos relevantes codificados por los genes F y G del VSR y con ellos se transformaron plantas de lechuga y cloroplastos de tabaco. Los genes sintéticos, optimizados para su expresión en plantas, codifican tres epítomos de la proteína F y un epítomo de la proteína G de VSR unidos por espaciadores. Se transformó lechuga con *Agrobacterium tumefaciens* y cloroplastos de tabaco por biobalística. El transgén se detectó por PCR y Southern blot; la proteína heteróloga por SDS-PAGE y la antigenicidad de ésta mediante ELISA y Western blot. Finalmente se realizaron análisis inmunogénicos en ratones Balb/c; grupos de cinco ratones fueron inmunizados con lechuga transgénica, lechuga silvestre y una suspensión de proteínas purificadas de VSR (Serotec). El grupo de lechuga transgénica mostró niveles más altos de seroanticuerpos IgG que el grupo de lechuga silvestre. Este trabajo es un primer paso hacia la generación de una vacuna comestible en sistemas vegetales contra VSR que contiene epítomos de las proteínas F y G.

Palabras clave: Vacuna en sistemas vegetales, polipéptidos antigénicos, transformación genética de plantas.

ABSTRACT

Immunological analysis of relevant epitopes of respiratory syncytial virus produced in plants

Infectious respiratory diseases are an important area for the vaccine development due to the high cost of hospitalization that they generate. Respiratory syncytial virus (RSV) is the most important respiratory pathogen leading to hospitalizations in young children but is also important in elderly people. Although RSV has been investigated for more than 40 years, an effective vaccine is not yet available. The current trend for the development of acellular vaccines is produced by recombinant methods. Recently, plants are being exploited to express recombinant proteins of pharmaceutical value; plant-based vaccines present an attractive system for the production of antigenic peptides. The current work focused on the expression of antigenic peptides derived from RSV in plants as a first step for the development of an edible vaccine. F and G proteins of the envelope of VSR could be targets for the development of vaccines. We designed vectors for transformation of lettuce plant and tobacco plastids, harboring sequences for relevant epitopes encoded by the F and G genes of RSV. The synthetic genes, optimized in the codon-usage bias for their expression in plants encode three epitopes from the F protein and one epitope from the G protein fused by linkers. The lettuce transformation was achieved by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* and tobacco plastids by biobalistics. The presence of the transgene was demonstrated by PCR and Southern blot analysis, and production of the heterologous protein by SDS-PAGE, in addition the antigenicity of the latter was demonstrated by ELISA and Western blot. Finally we performed immunogenic analysis in Balb/c mice; three groups of five female mice were immunized with transgenic lettuce, wild type lettuce and a suspension of purified proteins from RSV (AbD Serotec). The transgenic lettuce group showed higher IgG antibodies levels than the wild type lettuce group. This work is a first step towards the generation of an edible vaccine in plant systems against RSV harboring epitopes from F and G proteins.

Keywords: Plant based vaccine, antigenic polypeptides, plants genetic transformation

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades respiratorias

Las enfermedades respiratorias ocupan uno de los tres primeros lugares dentro de las enfermedades infecciosas a nivel mundial; en México y en los demás países en vías de desarrollo o subdesarrollados, las infecciones respiratorias agudas (IRA) ocasionan altas tasas de morbilidad y mortalidad.

Las IRA se presentan principalmente en niños menores de cinco años y en ancianos mayores de 65, siendo de gran importancia por la gravedad de su cuadro clínico (Rosete y col., 2002).

Los principales agentes etiológicos de las enfermedades respiratorias son los virus, entre los cuales destacan los de influenza, parainfluenza, rinovirus y virus sincicial respiratorio; este último es el principal agente causal de bronquiolitis y neumonía (Rosete y col., 2002).

1.2. Virus sincicial respiratorio

1.2.1. Epidemiología

El virus sincicial respiratorio (VSR) es uno de los patógenos más importantes en las infecciones respiratorias; es la principal causa de hospitalización de niños menores de dos años (Fig. 1) y es responsable de cerca de 160,000 muertes anuales a nivel mundial. En un año aproximadamente 34 millones de episodios de infecciones de tracto respiratorio bajo fueron asociadas al VSR en niños menores de 5 años, de los cuales el 10% requirieron hospitalización (Nair y col., 2010). En pacientes con bronquiolitis y neumonía se ha identificado al VSR como agente etiológico en el 90% y 50% de los casos respectivamente (Paramore y col., 2010). Se considera que antes de los dos años de edad del 80% al 100% de los niños ha tenido infección por este virus, con una tasa de mortalidad de 0.1-2.5% (Kneyber y col., 2000; Noyola y col., 2007). El VSR es una de las principales causas de neumonía en ancianos con un índice de mortalidad de hasta 10%. Los niños recién nacidos están parcialmente protegidos contra la enfermedad debido a los anticuerpos maternos; sin embargo, esta es una protección a corto plazo (Piedra y col., 2003). La reinfección con VSR es común ya que la infección confiere solo

inmunidad temporal. En años recientes las infecciones por VSR se han incrementado tanto en guarderías como en asilos de ancianos, y se caracterizan por producir un aumento en la cantidad de casos de bronquiolitis y neumonía y un incremento en la hospitalización de niños y ancianos con infecciones respiratorias agudas (Falsey y Walsh, 2000). Los bebés prematuros, inmunosuprimidos o con inmunodeficiencias son particularmente propensos a la infección; sin embargo, la infección puede presentarse de manera aguda en niños sin ningún factor de riesgo (Falsey y col., 2005).

Virus detectados en niños hospitalizados con infección respiratoria aguda (Hospital central, SLP, 2002-2004)

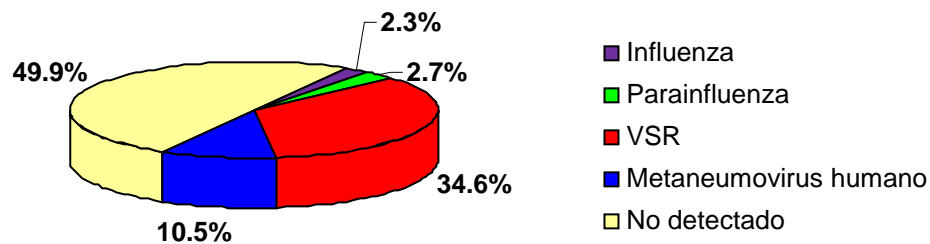


Figura 1. Principales causas de hospitalización por enfermedades de las vías respiratorias (Noyola y col., 2005).

1.2.2. Clasificación y estructura

El VSR es un virus de RNA de cadena sencilla, no segmentada y de orientación negativa. Pertenece al género *Pneumovirus* y a la familia *Paramyxoviridae*. Tiene dos subtipos, el A y el B. El virión consta de una nucleocápside contenida dentro de una envoltura lipídica (Fig. 2). El tamaño de los viriones varía entre 150 y 300 nm. Su genoma está compuesto por aproximadamente 15,222 nucleótidos y 10 genes que codifican 11 proteínas; el ARN mensajero para el gen M2 tiene dos

marcos de lectura por lo cual da lugar a dos proteínas diferentes, M1 y M2 (Vergara y col., 2006).

Las proteínas N, P y L forman la nucleocápside, las glicoproteínas F, G y SH se organizan formando espículas y la proteína de la matriz (M) conecta la nucleocápside con la envoltura (Dudas y Karron, 1998).

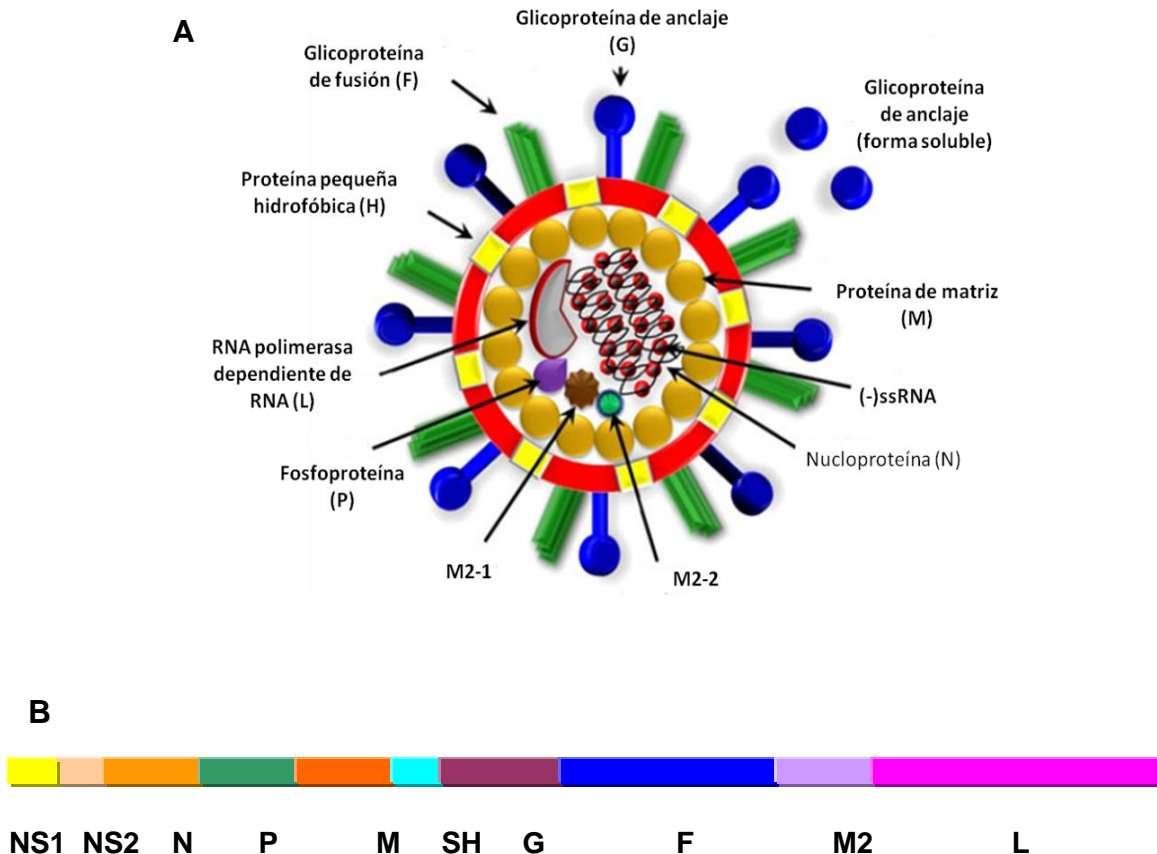


Figura 2. Estructura del virus sincicial respiratorio. A) Diagrama de la estructura del virión mostrando la distribución espacial de las proteínas (modificado de González y col. 2012). B) Distribución de los genes que codifican 11 proteínas (modificado de Durbin y Karron 2003).

1.2.3. Características de las proteínas G y F

Las proteínas de superficie, llamadas proteína de anclaje (G) y de fusión (F), son los principales determinantes antigénicos y forman parte importante en la adhesión

y el anclaje del virus a la célula. La proteína G es una proteína de aproximadamente 300 aminoácidos, tiene abundantes glicosilaciones tipo N y O por lo que su peso molecular es de aproximadamente 90 kDa. Es la proteína de unión del virus a la célula; las glicosilaciones le permiten la unión con los glicosaminosacáridos presentes en la membrana plasmática (Bourgeois y col., 1998).

La proteína F tiene similitud estructural con la proteína de fusión de otros paramixovirus y consta de dos fragmentos unidos por puentes disulfuro. Es una proteína de aproximadamente 500 aminoácidos y 70 kDa, contiene glicosilaciones aunque no tan abundantes como la proteína G. La proteína F inicia la penetración viral fusionando la envoltura viral y la membrana celular y favorece la diseminación del virus uniendo las células infectadas a las adyacentes no infectadas para formar los sincicios característicos (Collins y col., 2008).

1.2.4. Patogenia

La infección por VSR está confinada a las vías respiratorias; la diseminación del virus se puede producir desde las vías respiratorias altas hasta comprometer la totalidad de las vías respiratorias inferiores.

En la mayoría de los adultos sanos los síntomas de una infección por VSR se manifiestan como un cuadro de rinitis o de resfriado común; sin embargo, puede causar inflamación en el tracto respiratorio inferior de niños menores de dos años, adultos mayores y personas inmunosuprimidas

La infección inicia con la unión de la proteína G a la célula receptora por medio de las glicosilaciones; posteriormente la proteína F media la fusión de las membranas y la penetración de la nucleocápside al citoplasma. El virus se replica causando daño y muerte del epitelio bronquial, lo que culmina con el taponamiento de las vías aéreas por moco y aumento de la permeabilidad del epitelio (Kneyber y col., 2000). También se produce impedimento del flujo de aire, con lo que se producen las características sibilancias.

1.2.5. Inmunología

La inmunidad contra VSR naturalmente adquirida es incompleta. La mayoría de los niños con infección por VSR generan una respuesta transitoria de anticuerpos IgE o IgG, pero no inmunidad protectora duradera por lo que las reinfecciones con este virus son frecuentes.

En individuos inmunocompetentes la infección por VSR desencadena una cascada de señales que dan lugar a una respuesta inmune de tipo Th1, lo cual resuelve la infección; sin embargo, en individuos inmunosuprimidos y en las reinfecciones en niños menores de 2 años, la infección genera una respuesta inmunológica predominante Th2, lo que desencadena eosinofilia y gran cantidad de moco que taponan las vías respiratorias generando la enfermedad (Openshaw y Tregoning, 2005). Las proteínas de superficie G y F median la respuesta inmune hacia el VSR; la proteína F induce una respuesta predominante Th1 mientras que la proteína G preferentemente Th2 (Openshaw y Tregoning, 2005).

1.2.6. Medidas profilácticas y terapéuticas

1.2.6.1. Terapia antiviral

La ribavirina es el único fármaco registrado para el tratamiento de niños con bronquiolitis por VSR; sin embargo, este fármaco no genera resultados satisfactorios en todos los casos y es altamente teratogénico, por lo cual en los últimos años ha dejado de utilizarse (Kneyber y col., 2000).

1.2.6.2. Profilaxis pasiva

En la actualidad la única medida profiláctica contra la infección por VSR es la inmunidad pasiva con un anticuerpo monoclonal humanizado anti-VSR (Palivizumab). Éste es producido mediante tecnología del ADN recombinante está dirigido a un epítipo de la proteína F, con actividad neutralizante e inhibidora de la fusión de VSR. Sin embargo, la protección generada por este anticuerpo solamente es temporal y su costo es elevado.

1.3 Vacunas

La vacunación ha sido uno de los grandes logros en el campo de la salud, desde el descubrimiento de la vacuna de la rabia por Louis Pasteur, hasta nuestra época en la que se han logrado generar vacunas contra una gran variedad de patógenos (Fig. 3), y en el caso como el de la viruela, se ha logrado erradicar la enfermedad.

La vacunación es el proceso que permite generar resistencia a una enfermedad infecciosa. Las dos grandes propiedades que deben reunir las vacunas son la eficacia y la inocuidad; esto es, que tenga la capacidad para prevenir la enfermedad sin que desencadene reacciones adversas (López y col., 2004).

Una vacuna ideal debería tener las siguientes características:

- Mimetizar una respuesta inmunológica similar a la de la infección natural.
- Proporcionar más del 90% de protección.
- Ser completamente segura y producir los mínimos efectos secundarios.
- Contar con inmunidad persistente a largo plazo.
- Ser compatible con otras vacunas.
- Ser de administración no invasiva (vía oral preferentemente) y en los primeros años de vida.
- Ser estable a temperatura ambiente.
- Ser de fácil producción y económicamente accesible.
- En el caso del VSR, que tenga un correcto balance entre la respuesta inmune Th1 y Th2 que permitan inducir protección sin exacerbar los síntomas de la infección.

Las vacunas clásicas son vacunas de microorganismos atenuados o inactivados o fragmentos de ellos (proteínas purificadas conocidas como vacunas de subunidades); sin embargo, existen vacunas de nueva generación que prometen ser más efectivas e inocuas las cuales pueden producirse por técnicas de ADN recombinante (López y col., 2004).

Desarrollo de vacunas: 1798-2010

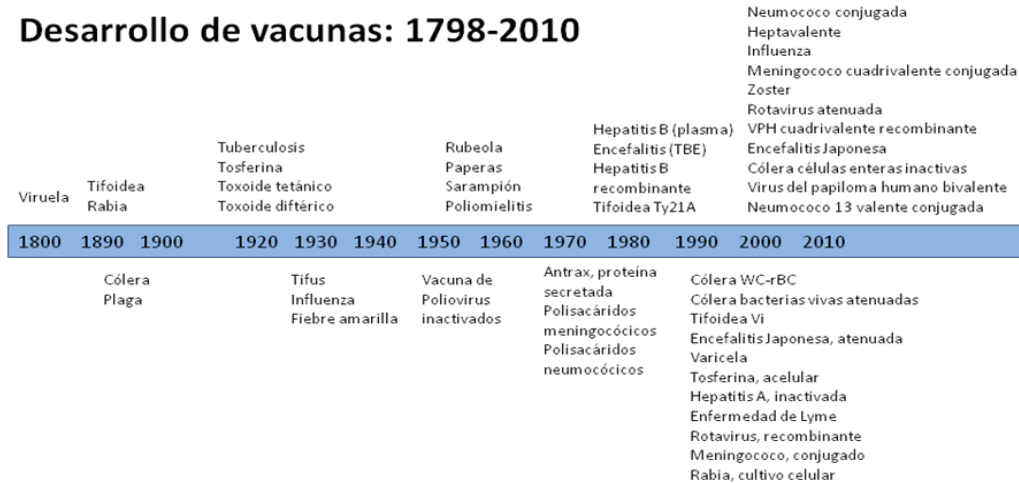


Figura 3. Desarrollo de vacunas desde 1798 y su crecimiento exponencial hasta el 2010 (Modificada de Loucq, 2013)

1.3.1 Vacunas de nueva generación

En las últimas dos décadas los avances de la biotecnología nos han permitido nuevas estrategias para el diseño de vacunas. Esto debido a los avances en técnicas de aislamiento de genes de origen vírico o bacteriano, y la posibilidad de introducirlo a otro organismo. Dentro de la nueva generación de vacunas a partir de microorganismos modificados genéticamente se encuentran las vacunas recombinantes de subunidades y las vacunas basadas en vectores recombinantes (Dixon, 1995).

Un área importante en el estudio de nuevas vacunas es la inmunidad de mucosas, debido a que la vacunación tradicional vía parenteral, que ha sido exitosa contra algunas enfermedades, es poco efectiva al proporcionar protección contra enfermedades entéricas y respiratorias (Van Ginkel y col., 2000; Rigano y Walmsley, 2005).

1.3.2. Vacunas de polipéptidos recombinantes

La tecnología del ADN recombinante permite aislar genes o fragmentos de ellos que codifican para proteínas antigénicas o epítopos de éstas. Estos genes pueden

introducirse a sistemas biológicos como bacterias, levaduras o plantas que son usados como biorreactores. Estas nuevas vacunas tienen la ventaja de las vacunas de subunidades, que permiten generar protección y disminuir los efectos secundarios.

1.3.3. Vacunas contra VSR

Desde el descubrimiento del VSR se han realizado diversos intentos por desarrollar una vacuna (Tabla 1). Alrededor de 1960 se generó una vacuna a partir de virus inactivos por medio de formaldehído (FI-VSR) la cual fue probada en lactantes y niños en los Estados Unidos. Al estar en contacto con el virus resultó una enfermedad más severa en niños que habían sido vacunados en comparación con los niños no vacunados; esto se debió a la producción de una respuesta inmune Th2 exacerbada lo que desencadenó abundante eosinofilia, y en consecuencia producción de moco y taponamiento de las vías respiratorias. Posteriormente se han realizado diversos intentos de vacunación sin que se haya conseguido una vacuna efectiva disponible en el mercado.

Las proteínas de VSR F y G inducen anticuerpos neutralizantes, por lo que la mayoría de las vacunas candidatas se han centrado en la inducción de anticuerpos contra la proteína F, ya que produce induce niveles altos de anticuerpos neutralizantes y es altamente conservada entre las cepas de VSR. El siguiente blanco ha sido la proteína G, que tiene el inconveniente de ser altamente variable entre las cepas de VSR, con la excepción de la región central de la proteína que es la que se ha utilizado en el desarrollo de vacunas. Algunos autores han atribuido la respuesta exacerbada de la vacuna F1-VSR a la presencia de la proteína G completa (Hancock y col., 1996); sin embargo, otros consideran que incluir dicha proteína dentro de las vacunas es importante debido a que genera una mejor respuesta inmune con respecto a las que solo tienen F (Morrison y Walsh, 2013). Recientemente se ha trabajado con cepas mutantes y vacunas de subunidades; de estas últimas llegó a fase III la serie PFP (1, 2 y 3) que contiene del 90 al 98% de la proteína F. Con esta vacuna se obtuvieron niveles altos de anticuerpos en suero; sin embargo, la reducción en la incidencia

de infección por VSR no fue significativa. Por otro lado, la BBG2Na, un polipéptido de la proteína G que incluye los aminoácidos 130-230 resultaba ser prometedora en cuanto a títulos de anticuerpos e inmunoprotección; desafortunadamente en estudios de fase III se presentaron efectos adversos en un pequeño número de individuos (Dubin y Karron, 2003; Piedra y col., 2003; Nguyen y col., 2012; Morrison y Walsh, 2013).

Las vacunas de subunidades tienen como ventaja que al utilizar solo fragmentos antigénicos de las proteínas del virus se puede producir una respuesta inmune sin reacciones secundarias, además de que la selección de epítomos específicos ayudará a crear un equilibrio de la respuesta inmune, evitando así respuestas con un sesgo y exacerbación de síntomas.

Tabla 1. Estrategias de desarrollo de vacunas contra VSR.

Estrategia	Plataforma	Estatus
Virus inactivado	Virus de VSR inactivado con formaldehído	Descontinuada
Virus atenuados	Atenuación por temperatura	Fase I/IIa
	Ingeniería genética por genética reversa	Fase I/IIa
Subunidades	Proteína F purificada (PFP-1,2,3)	Fase III-descontinuada
	BBG2Na	Fase III-descontinuada
	Formulación mezcla de F/G/M	Fase II
	Partículas tipo virus (VPL) de la proteína F	Fase I
	Proteína quimérica F/G	Fase I/IIa
	Péptidos F/G	Pre-clínica
Vectores	Virus Vaccinia (proteínas F o G)	Pre-clínica
	Adenovirus (proteínas F o G)	Pre-clínica
	PIV3 (proteínas F o G)	Fase I/IIa
	Alfavirus/virus de la enfermedad de Newcastle (proteínas F o G)	Pre-clínica
	Estafilococos	Pre-clínica
	ADN	Pre-clínica

* Modificada de Chang 2011

1.4. Plantas transgénicas para la producción de proteínas heterólogas

A principios de la década de los 90's se planteó una nueva aplicación de la biotecnología que consiste en emplear sistemas vegetales para la producción de proteínas de alto valor agregado en biomedicina o industria. Este sistema alternativo es novedoso dado que los vegetales producen una gran cantidad de biomasa, en algunos casos a más de 100 ton / ha, y es un sistema fácil de llevar a gran escala. Algunos grupos de investigación se enfocaron hacia la obtención de proteínas terapéuticas tales como anticuerpos, albúminas y hormonas. Otra aplicación importante en este campo consiste en la producción de vacunas (Tabla 2) (Daniell y col., 2001; Kaprowski y Yusibov, 2001; Mason y col., 2002). En la actualidad existen empresas como MedicaGo, Fraunhofer y Bayer que están utilizando a las plantas para producción de biofármacos para uso en animales y humanos. Pfizer y Protalix ya producen la glucocerebrosidasa en células vegetales para tratar la enfermedad de Gaucher en humanos. También SIGMA y otras compañías ya usan plantas como biorreactores para producir compuestos para uso en investigación debido a su bajo costo de producción.

1.4.1. Vacunas producidas en plantas

A pesar de que las vacunas son uno de los grandes y más importantes sucesos que ha tenido la medicina, sus costos de producción, almacenamiento y traslado, no permiten en muchos casos, que alcancen una distribución completa, siendo afectados principalmente los países pobres (Mason y col., 2002).

Ante la necesidad de desarrollar vacunas efectivas pero accesibles, se concibió la idea de utilizar los vegetales como fuentes de vacunas comestibles. El enfoque es que la administración oral de vegetales conteniendo epítomos relevantes de algún patógeno genere una respuesta inmune en las mucosas para producir inmunidad protectora, aplicado en el caso de enfermedades cuya vía de infección es la mucosa, ya que ésta constituye la primera barrera de protección que enfrenta el antígeno y, por lo tanto, un blanco importante para inducir protección (Streatfield y col., 2001).

Las ventajas de producir vacunas en vegetales son enormes debido a que se reduce en gran medida el costo por producción, purificación, almacenamiento y transporte, ya que se pueden utilizar vegetales de la región cuyo manejo en invernadero es conocido. Aunado a esto, las vacunas en plantas permiten evitar el uso de jeringas no estériles, que en países subdesarrollados es uno de los principales riesgos de contagio de enfermedades como SIDA o hepatitis B (Daniell y col., 2001; Streatfield y col., 2001).

Por otro lado, el empleo de subunidades antigénicas eliminaría los riesgos que acompañan al uso de organismos completos atenuados, tales como el desarrollo de la enfermedad y efectos secundarios (Clements y col., 2004)

Lo ideal en este tipo de vacunas es que se expresen en vegetales que se consuman de preferencia crudos o con un procesamiento mínimo, ya que parte del antígeno puede degradarse con la cocción. Los primeros trabajos para generar vacunas en plantas comestibles utilizaron tabaco y papa; sin embargo, los sistemas vegetales ideales para este propósito no deben tener toxicidad y consumirse frescos (Daniell y col., 2001).

Una de las principales limitantes en este campo es el nivel de expresión de la proteína recombinante y este problema se ha afrontado usando genes sintéticos, diseñados con codones optimizados para su uso en las plantas, para hacerlos eficientes, sin cambiar la secuencia de aminoácidos (Arakawa y col., 1999).

El suministro oral de vacunas recombinantes producidos en plantas es una ruta ideal de la vacunación debido a la simplicidad y seguridad de la administración, bajo costo de producción, la bio-encapsulación natural de los antígenos (protegidos por la pared celular vegetal) y, por lo tanto, la estabilidad en el tracto gastrointestinal, y la inmunidad protectora en la mucosas (Streatfield, 2006; Yusibov y col., 2011). Recientemente se ha publicado que una alternativa para dar mayor vida de anaquel a estas vacunas es liofilizar el producto vegetal y generar pastillas. Un punto importante es analizar la cantidad de la proteína antigénica recombinante por lotes para asegurar se suministre la dosis requerida (Thomas y col., 2011).

En la actualidad diversas vacunas y proteínas terapéuticas han intentado producirse en diferentes plantas (Tabla 2) y en algunos casos ya se encuentran en comercialización.

Tabla 2. Vacunas, anticuerpos y proteínas terapéuticas producidas en plantas que se encuentran en estudios clínicos o en el mercado.

Producto	Planta	Sistema de expresión	Indicación	Ruta de administración	Estado de desarrollo del producto
Vacunas					
<i>E. coli</i> LT-B	Papa Maíz	Transgénica Transgénica	Diarrea	Oral	Fase I Fase I
CP del Virus Norwalk	Papa	Transgénica	Diarrea	Oral	Fase I
HBsAg	Papa Lechuga	Transgénica Transgénica	Hepatitis B	Oral	Fase I Fase I
Virus de la rabia GP/NP	Espinaca	Transitoria (vector viral)	Rabia	Oral	Fase I
Virus de la enfermedad de Newcastle HN	Células en suspensión de tabaco	Transgénica	Enfermedad de Newcastle (aves de corral)	Subcutánea	Aprobada por la USDA (no comercializada)
Anti-idiotipo scFVs personalizado	<i>Nicotiana bentamiana</i>	Transitoria (vector viral)	Linfoma no Hodking	Subcutánea	Fase I
Anti-idiotipo dcFVs personalizado	<i>Nicotiana bentamiana</i>	Transitoria (vector magnICON)	Linfoma no Hodking	Subcutánea	Fase I (en proceso)
Influenza HA H5N1 VPL	<i>Nicotiana bentamiana</i>	Transitoria (vector binario, agrobacteria)	H5N1 influenza "aviar"	Intramuscular	Fase I (en proceso) Fase II (utilizada en Canadá en voluntarios)
Influenza HA11 H5N1	<i>Nicotiana bentamiana</i>	Transitoria (vector lanzadera)	H5N1 influenza "aviar"	Intramuscular	Fase I
Influenza HAC1 H1N1	<i>Nicotiana bentamiana</i>	Transitoria (vector lanzadera)	H5N1 influenza "porcina"	Intramuscular	Fase I

Producto	Planta	Sistema de expresión	Indicación	Ruta de administración	Estado de desarrollo del producto
Anticuerpos					
Anti-CD20	Lenteja de agua	Transgénica	Linfoma no Hodking, artritis reumatoide	intravenosa	Pre-clínica
Anti- antígeno de superficie I/II de estreptococo	Tabaco	Transgénica	Caries dental	Tópica	Fase II; aprobada en EU
Anti- α CCR5	<i>Nicotiana bentamiana</i>	Transitoria (vector magnICON)	VIH	Tópica	Pre-clínica
Anti-VIH gp120	Maíz <i>Nicotiana bentamiana</i>	Transitoria (vector binario, agrobacteria)	VIH	Tópica	Pre-clínica
Proteínas terapéuticas y dietarias					
Glucocerebrosidasa	Células de zanahoria en suspensión	Transgénica	Enfermedad de Gaucher	Intravenosa	En el mercado
Insulina	Cártamo	Transgénica	Diabetes	Subcutánea	Fase I/II (en espera de comercialización)
Lipasa gástrica	Maíz	Transgénica	Fibrosis quística, pancreatitis	Oral	Fase II (comercializada como reactivo analítico)
Lactoferrina	Maíz	Transgénica	Infecciones gastrointestinales	Oral	Fase I (comercializada como reactivo analítico)
Factor intrínseco	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transgénica	Deficiencia de vitamina B12	Oral	Fase II

*Modificada de Yusibov y col., 2011.

1.4.2. Trabajos preliminares de vacunas contra VSR producidas en plantas

Las proteínas más estudiadas del VSR debido a su inmunogenicidad son las proteínas de superficie F y G. A la fecha existen reportes de expresión de estas proteínas en diferentes sistemas vegetales, como en tabaco, tomate y protoplastos de manzana.

En 1999 Shandu y col., reportaron la expresión del gen F de VSR usando como modelo protoplastos de hoja de manzana. En 2000, nuevamente Shandu y col., expresan el gen F de VSR ahora en jitomate, comprobando la generación de anticuerpos en ratones; posteriormente Lau y Korban (2009) prueban la estabilidad de este transgén en la generación T3 de este jitomate y patentan su producción; sin embargo, no han probado si su proteína heteróloga es inmunoprotectora además de inmunogénica. Por otro lado Belanger y col. publican en el 2000 la expresión de un epítipo de la proteína G de VSR en plantas de tabaco, comprobando que es inmunogénica e inmunoprotectora en ratones, aunque no dan información sobre el balance inmunológico Th1 y Th2 que fue uno de los problemas con la primera vacuna inactivada con formaldehído.

1.5. Transformación genética de plantas

1.5.1. Transformación nuclear vía *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens es una bacteria Gram negativa del suelo que infecta una gran cantidad de plantas dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas. La infección por esta bacteria comienza en una zona herida de la planta. Las cepas virulentas de *A. tumefaciens* contienen un plásmido de alrededor de 200 kb denominado Ti (Tumor-inducing). El plásmido Ti contiene dos regiones importantes: por un lado, la región *vir* (región de virulencia) de cerca de 35 kb es responsable del procesamiento y transferencia del T-DNA, ya que codifica para funciones de corte, extensión, transferencia e integración del T-DNA al genoma de la célula receptora; por otro lado, la región T es un segmento de 23 kb (comprende entre 8 y 13 genes) y corresponde al segmento de ADN que se transfiere al genoma vegetal. Esta región está flanqueada por dos secuencias repetidas de 25 pb,

llamados borde derecho e izquierdo, que son indispensables para su transferencia (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1994).

Cuando la planta se expone a la colonización por agrobacterias, se desencadena una serie de eventos, como unión a la célula vegetal, transferencia del T-DNA, integración al genoma de la célula y la expresión de las funciones codificadas por el ADN transferido. La activación de los genes *vir* trae como consecuencia el desprendimiento de los bordes de la región T y la incorporación de este al genoma de la célula receptora. La agrobacteria es un excelente vector capaz de transferir parte de su genoma a las células vegetales, se convierte en un excelente vector para transferir genes de interés a plantas, insertando la secuencia de DNA específica entre los bordes de la región T (Zambryski, 1992).

Las plantas que han sido transformadas con agrobacterias muestran transformación estable, lo cual significa que la nueva información introducida a la planta se hereda en las siguientes generaciones (Kaprowski y Yusibov, 2001).

1.5.2. Biobalística

A pesar de que el método de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* es muy eficiente y la transformación genética se da en el núcleo celular, uno de los inconvenientes de la producción de proteínas heterólogas en sistemas vegetales es el bajo nivel de expresión de dichas proteínas, lo cual puede mejorarse con la transformación de cloroplastos lo que aumenta en gran medida la producción de las proteínas recombinantes de interés debido a que podemos encontrar hasta 10,000 copias de un transgén insertado en el genoma del cloroplasto.

La técnica de biobalística permite introducir genes específicos en todo tipo de tejidos vegetales por medio de bombardeo con microprojectiles, sin causar daño letal al tejido. Los microprojectiles son partículas microscópicas de 0.4 a 2.0 micrómetros de diámetro, pueden estar hechas de tungsteno u oro, y se recubren con el ADN de interés. Estos microprojectiles se colocan en la superficie de un acarreador o macroprojectil que es generalmente impulsado por un choque de gas a alta velocidad. La trayectoria del macroprojectil es detenida a cierta distancia antes de llegar al blanco y de esta manera los microprojectiles llegan al

tejido vegetal con una presión determinada, perforando las paredes celulares e introduciéndose incluso hasta organelos celulares como cloroplastos o mitocondrias (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1994).

1.5.2.1. Transformación de cloroplastos

Los cloroplastos tienen su propio genoma llamado plastoma, de un tamaño entre 120 y 180 kb (Sugiura, 2003). Las células vegetales tienen en promedio 100 cloroplastos que contienen 100 moléculas de plastoma por lo cual por cada célula puede haber de entre 1,000 y 10, 000 copias idénticas de plastomas; esto convierte a los cloroplastos en un atractivo sistema de expresión de proteínas heterólogas (Maliga, 2003). Desde hace 15 años se logró introducir ADN foráneo a los cloroplastos de plantas superiores. Daniell y col. (1990) lograron transformar hojas de tabaco y detectar la expresión de la proteína GUS (β -glucoronidasa), de forma transitoria. En ese mismo año, Svab y col. (1990) lograron transformar cloroplastos de células de tabaco de manera estable. La transformación genética de cloroplastos sigue los principios de la recombinación homóloga, por lo que para una transformación exitosa el transgén tiene que estar flanqueado por secuencias que aseguren su integración en el plastoma en un sitio específico (Bel y col., 2001) y los vectores de transformación deben ser específicos para cada planta para mejorar la eficiencia de la doble recombinación homóloga (Daniell y col., 2005).

1.6. Características de las plantas utilizadas

1.6.1. Lechuga

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta herbácea, dicotiledónea; pertenece a la familia de las compuestas y a la clase Angiospermae. El género *Lactuca* contiene aproximadamente 100 especies distribuidas alrededor del mundo: 17 en Europa, 10 en América, 33 en África y cerca de 40 especies en Asia. Su descripción como un vegetal cultivado fue hecha por Hipócrates en 343 a.C. y Aristóteles en 356 a.C. Es originaria de Europa y Asia y ha sido cultivada por más de dos mil años; en América se cultiva desde alrededor de 1494 (Davey y col., 2002).

La lechuga se clasifica por sus características morfológicas, principalmente por el tamaño y forma de sus hojas y la conformación de éstas en la llamada “cabeza”. Así, tenemos dos variedades principales: de hoja suelta y acogollada. El cultivo de lechuga tiene una enorme importancia en varios países europeos y en los Estados Unidos, en donde se considera el cuarto vegetal mas consumido (luego del tomate, la naranja y la papa). En México se cultiva principalmente en Puebla y Guanajuato y en menor escala en Baja California, San Luis Potosí y Zacatecas (Claridades Agropecuarias, 1999).

Dentro de su valor nutricional encontramos que es fuente de fósforo, hierro, sodio, potasio, calcio, magnesio, ácido ascórbico y vitamina A, principalmente.

Una de las ventajas del cultivo de lechuga es que la parte consumible de la planta son las hojas, por lo cual se obtiene un producto listo para el mercado en un corto tiempo (plantas jóvenes) y se consume en su forma fresca. Al ser la lechuga un vegetal que se come crudo, se convierte en un excelente modelo para expresar proteínas de interés biofarmacéutico ya que los procesos de cocción, que pueden desnaturalizar a la proteína heteróloga, son innecesarios. Además, es una planta de rápido desarrollo y de un solo ciclo. Por lo anterior, la lechuga constituye un vegetal apropiado para la producción de vacunas comestibles.

1.6.2. Tabaco

Nicotiana tabacum es una planta dicotiledónea, pertenece al género *Nicotiana* y a la familia de las Solanáceas, en la que se encuentran algunas de las plantas más importantes del mundo, como son la papa, el jitomate y el chile. Esta familia se caracteriza por tener un gran número de alcaloides, entre los que destaca la nicotina del tabaco. El género *Nicotiana* incluye tres subgéneros: *Rústica*, *Tabacum* y *Petunoides*. En ellos se distribuyen 45 especies que se encuentran en América. Se cree que *Nicotiana tabacum* es originaria del noroeste de Argentina, de donde pudo haber pasado a las tierras bajas tropicales para ser cultivado y de ahí se extendió a Las Antillas y tal vez a Centroamérica y el sureste de México (Claridades Agropecuarias, 2001).

El tabaco es un excelente modelo para la transformación genética debido a la relativa facilidad en los métodos de transformación y la rapidez de su regeneración *in vitro*; aun cuando no es una planta que podría utilizarse como para la producción de vacunas comestibles por su alto contenido de alcaloides, nos permite realizar la prueba de concepto de proteínas recombinantes en líneas de bajo contenido en nicotina, antes de realizar transformaciones en las plantas apropiadas que usualmente requieren un proceso lento de regeneración en cultivo de tejidos y transformación genética.

II. JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

La vacunación ha sido uno de los logros más grandes de la medicina y ha permitido prevenir e incluso erradicar (como el caso de la viruela) un gran número de enfermedades. Sin embargo, aún existen padecimientos para los cuales no hay una vacuna disponible; este es el caso del virus sincicial respiratorio (VSR).

La infección por VSR es una de las principales causas de hospitalización en niños menores de 5 años, causando anualmente 34 millones de episodios de infecciones del tracto respiratorio bajo de los cuales el 10% requiere hospitalización; además, la infección con VSR solo produce inmunidad temporal por lo que las reinfecciones son frecuentes. Se han realizado diversos intentos de producción de vacunas contra VSR; sin embargo a la fecha no hay ninguna que sea eficiente y no cause efectos secundarios.

Una parte importante en el estudio de nuevas vacunas incluye aquellas que generen inmunidad de mucosas, debido a que la vacunación tradicional por vía parenteral que ha sido exitosa contra algunas enfermedades es poco efectiva al contra enfermedades entéricas y respiratorias

Unos de los problemas que afronta la vacunación son sus costos de producción, almacenamiento y traslado, por lo que en muchos casos no se alcanza una distribución completa, siendo afectados principalmente los países pobres. Ante la necesidad de desarrollar vacunas efectivas pero accesibles, es necesario explorar alternativas de vacunación eficientes y de bajo costo. Al producir vacunas en vegetales se reduce en gran medida el costo por producción, purificación, almacenamiento y transporte abaratándolas hasta en 2 órdenes de magnitud.

Es necesario obtener una vacuna contra VSR que no produzca efectos secundarios y sea de un costo accesible; por ello, el producir una proteína multiepítipo del VSR en plantas como la lechuga es una alternativa viable que sería la base de una vacuna comestible, con un bajo costo de producción, que al ser deshidratada aumente su vida de anaquel y sea de fácil almacenamiento y traslado, y al ser de subunidades disminuyera los posibles efectos secundarios que generarían vacunas de células completas con virus atenuados.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Obtener y caracterizar plantas de tabaco y lechuga que produzcan péptidos antigénicos del virus sincicial respiratorio (VSR)

3.2 Objetivos específicos

- Transformar genéticamente plantas de tabaco y lechuga con construcciones generadas con los genes sintéticos de VSR conteniendo las proteínas F y G y solamente la F.
- Analizar las transformantes de tabaco y lechuga.
- Comprobar inmunogenicidad de la proteína heteróloga en ratones Balb/c.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

*La preparación de reactivos, soluciones y medios de cultivo así como los protocolos detallados se describen en el anexo II

4.1. Construcciones genéticas

Se cuenta con cuatro construcciones genéticas, descritas en la Tabla 3, las cuales fueron utilizadas para la transformación estable de plantas de lechuga ya sea nuclear vía *Agrobacterium tumefaciens* y de cloroplastos de tabaco por biobalística.

Tabla 3. Construcciones utilizadas para la transformación genética

Construcción	Vector	Gen	Método de transformación
pBI-VSRsn	pBI-121	VSRsn	Nuclear por <i>A. tumefaciens</i>
pBI-VSRsnΔG	pBI-121	VSRsnΔG	Nuclear por <i>A. tumefaciens</i>
pKCZ-VSRsc	pKCZ	VSRsc	Cloroplastos por biobalística
pKCZ-VSRscΔG	pKCZ	VSRscΔG	Cloroplastos por biobalística

Estas construcciones se diseñaron por nuestro grupo con dos genes sintéticos que comprenden una fusión de epítomos de la proteína F y G de VSR optimizados con el uso de codones para la expresión en lechuga, uno de ellos para transformación nuclear (VSRsn) y otro para transformación de cloroplastos (VSRsc). Estos genes se enviaron a sintetizar a la compañía GeneArt en EUA.

El diseño de estos genes se basó en el análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas F y G con el programa *Antheprot* (disponible en <http://antheprot-pbil.ibcp.fr>), que determina las regiones inmunogénicas de epítomos relevantes (Parker y col., 1986) con base en la hidrofobicidad de los aminoácidos. Partimos de los estudios de las regiones inmunogénicas de la proteína F (López y col., 1998) y del estudio de la expresión en plantas de un epítomo de la proteína G que resultó ser inmunogénico e inmunoprotector (Belanger y col., 2000). Estos genes están compuestos por tres epítomos de la proteína F, uno de la proteína G y como adyuvantes dos regiones tomadas de la secuencia de la toxina tetánica utilizados

en un trabajo previo en una fusión de epítomos de difteria, tos ferina y tétanos (Soria-Guerra y col., 2007) unidos por espaciadores o linkers (Cárdenas y Clements, 1993); estos espaciadores exponen adecuadamente los epítomos lineales. Cuentan además con sitios de restricción que permiten eliminar la secuencia del epítomo de la proteína G y facilitan la subclonación en los vectores de transformación.

El gen usado en la transformación nuclear contiene una secuencia SEKDEL para la retención en el retículo endoplásmico y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI-121, sustituyendo el cassette del gen reportero GUS; este vector dirige la expresión del gen con el promotor constitutivo 35S de Virus del Mosaico de la Coliflor (35SCaMV), contiene un gen de selección que confiere resistencia a kanamicina a las células vegetales transformadas y un UTR de 120 pares de bases de la gama zeina de maíz que ha demostrado aumentar la estabilidad del RNA mensajero (Carrigton y Freud, 1990) (Fig. 4).

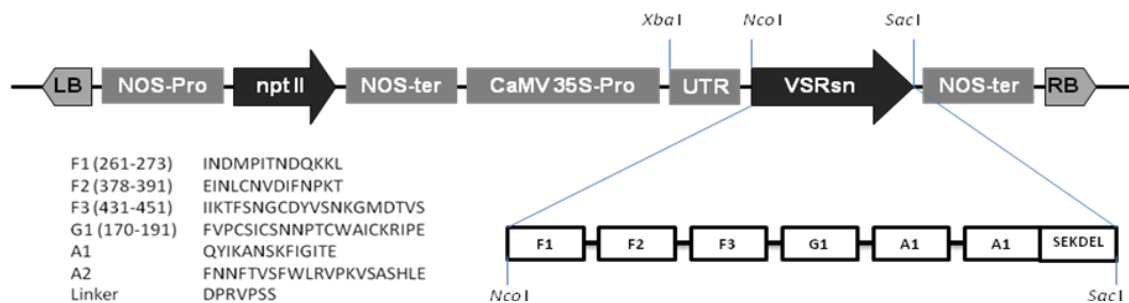


Figura 4. Representación esquemática de la construcción pBIVSRsn. La construcción contiene el gen sintético VSRsn formado por las secuencias de tres epítomos de la proteína F, un epítomo de la proteína G y como adyuvantes dos regiones tomadas de la secuencia de la toxina tetánica (A1 y A2), bajo el control del promotor 35SCaMV. Las secuencias que codifican para los adyuvantes y la señal de retención al retículo endoplásmico se encuentran en el extremo 3' del gen. Se indican los sitios de enzimas de restricción para la subclonación en el vector binario pBI121.

El gen usado para transformación en cloroplastos contiene un sitio de unión al ribosoma y sitios de restricción para ser clonado en un vector de transformación

de cloroplastos derivado del pKCZ desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación; este contiene un gen de selección que confiere resistencia a espectinomicina a las células vegetales transformadas y un promotor del operón de RNA ribosomal de plastidos (*Prrn*), unido a la región 5'UTR del gen 10 del fago T7 que provee mayor estabilidad al RNA mensajero (Fig. 5).

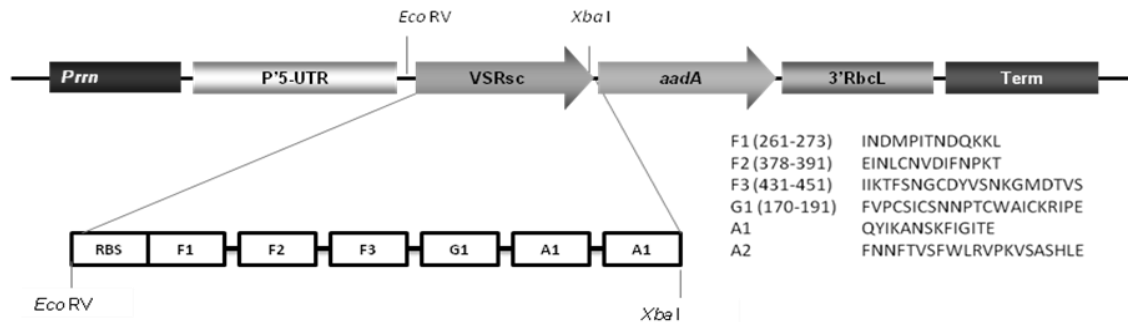


Figura 5. Representación esquemática de la construcción pKCZVSRsc. La construcción contiene el gen sintético VSRsc formado por las secuencias de tres epítopos de la proteína F, un epítipo de la proteína G y como adyuvantes dos regiones tomadas de la secuencia de la toxina tetánica (A1 y A2), bajo el control del promotor de cloroplastos *Prrn*. Se indican los sitios de enzimas de restricción para la subclonación en un derivado del vector pKCZ.

4.2. Transformación genética de plantas.

4.2.1. Transformación nuclear vía *Agrobacterium tumefaciens*

Las construcciones en el plásmido pBI-121 se transfirieron a *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 por electroporación, las bacterias transformadas se utilizaron para la transformación nuclear de cotiledones de lechuga.

4.2.1.1. Obtención de hojas cotiledonarias

Para obtener los explantes iniciales (hojas cotiledonarias) se utilizaron semillas estériles de lechuga de la variedad Green Wave, se sembraron aproximadamente 200 semillas en medio Murashige Skoog (MS) al 50%. A los siete días, de las plántulas obtenidas se cortaron las hojas cotiledonarias que se emplearon para los ensayos de transformación genética.

4.2.1.2. Transformación genética

Se utilizaron 300 cotiledones por experimento que fueron heridos con un bisturí; éstos fueron colocados en el medio MS líquido para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una suspensión de *A. tumefaciens* que portaba el plásmido de interés. Después de eliminar el exceso de bacterias con papel absorbente estéril, se colocaron en el medio de cocultivo Uchimiya Murashige (UM) por 2 días. Pasado el periodo de cocultivo, los explantes se transfirieron al medio de selección MSJ (con 100 mg/L de kanamicina) adicionado con 500 mg/L de cefotaxima para eliminar a la agrobacteria. Los tejidos fueron subcultivados cada dos semanas en medio fresco, seleccionando solo los explantes resistentes a la selección; una vez que se presentó el desarrollo de callos, éstos se colocaron en medio de selección MS104 y fueron subcultivados cada dos semanas hasta el desarrollo de brotes.

Posteriormente las plántulas obtenidas en el medio de selección se colocaron en medio de enraizamiento por dos semanas; una vez que se desarrolló la raíz las plantas fueron colocadas en tierra.

4.2.2. Transformación genética de cloroplastos por el método de biobalística

Para la transformación de cloroplastos de tabaco se utiliza el protocolo descrito por en Daniell y col. (2005), en el cual se emplea como explante inicial hojas jóvenes y como medio de regeneración el RMOP.

4.2.2.1. Obtención del explante

Se utilizaron semillas de tabaco estériles, se colocaron en botes con medio de cultivo MS (1-3 semillas por bote), a las 3 o 4 semanas después de la germinación se separaron las hojas y se colocaron en medio RMOP con la cara abaxial hacia arriba.

4.2.2.2. Recubrimiento de partículas de oro con el ADN de interés.

Las partículas de oro que se utilizan para el bombardeo deben ser preparadas por lo menos con un día de anticipación, se siguió el protocolo descrito por Daniell y

col. (2004). Cincuenta μL de la solución de partículas oro previamente preparadas fueron recubiertas con el ADN de interés (10 μL de ADN plasmídico de concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se resuspendieron en 35 μL de etanol al 100%. Este material se utilizó para 6 bombardeos.

4.2.2.3. Obtención de plantas transplastómicas

Los bombardeos se realizaron en una pistola de helio Bio-Rad; se utilizaron discos de ruptura de 1,100 psi, y una distancia de 9 cm. Las hojas bombardeadas se incubaron durante 48h a 25°C en la oscuridad. Después de este periodo, cada hoja se cortó en fragmentos de alrededor de 5mm² y se colocaron en medio RMOP con espectinomicina 500mg/L para inducir la selección de las plantas transplastómicas.

Los explantes se cambiaron a medio nuevo cada dos semanas y se seleccionaron los callos resistentes al agente de selección. Una vez que se desarrollaron las primeras hojas, éstas se cortaron y se colocaron nuevamente en medio de regeneración (primera ronda de selección); esto se realizó por dos rondas más (segunda y tercera ronda de selección).

Posteriormente las plántulas obtenidas en el medio de selección se colocaron en medio de enraizamiento por dos semanas; una vez que se desarrolló la raíz las plantas fueron colocadas en tierra.

4.2.3. Obtención de generaciones estables (T2) de lechuga y tabaco

Las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* fueron pasadas a tierra y analizadas para comprobar la presencia del transgén (generación T0); las plantas positivas para el transgén y fenotípicamente semejantes a la planta silvestre se conservaron en tierra hasta la producción de semillas; estas semillas se germinaron en medio MS al 50% con antibiótico para seleccionar las semillas transformadas de las no transformadas y las plantas obtenidas se llevaron nuevamente a tierra (generación T1), se analizaron para comprobar la presencia del transgén; el proceso de obtención y germinación de semillas se repitió para obtener la generación T2.

4.3. Análisis de transformantes

4.3.1. Extracción de ADN

El ADN genómico se aisló de tejido vegetal siguiendo el protocolo de Michiels y col. (2003).

4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la Tabla 4 se describen los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diferentes transgenes.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en las diferentes reacciones de amplificación.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Gen para el que fue diseñado
FSN	CATGGGAATCAACGATATGCC	Sintético nuclear (VSRsn)
RSN	CATCACAACCTCATCCTTCTCA	VSRsn
RSNint	GGTATCCATTCCCTTGTTAGACA	VSRsn
FSC	GGGAGGGATTTATGATCAATG	Sintético cloroplasto (VSRsc)
RSC	CAAGATGAGAAGCAGAACTT	VSRsc
FSCint	GTGGACCCTAGAGTTCCTTCT	VSRsc

La mezcla maestra de reacción (25 μ L) contenía ADN genómico (20 ng), buffer de Taq polimerasa (1X), $MgCl_2$ (1.5mM), dNTPs (0.2mM), oligonucleótidos (10 μ M) y Taq polimerasa (1U).

La amplificación se llevó a cabo en un equipo de Techne bajo los protocolos descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Protocolos de PCR para las amplificaciones de los diferentes genes.

Gen	Tamaño de amplicón (pb)	Oligonucleótido	Condiciones				
			Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
VSR Nuclear	480	FSN + RSN	5 min 94°C	30 s 94°C	30 s 49°C	30 s 72°C	5 min 72°C
VSR Nuclear fragmento	120	FSN + RSNint			30 s 51°C		

VSR	460	FSC+RSC			30 s 51°C		
VSR Cloroplasto fragmento	220	FSC+RSCint			30 s 52°C		

Después de la amplificación, las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1%, corridos en TAE 1X a 70 V, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV en un fotodocumentador Chemisystem (UVP) empleando el software Labworks 4.0.0.8.

4.3.3. Southern blot

Setenta microgramos de ADN genómico obtenido de las plantas transformadas fueron digeridos con la enzima *Hind* III (para la cual existe solo un sitio de corte en el T-DNA fuera del gen de VSR) para determinar el número de copias del transgén en el caso de las plantas transgénicas o con la enzima *Bgl* II para determinar la homoplastia en las plantas transplastómicas. El ADN digerido se corrió en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond N (Amersham, Buckinghamshire, UK) de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y col. (1989). La sonda fue generada por medio de PCR utilizando la mezcla PCR DIG High Prime Labelling Mix (Roche Co., Mannheim, Germany) utilizando oligonucleótidos específicos del transgén. La hibridación y la detección se realizaron según las condiciones descritas por el fabricante utilizando el kit Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

4.3.4. Extracción de proteínas

Se homogenizaron 100 mg de tejido vegetal en 500 μ L de buffer de extracción (PBS, tritón 1% y coctel inhibidor de proteasas (SIGMA P9599) 10 μ L/mL). El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford (1968), se empleó albúmina de suero bovino como estándar (5-20 ng/ μ L).

La calidad de las proteínas obtenidas fue analizada mediante electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) en un gel de acrilamida al 16% teñido con azul de Coomassie coloidal.

4.3.5. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Se siguió el protocolo estandarizado por Clark y Adams en 1977. Las placas fueron sensibilizadas con extracto soluble de tejido vegetal en cantidad necesaria para 500ng de proteína a 4°C durante toda la noche; posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con leche descremada al 5%. Después los pozos se incubaron a 37°C en presencia del anticuerpo policlonal de ratón anti-FVSR (Serotec, MCA490) en dilución 1:1000 durante 4 horas y en seguida con el anti-anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón (SIGMA) conjugado con fosfatasa alcalina (1:5000) durante dos horas. Por último, se agregó p-nitrofenilfosfato como sustrato disuelto en el buffer de fosfatasa alcalina (1 mg/mL) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad de la luz. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas Bio-Rad modelo 550, empleando el software Microplate Manager 5.1. Los datos se procesaron en el programa Microsoft Excel. En cada ensayo se incluyó blanco de reactivos y extracto de una planta no transformada.

4.3.6. Western Blot

Se emplearon muestras de 60 µg de proteína total que fueron previamente desnaturalizadas por 5 min en baño de agua hirviendo. Las muestras fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida y posteriormente el gel se sometió a un protocolo de transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) empleando un tanque de transferencia Transblot (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La detección inmunológica se llevó a cabo usando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal de ratón contra la proteína F de VSR y como anticuerpo secundario un anti-conejo

conjugado a peroxidasa. La detección se llevó a cabo con el sustrato para peroxidasa SuperSignal West Dura substrate (Pierce) y se detectó la señal luminiscente en un fotodocumentador UVP chemisystem (UVP, Inc.).

4.4. Ensayos preliminares de inmunización

4.4.1. Inmunización subcutánea de ratones Balb/c

Se seleccionaron dos lechugas transgénicas de generación T2 transformadas con el gen VSRsn (26A3 y 4C9). Se formaron 5 grupos de cinco hembras Balb/c de 8 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en ayuno el día previo a la inmunización; el tratamiento consistió en administrar por vía oral 50 mg de planta liofilizada resuspendida en 500 μ L de PBS (26A3, 4C9 y silvestre), 5 μ g de antígeno de VSR (Serotec) como control positivo o 500 μ L de PBS solo como control negativo. Se administraron cuatro dosis, los días 0, 7, 14 y 23; el día 31 fueron sacrificados y se recolectaron muestras de suero y lavados traqueo-pulmonares (Figura 6).

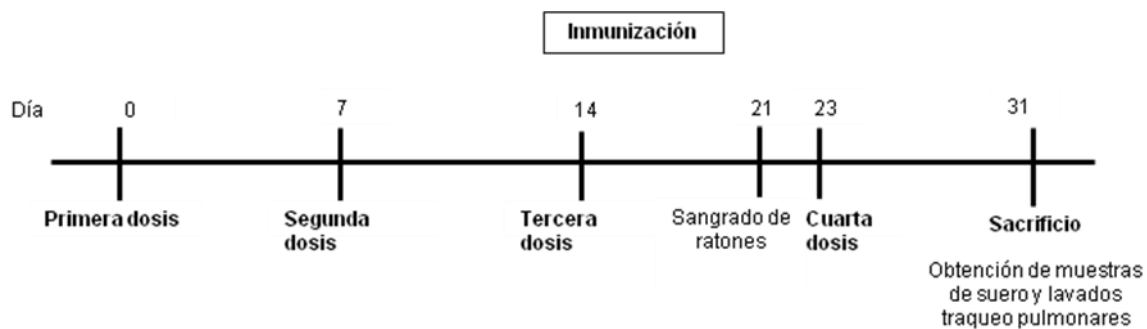


Figura 6. Esquema de inmunización de ratones Balb/c. Se administraron cuatro dosis, los días 0, 7, 14 y 23; el día 31 fueron sacrificados y se recolectaron muestras de suero y lavados traqueo-pulmonares.

4.4.2 Obtención de las muestras

Los ratones fueron anestesiados con cloroformo y se extrajo sangre por punción cardiaca. El suero se recuperó por centrifugación a 7,000 rpm por 10 minutos y se almacenó a -70° C hasta su uso.

Para obtener los lavados traqueo-pulmonares, después de la obtención de la sangre se diseccionó el ratón exponiendo el aparato respiratorio; se introdujo una cánula en la tráquea, se llenaron los pulmones con 1 mL de PBS adicionado de un inhibidor de proteasas (SIGMA P9599) y sin retirar la cánula se extrajo el PBS de los pulmones. Las muestras fueron centrifugadas a 8,000 rpm a 4° C por 10 minutos y almacenadas a -70° C hasta que fueron analizadas.

4.4.3. Determinación de los niveles de anticuerpos

La determinación de los niveles de anticuerpos se realizó un ensayo de ELISA; las placas fueron sensibilizadas con el antígeno comercial de VSR (Serotec) a 4° C durante toda la noche, se lavaron y se bloquearon con leche descremada al 5%, se añadieron posteriormente los sueros obtenidos por punción cardiaca en dilución 1:50 o los lavados traqueo-pulmonares en dilución 1:2. Las placas se incubaron durante 3 horas a 37° C, se lavaron y se añadió un anti-IgG de ratón o cada uno de los subtipos de IgG (IgG1 e IgG2a) conjugados con fosfatasa alcalina, se incubó durante 1 hora a 37° C, se lavó la placa y se añadió 1 mg/mL de p-nitrofenil fosfato en buffer de fosfatasa alcalina; después de 30 min de incubación se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector modelo 550microplate (Bio-Rad).

Los datos se analizaron con ANOVA por Graph Pad Prism software 5. Se utilizó la prueba de la diferencia estadística significativa de Tukey. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de plantas transgénicas de lechuga con el gen sintético

VSRsn

En los reportes de vacunas generadas en plantas para el VSR, se expresan el gen de la proteína F (Shandu y col., 2000) o epítomos de la proteína G (Belanger y col., 2000) aislados directamente del virus, que han resultado inmunogénicas y en el caso de los epítomos de la proteína G inmunoprotectoras; sin embargo, se sabe que expresar genes de otros organismos en plantas, debido a un uso de codones diferente, reduce la eficiencia de la expresión y se producen niveles bajos de proteínas recombinantes, por lo que existen reportes que demuestran que expresar genes sintéticos diseñados para la expresión en plantas mejora hasta en un orden de magnitud la expresión de proteína soluble total (Haq y col., 1995). Por otro lado, la expresión de epítomos relevantes en lugar de proteínas completas reduce el riesgo de reacciones adversas generadas por muchas vacunas (Yu y Langrige, 2001).

Para generar una vacuna contra VSR en lechuga se decidió hacer una fusión de epítomos de la proteína F y la G de VSR y diseñar un gen sintético optimizado para el uso eficiente de codones para su expresión en lechuga por transformación nuclear.

Para determinar las regiones seleccionadas, se analizaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas F y G (Martínez-González, 2009) con el programa Antheprot, que determina las regiones antigénicas dando un valor a cada aminoácido de acuerdo a sus características (hidrofilicidad, estructura, entre otras). Por otro lado, se tomaron en cuenta estudios previos de las regiones inmunogénicas de la proteína F (López y col., 1998) y la expresión en plantas de un epítomo de la proteína G que resultó ser inmunogénico e inmunoprotector (Belanger y col., 2000). Con base en lo anterior se decidió fusionar tres epítomos de la proteína F (aminoácidos 261-273, 378-391 y 431-451) y uno de la proteína G (aminoácidos 170-191) y dos regiones tomadas de la secuencia de la toxina tetánica (Soria-Guerra y col., 2007) unidos por un espaciador rico en prolinas reportado por Cárdenas y Clements en 1993.

Se añadió una secuencia SEKDEL para la retención de la proteína recombinante en el retículo endoplásmico lo que incrementa su acumulación en las células vegetales de 2 a 10 veces (Yu y Landrige 2001; Rigano y Walmsley, 2005) y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI-121.

5.1.1. Obtención de plantas transgénicas para el gen VSRsn

La estandarización de la transformación y regeneración de plantas de lechuga fue realizada en el laboratorio con anterioridad (Martínez-González y col., 2011).

La transformación de plantas de lechuga fue realizada mediante la infección de cotiledones con la cepa de *A. tumefaciens* que porta la construcción pBI-VRSsn; se transformaron 300 cotiledones de los cuales, aproximadamente dos meses posterior a la infección, se obtuvieron callos resistentes al agente de selección en el medio de cultivo (MSJ +100 mg/L kanamicina + 500 mg/L cefotaxima). Estos callos se colocaron en el medio MS104 adicionado de 100mg/L de kanamicina y en dos meses más, se obtuvieron brotes que se cortaron y se colocaron en medio de enraizamiento (MS + kanamicina 100 mg/mL); una vez enraizadas, las plantas se llevaron a tierra, se analizaron por PCR y las plantas positivas (13 líneas) se mantuvieron hasta la formación de semillas (generación T0). El proceso de transformación y regeneración se esquematiza en la Figura 7.

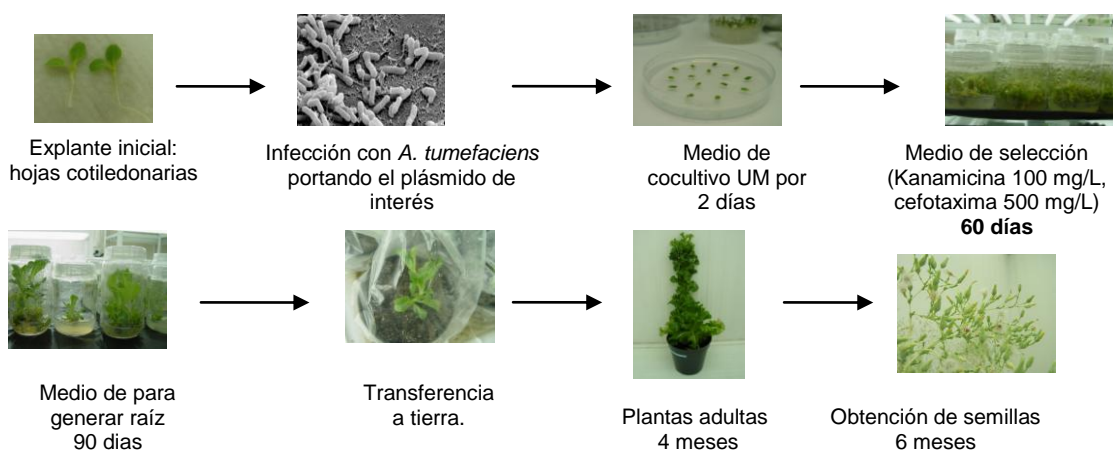


Figura 7. Representación esquemática de la transformación de plantas vía *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración de plantas de lechuga.

5.1.1.1. Obtención de la generación estable T2

Once de las 13 líneas obtenidas en la generación T0 produjeron semillas que fueron germinadas en medio de selección (1/2 MS + 200 mg/L de kanamicina); una vez germinadas se pasaron a tierra obteniendo así la generación T1. Las trece líneas resultaron positivas por PCR con oligonucleótidos específicos para el transgén y ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína F viral del VSR (Figura 8); ocho de estas plantas produjeron semilla y se colocaron en medio para germinación con 200 mg/L de kanamicina, obteniendo el 100% de germinación y desarrollo de la plántula en 7 de ellas (Figura 9). Para el caso de la línea 29A de la planta T1 solo se obtuvo una semilla y la plántula no toleró el agente de selección.

La inserción del transgén por *Agrobacterium* no está dirigida; ocurre al azar dentro del genoma de la planta. Esto puede ser una razón del porque no todas las plantas lleguen a ser adultas, mantengan el fenotipo silvestre o generen semillas viable, ya que el ADN insertado puede interrumpir genes necesarios para el desarrollo o reproducción normal de la planta (Leeuwen y col., 2001).

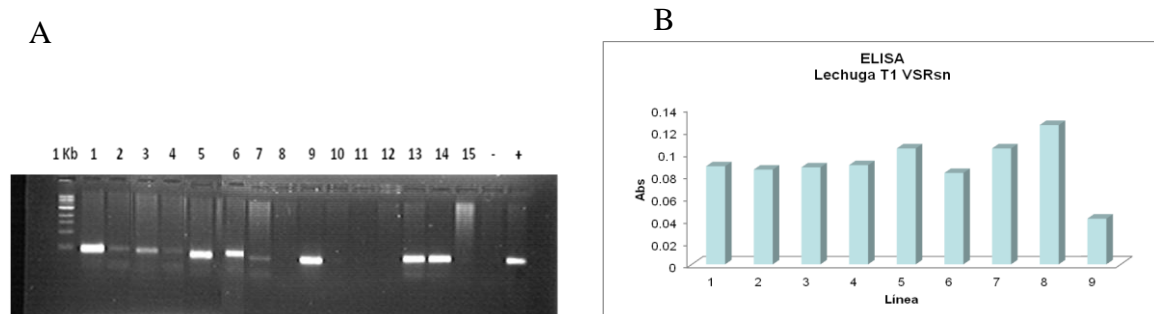


Figura 8. Análisis de la generación T0 de lechuga transgénica. A. Reacción en cadena de la polimerasa; los productos (460pb) fueron amplificados a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos FSN y RSN, 1Kb es el marcador de peso molecular, 1-15 plantas transgénicas; B. ELISA de plantas T1 de lechuga, se

utilizó un anticuerpo comercial contra la proteína F y extractos solubles de las plantas transgénicas (1-8) y planta silvestre (9).

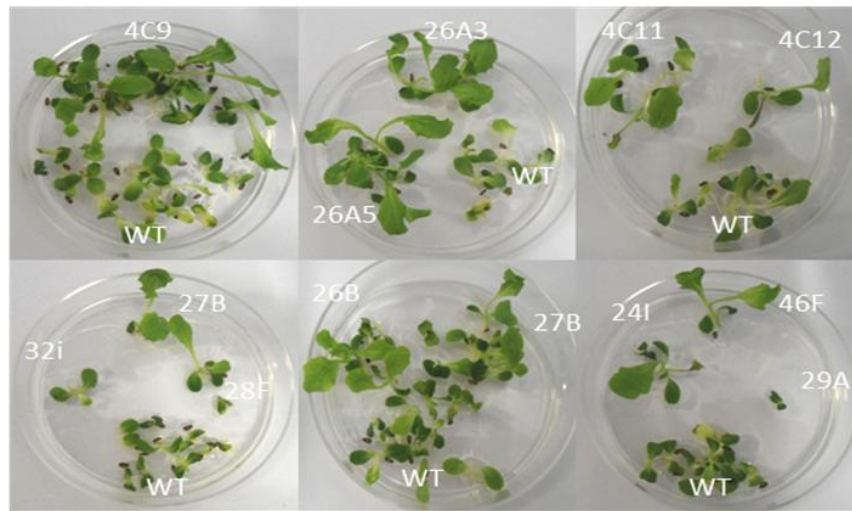


Figura 9. Plántulas de lechuga transgénicas con el gen VSRsn (T2). Se germinaron semillas de lechuga T1 en 200mg/L de kanamicina de las líneas 4, 24, 26, 27, 29, 32 y 46 y lechuga silvestre (WT).

5.1.2. Análisis de transformantes de la generación T2

Tanto a la generación T0 como a la T1 se le realizaron análisis de PCR y ELISA que al ser positivos nos corroboraron la presencia del transgén y de la proteína heteróloga respectivamente (Figura 8); sin embargo, se considera que las generaciones T0 son heterocigotas y la T1 en un alto porcentaje sigue siendo heterocigotas para el transgén a pesar de haberse seleccionado en un medio con antibiótico; la homocigosis suele alcanzarse hasta la generación T2 que sigue creciendo en el agente de selección y, por lo tanto, es esta generación la que consideramos estable y es la que se utiliza en los ensayos de inmunogenicidad de la proteína, por lo que antes de realizar los ensayos inmunológicos y con el fin de seleccionar las plantas que nos servirán para dichos ensayos se realizan análisis que nos confirmen la presencia del transgén y de la proteína heteróloga en las plantas T2.

5.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con la finalidad de comprobar la presencia del transgén se realiza un análisis por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen VRSsn (FSN y RSN), a partir de ADN genómico de las siete plantas transgénicas y una planta silvestre, usando como control positivo el plásmido pBI-VSRsn; la Figura 10 muestra el resultado de dicho análisis. La banda esperada es de 480pb; las siete plantas analizadas resultaron positivas, lo que nos indica que las plantas de la generación T2 presentan el transgén de VSRsn.

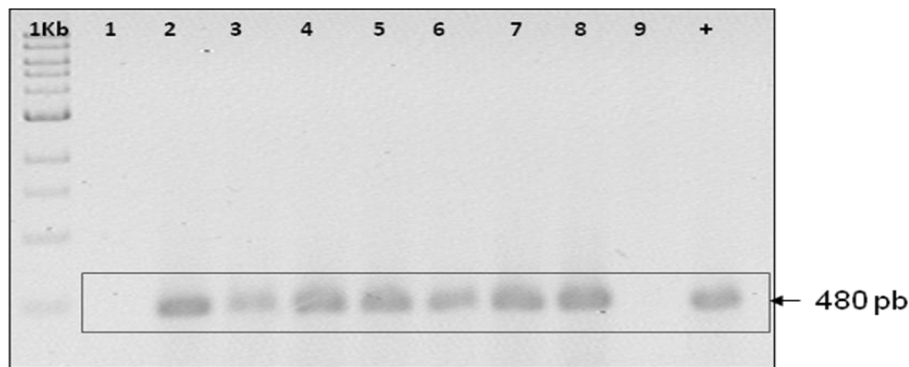


Figura 10. Detección por PCR del gen VSRsn en plantas transgénicas. Los productos de PCR fueron amplificados a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos FSN y RSN. 1kb es el marcador de peso molecular, 1 planta silvestre, 2-8 plantas transgénicas, 9 control negativo (blanco de reactivos), y + control positivo plásmido pBI-VSRsn.

5.1.2.2. Southern blot

Para confirmar la integración del transgén VSRsn al genoma de la planta, se analizaron 5 de las líneas positivas por PCR (ya que no se contaba con material suficiente de las otras dos líneas) y una planta no transformada (control negativo) mediante Southern blot, utilizando 70 μ g de ADN sometido a restricción con la enzima *Hind*III, la cual reconoce un sitio de restricción único en el T-DNA; la hibridación se realiza con la una sonda específica para VSRsn (producto de PCR marcado no radiactivamente).

Este análisis se realizó en varias ocasiones; sin embargo, solo fue posible ver la señal de hibridación en las líneas 4C y 26A, con una sola copia del transgén (Figura 11). Las siete líneas habían sido positivas para PCR y, como se verá más adelante, también son positivas por ELISA; la discrepancia en estos resultados quizá se deba a las variantes de la metodología como la calidad y pureza del ADN, la eficiencia en la digestión con la enzima de restricción o la técnica de revelado (quimioluminescente) que es menos sensible que técnicas radiactivas no disponibles en el laboratorio. Sin embargo, este resultado nos da una primera pauta para seleccionar las plantas de las líneas 4C y 26A para los análisis de inmunogenicidad.

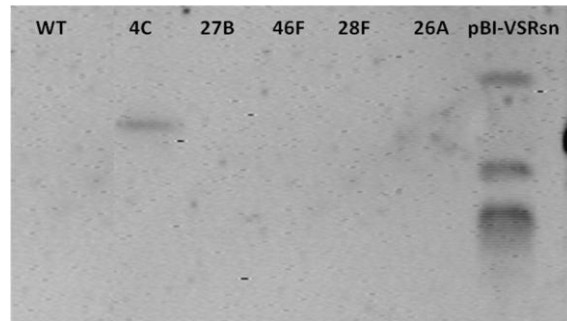


Figura 11. Análisis tipo Southern blot para confirmar el patrón de integración del gen VSRsn en el genoma de lechuga. Los ADNs fueron digeridos con *Hind*III e hibridados con la sonda VSRsn (producto de PCR marcado con Digoxigenina). WT, planta silvestre; carriles 4C, 27B, 46F, 24I y 26A plantas transgénicas, pBI-VSRsn, control positivo.

5.1.2.3. SDS-PAGE

Una vez que se confirmó la presencia del transgén en las plantas transgénicas, es necesario corroborar la presencia de la proteína heteróloga; para ello a la par del Southern blot se realiza un ensayo con geles de SDS-PAGE. Para ello se cuantificó por el método de Bradford el extracto soluble de 5 de las líneas transgénicas y de una planta silvestre y se tomaron aproximadamente 20 µg de proteína y se corrieron en un gel de SDS-Poliacrilamida al 16%. Los resultados se muestran en la Figura 12.

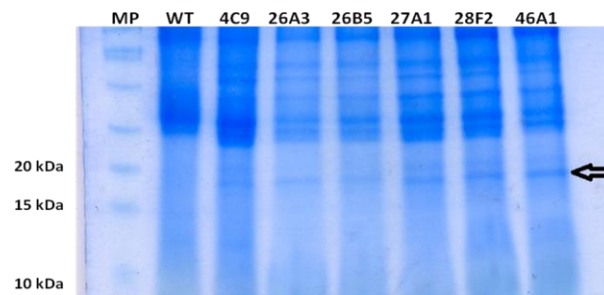


Figura 12. Análisis de SDS-PAGE de los extractos solubles de las plantas transgénicas. Gel de SDS-Poliacrilamida al 16% teñido con azul de Coomassie coloidal; MP, marcador de peso; WT extracto de planta silvestre, carriles 4C9, 26A3, 26B5, 27A1, 28F2 y 46A1 extractos de plantas transgénicas.

Como se puede observar el Figura 12, los extractos de las seis plantas analizadas (5 líneas; 26A3 y 26B5 son plantas diferentes de una misma línea), muestran una banda diferencial con respecto al extracto de la planta silvestre, de aproximadamente 19 kDa, que es la banda esperada; ello nos da un indicio de la presencia de la proteína heteróloga en las plantas transgénicas; sin embargo, es necesario realizar los ensayos de ELISA y Western blot para confirmar.

5.1.2.4. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Para confirmar la antigenicidad de la proteína obtenida las plantas de lechuga se realizó un ensayo enzimático (ELISA); nuestra proteína está conformada por tres epítopos de la proteína F y uno de la proteína G de VSR por lo cual se hizo este análisis usando un anticuerpo policlonal anti-F de RSV (Serotec MCA490) y un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina. Se analizaron 5 líneas de la generación T2; la Figura 13 muestra los resultados de este análisis. Todas las líneas analizadas presentaron una absorbancia mayor comparadas con la planta silvestre (0.08-0.13 en comparación con la silvestre que es 0.04), lo que indica que la proteína heteróloga es reconocida por el anticuerpo policlonal anti-proteína F del VRS; además, podemos observar que hay diferentes niveles de producción de la proteína en las 5 líneas, destacando la 4 (0.11) 26 (0.10) y 27 (0.13). La variabilidad observada en la expresión del antígeno de línea a línea es común y se

ha informado anteriormente; esta variación puede deberse a los diferentes sitios de integración del transgén, los cambios en la actividad del promotor y el número de copias insertadas (Mlynarova y col., 1994; Leeuwen y col., 2001).

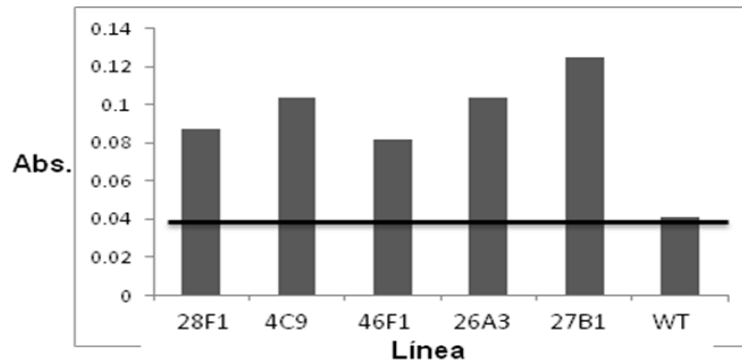


Figura 13. Análisis de ELISA para las plantas transgénicas de lechuga de generación T2. Se utilizó un anticuerpo comercial contra la proteína F de VSR y extractos solubles de las plantas transgénicas y de una planta silvestre (WT).

5.1.2.5. Western blot

El análisis de ELISA descrito con anterioridad no solo confirma la presencia de la proteína heteróloga que veíamos como banda diferencial en el SDS-PAGE, además nos dice que nuestra proteína puede ser reconocida por un anticuerpo policlonal contra la proteína F de VSR (Serotec MCA490); en otras palabras, que es antigénica. Sin embargo, para confirmar esta afirmación realizamos un análisis de Western blot a las líneas 4C y 26A que serán utilizadas en los ensayos de inmunogenicidad. En la Figura 14 podemos ver que ambas líneas son positivas para este ensayo.

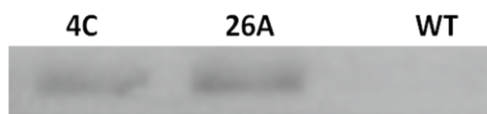


Figura 14. Análisis de Western blot del extracto soluble de lechugas transgénicas. Líneas transgénicas: 4C y 26A; línea silvestre: WT. Se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo anti-F de VSR y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa; la membrana se reveló por quimioluminiscencia.

5.1.3. Ensayos de inmunogenicidad por vía oral en ratones Balb/c de la proteína VSRsn producida en lechuga

Actualmente no existe una vacuna contra el VSR en el mercado; los estudios que se han hecho tratando de encontrar una vacuna son diversos y varían tanto en las proteínas del VSR utilizadas como en las dosis y las vías de inmunización.

Con el objetivo de comprobar la inmunogenicidad *in vivo* de la proteína expresadas en lechuga se realizaron estudios inmunológicos en donde se evaluó la producción de anticuerpos IgG, IgA, IgG2a e IgG1 en muestras de suero y lavados traqueo-pulmonares obtenidos de ratones Balb/c de 8-12 semanas de edad, a los que se les administró por vía oral 50 mg de lechuga transgénica de las líneas 4 y 26, liofilizada y resuspendida en 500 µL de PBS.

Cada grupo constó de 5 ratones a los cuales se les aplicaron cuatro dosis a los 0, 7, 14 y 21 días, como se describe en la sección de metodología.

Una semana después de la cuarta dosis los ratones se sacrificaron y se obtuvo suero y lavados traqueo-pulmonares; ambos fueron analizados por ELISA para determinar los niveles de anticuerpos.

Considerando que no hay una vacuna comercial que nos sirva de base sobre las dosis que debemos utilizar, que en los intentos de vacunación que se han realizado no hay un consenso en las dosis utilizadas y que nuestra proteína es una mezcla de epítomos que no ha sido reportada con anterioridad, la dosis utilizada (50 mg de planta liofilizada) fue seleccionada con base en estudios que se han hecho para otros antígenos en plantas y para la proteína F de VSR en tomate (Shandu y col., 2000).

5.1.3.1. Determinación de los niveles de anticuerpos en suero

Los sueros obtenidos de cada una de los ratones (5 por grupo) fueron analizados por ELISA indirecto en una dilución 1:50 y utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. Podemos observar en la Figura 15 que la absorbancia obtenida en las líneas transgénicas (L4 y L26) es mayor que la obtenida en la planta silvestre y en el control negativo (PBS); esto nos indica que

la proteína producida en las plantas transgénicas es capaz de generar anticuerpos IgG y por lo tanto podemos considerarla como inmunogénica por vía oral.

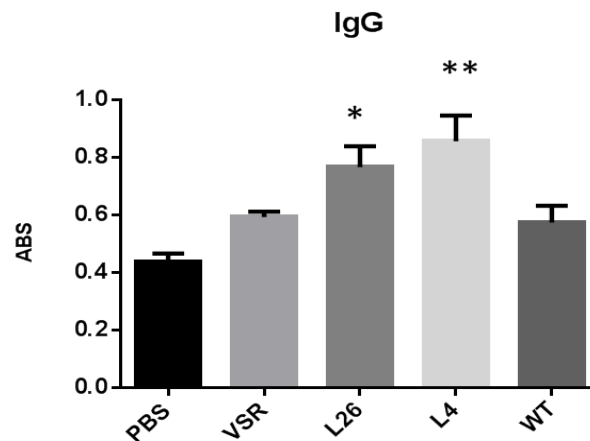


Figura 15. Respuesta anti-VSR en suero (IgG). Se administraron cuatro dosis 50mg de lechuga transgénica (L4 y L26), 50mg de lechuga silvestre (WT), 5 µg del antígeno comercial VSR como control positivo y PBS como control negativo a ratones Balb/c. Los sueros se analizaron por ELISA en dilución 1:50. Se muestra el valor medio A₄₉₂, de cada grupo experimental (n=5).

La inmunoglobulina IgG representa el 80% de las inmunoglobulinas en suero y se genera como defensa a infecciones producidas por patógenos como bacterias o virus; por lo tanto la presencia de este anticuerpo es un reflejo de una exposición previa con un antígeno (Abbas y Lichtman, 2004).

5.1.3.2 Determinación de los niveles de anticuerpos en lavados traqueo-pulmonares.

Los lavados traqueo-pulmonares se analizaron en una dilución 1:2 y, como podemos observar en la Figura 16, la absorbancia correspondiente a los lavados traqueo-pulmonares obtenidos de ratones inmunizados con la planta transgénica L4 (0.75) es mayor que la obtenida en los inmunizados con la planta silvestre (0.3) y el control negativo (PBS); esto nos indica que la proteína producida en

plantas es capaz de generar anticuerpos específicos IgG en la mucosa respiratoria cuando se administra por vía oral.

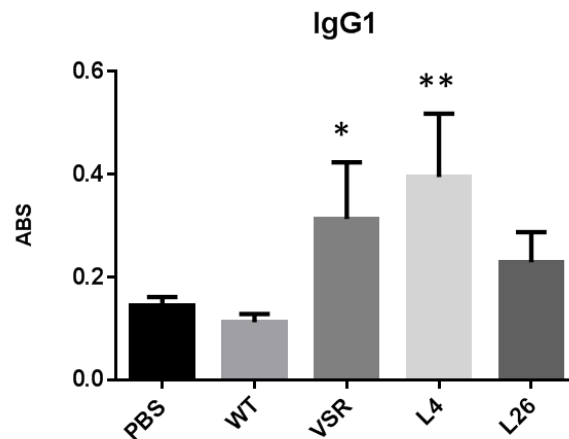


Figura 16. Respuesta anti-VSR en lavados traqueo-pulmonares (IgG). Se administraron cuatro dosis 50mg de lechuga transgénica (L4 y L26), 50mg de lechuga silvestre (WT), 5 µg del antígeno comercial VSR como control positivo y PBS como control negativo a ratones Balb/c. Se obtuvieron lavados traqueo-pulmonares y se analizaron por ELISA en dilución 1:10; se muestra el valor medio A₄₉₂ de cada grupo experimental (n=5).

Considerando que el VSR es un virus respiratorio, su vía de entrada es aérea y su tejido blanco las células pulmonares, obtener una respuesta inmune en las mucosas del sistema respiratorio contribuye a la eficacia de la vacuna.

5.1.3.3 Determinación de los isotipos IgG1 e IgG2a

A fin de caracterizar el tipo de la respuesta inmune inducida (Th1 o Th2), se cuantificaron por ELISA las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG2a en los sueros y lavados traqueo-pulmonares de los ratones inmunizados con las plantas transgénicas.

Se sensibilizaron placas de ELISA con el antígeno comercial VSR (Serotec), se agregó el suero o los lavados traqueo-pulmonares de los ratones alimentados con las lechugas transgénicas y se utilizaron como anticuerpos secundarios los subtipos IgG1 e IgG2a conjugados con fosfatasa alcalina.

La Figura 17 muestra las absorbancias correspondientes a los sueros de ratones inmunizados con la lechuga transgénica 4C9 (A) y la 26A3 (B) para cada uno de los subtipos. Para ninguno de los dos grupos de ratones se observó una diferencia significativa entre el resultado para los isotipos de IgG; este resultado fue semejante cuando se analizaron los lavados traqueo-pulmonares (Figura 18).

Las respuestas del sistema inmune hacia los antígenos suelen ser complejas y diferentes, dependiendo de la vía de infección o inmunización, del tipo de antígeno, del estado de salud de la persona, entre otras consideraciones.

Generalmente podemos distinguir dos tipos de respuesta inmune principales debidos al equilibrio funcional de los linfocitos CD4 o Th. El estímulo de los linfocitos CD4 por algunos antígenos da lugar a una respuesta Th1 caracterizada por la secreción de gamma interferón, interleucina 2, interleucina 12 y anticuerpos IgG2a; esta respuesta origina una población de linfocitos citotóxicos, que es fundamental en la defensa y aclaramiento de infecciones producidas por microorganismos intracelulares, como bacterias, protozoos y virus.

Otros antígenos desencadenan una respuesta Th2; en este caso se produce una secreción de interleucina 4, interleucina 5, interleucina 6, interleucina 10 y anticuerpos IgG1 esta respuesta favorece la producción de anticuerpos que median la destrucción de organismos extracelulares.

En el caso de una infección por VSR idealmente se genera una respuesta Th1 que en condiciones favorables resuelve la enfermedad (Openshaw y col., 2005), se ha demostrado tanto en células humanas como en modelos experimentales de ratones que la producción de IFN γ crea un ambiente antiviral contra el VSR (Vergara y col.); sin embargo, los intentos previos de vacunación contra este patógeno desencadenaron una respuesta inmune Th2 exacerbada en los individuos vacunados cuando estuvieron en contacto con el virus, que no se presentó en los individuos a quienes se les administró el placebo. Es por ello que

tener un equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 es importante en el caso de vacunas contra VSR.

Al no observar una diferencia entre los isotipos IgG1 e IgG2a suponemos que existe un balance entre los tipos de respuesta Th1 y Th2; esto concuerda por lo reportado por Shandu y col. en 2000, donde probaron por vía oral la proteína F viral producida en jitomate. También está de acuerdo a los resultados de Stab y col., (2013) en donde probaron una vacuna de ADN (F de VSR) por electroporación intramuscular y por Phan y col. (2014) donde probaron por vía intranasal una vacuna recombinante basada en la proteína F de VSR.

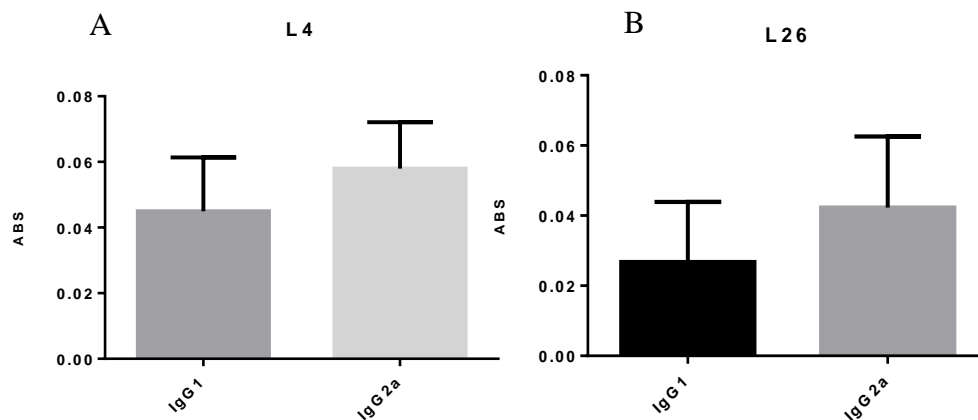


Figura 17. Isotipos IgG1 e IgG2a en suero. Suero de ratones a los que se les administraron cuatro dosis de 50mg de lechuga transgénica de la línea 4 (A) y de la línea 26 (B) fueron analizados por ELISA en dilución 1:50 para los isotipos de IgG1 e IgG2a. Se muestra el valor medio A₄₉₂ de cada grupo experimental (n=5)

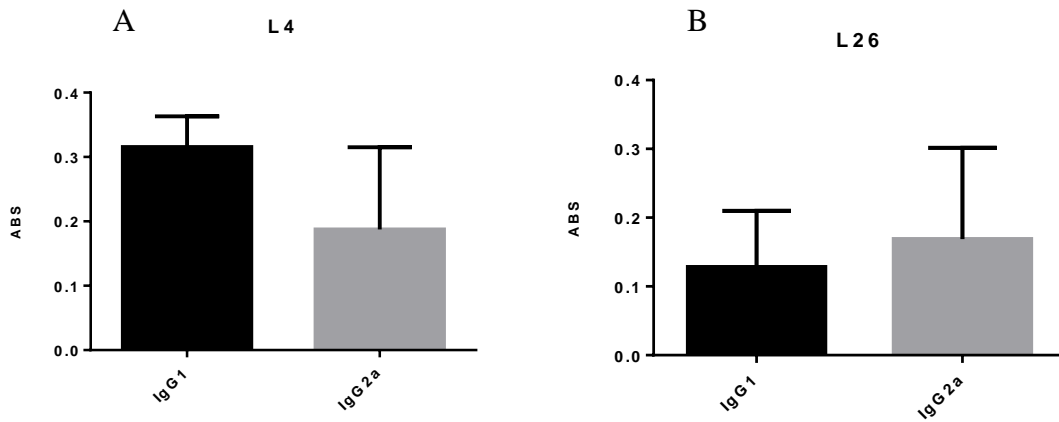


Figura 18. Isotipos IgG1 e IgG2a en lavados traqueo-pulmonares. Líquidos traqueo-pulmonares de ratones a los que se les administraron cuatro dosis de 50mg de lechuga transgénica de la línea 4 (A) y de la línea 26 (B) fueron analizados por ELISA en dilución 1:10 para los isotipos de IgG1 e IgG2a. Se muestra el valor medio A_{492} de cada grupo experimental (n=5).

La exacerbación de la respuesta inmune Th2 generada por la vacuna F1-VSR (vacuna de la década de los 60's inactivada por formalina) se presentó cuando los individuos vacunados estuvieron en contacto con el virus causando que el 80% de los niños que se infectaron necesitaran hospitalización frente a un 5% del grupo control (Kim y col., 1969); por ello es necesario que evaluemos como siguiente paso que este balance de la respuesta inmune generada por nuestra proteína se mantenga después de la exposición al virus.

El análisis de inmunogenicidad por vía oral de péptidos antigénicos ya ha sido descrito en trabajos donde han expresado diversas proteínas en plantas. El primer trabajo donde se reporta la expresión de un antígeno en plantas fue realizado por Curtiss y Cardineau (1990) quienes expresaron la proteína de superficie de *Streptococcus mutans* en tabaco obteniendo una respuesta inmune en mucosas; este estudio marca una pauta en la producción de proteínas en plantas y sus posteriores análisis. Así, diversos antígenos han sido producidos en plantas y

demostrado su inmunogenicidad en ratones: antígenos de la hepatitis B en papas (Mason y col., 1998; Rukavtsova y col., 2015); *E. coli* (LTB) en zanahoria y lechuga (Rosales-Mendoza y col., 2009; Martínez-González y col., 2011); antígenos de DPT en jitomate (Soria-Guerra y col., 2011); particularmente para VSR se ha expresado la proteína F viral en tomate cherry, mostrando respuesta inmune generando antígenos IgG e IgA en ratones Balb/c (Shandu y col., 2000). En este trabajo nosotros logramos obtener en plantas de lechuga una proteína que resultó ser inmunogénica en ratones Balb/c cuando se administra por vía oral. Este es un primer paso para la generación de una vacuna en plantas contra el VSR que contenga epítomos de las proteínas F y G.

Como siguiente paso debemos evaluar si nuestra proteína es capaz de generar anticuerpos neutralizantes contra el VSR.

5.2. Transformación genética de cloroplastos de tabaco con el gen VSRsc.

Para la transformación genética de cloroplastos de tabaco contamos con un gen bicistrónico (Patiño-Rodríguez, 2007) derivado del vector pKCZ, el cual contiene el gen *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycinina a las células transformadas; en este vector fue clonado nuestro gen sintético VSRsc optimizado según el uso de codones para su expresión en cloroplastos.

Este gen, al igual que el descrito para la transformación genética de lechuga, contiene la secuencia para tres epítomos de la proteína F y un epítomo de la proteína G, además de dos adyuvantes de la toxina tétanica. A diferencia del gen para transformación nuclear que contiene una señal de retención al retículo endoplásmico, éste contiene un sitio de unión a ribosomas y al ser clonado en el vector biscistrónico adquiere el promotor de cloroplastos *Prrn* y los sitios de recombinación homóloga para el genoma de cloroplastos de tabaco (*trnR-ACG* y *trnN-GUU*); de esta manera por doble recombinación homóloga insertamos nuestro gen en el genoma del cloroplasto de tabaco.

5.2.1. Obtención de plantas transplastómicas de tabaco con el gen VSRsc.

La transformación y regeneración de hojas de tabaco ha sido estandarizada con anterioridad en el laboratorio (Herrera-Díaz, 2005; Patiño-Rodríguez, 2007), y se basa en el protocolo descrito por en Daniell y col. (2005); el proceso se esquematiza en la Figura 19.

Se transformaron hojas de 3 a 4 semanas de edad de *Nicotiana tabacum*, usando partículas de oro de 0.6 μm de diámetro cubiertas de ADN plasmídico; después del bombardeo las hojas se cortaron en fragmentos pequeños y se colocaron en medio de cultivo RMOP (sin antibiótico), donde se incubaron durante 2 días en obscuridad. Posteriormente se transfirieron al medio RMOP de selección (RMOP + 500 mg/L de espectinomicina). Aproximadamente dos meses después se observaron los primeros brotes organogénicos; una vez que se obtuvieron hojas de aproximadamente 1 cm de diámetro se cortaron y se colocaron nuevamente en medio de selección con la finalidad de formar nuevamente callo (primera ronda de selección), este proceso se repitió tres veces más. El objetivo de las 3 rondas de

selección es obtener plantas homoplásticas; de este proceso se obtuvieron 5 líneas tentativamente transplastómicas de las cuales las plántulas resultantes de la tercera ronda de selección fueron colocadas en medio MS sin reguladores de crecimiento para generar raíz y posteriormente se transfirieron a tierra.

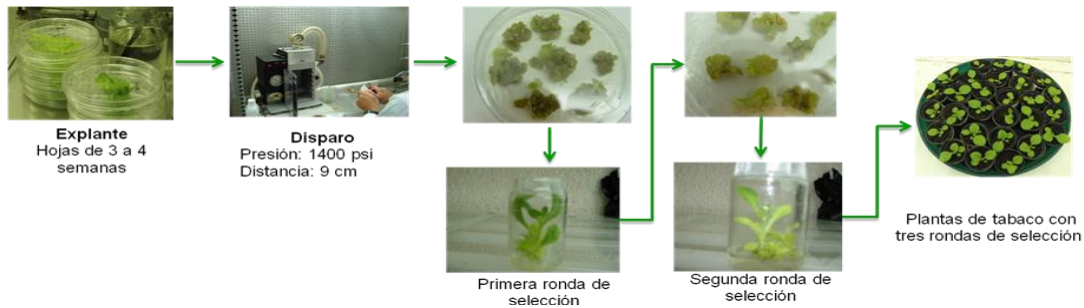


Figura 19. Proceso de transformación de hojas de tabaco por el método de biobalística.

5.2.1.1 Obtención de plantas de la generación T2

Se obtuvieron semillas de 5 líneas de tabaco transplastómico T1 que había sido analizado por PCR y ELISA dando resultados positivos para el transgén y la proteína; estas semillas se germinaron en medio de selección (1/2 MS + espectinomicina 500 mg/L). La Figura 20 muestra los resultados obtenidos.

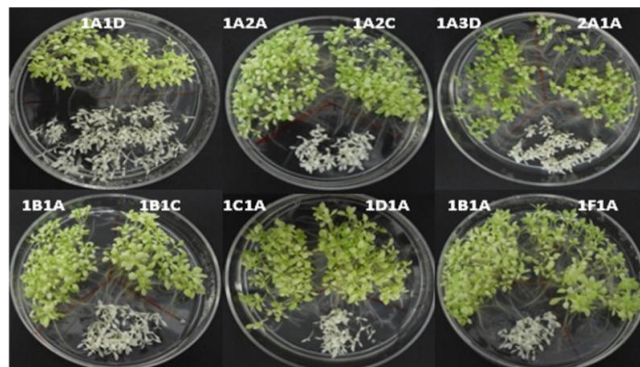


Figura 20. Plántulas de tabaco transplastómico T2 con el gen VSRsc , germinadas en medio con espectinomicina 500 mg/L. Las plántulas blancas corresponden a la línea silvestre; en las plantas transplastómicas el primer número y letra se designan en la generación T0, las segundo en la T1.

Como se mencionó en la sección 5.2 las plantas transplastómicas, contienen el gen *aadA* y se seleccionan con espectinomicina y estreptomicina, estos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas del cloroplasto en las plantas silvestres y por ello presentan un fenotipo blanco cuando se someten al agente de selección como se observa en la Figura 20, por otro lado, las plantas transformadas no deberán presentar cambios en su fenotipo.

5.2.2. Análisis de transformantes de la generación T2

5.2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La presencia del transgén se verificó por medio de un ensayo de PCR con oligonucleótidos específicos para el transgén (FSC y RSC) a partir de ADN genómico de cuatro plantas transplastómicas y una planta silvestre, usando como control positivo el plásmido pKCZ-VSRsc. La Figura 21 muestra el resultado de dicho análisis.

La banda esperada es de 480pb; las cuatro plantas analizadas resultaron positivas, lo que nos indica que las plantas de la generación T2 presentan el transgén de VSRsc.

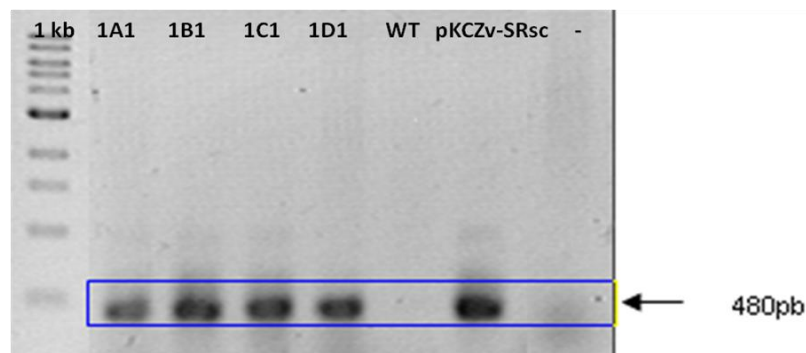


Figura 21. Detección por PCR del gen VSRsc en plantas transplastómicas. Los productos de PCR fueron amplificados a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos FSC y RSC; usando el plásmido pKCZ-VSRsc como control positivo. 1kb es el marcador de peso molecular, WT es la planta silvestre.

5.2.2.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA).

A las plantas de tabaco positivas por PCR se realizó un análisis de ELISA para comprobar la antigenicidad de la proteína heteróloga, el protocolo se describe en la metodología. Se sensibilizaron las placas con extracto acuoso obtenido de plantas de tabaco, se utilizó un anticuerpo policlonal anti-F de VSR y un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, la placa se leyó a 405 nm en un lector de microplacas; en la Figura 22 se muestran los resultados de este ensayo. Todas las líneas analizadas presentaron una absorbancia mayor comparadas con la planta silvestre (0.06-0.08 en comparación con la silvestre que es 0.04), lo que indica que la proteína heteróloga es reconocida por el anticuerpo policlonal anti-proteína F del VRS.

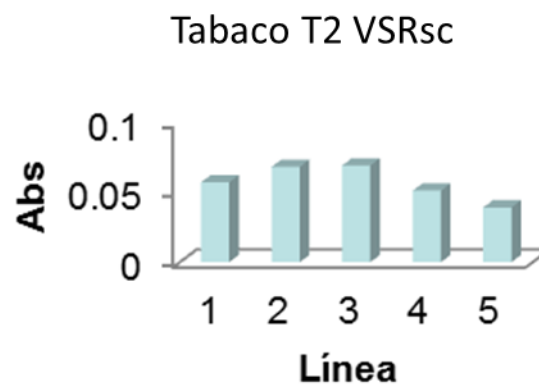


Figura 22. Análisis de ELISA para las plantas transplastómicas de tabaco de generación T2. Se utilizó un anticuerpo comercial contra la proteína F de VSR y extractos solubles de las plantas transplastómicas (1-4) y de una planta silvestre (5).

5.2.2.3 Southern blot

Con el fin de realizar un ensayo confirmatorio de la integración del transgén en el genoma del cloroplasto de tabaco, se decidió realizar el ensayo de Southern blot. Para detectar la integración al genoma de cloroplasto se utilizó una sonda dirigida a uno de los sitios de recombinación homóloga (*trnN*) En la Figura 23 se muestra el análisis de Southern blot y el mapa de restricción y la localización de la sonda.

En el genoma de cloroplasto de tabaco silvestre se encuentran naturalmente tres sitios de corte de la enzima *Bgl*II en la zona de recombinación homóloga donde se encuentran los genes *rrn23-trnR/trnN-ndhF*, por lo tanto al digerir totalmente el genoma silvestre de cloroplastos y utilizar una sonda que detecta el gen *trnN* se debe detectar una señal con el peso molecular de 2.0 kb. Sin embargo, al transformar el genoma de cloroplastos en este mismo sitio se pierde uno de los sitios de corte de la enzima *Bgl*II; por lo tanto, el resultado de la señal usando la sonda contra el gen *trnN* permite detectar la señal correspondiente al peso molecular de 7.5 kb que incluye la zona de recombinación homóloga junto con el gen bicistrónico que está formado por el gen de VSRsc y el gen del agente de selección a espectinomicina.

Los resultados observados en del Southern blot con la sonda *trnN*, nos comprueban la integración del gen VSRsc en el genoma de cloroplastos de tabaco y nos sugiere que las plantas analizadas alcanzaron la homoplasia; esto ya que solo observamos una banda de 7.5 kb. Si en nuestras plantas hubiera heteroplasia, observaríamos también la banda de 2.0 kb correspondiente al genoma silvestre.

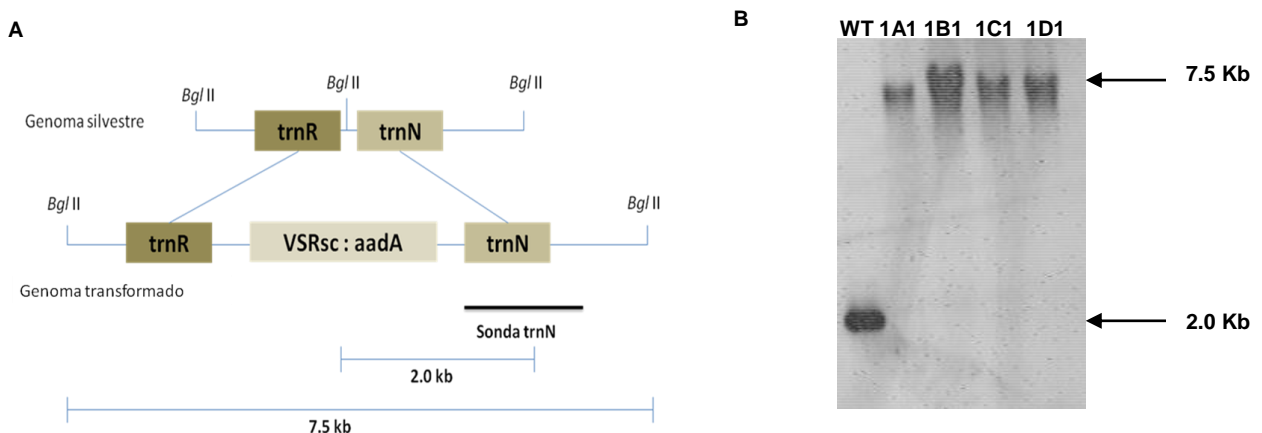


Figura 23. Análisis de Southern blot de plantas transplastómicas de tabaco con el gen VSRsc. Los ADNs fueron digeridos con *Bgl*II e hibridados con la sonda TRN (producto de PCR marcado con Digoxigenina). A. esquema de localización de la sonda marcada; B. resultado del análisis, WT, planta silvestre; 1A1, 1B1, 1C1 y 1D1 plantas transplastómicas.

Los análisis hechos a las plantas transplastómicas nos demuestran que es posible expresar un gen sintético del VSR en cloroplastos de tabaco y que la proteína heteróloga resultante es reconocida por un anticuerpo policlonal contra la VSR; anteriormente se comprobó que cuando se obtiene una proteína semejante por transformación nuclear en plantas de lechuga dicha proteína es inmunogénica en ratones Balb/c por vía oral; queda por evaluar si la proteína obtenida en cloroplastos de tabaco tiene un resultado semejante.

5.3 Transformación genética de plantas de lechuga y tabaco con los genes VRSsn Δ G y VSRsc Δ G.

5.3.1 Genes VRSsn Δ G y VSRsc Δ G

Las vacunas generadas contra el VSR han resultado con una respuesta exacerbada y dañina del sistema inmune; algunos autores adjudican ésto a la proteína G (Shandu y col., 1999); es por esto que los genes sintéticos se diseñaron de manera que el epítipo de la proteína G quede flanqueado por sitios de restricción que permitan eliminarlo de la construcción para expresar solo los epítipos de la proteína F.

Se eliminó la secuencia que codifica para la proteína G tanto en la construcción para transformación nuclear como en la de cloroplastos.

5.3.2 Transformación de plantas

La construcción modificada para transformación nuclear se introdujo en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 y con ella se realizó la transformación genética de plantas de lechuga.

Con la construcción modificada para transformación de cloroplastos se recubrieron partículas de oro que fueron usadas para la transformación de cloroplastos de tabaco vía biobalística.

Se lograron obtener 7 líneas de tabaco transplastómico de generación T1 y 3 líneas transgénicas de lechuga.

5.3.3 Análisis de transformantes

5.3.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa

La presencia del transgén se verificó por medio de un ensayo de PCR con oligonucleótidos específicos para el transgén (FSC y RSC para tabaco y FSN y RSN para lechuga) a partir de ADN genómico de las plantas transformadas y una planta silvestre, usando como controles positivos los plásmidos pKCZ-VSRsc Δ G y pBI-VRSsn Δ G. La Figura 24 muestra el resultado del análisis hecho a las plantas de tabaco (A) y lechuga (B).

La banda esperada es de 380pb; las 7 plantas de tabaco y las 5 de lechuga analizadas resultaron positivas, lo que nos indica que las plantas de la generación T1 presentan el transgén de VSRsc Δ G en tabaco y VSRcn Δ G en lechuga.

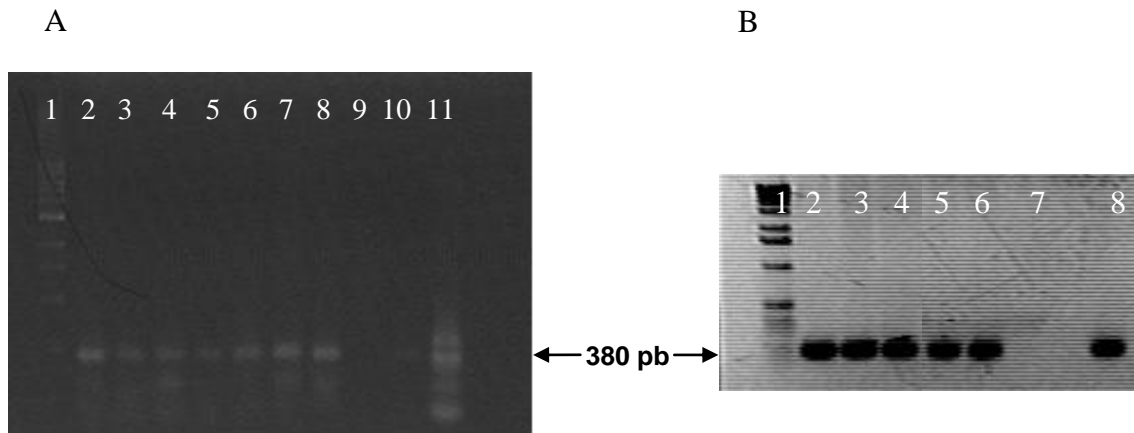


Figura 24. Análisis por PCR de plantas transgénicas y transplastómicas. A. Plantas de tabaco transplastómicas con el gen VSRsc Δ G. Carril 1 marcador de peso molecular, carriles 2-8 plantas transplastómicas, carril 9 planta silvestre, carriles 10 y 11 controles negativo y positivo respectivamente; B. Plantas de lechuga transgénicas con el gen VSRsn Δ G: carril 1 marcador de peso molecular, carriles 2-6 plantas transgénicas, carriles 7 y 8 control positivo y negativo respectivamente.

Por cuestiones de tiempo no fue posible obtener las generaciones estables en ambas transformaciones; es necesario tener la T2 y realizar los análisis para comprobar la presencia de la proteína recombinante y posteriormente los análisis de inmunogenicidad en ratones y hacer una comparación entre los resultados obtenidos cuando se tienen epítomos de las proteínas F y G o solo F, poniendo especial énfasis en los subtipos de IgGs ya que nos daría una idea de si se altera el balance de respuesta Th1/Th2.

Una de las principales causas de mortalidad y morbilidad alrededor del mundo son las enfermedades respiratorias de las cuales los principales agentes etiológicos son los virus y de estos el virus sincicial respiratorio ocupa un lugar preponderante

(Melero y Mas, 2015); el VSR es el responsable de 33.8 millones de casos al año en niños menores de 5 años, de 3.4 millones de hospitalizaciones y de 66,000-190,000 muertes (Nair y col., 2010) y a la fecha no existe una medida profiláctica o terapéutica totalmente efectiva; es por ello que el desarrollo de una vacuna contra este patógeno es importante; este trabajo presenta un primer paso para el desarrollo de dicha vacuna. La proteína heteróloga obtenida en las plantas demostró ser inmunogénica en ratones Balb/c; ahora nos queda por comprobar que puede también generar anticuerpos neutralizantes. Por otro lado, actualmente mueren miles de personas alrededor del mundo a causa de enfermedades que podrían ser prevenidas por vacunación; sin embargo, las vacunas no son siempre accesibles y necesitan de personal capacitado y condiciones especiales para su manejo, generar vacunas en plantas nos permitiría un manejo más sencillo (al no necesitar cadena de frío) y un menor costo lo que permitiría que las vacunas fueran más accesibles.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- La transformación genética de plantas con los diferentes genes sintéticos del virus sincial respiratorio es exitosa al poder corroborar la presencia del transgén hasta la generación T2.
- Es posible producir polipéptidos con epítomos antigénicos relevantes del VSR en plantas.
- Las proteínas heterólogas son reconocidas por un anticuerpo específico contra VSR, demostrando así que son antigénicas.
- La proteína obtenida del gen nuclear VSRsn en plantas de lechuga es inmunogénica ya que induce anticuerpos específicos en ratones Balb/c.
- La respuesta inmune humoral de ratones Balb/c muestra el balance Th1/Th2 deseable para VSR.

VII. REFERENCIAS

VII. REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman A (2004) En: Propiedades generales de las respuestas inmunitarias, células y tejidos del sistema inmunitario, Apéndice I 5ed. Goldsby R, Kindt T (Eds) Madrid: Elsevier, 478- 492
- Arakawa T, Yu J y Langridge WH (1999). Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization. *Adv Exp Med Biol.* 464: 161-178.
- Argüello-Astorga GR y Herrera-Estrella LR (1994). Métodos de transformación y vectores de expresión en plantas, En: Vicente M, (Ed.) Avances en Ingeniería Genética, 2ª edición, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 41-70.
- Bel AJE, Hibberd J, Prüfer D, y Knoblauch M (2001). Novel approach in plastid transformation. *Curr Opin Biotech.* 12:144–149.
- Belanger H, Fleysh N, Cox S, Bartman G, Deka D, Trudel M, Koprowski H y Yusivob V (2000). Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB J.* 14: 2323.
- Bourgeois C, Bour JB, Lindholt K, Gauthay C y Pothier P (1998). Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in infectivity *in vitro*. *J. Virol.* 72:7221.
- Bradford MM (1968). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G y Nestei EW (1991). Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Meth Enzymol.* 204: 384-397.
- Cárdenas L y Clements JD (1993). Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect Immun.* 61: 4629-4636.
- Carrington JC y Freed DD (1990). Cap-independent enhancement of translation by plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol.* 64 (4): 1590-1597
- Chang J (2011). Current progress on development of respiratory syncytial virus vaccine. *BMB reports.* 44: 4. 232-237.
-

- Claridades Agropecuarias* (1999). Lechuga y trigo. ASERCA.
- Claridades Agropecuarias* (2001). Tabaco y soya. ASERCA.
- Clark MF y Asams AN (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked Immunosorbent assay for the detection of plant viruses *J Gen Virol.* 34: 475-483.
- Clements CJ, Larsen G y Jodar L (2004). Technologies that make administration of vaccines safer. *Vaccine.* 22: 2054-2058.
- Collins PL, Graham BS (2008). Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis *J Virol.* 82:2040-2055.
- Curtis RI, Cardineau CA (1990) Oral immunization by transgenic plants. World Patent Application, WO 90/02484
- Curtis IS, Power JB, Blackhall NW, Laat AMM y Davey MR (1994). Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens.* *J Exp Bot.* 45: 1441-1449.
- Daniell H, Vivekananda J, Nielsen BL, Ye GN y Tewari KK (1990). Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 88-92.
- Daniell H, Streatfield SJ y Wycoff K (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 6: 219-226.
- Daniell H, Ruiz ON y Dhingra A (2005). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol.* 286:111-138.
- Davey MR, McCabe MS, Mohapatra U y Power JB (2002). Genetic manipulation of lettuce. En: *Transgenic Plants.* Hui YH, Khachatourians G, Lydiate D, McHughen A, Nip WK and Scorza R. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, 613-635.
- Dixon B (1995). The third vaccine revolution. A look at the development of vaccines in today's laboratories. *Bio/Technology* 13:420.
- Dudas RA y Karron R (1998). Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 11: 430-439.
-

- Durbin AP y Karron RA (2003). Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. *Clin Infect Dis.* 37:1668–1677.
- Falsey AR y Walsh EE (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev.* 13:371-384.
- Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE (2005). Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med.* 352:1749–1759.
- González PA, Bueno SM, Carreño LJ, Riedel CA y Kalergis AM (2012). Respiratory syncytial virus infection and immunity. *Rev Med Virol.* 22: 230-244
- Hancock GE, Speelman DJ, Heers K, Bortell E, Smith J y Cosco C (1996). Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in Balb/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 70:7783-7791.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD y Arntzen CJ (1995). Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science.* 268: 714-715.
- Herrera-Díaz A. (2005) Transformación nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Tesis de Maestría en Ciencias en Biología Molecular. San Luis Potosí, México
- Kaprowski H y Yusibov V (2001). The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine.* 19 (17-19): 2735-2741.
- Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K y Parrott RH (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol.* 89:422–434.
- Kneyber MCJ, Moll HA y Groot R (2000). Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur J Pediatr.* 159: 399-411.
-

- Lau JM y Korban SS (2009). Analysis and stability of the Respiratory syncytial virus antigen in a T3 generation of transgenic tomato plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 96:335–342.
- Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrenssen AWM, Plas LHW y Krol AR (2001). Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Exp Bot.* 52 (358): 949-959.
- López JA, Bustos R, Orvell C, Berois M, Arbiza J, García-Barreno B y Melero JA (1998). Antigenic Structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein, *J Virol.* 72: 6922-6928.
- López M, Mallorquín P, Pardo R y Vega M (2004). Vacunas humanas de nueva generación. GENOMA España CIBT/FGUAM.
- Loucq C (2013). Vaccines today, vaccines tomorrow: a perspective. *Clin Exp Vaccine Res.* 2: 4-7.
- Maliga P (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotech.* 21:20-28.
- Martínez-González L, Producción de una vacuna comestible en sistemas vegetales contra el virus sincicial respiratorio. Tesis de Maestría. IPICYT
- Martínez-González L, Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros López-Revilla R, Korban SS, Guevara-Arauz JC y Alpuche-Solís AG (2011). Oral immunization with a lettuce-derived *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit induces neutralizing antibodies in mice. *Plant Cell Tiss Organ Cult,* 107: 441-449.
- Mason HS, Haq TA, Clements JD y Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine,* 16:1336-1343
- Mason H, Warzecha H, Mor T, y Arntzen C (2002). Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends in Mol Med.* 8: 324-329.
- Melero JA y Mas V (2015). The Pneumovirinae fusión (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. *Virus Res,* 209: 128-135
-

- Michiels A, Van den Ende W, Tucker M, Riet LV y Laere AV (2003). Extraction of high quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal Biochem.* 1(315): 85-89.
- Mlynárová L, Loonen A, Heldens J, Jansen RC, Keizer P, Stiekema WJ y Nap JP (1994). Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *The Plant Cell.* 6: 417-426.
- Morrison TG y Walsh EE (2013). Subunit and virus like particle vaccine approaches for respiratory syncytial virus. En Changes and opportunities for respiratory syncytial virus vaccines. Anderson LJ y Graham BS, Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer Science, 372: 286-302
- Murashige T y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratu E, Sutano A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasasmita C, Simoes EAF, Rudan I, Webwe MW, y Campbell H (2010). Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375: 1545-1555.
- Nakano M, Makino M y Sueyoshi K (2003). *Agrobacterium*-mediated transformation of Lettuce widely cultivated in Japan. *Jap Crop Sci.* 56 (2): 59-66.
- Nguyen TN, Power UF, Robert A, Haeuw JF, Perez A, Asin MA, Corvaia N, Libon C (2012). The respiratory syncytial virus G protein conserved domain induces a persistent and protective antibody response in rodents. *PLoS ONE* 7 e34331
- Noyola DE Alpuche-Solís AG, Herrera-Díaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J y López Revilla R (2005). Human metapneumovirus infections in México: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol*, 54: 969-974

- Noyola DE, Zuviri-González A, Castro-García J y Ochoa-Zavala JR (2007). Impact of respiratory syncytial virus on hospital admissions in children younger than 3 years of age. *J Infect.* 54:180-184.
- Openshaw PJM y Tregoning JS (2005). Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 18:541-545.
- Paramore LC, Mahadevia PJ, Piedra PA (2010). Outpatient RSV lower respiratory infections among high-risk infants and other pediatric populations. *Pediatr Pulmonol.* 45:578–584.
- Parker JMR, Guo D y Hodges RS (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry.* 25:5425-5432.
- Patiño-Rodríguez O (2007). Transformación de cloroplastos de lechuga con tres genes sintéticos de protegrinas con actividad antimicrobiana. Tesis de maestría. IPICYT.
- Pileggi M, Mielniczki AA, Silva JS, Veiga SA, y Verma DP (2001). An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. *Braz Arch Biol Tech* 44: 191-196.
- Piedra PA, Jewell AM, Cron SG, Atmar RL, y Glezen WP (2003). Correlates of immunity to respiratory syncytial virus (RSV) associated-hospitalization: establishment of minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies. *Vaccine.* 21: 3479–3482.
- Rigano MM y Walmsley AM (2005). Expression system and developments in plant-made vaccine. *Immunol Cell Biol.* 83:271-277.
- Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solís AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martínez-González L, Herrera-Díaz A y Korban SS. (2009), Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J,* 57(1): 45-54
-

- Rosete DP, Archundia FJ, Cabello C, Manjares ME (2002). Patogenia de las infecciones respiratorias por virus. *Rev Inst Nal Enf Resp México*.15: 239-254.
- Rukavtsova EB, Rudenko NV, Puchko EN, Zakharchenko NS y Buryanov YI (2015). Study of the immunogenicity of hepatitis B surface antigen synthesized in transgenic potato plants with increased biosafety. *J Biotechnol*. 203: 84-88
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandhu JS, Osadjan MD, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS y Buetow DE (1999). Enhanced expression of the human respiratory syncytial virus-F gene in apple leaf protoplasts. *Plant Cell Rep*. 18: 394-397.
- Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier L, Korban SS, Osadjan MD y Buetow DE (2000). Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Trans Res*. 9: 127-135.
- Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Márquez-Mercado C, López-Revilla R, Castillo-Collazo R y Alpuche-Solís AG (2007). Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene. *Plant Cell Rep*. 26:961–968.
- Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L y Rosales-Mendoza S (2011). Two decades of plant-based candidate vaccines: a review of the chimeric protein approaches. *Plant Cell Rep* 30: 1367-1382.
- Streatfield SJ (2006). Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods* 38:150-157.
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodars SL, Beifuss K, Horn ME, Delaney DE, Tizard LR y Howard JA (2001). Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*, 19: 2742-2748.
- Sugiura M (2003). History of chloroplast genomics. *Photosynth Res*. 76:371–377.

- Svab Z, Hajdukiewicz P y Maliga P (1990). Stable transformation of plastids in highe plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 8526-8530.
- Thomas DR, Penney CA, Majumder A y Walmsley AM (2011). Evolution of Plant-Made Pharmaceuticals. *Int. J Mol Sci* 12, 3220-3236.
- Van Ginkel FW, Nguyen HH y McGhee JR (2000). Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 6(2):123-132.
- Vergara HSJ, Gutierrez MA y Mohapatra SS (2006). Biología molecular del virus sincicial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. *Revisiones básicas*. 22: 135-153.
- Yu J y Landrige WH (2001). A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol*. 19: 548-552.
- Yusibov V, Streatfield SJ y Kushnir N (2011). Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals. *Human Vaccines*. 7 (3), 313-321.
- Zambrysky PC (1992). Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Plant Mol Biol*. 43: 465-490.

VIII. ANEXO I PUBLICACIONES

Antigenic peptides derived from F and G proteins of respiratory syncytial virus produced on lettuce plants as an alternative to produce prophylactic proteins.

Luzmila Martínez-González¹, Daniel E. Noyola², Leticia Moreno-Fierros³, Sergio Rosales-Mendoza⁴ y Ángel G. Alpuche-Solís¹.

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., México; ²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Venustiano Carranza 2405, Los Filtros, San Luis Potosí S.L.P., México; ³Inmunidad de Mucosas, UBIMED, FES Iztacala, Universidad Autónoma de México, Avenida de los Barrios1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlanepantla, México; ⁴Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava # 6, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., México.

Author for correspondence

Dr. Ángel G. Alpuche Solís

División de Biología Molecular

IPICYT

Camino a la Presa San José 2055

78216 San Luis Potosí

México

Phone +52 (444) 8 342000 ext. 2080

Fax +52 (444) 8 342010

E-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

ABSTRACT

Recently, plants are being exploited to express recombinant proteins of pharmaceutical value at low cost; plant-based vaccines present an attractive system for the production of antigenic peptides. Respiratory syncytial virus (RSV) is the most important pathogen leading to hospitalizations in young children but is also important in elderly people. Although RSV has been well studied for more than 40 years, an effective vaccine is not yet available. The current work focused on the expression of antigenic peptides derived from RSV in plants as a first step for the development of an edible vaccine. The vector for transformation of lettuce plant, harboring antigenic sequences of the F and G genes of RSV was obtained. The synthetic genes were optimized in the codon-usage bias for their expression in plants. These genes encode for two adjuvants and three epitopes from the F protein and an epitope from the G protein fused by linkers. The lettuce transformation was achieved by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. We demonstrated the presence of the synthetic gene by PCR and Southern blot analysis; in addition, the antigenicity of the heterologous protein was demonstrated by ELISA using a monoclonal antibody against F protein and finally we performed immunogenic analysis in Balb/c mice; three groups of five female mice were immunized with transgenic lettuce, wild type lettuce and positive control, the transgenic lettuce group showed higher IgG antibodies levels than the wild type lettuce group. This work is a first step towards the generation of an edible vaccine in plant systems against RSV harboring epitopes from F and G proteins.

Este artículo esta en proceso de publicación

Oral immunization with a lettuce-derived *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit induces neutralizing antibodies in mice

Luzmila Martínez-González · Sergio Rosales-Mendoza · Ruth Elena Soria-Guerra ·
Leticia Moreno-Fierros · Rubén López-Revilla · Schuyler S. Korban ·
Juan C. Guevara-Arauz · Ángel Gabriel Alpuche-Solís

Received: 3 March 2011 / Accepted: 17 May 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Transgenic plants serve as attractive systems for the production and delivery of subunit vaccines, thus expression of an enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) antigen in an edible plant may lead to the development of a viable oral vaccine against cholera and ETEC diarrhea. In this study, expression of the heat labile toxin B subunit (LTB) from ETEC was performed in lettuce, and its immunological characterization was investigated. A total of 27 independent transgenic lines were established

following *Agrobacterium*-mediated transformation. Selected lettuce lines were subjected to GM1-ELISA to confirm the proper quaternary structure of the LTB protein. Levels of accumulation of the pentameric LTB reached up to 0.05% of the total soluble protein (TSP) in T1 and T2 progenies of these lines. Oral immunization of Balb/c mice was conducted using three weekly doses of lettuce-derived LTB. This elicited specific and significant antibody responses in both serum and intestinal tissues. Moreover, mice immunized with lettuce-derived LTB showed diminished intestinal fluid accumulation following challenge with the cholera toxin. This study demonstrated that this plant-based vaccine may contribute to immunization practices against diarrheal diseases.

Luzmila Martínez-González and Sergio Rosales-Mendoza are contributed equally to this work.

L. Martínez-González · S. Rosales-Mendoza ·
R. E. Soria-Guerra · R. López-Revilla ·
Á. G. Alpuche-Solís (✉)
División de Biología Molecular, IPICYT/Instituto Potosino de
Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San
José 2055, 78216 San Luis Potosí, SLP, Mexico
e-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

Present Address:
S. Rosales-Mendoza · R. E. Soria-Guerra
Laboratorio de Biofarmacéuticos recombinantes, Facultad de
Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí,
Av. Dr. Manuel Nava 6, San Luis Potosí, SLP 78210, Mexico


L. Moreno-Fierros
Inmunidad en Mucosas, UBIMED, FES-Iztacala, Universidad
Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, Los
Reyes Iztacala 54090, Tlalnepantla, Mexico

S. S. Korban
Department of Natural Resources and Environmental Sciences,
University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA

J. C. Guevara-Arauz
Laboratorio de Biofarmacéuticos recombinantes, Facultad de
Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí,
Av. Dr. Manuel Nava 6, 78210 San Luis Potosí, SLP, Mexico

Keywords Enteric diseases · Plant-based vaccine ·
Oral immunization

Published online: 16 July 2011

 Springer

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11240-011-9994-7>.

Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants

Sergio Rosales-Mendoza^{1,†}, Ángel Gabriel Alpuche-Solis^{2,†}, Ruth Elena Soria-Guerra¹, Leticia Moreno-Fierros³, Luzmila Martínez-González², Areli Herrera-Díaz² and Schuyler S. Korban^{1,*}

¹Department of Natural Resources and Environmental Sciences, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA,

²División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, México, and

³Inmunidad en Mucosas, UBIMED, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, México

Received 18 June 2008; revised 8 August 2008; accepted 18 August 2008; published online 1 October 2008.

*For correspondence (fax +217 333 8298; e-mail korban@illinois.edu).

†These authors contributed equally to this work.

Summary

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains are important pathogens in developing countries. Some vaccine formulations containing the heat labile toxin B subunit (LTB) have been used in clinical trials; however, the induction of neutralizing antibodies against the heat-stable toxin (ST), a poor immunogenic peptide, is necessary, as most ETEC strains can produce both toxins. In this study, a plant optimized synthetic gene encoding for the LTB-ST fusion protein has been introduced into plastids of tobacco leaf tissues, using biolistic microprojectile bombardment, in an effort to develop a single plant-based candidate vaccine against both toxins. Transplastomic tobacco plants carrying the *LTB-ST* transgene have been recovered. Transgene insertion into the plastid was confirmed by both PCR and Southern blot analysis. GM1-ELISA revealed that the LTB-ST fusion protein retained its oligomeric structure, and displayed antigenic determinants for both LTB and ST. Western blot analysis, using LTB antisera, confirmed the presence of a 17-KDa protein in transplastomic lines, with the correct antigenicity of the fusion protein. Expression levels of this fusion protein in different lines reached up to 2.3% total soluble protein. Oral immunization of mice with freeze-dried transplastomic tobacco leaves led to the induction of both serum and mucosal LTB-ST specific antibodies. Following cholera toxin challenge, a decrease of intestinal fluid accumulation was observed in mice immunized with LTB-ST-containing tobacco. These findings suggest that tobacco plants expressing LTB-ST could serve as a plant-based candidate vaccine model providing broad-spectrum protection against ETEC-induced diarrhoeal disease.

Keywords: ETEC-induced diarrhea, plant-based vaccine, fusion protein, broad-spectrum vaccine, plastid transformation, oral immunogenicity.

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2008.03666.x>

Expression of a multi-epitope DPT fusion protein in transplastomic tobacco plants retains both antigenicity and immunogenicity of all three components of the functional oligomer

Ruth Elena Soria-Guerra · Angel G. Alpuche-Solís · Sergio Rosales-Mendoza · Leticia Moreno-Fierros · Elise M. Bendik · Luzmila Martínez-González · Schuyler S. Korban

Received: 2 February 2009 / Accepted: 4 March 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Expression of genes in plant chloroplasts provides an opportunity for enhanced production of target proteins. We report the introduction and expression of a fusion DPT protein containing immunoprotective exotoxin epitopes of *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, and *Clostridium tetani* in tobacco chloroplasts. Using biolistic-mediated transformation, a plant-optimized synthetic DPT gene was successfully transferred to tobacco plastomes. Putative transplastomic T0 plants were identified by PCR, and Southern blot analysis confirmed homoplasmy in T1 progeny. ELISA assays demonstrated that the DPT protein retained antigenicity of the three components of the fusion protein. The highest level of expression in

these transplastomic plants reached 0.8% of total soluble protein. To assess whether the functional recombinant protein expressed in tobacco plants would induce specific antibodies in test animals, a mice feeding experiment was conducted. For mice orally immunized with freeze-dried transplastomic leaves, production of IgG and IgA antibodies specific to each toxin were detected in serum and mucosal tissues.

Keywords Plastid expression · Transplastomic plants · DPT recombinant protein · Immunogenic polypeptide

R. E. Soria-Guerra and A. G. Alpuche-Solís contributed equally to this work.


R. E. Soria-Guerra · S. Rosales-Mendoza · E. M. Bendik · S. S. Korban
Department of Natural Resources and Environmental Sciences,
University of Illinois, Urbana, IL 61821, USA

A. G. Alpuche-Solís · L. Martínez-González
División de Biología Molecular,
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,
Camino a la Presa San José 2055,
78216 San Luis Potosí, Mexico

L. Moreno-Fierros
Inmunidad en Mucosas, UBIMED, FES-Iztacala,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala,
54090 Tlalnepantla, Mexico

S. S. Korban (✉)
University of Illinois at Urbana-Champaign,
Urbana, IL 61801, USA
e-mail: korban@illinois.edu

Published online: 21 March 2009

 Springer

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00425-009-0918-2>.

Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague

Sergio Rosales-Mendoza · Ruth E. Soria-Guerra ·
Leticia Moreno-Fierros · Ángel G. Alpuche-Solís ·
Luzmila Martínez-González · Schuyler S. Korban

Received: 20 January 2010 / Accepted: 15 April 2010 / Published online: 12 May 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract *Yersinia pestis* is a pathogenic agent that causes the bubonic and pneumonic plague. The development of an efficient and low-cost oral vaccine against these diseases is highly desirable. In this study, the immunogenic fusion protein F1-V from *Y. pestis* was introduced into lettuce via *Agrobacterium*-mediated transformation, and putative transgenic lines were developed. The presence of the transgene in these putative transgenic lines was determined using polymerase chain reaction (PCR), and transgene integration and transgene copy number were confirmed following Southern blot analysis. The presence of specific F1-V transcripts was confirmed by reverse-transcriptase (RT)-PCR. Using monoclonal antibodies, ELISA and western blot analysis revealed that the expected antigenic F1-V protein was successfully expressed in transgenic lines. Mice immunized subcutaneously with lettuce

expressing the F1-V antigen developed systemic humoral responses as ‘proof of concept’ of using lettuce as a production platform for the F1-V immunogen that could be used as a candidate plant-based vaccine against plague.

Keywords *Yersinia pestis* · Transgenic plants · Plague · Antigenic fusion protein · Plant-based vaccine

Introduction

S. Rosales-Mendoza and R. E. Soria-Guerra contributed equally to this work.

S. Rosales-Mendoza
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma
de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6,
78210 San Luis Potosí, Mexico

R. E. Soria-Guerra · S. S. Korban (✉)
Department of Natural Resources and Environmental Sciences,
University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA
e-mail: korban@illinois.edu

L. Moreno-Fierros
Inmunidad en Mucosas, UBIMED, FES-Iztacala,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Avenida de los Barrios 1, 54090 Tlalnepantla, Mexico

Á. G. Alpuche-Solís · L. Martínez-González
División de Biología Molecular, IPICYT, Camino a la Presa San
José 2055, 78216 San Luis Potosí, Mexico

IX. ANEXO II PROTOCOLOS

IX. PROTOCOLOS

9.1 Reactivos generales:

TAE 50X

- 98.8 g de Tris base
- 22.84 ml de ácido acético
- 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8

Disolver y aforar a 1 L con agua destilada, esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Soluciones Bradford

Solución A

- 25 ml de etanol al 95%
- 50 ml de ácido fosfórico al 85%
- 87.5 mg de azul de Coomassie

Agitar hasta disolver completamente, almacenar a 4°C.

Solución B

- 7.5 ml de etanol al 95%
- 15 ml de ácido fosfórico
- 15 ml de la solución A

Aforar a 250 ml con agua destilada estéril y almacenar a 4 °C.

Buffer salino de fosfatos 10X (PBS 10X)

- 14.2 g de fosfato de sodio
- 4.08 g de fosfato de monobásico de potasio
- 58.5 g de cloruro de sodio

Disolver en agua destilada estéril, ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico 1 N / hidróxido de sodio 1.0 N, aforar a un litro. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de carbonatos

- 1.59 g de carbonato de sodio
- 2.94 g de bicarbonato de sodio

Disolver en agua destilada estéril, ajustar el pH a 9.6 con ácido clorhídrico 1 N. Aforar a un litro.

Buffer de fosfatasa alcalina

- 1.017 g de cloruro de magnesio
- 1.211 g de Tris base
- 584.4 mg de cloruro de sodio

Disolver en agua destilada estéril, ajustar el pH a 9.5 con ácido clorhídrico 1 N/hidróxido de sodio 1.0 N. Aforar a 100mL.

9.2 Antibióticos

Kanamicina

Para preparar un stock de 100 mg/ml.

1. Disolver 2 gramos de sulfato de kanamicina en agua desionizada.
2. Aforar a 20 ml
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μm)
4. Almacenar en alícuotas de 1.5ml a -20 °C.

Cefotaxima

Para preparar un stock de 250 mg/ml.

1. Disolver 2.5 gramos de cefotaxima en agua desionizada.
2. Aforar a 10 ml.
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μm)
4. Almacenar en alícuotas de 1.5ml a -20 °C.

Ampicilina

Para preparar un stock de 100 mg/ml.

1. Disolver 500 g de Ampicilina en agua desionizada.
2. Aforar a 5 ml
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μm)
4. Almacenar en alícuotas de 1.5 ml a -20 °C.

*Este antibiótico se mantiene en buen estado hasta 6 meses

Espectinomicina

Para preparar un stock de 200 mg/ml

1. Disolver 2 gramos de sulfato espectinomicina en agua desionizada
2. Aforar a 10 ml
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μm)
4. Almacenar en alícuotas de 1.5ml a -20 °C.

Estreptomicina

Para preparar un stock de 200 mg/ml,

1. Disolver 2 gramos de sulfato de estreptomicina en agua desionizada
2. Aforar a 10 ml
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μm)
4. Almacenar en alícuotas de 1.5ml a -20 °C

9.3 Reguladores de crecimiento

Ácido naftalenacético (ANA)

Para preparar un stock de 1.5 mg/ml

1. Disolver 150 mg de ANA en 1.0 ml de hidróxido de sodio
2. Aforar a 100 ml con agua desionizada y se almacenar a -20 °C

Benciladenina (BA)

Para preparar un stock de 0.6 mg/ml

1. Disolver 60 mg de BA en 1.0 ml de ácido clorhídrico 1 N
2. Aforar a 100 ml con agua desionizada y se almacenar a -20 °C

Cinetina (Cin)

Para preparar un stock de 1.0 mg/ml

1. Disolver 100 mg de cinetina en 1.0 ml de ácido clorhídrico 1 N.
2. Aforar a 100 ml con agua desionizada y almacenar a -20 °C.

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

Para preparar un stock de 1.0 mg/ml

1. Disolver 100 mg de 2,4-D en 1.0 ml de hidróxido de sodio 1 N
2. Aforar a 100 ml con agua desionizada y almacenar a -20 °C.

9.4 Medios de cultivo bacterianos

Medio de cultivo LB

- 5 mg de extracto de levadura
- 10 mg de cloruro de sodio
- 10 mg de bactotripton

Disolver en agua destilada, aforar a un litro y esterilizar

Medio de cultivo YM

- 400 mg de extracto de levadura
- 10 g de manitol
- 100 mg de cloruro de sodio
- 200 mg de sulfato de magnesio
- 500 mg de fosfato de potasio.

Disolver en agua destilada, ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N, Aforar a un litro con agua destilada y esterilizar.

11.5 Medios de cultivo para plantas

Mezcla basal de sales MS

Solución	Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del stock 100 X (g/L)
MS I	Nitrato de amonio	1650.0	165.0
	Nitrato de potasio	1900.0	190.0
MS II	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.86
	Sulfato de cobre	0.025	0.0025
MS III	Cloruro de calcio	440.0	44.0
	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobalto	0.025	0.0025
MS IV	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
	Ácido bórico	6.2	0.62
	Molibdato de sodio dihidratado	0.25	0.025
MS V	Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	2.78
	EDTA dihidratado	37.3	3.73

Los compuestos se disuelven en agua destilada estéril y se almacenan en alícuotas de 250 ml a 4°C.

Vitaminas MS

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/ml)
Myoinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0
Ácido nicotínico	1.0	1.0
Piridoxina	1.0	1.0

Los compuestos se disuelven en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 ml a -20 °C.

Vitaminas B5

Compuesto	Concentración (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/ml)
Myoinositol	100	100
Tiamina	0.1	0.1
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0

Los compuestos se disuelven en agua destilada estéril y se almacenan en alícuotas de 25 ml a -70 °C.

Procedimiento general para la preparación de medios de cultivo

Para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Añadir 10 ml de cada solución MS (MS I – MS V) a 700 ml de agua desionizada.
2. Adicionar 30 gramos de sacarosa
3. Añadir reguladores de crecimiento y vitaminas apropiados
4. Ajustar el pH a 5.7 con hidróxido de sodio 1 N / ácido clorhídrico 1 N y se aforan con agua destilada estéril.
5. Para los medios semisólidos se añaden 2.5 gramos de fitagel.
6. Los medios se esterilizan a 15 lb/pulgada² por 15 minutos.

*Si es necesario agregar antibióticos al medio de cultivo, estos se agregan previamente estériles una vez que el medio esté estéril y a una temperatura inferior a los 50°C.

Composición de medios de cultivo

Medio	Vitaminas	ANA (mg/L)	BA (mg/L)	Cinetina (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Caseína (g/L)
MS	MS					
MSO	B5	-	-	-	-	-
MS104	B5	0.05	0.02	-	-	-
MSJ	MS	1.0	0.5	-	-	-
UM	MS	-	-	0.25	2.0	2.0
RMOP	B5	1.0	0.1	-	-	-

9.6 Protocolos generales

Preparación de células competentes y transformación de *E. coli* por choque térmico

Células competentes de *E. coli* Top 10 F'

- Tomar 250 μ l un preinoculo de *E. coli* Top 10 crecido en caldo LB a 37 °C por 24 horas y agregar a 25 ml de caldo LB
- Incubar por 90 minutos a 37°C y agitación de 150 rpm.
- Enfriar el cultivo se en baño de hielo y centrifugar 30 segundos a 12,000 rpm.
- Lavar la pastilla con 4 ml de cloruro de calcio 0.1M y glicerol al 15%, y centrifugar nuevamente.
- Finalmente resuspender las células en 630 μ l de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y almacenar a -70 °C en alícuotas de 30 μ l.

Para realizar la transformación,

- Descongelar sobre hielo las células competentes y añadir 3.0 μ l del ADN de interés, mezclar e incubar en hielo por 15 minutos.
- Llevar los tubos a un baño a 43°C por 45 segundos y regresar inmediatamente al hielo por 10 minutos.
- Añadir 1 ml de medio de cultivo LB e incubar 40 minutos a 37°C y 150 rpm.
- Centrifugar y sembrar en medio de cultivo LB adicionado del antibiótico correspondiente.

Preparación de células electrocompetentes y transformación por electroporación de *Agrobacterium tumefaciens*

Cepa LBA4404, de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col (1991).

- Inocular la cepa en medio de cultivo YM por dos días, de este cultivo (DO. 0.04-0.08 a 600nm), tomar 5 ml y agregar medio YM hasta 100 ml, incubar a 28 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (aproximadamente 4 h).

- Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, eliminar el sobrenadante y resuspender la bacteria en 40 ml de buffer HEPES 1mM pH 7
- Centrifugar nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, Eliminar el sobrenadante y resuspender la bacteria en 40 ml de buffer HEPES 1mM pH 7 y 10% de glicerol
- Centrifugar y resuspender la bacteria en 2 ml de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol
- Finalmente centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, resuspender la pastilla en 400 μ l de buffer HEPES y 10% de glicerol, tomar alícuotas de 50 μ l y almacenar a -70°C

Para realizar la transformación:

- Agregar 3.0 μ l de ADN a 50 μ l de células competentes
- Incubar en hielo por 2 minutos y trasferir a una cubeta de electroporación Bio-Rad para aplicar corriente bajo los parámetros establecidos por el proveedor Bio-Rad (25 μ F, 400 Ω , 2.5kV por 8-9 milisegundos).
- Inmediatamente añadir 1.0 ml de medio de cultivo YM y pasar a un tubo Eppendorff de 1.5 ml
- Las células se recuperan a 28°C por dos horas.
- Finalmente centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos, rsuspender la pastilla en 200 μ l de medio de cultivo YM e inocularon en el medio de cultivo YM adicionado del antibiótico correspondiente.

Extracción de ADN plasmídico

Método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989).

1. Tomar 1.5 ml de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas y se centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos
2. Eliminar el sobrenadante, resuspender la pastilla con vórtex y añadir 150 μ l de la solución I de Birnbioim (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 10 mM)

3. Mezclar en vortex y agregar 300 μ L de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién preparada, agitar por inversión 5 veces
4. Añadir 225 μ l de la solución III de BD (Acetato de sodio 3M, pH 4.8), mezclar por inversión y colocar los tubos por 5 minutos en hielo
5. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos, recuperar la fase acuosa, agregar un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar suavemente y Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm
6. Recuperar el sobrenadante y adicionar un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7 y un volumen de isopropanol frío, mezclar por inversión.
7. Precipitar a -20°C por 30 minutos
8. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C , eliminar el sobrenadante y lavar la pastilla con 300 μ l de etanol al 70 %, centrifugar por 5 minutos a 12,000 rpm
9. Agregar RNAsa e incubar a 37°C por una hora
10. Repetir el proceso de lavado con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, precipitar y lavar con etanol al 70%
11. Secar la pastilla a $50-60^{\circ}\text{C}$ y resuspender en 20 μ l de agua milli Q.
12. Almacenar a -20°C

9.7 Protocolos para la transformación genética de plantas

Esterilización de semillas

Las semillas deben estar en constante agitación.

1. Añadir etanol al 70% por un minuto
2. Enjuagar con agua destilada estéril tres veces
3. Agregar una solución de hipoclorito de sodio al 20%, twen 20 al 5% y desinfectante comercial “microdin”; en esta mezcla se quedan las semillas por 10 minutos
4. Enjuagar con agua destilada estéril tres veces
5. Sembrar en medio de cultivo MS al 50%

Transformación genética de lechuga vía *A. tumefaciens*

La metodología para la transformación genética de lechuga es una mezcla de tres diferentes protocolos que se probaron y adecuaron a nuestras condiciones de laboratorio con anterioridad; la tabla describe las características del protocolo final.

Variable	Condición	Protocolo
Variedad de lechuga	Green Wave	Nakano y col. (2003)
Explante utilizado	Cotiledones heridos con bisturí, por la cara abaxial	Curtis y col. (1994)
Carga bacteriana medida en DO _{600nm}	0.2	Nakano y col. (2003)
Tiempo de exposición a la bacteria	5-10 minutos	Curtis y col. (1994)
Tiempo de cocultivo	2 días	Curtis y col. (1994)
Medio de cocultivo	UM	Curtis y col. (1994)
Medio de regeneración	MS104, MSJ	Nakano y col. (2003) Pileggi y col. (2001)
Medio de enraizamiento	MS	Curtis y col. (1994) Nakano y col. (2003)

Transformación de cloroplastos por el método de biobalística

Preparación de la suspensión de micropartículas de oro

Las partículas de oro que se utilizan para el bombardeo deben ser preparadas por lo menos con un día de anticipación, se siguió el protocolo descrito por Daniell y col. 2004.

1. Pesar 50 mg de partículas de oro 0.6 μ m (Bio-Rad) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar 1 ml de etanol grado reactivo al 100% y mezclar en vórtex durante 3 minutos, centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos

3. Descartar el sobrenadante y añadir 1 ml de etanol grado reactivo al 70%, mezclar con vórtex durante 2 minutos.
4. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando cada 5 minutos, Centrifugar por 3 minutos a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante
5. Agregar 1 ml de agua estéril, y mezclar con vórtex durante 1 minuto, hasta que las partículas estén resuspendidas completamente.
6. Dejar a temperatura ambiente durante 1 minuto para permitir que las partículas se bajen al fondo.
7. Centrifugar durante 2 minutos a 13,000 rpm, y descartar el sobrenadante
8. Repetir el lavado cinco veces, o hasta que las pastilla se resuspenda con facilidad
9. Finalmente agregar 850 μ l de glicerol al 50%.

La suspensión partículas de oro preparadas se almacenan a -20°C hasta al momento de usarlas.

Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés

1. Mezclar en vórtex la suspensión de partículas de oro previamente preparadas hasta estar completamente resuspendidas.
2. Tomar 50 μ l de estas partículas y en estricto orden agregar: 10 μ l de ADN plasmídico de concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 50 μ l de CaCl_2 2.5M recién preparado y 20 μ l de espermidina 0.1M; después de añadir cada solución agitar con vórtex durante 5 segundos, posteriormente mezclar con vórtex durante 20 min a 4°C .
3. Agregar 200 μ l de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezclar en vórtex durante 5 segundos, Centrifugar durante 30 segundos a 13,000 rpm.
4. Desechar el sobrenadante y repetir los lavados con etanol durante al menos 5 veces, hasta que las partículas de oro sean fácilmente resuspendidas.
5. Resuspender las partículas en 35 μ l de etanol al 100% y dejar en hielo hasta su uso.
6. Este material es suficiente para 6 bombardeos y debe ser preparado el mismo día que se piense disparar.

9.8 Extracción de ADN vegetal (Michiels y col., 2002)

Buffer de extracción.

- 100 mM Tris, pH 8
- 1.4 M NaCl
- 20 mM EDTA, pH 8
- 0.2 % (v/v) β -mercaptoetanol.

Se esteriliza y se añaden 2 % de polivinilpirrolidona y 2 % de CTAB inmediatamente antes de usarse.

Metodología

1. Triturar 50 mg de material vegetal en nitrógeno líquido en un mortero. Agregar 750 μ l de buffer de extracción a 60 °C y mezclar con cuidado.
2. Incubar las muestras a 60 °C por 60 minutos con mezclado ocasional para evitar agregaciones en el homogenizado.
3. Añadir 750 μ l de cloroformo alcohol isoamílico (24/1) sobre el extracto, agitar con vórtex. Centrifugar por 5 minutos a 2500 g (20 °C). transferir la fase superior a un tubo limpio. Repetir la extracción con cloroformo alcohol isoamílico hasta limpiar la fase acuosa.
4. Mezclar la fase acuosa con 2/3 de volumen de isopropanol, mezclar por inversión e incubar a 25 °C toda la noche. (25 °C, es mejor que 4 °C usados comúnmente).
5. Centrifugar a 5000 g por 10 minutos (20 °C). Separar el sobrenadante y añadir 750 μ l de solución de lavado (10 mM acetato de amonio, 70% de etanol).
6. Resuspender la pastilla en la solución de lavado e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugar a 2500 g por 6 minutos (20 °C). Repetir el lavado.
7. Eliminar el sobrenadante y secar la pastilla al aire. Resuspender en 50 μ l de buffer TE e incubar a 37 °C con RNasa en una concentración final de 10 μ g/ml por 30 minutos.

8. Añadir un volumen de fenol y mezclar vigorosamente para formar una emulsión. Centrifugar por 5 minutos a 2500 g (20 °C). transferir la fase superior a un tubo de centrifuga estéril y repetir la extracción con fenol cloroformo alcohol isoamílico (25/24/1) y con cloroformo alcohol isoamílico (24/1).
9. Añadir NH₄Ac, 7.5 M, pH 7.7, en una concentración final de 2.5 M y dos volúmenes de etanol frío a la fase acuosa transferida, mezclar e incubar en hielo por algunos minutos. Precipitar por centrifugación a 5000 g por 10 minutos a 4 °C.
10. Lavar la pastilla dos veces con etanol al 70 %, secar al aire y resuspender en 30 µl de agua libre de DNasa.

9.9 Southern Blot

Marcaje de la sonda

El marcaje de la sonda se realiza por medio de una reacción de PCR utilizando dNTPs marcados con digoxigenina.

Se realiza una mezcla de reacción de PCR:

- 20 ng de ADN genómico
- Buffer de Taq polimerasa 1X
- 1.5mM de MgCl₂
- 0.1mM de dNTPs sin marca
- 0.1mM de dNTPs marcados
- 10 µM de oligonucleótidos
- Taq polimerasa (1U)

Se realiza la PCR siguiendo el protocolo indicado para cada par de oligos que se esté utilizando.

El marcaje de la sonda se verifica en un gel de agarosa al 1%; el producto marcado debe ser alrededor de 50 pb más pesado que el no marcado.

Tratamiento del ADN

1. Digerir 70 μg de ADN genómico con enzimas de restricción durante 12 horas
2. Verifica la digestión en un gel de agarosa
3. A las muestras digeridas hacer una extracción con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol Isoamílico.
4. Precipitar con un décimo de volumen de acetato de sodio 3M y 0.7 volúmenes de isopropanol por 30 minutos
5. Recuperar la pastilla por centrifugación a 10,000 rpm por 5 minutos
6. Lavar con etanol al 80%.
7. Resuspender en 20 μL de agua Milli "Q", Incubar por 20-30 minutos a 65° C para ayudar a la resuspensión.
8. Separar las muestras en un gel de agarosa al 1% corrido en TAE 1X a 40 volts.
9. teñir el gel con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y observar bajo luz UV.

Tratamiento del gel

1. Incubar en una solución de HCl 0.5 M por 15 min,
2. Enjuagar con agua destilada
3. Incubar en una solución de NaCl 0.6M / NaOH 0.5 M por 45 minutos
4. Neutralizar por 30 minutos en una solución de Tris 0.5 M pH 7.5 / NaCl 1.5 M.

Tratamiento de la membrana de nylon

1. Antes de transferir el gel, enjuagar la membrana de nylon (Hybond-N+Amersham Pharmacia Biotech) con agua destilada.
2. Equilibra por 5 minutos en buffer de transferencia SSC 6X (NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3 M pH 7).

Transferencia a la membrana

1. La transferencia se realiza durante toda la noche en la modalidad “down blot”.
2. Colocar sobre una superficie plana los componentes en el siguiente orden
 - Papel absorbente de 20x20 cm (de aproximadamente 10 cm de altura)
 - 3 capas de papel Whatman 3MM,
 - Tiras de parafilm (que delimitan la zona de transferencia)
 - Membrana de nylon encima
 - Gel
 - 3 capas de papel Whatman humedecido con la solución de SSC 10X.
 - Cristal de 15 x 15 cm y 6 mm de grosor
 - Un peso de 500 g.

Tratamiento de la membrana después de la transferencia

1. Después de 12 horas, Enjuagar la membrana con SSC 6X
2. Colocar sobre un papel Whatman 3 M,
3. Fijar el ADN usando luz UV (120, 000 μ J, Spectrolinker XL-1500 UV Crosslinker).
4. Sellar en una bolsa de plástico y almacenar a 4° C hasta su uso.

Hibridación

1. 500 ng de sonda marcada para una membrana de aproximadamente 100 cm². La membrana se hibrida por 12 horas a 42° C en el buffer de hibridación Dig Easy Hyb.
2. Posteriormente lavar a temperatura ambiente con 10-20 mL del buffer de lavado primario (SSC 2X, SDS 0.1%) por 10 minutos con agitación constante
3. Después dos lavados con 10-20 mL del buffer de lavado secundario (SSC 0.5 X, SDS 0.1%) a 68° C por 15 minutos con agitación constante.

Detección inmunológica

Para revelar la reacción de hibridación:

1. Equilibrar la membrana en el buffer de lavado (Ácido maléico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 y Tween 20 0.3%) por 10 minutos.
2. Incubar por 30 minutos en 50 mL de la solución de bloqueo (Diluir 1:10 el vial 6 en buffer de ácido maléico, el cual contiene ácido maléico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5)
3. Incubar por 30 minutos en 10 mL de la solución con el anticuerpo (dilución 1:10 000 en solución de bloqueo).
4. Lavar en dos ocasiones a temperatura ambiente por 20 minutos c/u con 10-15 mL del buffer de lavado a temperatura ambiente y con agitación constante
5. Equilibrar por 5 minutos en 10 mL de buffer de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M pH 9.5)
6. Colocar en una bolsa sellarla.
7. Añade el reactivo de detección CSPD ready to use (1 mL por cada 100 cm² de membrana)
8. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
9. Retirar el líquido de la bolsa
10. La detección de la señal luminiscente se realiza exponiendo la membrana en el fotodocumentador por 1 h en oscuridad utilizando el filtro claro y la luz UV apagada.

9.10 SDS – PAGE

Soluciones:

Stock de Acrilamida-bisacrilamida al 30%.

- Acrilamida 29.2 g
- Bisacrilamida 0.8 g

Aforar a 100 ml con agua destilada estéril.

Buffer de resolución.

Mezclar 9.08 g de Tris y 2.0g de SDS en 25ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.8 y aforar a 50ml.

Buffer de concentración.

Mezclar 3.02 g de Tris y 2.0g de SDS en 25ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 y aforar a 50ml.

Buffer de electroforesis SDS (5X).

Tris – base 0.125M

Glicina 0.96 M

SDS 5 %

pH 8.3

Buffer de carga SDS (6X).

- Tris – HCl 0.3 M pH 6.8
- 2-β mercaptoetanol 0.3 M
- Azul de bromofenol 0.6 %
- Glicerol 60%
- SDS 12%

Para preparar el gel de acrilamida 16%

1. Mezclar 2.68 ml de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 1.87 ml de buffer de resolución, .405 ml de agua destilada, 37.5µl de persulfato de amonio al 20% y 2.5 µl de TEMED.
2. Vaciar inmediatamente en la cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD), y sobre ella agregar 1ml de etanol para eliminar el aire que pueda interferir en la polimerización, dejar polimerizar por 60 minutos.
3. Mezclar 536 µl de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 800 µl de buffer concentrador, 635 µl de agua destilada, 24 µl de persulfato de amonio al

20% y 2.5 μ l de TEMED. Eliminar el etanol de la cámara de electroforesis y en su lugar agregar esta solución, se deja polimerizar por 45 minutos.

4. Antes de cargar la muestra en el gel; se mezcla con el buffer de carga 6X y se calienta a 95 °C por 5 minutos, posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente.
5. El gel se corre a amperaje constante (10mA) hasta que las muestras pasan el gel de concentración, posteriormente se aumenta a 20 mA hasta que el colorante indicador llegara antes de 1 cm del fondo del gel (aproximadamente 45 minutos).

Tinción con Coomassie coloidal

1. Colocar el gel en una solución de fijado (50% metanol 2% ac. Fosfórico) de 3 h a toda la noche.
2. Lavar con agua destilada 3 veces durante 10 minutos
3. Dejar el gel en 10 ml de la solución de equilibrio (33% metanol, 17% sulfato amónico, 3 % Ac. Fosfórico) por una hora.
4. Añadir a la solución de equilibrio 100 μ l de solución de Coomassie (66% Azul de Coomasie en metanol) durante toda la noche.
5. Lavar con agua destilada hasta que las bandas se definan.

9.11 Western Blot

Se siguió la metodología de Gelvin y Schilperroort (1997).

Transferencia a membrana de nitrocelulosa

1. Se separan las muestras en un gel de poliacrilamida
2. La proteína separada en el gel se transfiere a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia líquida en el equipo miniprotean III de BIO-RAD.

3. Humedecer la membrana, dos hojas de papel filtro y las esponjas en el buffer de electroforesis (Tris – base 0.025 M, glicina 0.192 M, metanol 20 % y SDS 0.1%)
4. Colocar en el soporte de plástico del equipo miniprotean III, en estricto orden: esponja, papel filtro, membrana de nitrocelulosa, gel de acrilamida, papel filtro, esponja; cerrar el soporte de plástico y colocar en la cámara de electroforesis de manera que la membrana de nitrocelulosa este en dirección al ánodo.
5. La transferencia se lleva a cabo a 200-300 mA por dos horas.

Tinción con Ponceau S

Para comprobar la transferencia se cubre la membrana con el colorante Ponceau S por 5 minutos, este colorante mostrara las bandas de proteínas teñidas de color rojo.

Para eliminar el colorante se lava la membrana con agua destilada en varias ocasiones.

Detección inmunológica.

1. Bloquear los sitios libres de proteína de la membrana con una solución de leche descremada al 2% en PBS, incubar con agitación constante por 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Agregar el anticuerpo primario (1:1500) en PBS y 1% de leche descremada, Incubar por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
3. Incubar por 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante con el anticuerpo secundario, conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:10000 en PBS y 1% de leche descremada.
4. Se agregó el reactivo de revelado (BCIP/NTB-BLUE, SIGMA, México), se incubó de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, las bandas debieron observarse de color púrpura.