



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Producción de una vacuna comestible en
sistemas vegetales contra el virus sincicial
respiratorio**

Tesis que presenta

Luzmila Martínez González

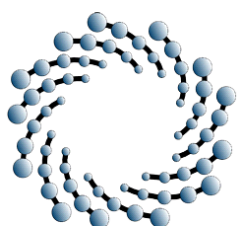
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2009



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Producción de una vacuna comestible en sistemas vegetales contra el virus sincicial respiratorio**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Luzmila Martínez González** y aprobada el **06 de Enero de 2009** 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 G. Alpuche Solís
(Director de la tesis)

Dr. Daniel E. Noyola Cherpitel
(Asesor de la tesis)

Dr. Rubén López Revilla
(Asesor de la tesis)



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 Potosino de Ciencia y Tecnología, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto 56980.



IPICYT

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 059 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de enero del año 2009, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel	Sinodal externo	UASLP

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Luzmila Martínez González

sobre la Tesis intitulada:

Producción de una vacuna comestible en sistemas vegetales contra el virus sincicial respiratorio

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

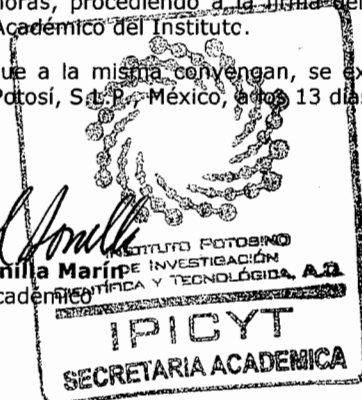
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:45 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 13 días del mes de enero de 2009.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

“Señor, concédeme la serenidad para aceptar las cosas que no puedo cambiar, valor para cambiar las que sí puedo y sabiduría para encontrar la diferencia”

A mis padres Luzmila González y Jorge Martínez por ser mi pilar y mi guía y por darme la oportunidad de 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 Luis, Eduardo, Sofía, Erick, Ana, César y Karen porque sin personas que creen que somos capaces de lograr grandes cosas no podríamos lograrlas nunca

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 y por darme la oportunidad que otros me habrían negado.

Al Dr. Daniel Noyola y al Dr. Rubén López Revilla por sus consejos y aportaciones para mejorar mi trabajo.

A Sergio Rosales por compartir conmigo sus conocimientos y sus experiencias, por su ayuda y sus consejos, porque comenzó siendo un maestro y terminó siendo un amigo.

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

A la Dra. Leticia Moreno Fierros de la UNAM, por las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A los compañeros y técnicos del laboratorio 1 de “Biología Molecular de Plantas” Especialmente a Ruth, Silvia, Pablo, Benita, Rosy, Vero y Omar, por sus consejos y su ayuda.

A mis compañeros de generación por estar siempre dispuestos a brindarme su ayuda.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por la oportunidad y el apoyo para continuar con mis estudios.

Al COPOCYT, IPICYT y CONACYT por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

	Página
Carátula	i
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen de grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Enfermedades respiratorias	2
2.2. Virus sincicial respiratorio	3
2.2.1. Epidemiología	3
2.2.2. Clasificación y estructura	4
2.2.3. Replicación	5
2.2.4. Características de las proteínas G y F	6
2.2.5. Patogenia	6
2.2.6. Inmunología	6
2.2.7. Medidas profilácticas y terapéuticas	7
2.2.7.1. Terapia antiviral	7
2.2.7.2. Profilaxis pasiva	8
2.2.7.3. Vacunas contra VSR	8
2.3. Vacunas	9
2.3.1. Vacunas de nueva generación	9
2.3.2. Vacunas de péptidos recombinantes	10
2.4. Plantas transgénicas para la producción de proteínas heterólogas	10
2.4.1. Estrategias utilizadas para optimizar la producción de proteínas recombinantes en plantas	10
2.4.2. Vacunas comestibles	11
2.4.3. Vacunas contra VSR producidas en plantas	13

2.5. Transformación genética de plantas	14
2.5.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
2.5.2. Biobalísitica	15
2.5.2.1. Transformación de cloroplastos	16
2.6. Características de las plantas utilizadas	16
2.6.1. Lechuga	16
2.6.2. Tabaco	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAL Y EQUIPO	20
4.1. Material biológico	20
4.2. Vectores	20
4.3. Reactivos	21
4.4. Equipo	24
5. METODOLOGÍA	26
5.1. Diseño de genes sintéticos para los epítomos de las proteínas F y G del virus sincicial respiratorio (VSR)	26
5.2. Obtención de los genes nativos F y G de VSR	27
5.3. Construcciones genéticas	29
5.3.1. Construcciones para transformación nuclear	29
5.3.1.1. Estrategia general	29
5.3.1.2. Clonación del gen G nativo en el vector pBI-121	30
5.3.1.3. Clonación del fragmento del gen F nativo en el vector pBI-121	30
5.3.1.4. Clonación del gen sintético VSRsn en el vector pBI-121	30
5.3.1.5. Construcción pBI-VSRsn sin la secuencia del epítomo de la proteína G	32
5.3.2. Construcciones para transformación de cloroplastos	31
5.3.2.1. Clonación del gen VSRsn en el vector pKCZ	31
5.3.2.2. Construcción pKCZ-VSRsc sin la secuencia del epítomo de la proteína G	31
5.4. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
5.5. Estandarización del proceso de obtención de plantas transgénicas de lechuga y tabaco	32

5.5.1. Lechuga	32
5.5.1.1. Obtención de hojas cotiledonarias	33
5.5.1.2. Ensayos de regeneración	33
5.5.2. Tabaco	34
5.6. Ensayos de transformación genética nuclear vía <i>A. tumefaciens</i>	34
5.6.1. Lechuga	34
5.6.2. Tabaco	36
5.7. Ensayos de transformación genética de cloroplastos por el método de biobalística	37
5.7.1. Obtención del explante	37
5.7.2. Preparación de la suspensión de micropartículas de oro	37
5.7.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco	38
5.7.3.1. Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés	38
5.7.3.2. Bombardeo de las hojas de tabaco (Pistola Bio-Rad)	38
5.8. Análisis de transformantes	39
5.8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	39
5.8.1.1. Extracción de ADN genómico	39
5.8.1.2. Protocolo de PCR	40
5.8.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	42
5.8.2.1. Extracción de proteína total soluble	42
5.8.2.2. Protocolo de ELISA	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1. Diseño de genes sintéticos para los epítomos de las proteínas F y G del virus sincicial respiratorio (VSR)	43
6.2. Obtención de los genes nativos F y G de VSR	49
6.3. Construcciones genéticas	51
6.3.1. Construcciones para transformación nuclear	51
6.3.1.1. Clonación del gen G nativo en el vector pBI-121	51
6.3.1.2. Clonación del fragmento del gen F nativo en el vector pBI-121	53
6.3.1.3. Clonación del gen sintético VSR en el vector pBI-121	54
6.3.1.4. Construcción de pBI-VSR sin la secuencia del epítomo de la proteína G	57

6.3.2. Construcciones para la transformación de cloroplastos	58
6.3.2.1. Clonación del gen VSRsc en el vector pKCZ	58
6.3.2.2. Construcción de pKCZ-VSRsc sin la secuencia del epítipo de la proteína G	61
6.4. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	61
6.5. Proceso general para la obtención de plantas transgénicas de lechuga y tabaco vía <i>A. tumefaciens</i>	62
6.6. Transformación genética nuclear vía <i>A. tumefaciens</i> conteniendo secuencias de VSR	62
6.6.1. Lechuga	62
6.6.2. Tabaco	64
6.7. Transformación genética de cloroplastos de tabaco por el método de biobalística	65
6.8. Análisis de transformantes	66
6.8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	66
6.9. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	67
6.9.1. pVI-VSR	67
7. CONCLUSIONES	70
8. PERSPECTIVAS	71
9. APÉNDICE	72
10. REFERENCIAS	79

Lista de tablas

Número	Título	Página
1	Descripción de los protocolos empleados en la estandarización de la transformación genética de lechuga	35
2	Descripción del protocolo usado para la transformación genética de lechuga en este trabajo	36
3	Oligonucleótidos utilizados en las diferentes reacciones de amplificación	40
4	Protocolos de PCR para las amplificaciones de los diferentes genes	41
5	Epítomos seleccionados para diseñar los genes sintéticos VSR	45

Lista de figuras

Número	Título	Página
1	Principales agentes etiológicos en los diferentes padecimientos respiratorios	2
2	Principales causas de hospitalización por enfermedades de las vías respiratorias	4
3	Estructura del virus sincicial respiratorio	5
4	Comparación de costos en diferentes sistemas de expresión de proteínas heterólogas	13
5	Transferencia de genes por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a células vegetales	15
6	Gen sintético para transformación nuclear	27
7	Gen sintético para la transformación de cloroplastos	27
8	Esquema de diseño de oligonucleótidos para aislar los genes nativos	28
9	Análisis de las secuencias de los genes sintéticos por medio del programa <i>Antheprot</i> .	46
10	Secuencia del gen sintético VSRsn optimizado para su expresión en lechuga	47
11	Secuencia del gen VSRsc optimizado para su expresión en cloroplastos de lechuga	48
12	Proceso de obtención de cDNA para el aislamiento de genes F y G nativos	49
13	Amplificación de un fragmento del gen F nativo (900pb)	50
14	Amplificación del gen G (750pb)	50
15	Análisis de clonas VSRG en el plásmido pGEM-T Easy	51
16	PCR de las clonas de pBI-VSRG	52
17	Vector binario pBI-VSRG usado para la transformación nuclear de tabaco y lechuga	52
18	Análisis de restricción de las clonas pGEM-VSRF	53
19	Análisis de las clonas pBI-VSRF por PCR	54
20	Vector binario pBI-VSRF usado para la transformación de tabaco y lechuga	54
21	Producto de la digestión del plásmido pGA4 con las enzimas <i>Nco I</i> y <i>Sac I</i>	55

Número	Título	Página
22	Vector binario pBI-VSR usado para la transformación nuclear de tabaco y lechuga	55
23	Análisis por restricción de clonas positivas para la construcción pBI-VSR en células de <i>E. coli</i> TOP10 F'	56
24	Análisis por PCR de clonas positivas para la construcción pBI-VSR en células de <i>E. coli</i> TOP10 F'	56
25	PCR para las clonas pBI-VSRΔG	57
26	Producto de la digestión del plásmido pMK con enzimas <i>Xba</i> I y <i>Eco</i> RV	58
27	Vector bicistrónico pKCZ-VSR conteniendo los epítomos F y G del VSR para transformación de cloroplastos de tabaco	59
28	Análisis de clonas pKCZ-VSR por perfil de restricción y análisis de PCR	60
29	PCR para confirmar la construcción pKCZ-VSRΔG	61
30	Representación esquemática de la transformación de plantas vía <i>Agrobacterium</i> y regeneración de plantas de lechuga	62
31	Callos de lechuga regenerados a partir de cotiledones infectados con los plásmidos binarios	63
32	Resultados de la transformación nuclear de tabaco con los plásmidos binarios pBI-VSR, pBI-VSRG y pBI-VSRF	64
33	Proceso de transformación de hojas de tabaco por el método de biobalística	65
34	Callos de tabaco resistentes al agente de selección transformados por biobalística a partir de hojas	66
35	Análisis de los productos de amplificación por PCR de plantas de tabaco transformadas con la construcción pBI-VSR vía <i>Agrobacterium</i>	67
36	Análisis por ELISA para la detección de VSRsn en plántulas de tabaco	68

I. RESUMEN

Las enfermedades infecciosas, principalmente las respiratorias, son un campo importante en el desarrollo de vacunas, debido a los altos costos de hospitalización que se generan de ellas; el virus sincicial respiratorio (VSR) es el principal patógeno de este tipo de enfermedades en niños; asimismo, es uno de los principales patógenos de vías respiratorias en ancianos. Actualmente no existe una vacuna para prevenir su infección. El presente trabajo se enfoca al desarrollo de una vacuna comestible contra VSR en plantas. Se generaron vectores para transformación nuclear de lechuga y tabaco, así como para cloroplastos de tabaco conteniendo epítomos de los genes F y G del VSR. Se transformaron genéticamente plantas de tabaco y lechuga por medio de *Agrobacterium tumefaciens* portando los genes nativos de las proteínas F y G de VSR y dos genes sintéticos optimizados para plantas: uno codifica para un polipéptido que contiene dos adyuvantes, tres epítomos de la proteína F y un epítomo de la proteína G unidos por péptidos conectores y el otro codifica para un péptido similar al cual se le ha eliminado el epítomo de la proteína G. Además se inició la transformación de cloroplastos de tabaco por el método de biobalística con genes sintéticos. Al igual que los utilizados para la transformación nuclear uno contiene tres epítomos de la proteína F y uno de G mientras que el otro solo contiene los de la proteína F.

Para la transformación nuclear de lechuga se logró regenerar callos con las construcciones de los genes sintéticos y del gen nativo G, mientras que en el caso de tabaco, con el gen sintético que contiene los cuatro epítomos, se logró regenerar plantas completas a las que se les verificó la integración del transgén por PCR y se confirmó la antigenicidad por un ensayo inmunoenzimático (ELISA) con anticuerpos específicos contra la proteína F del VSR y también se obtuvieron callos resistentes al agente de selección de las construcciones con los genes nativos F y G.

En la transformación de cloroplastos de tabaco se logró regenerar callos resistentes al medio de selección con las dos construcciones utilizadas (con y sin el epítomo del gen G). El tener callos resistentes al agente de selección nos permite considerar la posibilidad de obtener plantas transgénicas y/o transplastómicas con las otras construcciones, trabajo a realizarse posteriormente.

Este es el primer trabajo donde se han incluido cuatro diferentes epítomos de regiones antigénicas del VSR y se han introducido a plantas, además de demostrar que son funcionales *in vitro* , lo cual es el primer paso para un trabajo futuro de funcionalidad *in vivo*. Las diversas construcciones generadas nos permitirán comparar si los niveles de expresión de la proteína con los genes sintéticos son similares o superiores a las construcciones con los genes nativos, además del tipo de respuesta inmune (Th1 o Th2) que se genere en pruebas en ratones. Por otro lado el contar con construcciones con y sin el epítomo G nos ayudará a determinar si la presencia de antígenos de esta proteína altera el balance de la respuesta inmune (Th1/Th2) generado.

I. ABSTRACT

Respiratory tract infections are a leading cause of morbidity and mortality world-wide and an important area for vaccine development based on the high costs associated to their treatment. 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 recognized 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. Vectors for nuclear transformation of lettuce and tobacco were obtained as well as for tobacco chloroplast transformation, harboring antigenic sequences of the F and G genes of RSV.

Tobacco and lettuce plants were transformed by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* containing the native genes of the F and G proteins from RSV, and two synthetic genes optimized for their expression in plants. One of these genes encodes for two adjuvants and three epitopes from the F protein and an additional epitope from the G protein fused by linkers. The peptides were selected based on their theoretical antigenicity. The second synthetic gene is similar to the first one, but the G epitope was deleted.

Also, tobacco chloroplast transformation was started by biolistic assay with plasmids designed for homologous recombination. A biolistic vector including three epitopes of the F protein and one of the G protein fused by linkers was used; in addition another vector that lacked the G epitope was used. This strategy will allow us to compare the immunological responses of immunized mice with different compositions of recombinant protein.

As for the nuclear transformation of lettuce, it was possible to regenerate calli that contain the native G gene, as well as calli that contain the synthetic genes (F-G and F alone). In regards to the nuclear transformation of tobacco, adult plants transformed with the synthetic genes (F and G) were obtained and the presence of this gene was corroborated by a PCR assay. The functionality of the protein produced

in plants was demonstrated based on the results of an *in vitro* immunoassay. The ELISA was carried out with specific monoclonal antibody against the F protein of RSV.

In the case of the native genes, these were introduced by co-cultivation but currently only calli have been developed on the selection medium. The advances in the tobacco chloroplast transformation have been slower than those obtained for the nuclear transformation assays. At the moment we only have calli growing in the selection medium for the synthetic genes F-G and F alone. Future work will focus in obtaining the transgenic and transplastomic plants that are in callus stage at the moment.

To our knowledge this is the first work where four different epitopes from RSV antigenic regions have been included in a construct and introduced to a plant showing functionality *in vitro* assays, which is the first step to proceed to immunogenicity assays in mice. We will compare the antibody concentrations induced by vaccination with plants harboring the native and synthetic genes. In addition, we are interested in comparing the Th1/Th2 balance of the immune response generated in mice immunized with the different transgenic and transplastomic plants. More interestingly, we will be able to analyze if the presence or absence of the G epitope affects the Th1/Th2 balance in the immune response to these peptides, which is an important factor to consider in order avoiding adverse effects during vaccination.

1. INTRODUCCIÓN

La vacunación es una de las más grandes hazañas que ha logrado el hombre en el campo de la salud; sin embargo, aún existen padecimientos que impactan a la salud de la población mundial y para los cuales no se cuenta con una vacuna accesible. Las enfermedades respiratorias son la causa más frecuente de hospitalización principalmente en niños menores de dos años y son un ejemplo de padecimientos para los cuales es difícil tener una vacuna accesible.

Los avances de la biotecnología en las últimas décadas han generado beneficios relevantes para el ser humano. Tras el surgimiento de las técnicas de biología molecular y de transformación genética, la biotecnología vegetal ofreció en su inicio mejoras reflejadas en aplicaciones agronómicas, es decir, la producción de cultivos con características como resistencia a herbicidas, plagas, enfermedades y estrés. Sin embargo, una de las últimas tendencias se enfoca hacia el uso de las plantas como biorreactores en la producción de proteínas terapéuticas, anticuerpos y antígenos específicos, debido a la demanda que estos compuestos tienen en todo el mundo y sus altos costos de producción. En especial, la producción de los antígenos relevantes para la vacunación podría conducir al desarrollo de vacunas comestibles. Esta alternativa tiene entre sus ventajas el bajo costo, ya que se eliminan los gastos de infraestructura convencional e incluso de purificación. Existen reportes donde se estima que es diez veces más barato usar plantas como biorreactores que sistemas tradicionales de reactores con microorganismos (Streatfield y Howard, 2003).

En los últimos años, se ha explorado esta alternativa probándose que las plantas son capaces de incorporar transgenes de interés farmacéutico y que las proteínas heterólogas son funcionales, al realizar ensayos de inmunogenicidad. Dados los resultados positivos en este campo, esta aplicación biotecnológica ha generado buenas perspectivas en el campo de la Biomedicina. Por lo tanto, queda por continuar con estudios en los que se explore la expresión en plantas de péptidos que resulten relevantes para la inmunización contra patógenos de importancia epidemiológica.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades respiratorias

Las enfermedades respiratorias ocupan uno de los tres primeros lugares dentro de las enfermedades infecciosas, en México y en los demás países 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 del cuadro clínico que presentan (Rosete y col., 2002)

Los principales agentes etiológicos de las enfermedades respiratorias son los virus, entre los cuales destacan los virus de la influenza, parainfluenza, rinovirus y virus sincicial respiratorio, siendo éste el principal agente causal de bronquiolitis y neumonía (Rosete y col., 2002) (Fig. 1).

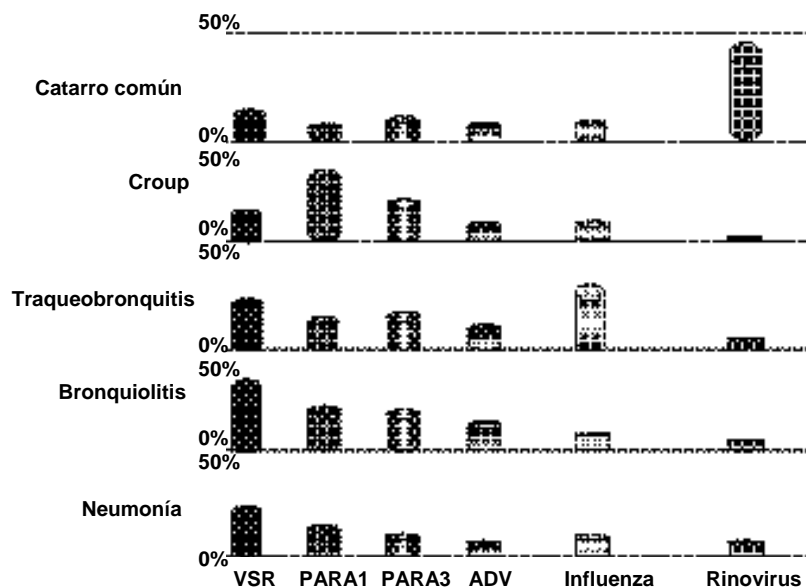


Figura 1. Principales agentes etiológicos en los diferentes padecimientos respiratorios.

2.2. Virus sincicial respiratorio

En 1956 Morris y col., aislaron un nuevo virus de chimpancé de un grupo que estaba resfriado, a ese virus lo llamaron agente de la coriza del chimpancé. Mas tarde, Chanock y col. (1957) confirmaron que el agente causaba enfermedad respiratoria en humanos cuando lograron aislar de dos niños con enfermedades de vías respiratorias bajas el agente de la coriza del chimpancé. El mismo año Chanock y Finberg detectaron anticuerpos neutralizantes específicos contra este agente en niños con patologías respiratorias; a partir de entonces el agente fue llamado virus sincicial respiratorio para destacar su principal manifestación histopatológica (formación de sincicios).

2.2.1. Epidemiología

El virus sincicial respiratorio (VSR) es uno de los patógenos mas importantes en las infecciones respiratorias, es la principal causa de hospitalización de niños menores de dos años (Fig. 2), desencadena cuadros de bronquiolitis y neumonía; 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). Es una de las principales causas de neumonía en ancianos con un índice de mortalidad de hasta 10%. 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).

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

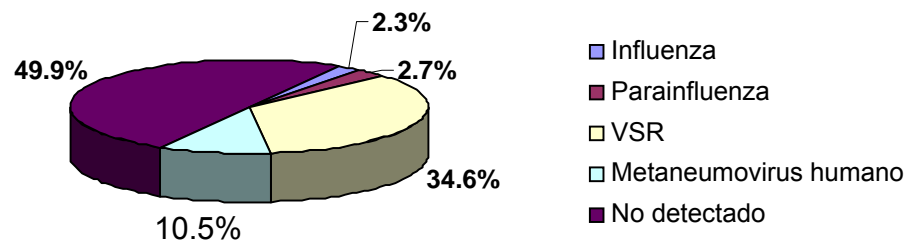


Figura 2. Principales causas de hospitalización por enfermedades de las vías respiratorias (Noyola y col., 2005).

2.2.2. Clasificación y estructura

Es un virus de RNA de cadena sencilla, no segmentada y de polaridad negativa, su genoma está compuesto por aproximadamente 15,222 nucleótidos y 10 genes que codifican para 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).

Pertenece al género *Pneumovirus*, y a la Familia *Paramyxoviridae*; consisten de una nucleocápside contenida dentro de una envoltura lipídica (Fig. 3), el tamaño de los viriones varía entre 150 y 300 nm. 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).

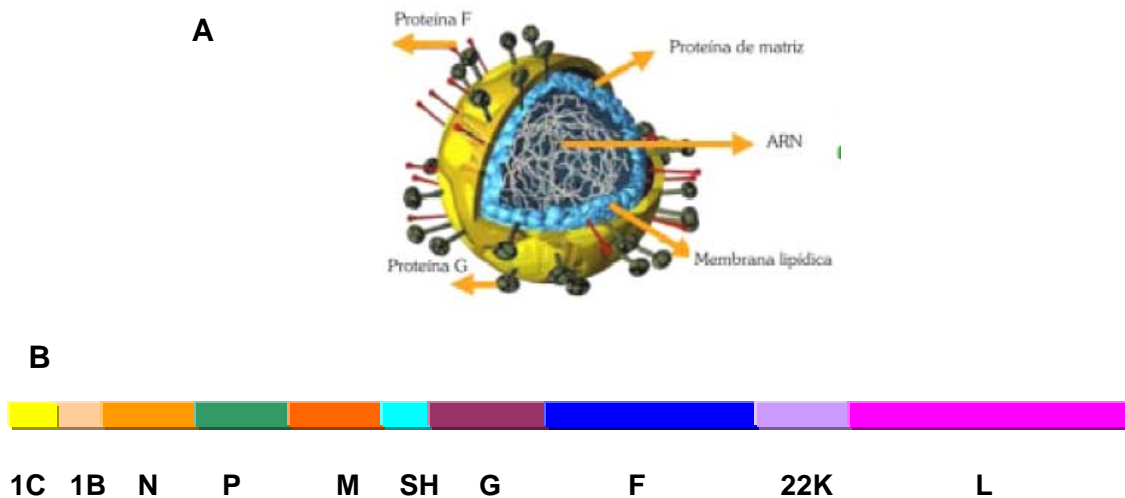


Figura 3. Estructura del virus sincicial respiratorio. A) Dibujo de la estructura mostrando la distribución espacial de las proteínas. B) Distribución de los genes que codifican 11 proteínas.

2.2.3 Replicación

El proceso de transcripción y replicación ocurre en el citoplasma, el VSR es un virus de ARN de orientación negativa por lo cual es necesario antes de generar el genoma del virión sintetizar la cadena positiva que servirá como ARN mensajero (Vergara y col., 2006).

El genoma del virus tiene unas secuencias cortas al inicio y al final de cada gen, la ARN polimerasa dependiente de ARN reconoce la secuencia de inicio e inicia la transcripción, la secuencia de término sirve para liberar el ARN mensajero recién sintetizado y añadir el poli A (Fearn y col., 2002).

La transcripción de los diferentes genes ocurre de manera secuencial con la ayuda de la proteína M2-1 que ayuda al complejo de la polimerasa a pasar a través de las regiones intergénicas, cuando el factor regulador M2-2 alcanza cierto nivel de concentración el complejo de RNA polimerasa ignora las señales de inicio de los genes (Fearn y col., 2002).

2.2.4 Características de las proteínas G y F

Las proteínas de superficie, llamadas proteína de fusión (F) y proteína de anclaje (G) parecen tener importancia en integrar la capacidad infecciosa y la patogenia del virus. La proteína G es una glicoproteína tipo II con abundantes glicosilaciones tipo N y O, es la proteína de unión del virus a la célula, estas glicosilaciones le permiten la unión con los glicosaminosacáridos altamente sulfatados presentes en la membrana plasmática (Bourgeois y col., 1998).

La proteína F presenta similitud estructural con la proteína de fusión de otros paramixovirus y consta de dos fragmentos unidos por puentes disulfuro. 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 el sincicio característico.

2.2.5. 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.

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., 1999). También se produce impedimento del flujo de aire, con lo que se producen las características sibilancias.

2.2.6. 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 generan inmunidad permanente por lo que las reinfecciones con este virus son frecuentes.

Una vez que el organismo es infectado por un virus, el tipo de respuesta depende de la vía de entrada del agente patógeno en el organismo, la concentración que los antígenos derivados de éste alcancen y la afinidad de los péptidos derivados de estos antígenos por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y el receptor de células T (RCT). Se han descrito dos perfiles de respuesta inmune de los linfocitos cooperadores (helper): la respuesta Th1 y la respuesta Th2. Tras haber reconocido el péptido viral como extraño, el linfocito cooperador T específico se diferenciará hacia un perfil de respuesta Th1, para producir el interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) e interleucina 2 (IL-2); o hacia un perfil Th2, que produce interleucinas 4, 5, 6, 9 y 10. En el caso de las respuestas Th1, se estimulará la diferenciación de los precursores de los linfocitos T citotóxicos (Pre-LTc) a LTc maduros y parcialmente también la respuesta humoral (Romagnani, 1991).

En condiciones de salud normales 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 caso de individuos inmunosuprimidos y en reinfecciones en niños menores de 2 años, en los cuales el sistema inmune aun no es maduro, 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). Son las proteínas de superficie G y F las que median la respuesta inmune hacia el VSR; se ha descrito que la proteína F genera una respuesta predominante Th1 mientras que la proteína G preferencialmente Th2 (Openshaw y Tregoning, 2005).

2.2.7. Medidas profilácticas y terapéuticas

2.2.7.1. Terapia antiviral

La ribavirina es el único fármaco registrado para el tratamiento de niños con bronquilitis 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).

2.2.7.2. Profilaxis pasiva

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

2.2.7.3. Vacunas contra VSR

Desde el descubrimiento del VSR se han realizado diversos intentos por desarrollar una vacuna. Alrededor de 1960 se generó una vacuna a partir de virus inactivos por medio de formaldehído (FI-VSR), esta vacuna 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 debe a la producción de una respuesta inmune Th2 exacerbada lo que desencadenaba abundante eosinofilia, y en consecuencia producción de moco y taponamiento de las vías respiratorias. Se intentó años después con una vacuna basada en virus vivos atenuados por frío la cual desencadenó abundantes secreciones que obstruyen las vías respiratorias. Actualmente se está trabajando con cepas mutantes y vacunas de subunidades; de estas últimas están en fase de prueba PFP-1 que contiene el 90-95% de la proteína F, PFP-2, que contiene el 98% de la misma proteína y BBG2Na polipéptido de la proteína G que incluye los aminoácidos 130-230 (Dudas y Karron, 1998).

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 epítopos específicos ayudará a crear un equilibrio de la respuesta inmune, evitando así respuestas exageradas.

2.3. Vacunas

La vacunación es el proceso que permite generar resistencia a una enfermedad infecciosa, con la finalidad de prevenir e incluso erradicar dichas enfermedades como en el caso de la viruela. 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 (Lopez 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.
- Inmunidad persistente a largo plazo.
- Ser compatible con otras vacunas.
- De administración no invasiva (vía oral preferentemente) y en los primeros años de vida.
- Estable a temperatura ambiente.
- De fácil producción y económicamente accesible.

Las vacunas clásicas son vacunas de microorganismos atenuados inactivos o fragmentos de ellos (vacunas de subunidades), sin embargo existen vacunas de nueva generación que prometen ser más efectivas e inocuas (Lopez y col., 2004).

2.3.1 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).

Una parte 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).

2.3.2. Vacunas de péptidos recombinantes

La tecnología del ADN recombinante permite aislar genes o fragmentos de ellos que codifican para proteínas antigénicas o epítomos de éstas, estos genes pueden introducirse a sistemas biológicos como bacterias, levaduras o plantas que son usados como biorreactores, este tipo de vacunas tienen la ventaja de las vacunas de subunidades que permiten tener protección y disminuyen los efectos secundarios.

2.4. Plantas transgénicas para la producción de proteínas heterólogas

Con el advenimiento de las técnica de manipulación del ADN y la transformación genética de plantas, 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 el costo del material vegetal es muy bajo 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 (Daniell y col., 2001; Kaprowski y Yusibov, 2001; Mason y col., 2002).

2.4.1. Estrategias utilizadas para optimizar la producción de proteínas recombinantes en plantas

Durante los últimos años se ha demostrado que las plantas tienen la capacidad de producir proteínas heterólogas, sin embargo, las proteínas foráneas en plantas se acumulan en niveles relativamente bajos [0.1-1% de la proteína total soluble

(PTS)]. Diversas estrategias se han desarrollado para incrementar la producción de proteínas en plantas transgénicas, como el uso de promotores constitutivos como el 35S del virus del mosaico de la coliflor (Tyagi, 2001), genes sintéticos optimizados en el uso de codones en plantas (Koziel y col., 1996) y añadir en el extremo 3' una señal de retención en el retículo endoplásmico (como la secuencia SEKDEL o KDEL) que incrementa la acumulación de proteínas antigénicas en las células vegetales de 2 a 10 veces más (Yu y Langridge, 2000; Napier y col., 2005; Rigano y Walmsley, 2005).

Otra alternativa para producir una alta expresión del transgén en la planta es la transformación de cloroplastos, ya que producen hasta 10 veces más PTS, se logra reducir el flujo genético de los transgenes mediante el polen ya que los plástidos se heredan de forma materna (Bogorad, 2000; Daniel y col., 2002), además no se conocen efectos epigenéticos como el silenciamiento de genes y efectos pleiotróficos. También es importante mencionar que en cloroplastos se pueden producir varias proteínas mediante operones (Goldschmidt-Clermont 1991). Sin embargo el uso de este sistema como una estrategia general en biotecnología es limitado debido a la incapacidad de los cloroplastos de realizar modificaciones postraduccionales, incluyendo glicosilaciones (Backstrom y col., 1995).

2.4.2. Vacunas comestibles

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, durante la década anterior se concibió la idea de utilizar los vegetales como fuentes de vacunas comestibles. El enfoque es obtener 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, pues es capaz de generar anticuerpos secretores (Streatfield y col., 2001).

Las ventajas de producir vacunas en vegetales son enormes, debido a que se elimina en gran medida el costo por producción, purificación, almacenamiento y transporte, ya que se pueden utilizar en vegetales de la región (Fig. 4). Aunado a esto, las vacunas en plantas permiten evitar el uso de jeringas no estériles, que en poblaciones subdesarrolladas, es uno de los principales riesgos de contagio de enfermedades como SIDA o hepatitis B (Daniell y col., 2001; Streatfield y col., 2001).

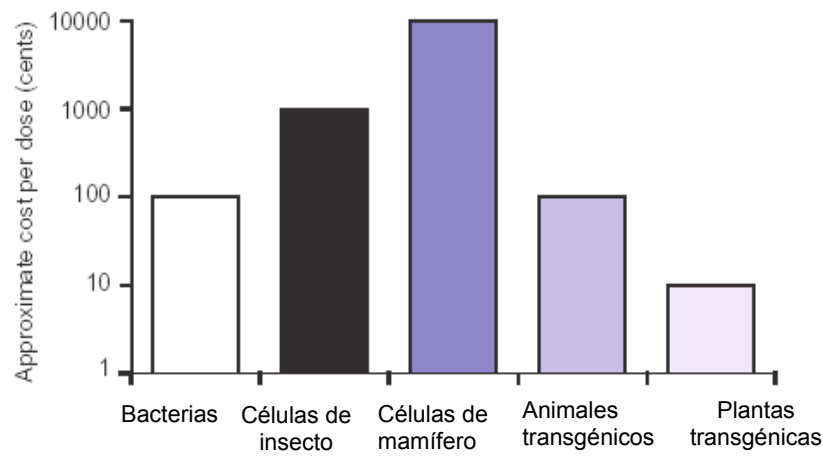
Por otro lado, el empleo de subunidades antigénicas eliminaría los riesgos que acompañan al uso de organismos atenuados, tales como el desarrollo de la enfermedad y efectos secundarios (Clements y col., 2004)

Lo ideal en este tipo de vacunas, es que se expresen en vegetales que se consuman de preferencia crudos, ya que el 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).

Dados estos antecedentes resulta interesante explorar nuevos sistemas y estrategias que permitan mejorar los niveles de expresión y que las proteínas sean funcionales. También deberá profundizarse en la expresión de nuevas proteínas antigénicas (Walmsley y Arntzen, 2000; Streatfield y Howard, 2003).

Asimismo, se han usado secuencias de retención para retículo endoplásmico y transformación de cloroplastos (Daniell y col., 2001; Streatfiel y col., 2001).



Sistemas de expresión

Figura 4. Comparación de costos en diferentes sistemas de expresión de proteínas heterólogas. (Streatfiel y col., 2001).

2.4.3. Vacunas contra VSR producidas en plantas

Las proteínas más estudiadas 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. 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 reportan nada sobre el balance inmunológico Th1 y Th2. Considerando el resultado obtenido en los intentos de vacunación que exacerban la respuesta inmune, y con base a las recomendaciones del Dr. Piedra quien ha trabajado en esta área (comunicación personal), es necesario probar diferentes epítopes tanto de la proteína F como de G y combinaciones de ambas intentando lograr una vacuna comestible que sea

inmunogénica e inmunoprotectora y que tenga un equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2.

2.5. Transformación genética de plantas

2.5.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium 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 bacteriana, 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 (Fig. 5) (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).

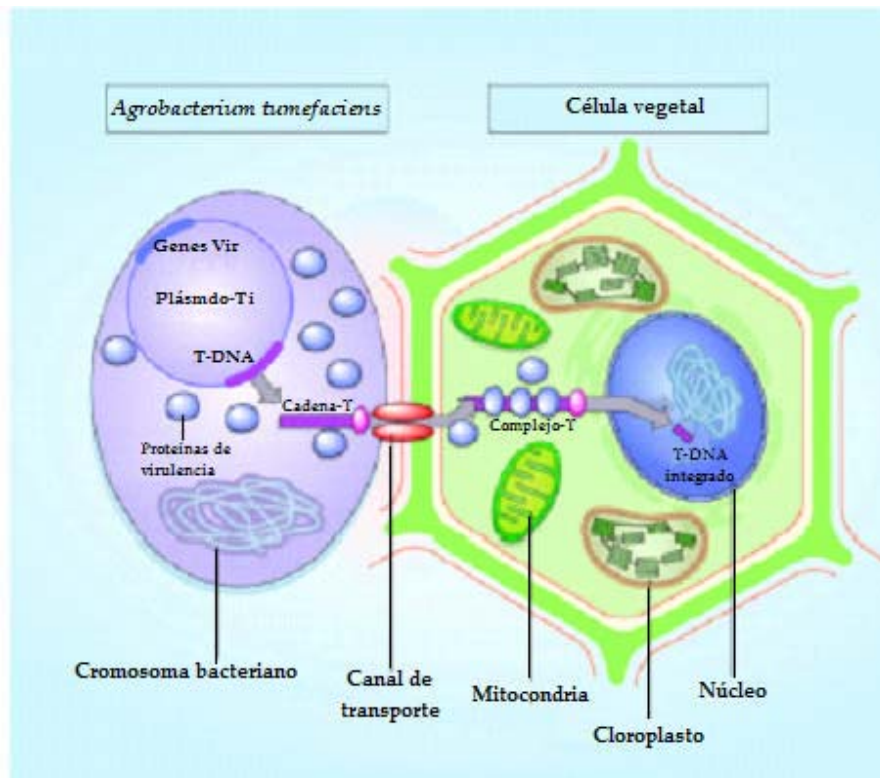


Figura 5. Transferencia de genes por *Agrobacterium tumefaciens* a células vegetales.

2.5.2. 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 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 microproyectiles, sin causar daño letal al tejido. Los microproyectiles 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 microproyectiles se colocan en la superficie de un

acarreador o macroproyectil que es generalmente impulsado por un choque de gas a alta velocidad. La trayectoria del macroproyectil es detenida a cierta distancia antes de llegar al blanco y de esta manera los microproyectiles 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).

2.5.2.1. 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, lo cual 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 (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).

2.6. Características de las plantas utilizadas

2.6.1. 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 más 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 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.

2.6.2. 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 comprobar la funcionalidad de los genes antes de realizar transformaciones en las plantas apropiadas que por lo general llevan un proceso de regeneración lento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Obtener y caracterizar plantas de tabaco y lechuga que produzcan péptidos antigénicos del virus sincicial respiratorio.

3.2. Objetivos específicos.

- Aislar los genes nativos de las proteínas F y G de VSR y clonarlos en vectores de transformación de plantas.
- Diseñar genes sintéticos con epítomos de los genes F y G de VSR y clonarlos en vectores de transformación nuclear y de cloroplastos de plantas.
- Transformar genéticamente plantas de tabaco y lechuga con las construcciones generadas tanto de genes sintéticos como nativos.
- Analizar las transformantes de tabaco y lechuga por PCR y ELISA.

4. MATERIAL Y EQUIPO

4.1. Material biológico

Material biológico	Proveedor
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa LBA4404	Cepario del Dr. W. Cress
<i>Escherichia coli</i> Top 10 F'	Donadas por el Dr. Gerardo Argüello Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
Semillas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) SR1 variedad Petite havana	Donadas por el Dr. S.S. Sorban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, U.S.A.
Semillas de lechuga de la variedad Green Wave	Donadas por el Dr. Masaru Nakano de la Universidad de Niigata, Japón

4.2. Vectores

Plásmido	Características	Proveedor
pGEM-T Easy	Vector de clonación	Promega, USA
pGA4	Vector de clonación	Cepario Laboratorio Dr. Alpuche
pMK	Vector de clonación	Cepario Laboratorio Dr. Alpuche
pBI-121	Vector binario que incluye un cassette de expresión con el promotor 35S completo del virus del mosaico de la coliflor, fusionado al gen <i>gusA</i> y al terminador NOS	Cepario del Dr. W. Cress
pKCZ	Vector para la transformación de cloroplastos de tabaco. Contiene sitios para recombinación entre los genes <i>trnR-ACG</i> y <i>trnN-GUU</i> , en la región de repetidos invertidos (IR), incluye un cassette de expresión del gen <i>aadA</i> bajo el promotor <i>Prrn</i> y el terminador <i>rbcl3'</i> .	Donado por el Dr Hans-Ulrich Koop del Instituto de Botánica de la Universidad de Munich, Alemania, mediante el Dr S.S. Sorban de la Universidad de Illinois en Urbana Champaign, U.S.A.

4.3. Reactivos

Reactivo	Proveedor
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	Phyto Technology Lab., USA
Ácido bórico	Sigma Chemical Co., USA
Ácido molibídico	Sigma Chemical Co., USA
Ácido naftalenacético (ANA)	Sigma Chemical Co., USA
Ácido nicotínico	Sigma Chemical Co., USA
Acetato de potasio	Sigma Chemical Co., USA
Acido clorhídrico	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Ácido fosfórico	J.T. Baker, USA
Agar grado bacteriológico	Invitrogen, USA
Agar grado micropropagación	Phyto Technology Lab., USA
Agarosa	Promega, USA
Albúmina de suero bovino	Sigma Chemical Co., USA
Alcohol isoamílico	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma Chemical Co., USA
Anticuerpo policlonal anti-FVSR	Serotec, USA
Antígeno purificado VSR	Serotec, USA
Azul de coomassie	Sigma Chemical Co., USA
Bencilaminopurina	Sigma Chemical Co., USA
Bicarbonato de sodio	J.T. Baker, USA
Bromuro de etidio	Promega, USA
Buffer de reacción para PCR	New England Biolabs, USA
Carbonato de sodio	Sigma Chemical Co., USA
Caseína	Phyto Technology Lab., USA
Cefotaxima	Laboratorios Kendrick, México
Cinetina	Phyto Technology Lab., USA

Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Cloruro de calcio	Riedel de Haen, USA
Cloruro de cobalto	PhytoTechnology Lab., USA
Cloruro de magnesio	Promega, USA
Cloruro de sodio	J.T. Baker, USA
Desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, USA
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB, USA
EDTA	Phyto Technology Lab., USA
Enzimas de restricción (<i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV, <i>Nco</i> I, <i>Pml</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Ssp</i> I, <i>Xba</i> I)	New England Biolabs, USA
Etanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Extracto de levadura	Fluka, USA
Fenol	Invitrogen, USA
Fosfato de potasio	J.T. Baker, USA
Fosfato de sodio	Sigma Chemical Co., USA
Fosfato monobásico de potasio	J.T. Baker, USA
Glicerol	Sigma Chemical Co., USA
Glicina	Riedel de Haen, USA
HEPES	USB, USA
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Hipoclorito de sodio	Cloralex, México
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V., México
Kanamicina	GIBCO BRL, USA
Kit para purificación de ADN de	Qiagen, USA

fragmentos de agarosa	
Kit Pico Green	Sigma Chemical Co., USA
Leche descremada	Svelty, Nestle, USA
Leupeptina	Sigma Chemical Co., USA
Manitol	Sigma Chemical Co., USA
Marcador de ADN de 1 kb	New England Biolabs, USA
Marcador de ADN de 100 pb	New England Biolabs, USA
Microdín	Laboratorio Lacami S.A. de C.V., México
Myoinositol	Phyto Technology Lab., USA
Nitrato de amonio	Sigma Chemical Co., USA
Nitrato de potasio	Riedel de Haen, USA
Oligonucleótidos	Invitrogen, USA
Piridoxina	Sigma Chemical Co., USA
Plásmido pGem-T easy	Promega, USA
PMSF	Sigma Chemical Co., USA
p-Nitro fenil fosfato	Sigma Chemical Co., USA
RNAsa	Roche, USA
Sacarosa	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato de cobre	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato de magnesio	Sigma Chemical Co., USA
Sulfato de manganeso	Sigma Chemical Co., USA
Sulfato de zinc	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato ferroso	Sigma Chemical Co., USA
T4 ADN Ligasa	New England Biolabs, USA
Taq ADN Polimerasa casera	Sintetizada en el laboratorio a partir de una cepa de <i>E. coli</i>
Taq ADN Polimerasa (<i>pfx</i>)	Invitrogen, USA
Terrazole	Uniroyal Chemical Co., USA
Tiamina	Phyto Technology Lab., USA

Tierra Cosmopeat	COSMOCEL, México
Tris base	Promega, USA
Tween 20	Sigma Chemical Co., USA
Yoduro de potasio	Riedel de Haen, USA

4.3. Equipo

- Agitador orbital de mesa con plataforma Daigger modelo MX2139E
- Autoclave eléctrica Sterilmatic modelo STM-E tipo C
- Balanza analítica eléctrica Scientech modelo SA210D
- Balanza granataria Ohaus modelo 1400
- Baño María digital Fisher Scientific modelo Isotemp 1025
- Bomba de vacío Felisa modelo FE 1402
- Cámara bioclimática Lumistell modelo Mac-510
- Cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD modelo minisub-cell GT
- Cámara fotográfica Sony Cyber Shot modelo DSCF717
- Campana de extracción de humos Fisher Alder modelo CS línea 2000
- Campana de flujo laminar Fisher Alder
- Campana de flujo laminar Lumistell modelo L-120
- Campana de flujo laminar Lumistell modelo LP-09
- Centrífuga refrigerada Kendro modelo Hareus Biofuge fresco
- Centrífuga Sorvall modelo RC 5C Plus
- Congelador Nieto modelo CVC15
- Cuarto de incubación de cultivos vegetales Lumistell
- Electroporador BTX modelo ECM 630
- Espectrofotómetro Beckman modelo DU 530
- Fluorómetro TECAN modelo Genios
- Fotodocumentador de geles UVP modelo EpiChemi3 Darkroom
- Fuente de poder Termo EC modelo EC105
- Homogenizador de tejidos Wheaton modelo 903475
- Horno de microondas LG modelo MS-217XQE
- Incubadora shaker New Brunswick Scientific modelo 12400

- Lector de microplacas BIO-RAD modelo 550
- Microcentrífuga Eppendorf modelo mini Spin
- Micropipetas Gilson
- Pistola de biobalística Bio-Rad PDS-1000/He biolistic
- Placa de calentamiento Corning modelo PC420
- Potenciómetro Orion 3 Star Termo Electro Corporation
- Refrigerador Torrey modelo R-14
- Tanque de Helio comprimido Praxair
- Termociclador Techne modelo Touchene Gradient
- Termociclador DNA Engine Bio Rad
- Termomezclador R Eppendorf modelo 22331
- Untracongelador Nuair modelo UN-6613A35
- Vortex Fischer Scientific modelo Genie – 2

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño de genes sintéticos para los epítomos de las proteínas F y G del virus sincicial respiratorio (VSR)

Se diseñaron dos genes sintéticos que comprenden una fusión de epítomos de la proteína F y la 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 fueron sintetizados por la compañía GeneArt.

Para determinar las regiones seleccionadas, se analizaron 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 (Parker y col., 1986) con base a la hidrofobicidad de los aminoácidos, además de 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 determinó fusionar tres epítomos de la proteína F, uno de la proteína G y dos adyuvantes utilizados en una fusión de epítomos de difteria tos ferina y tétanos (Soria-Guerra y col., 2007) unidos por un espaciador o linker (Cárdenas y Clements, 1993) el cual expone adecuadamente los epítomos; se agregaron sitios de restricción que permiten eliminar la secuencia del epítomo de la proteína G y facilitan la subclonación en los vectores de transformación.

Para la transformación en núcleo se añadió una secuencia SEKDEL para la fijación en el retículo endoplásmico y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI-121 (Fig 6).

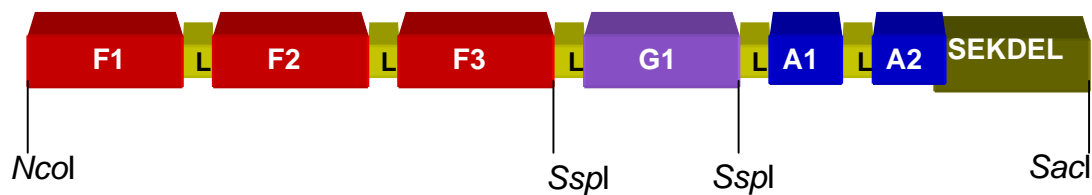


Figura 6. Gen sintético para transformación nuclear. F1, F2 y F3 epítomos del gen F; G1 epítomo del gen G; A1 y A2 adyuvantes de toxina tetánica; L linker; SEKDEL señal de retención en el retículo endoplásmico. Se muestran sitios de restricción.

Para transformación en cloroplastos se añadió un sitio de unión a ribosoma y sitios de restricción para ser clonado en un vector de transformación de cloroplastos pKCZ (Fig. 7).

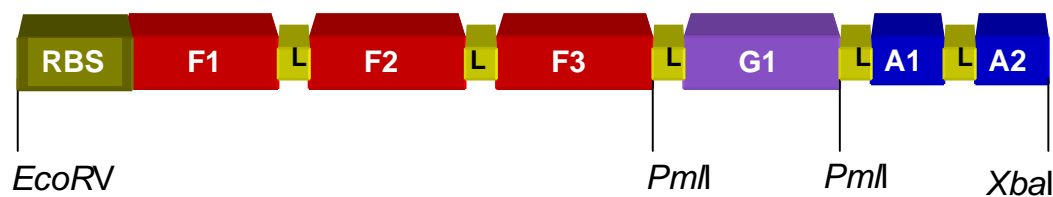


Figura 7. Gen sintético para la transformación de cloroplastos. RBS, sitio de unión a ribosoma; F1, F2 y F3 epítomos del gen F; G1, epítomo del gen G; A1 y A2 adyuvantes de toxina tetánica; L, linker.

5.2. Obtención de los genes nativos F y G de VSR

Se diseñaron oligonucleótidos basados en regiones altamente conservadas en alineamientos de las secuencias reportadas para el virus sincicial respiratorio humano en el GenBank para los genes F y G de VSR (No de acceso: AM040047, AY198175, AY525557, DQ885231, L25351, U31561, X02221 y Z25524 para el gen F; AF065254, AF233900, AF348825, AY927408, M11486 y M17213 para el gen G) (Fig. 8).

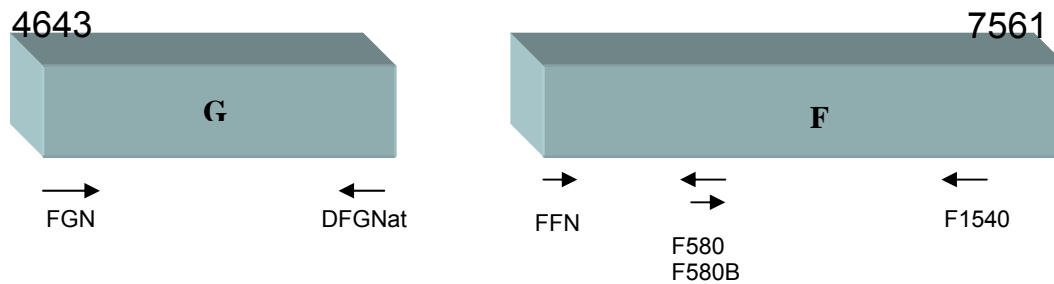


Figura 8. Esquema de diseño de oligonucleótidos para aislar los genes nativos.

Se partió de ARN viral aislado de pacientes con infección por VSR proporcionados por el Dr. Noyola-Cherpitel (Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UASLP). Se sintetizó el cDNA con el kit de Applied Biosystems (Taq Man, Reverse transcription reagents cat. N808-0234) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se comprobó la calidad del cDNA amplificando un fragmento del gen L de VSR que es altamente conservado y se ha reportado que es usado para diagnóstico molecular.

Con los oligonucleótidos F580B y F1540 se amplificó un fragmento de 900pb del gen nativo y la región en donde se incluyen los tres epítomos utilizados en la construcción del gen sintético, este fragmento servirá para comparar la respuesta inmune generada por esta región del gen nativo contra la de los genes sintéticos. El producto de PCR fue secuenciado en el CINVESTAV-IPN campus Irapuato y se confirmó que pertenece al gen F de VSR como se describe en la sección de Resultados.

Con los oligonucleótidos FGN y DFGNat se amplificó el fragmento de 700 pb que corresponde a la proteína G de VSR.

5.3. Construcciones genéticas

5.3.1. Construcciones para transformación nuclear

5.3.1.1. Estrategia general

Las reacciones de digestión y ligación de ADN se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor (T4 DNA ligasa y enzimas de restricción New England Biolabs). Estas reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1% (en TAE 1X), que fueron teñidos con bromuro de etidio (0.01%) y observados en un fotodocumentador UVP bajo luz UV.

Las construcciones para transformación nuclear fueron subclonadas en el vector binario pBI-121, sustituyendo el cassette del gen reportero GUS con el gen de interés; este vector dirige la expresión del gen con el promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) y contiene un gen de selección que confiere resistencia a kanamicina a las células vegetales transformadas.

Para eliminar el gen reportero GUS se realizó una digestión con la enzima de restricción *Sma* I. Posteriormente se purificó el plásmido digerido y se realizó otra digestión con la enzima *Sac* I, el vector se purificó nuevamente con el kit QIAquick gel extraction (Qiagen).

En el laboratorio se cuenta con una construcción que contiene un 5' UTR de 120 pares de bases TEV (tobacco etch virus), el cual se ha comprobado es un potenciador de la traducción (Carrington y Freed, 1989). Para añadir este TEV a nuestras construcciones se realizó un PCR amplificando el 5' UTR más el gen LTB-ST presentes en la construcción con la región UTR mencionada, para lo cual se utilizó como oligonucleótido sentido el del TEV y como antisentido el de LTB-ST. Posteriormente se realizó una digestión con la enzima *Nco* I el fragmento de 120pb se purificó del gel de agarosa.

Para obtener las construcciones se realizaron ligaciones triples en los sitios *Sma* I, *Nco* I y *Sac* I. Con estas construcciones se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (ver Apéndice 9.1). Las clonas resistentes a kanamicina se propagaron para aislar ADN plasmídico de acuerdo a Sambrook y col. (1989). El ADN de las clonas

obtenidas se analizó y se observó su perfil de restricción con las enzimas *Xba* I y *Sac* I.

5.3.1.2. Clonación del gen G nativo en el vector pBI-121

El fragmento de 700pb correspondiente al gen G nativo de VSR obtenido mediante PCR se clonó en el vector pGem-Easy, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (ver Apéndice 9.1). Las clonas resistentes a ampicilina se propagaron para aislar ADN plasmídico de acuerdo a Sambrook y col. (1989), al ADN de las clonas se le realizó una digestión con la enzima *Eco* RI, y un análisis por PCR con oligonucleótidos específicos para el gen. Una vez obtenidas las clonas positivas se realizó una digestión con las enzimas *Nco* I y *Sac* I y se subclonó el plásmido pBI-121 obteniendo la construcción pBI-VSRG

5.3.1.3. Clonación del fragmento del gen F nativo en el vector pBI-121

El fragmento de 900pb del gen F de VSR obtenido mediante PCR se clonó en el vector pGem-Easy, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (ver Apéndice 9.1). Las clonas resistentes a ampicilina se propagaron para aislar ADN plasmídico de acuerdo a Sambrook y col. (1989), al ADN de las clonas se realizó una digestión con la enzima *Eco*RI, y un análisis por PCR con oligonucleótidos específicos para el gen. Una vez obtenidas las clonas positivas se realizó una digestión con las enzimas *Nco* I y *Sac* I y se subclonó el plásmido pBI-121 obteniendo la construcción pBI-VSR F.

5.3.1.4. Clonación del gen sintético VSRsn en el vector pBI121

Se empleó un gen sintético VSRsn que fue optimizado para su expresión en plantas de acuerdo al uso preferencial de codones y sintetizado por la compañía GeneArt. El gen VSRsn fue liberado del vector de clonación pGA4 por digestión con las enzimas de restricción *Nco* I y *Sac* I. Los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% y el fragmento obtenido (480 pb) se cortó y purificó empleando el kit QIAquick gel extraction de Qiagen. A la par se digirió el

plásmido pBI-121 para eliminar el gen GUS, junto con el TEV 5'UTR obtenido anteriormente, se realizó la ligación triple empleando T4 ADN ligasa para dar lugar al plásmido pBI-VSR.

5.3.1.5. Construcción pBI-VSRsn sin la secuencia del epítipo de la proteína G

El gen sinético VSRsn contiene secuencias para tres epítipos de la proteína F y uno de la proteína G, esta última región está flanqueada por los sitios de restricción *Pml* I, para eliminar el epítipo de la proteína G se realizó una digestión con esta enzima y se religó el vector, dando lugar a la construcción pBI-VSR Δ G. El objetivo es tener una construcción sin esta región para comparar la respuesta inmunológica en ratones contra la construcción que contiene regiones antigénicas F y G.

5.3.2. Construcciones para transformación de cloroplastos

5.3.2.1. Clonación del gen VSRsc en el vector pKCZ

En el laboratorio se cuenta con una construcción en el vector pKCZ, la cual contiene el cassette bicistrónico que expresa el gen de la ubiquitina-protegrina y el gen de selección a espectinomicina (Patiño-Rodríguez, 2006); esta construcción fue digerida con las enzimas *Eco* RV y *Xba* I para liberar el gen de la ubiquitina-protegrina, a la par se digirió con las mismas enzimas el plásmido pMK que contiene el gen VSRsc. El gen se libera con estas enzimas y se liga en el vector pKCZ con esta ligación se transformaron células competentes de *E. coli* top 10 F'y se analizaron las clonas por perfil de restricción y por análisis de PCR.

5.3.2.2. Construcción pKCZ-VSRsc sin la secuencia el epítipo de la proteína G

El gen sintético VSRsc contiene secuencias para tres epítipos de la proteína F y uno de la proteína G, esta última región está flanqueada por los sitios de restricción *Ssp* I, para eliminar el epítipo de la proteína G se realizó una digestión con esta enzima y se religó el vector, dando lugar a la construcción pKCZ-VSR Δ G.

El objetivo de contar con esta construcción es similar a la planteada en la sección 5.3.1.5.

5.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para transferir la construcción pBI-LTB a *Agrobacterium tumefaciens*, se empleó la técnica de electroporación. Se prepararon células competentes de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col. (1991) (ver Apéndice 9.2). Se agregaron 3.0 μ l de ADN a 50 μ l de células competentes y después de incubar en hielo por 2 minutos se transfirieron 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) en un equipo BTX Mod. 630. Inmediatamente se añadió 1.0 ml de medio de cultivo YM (apéndice 10.5.13), se transfirió la solución a un tubo Eppendorff de 1.5 ml y las células se recuperaron a 28°C por dos horas. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, se resuspendió la pastilla en 200 μ l de medio de cultivo YM y se inocularon en el medio de selección (YM con 50 mg/L de kanamicina) para su cultivo por 3 días a 28°C y 150 rpm. Solo las bacterias transformadas se desarrollan en el medio de selección, debido a que el plásmido transferido confiere resistencia a kanamicina.

5.5. Estandarización del proceso de obtención de plantas transgénicas de lechuga y tabaco

5.5.1. Lechuga

Debido a los múltiples factores que influyen en la eficiencia tanto de regeneración como de la transformación genética de plantas, es frecuente encontrar poca reproducibilidad en los protocolos reportados. Con anterioridad (Martínez-González, 2005), se probaron tres protocolos para la transformación de lechuga, a fin de ensayar su eficiencia en nuestro laboratorio: Curtis y col., (1994), Nakano y col., (2003) y Pileggi y col., (2001) (Tabla 1) y se concluyó que una combinación de los tres métodos era la mejor opción, por lo cual en esta ocasión la metodología usada para la regeneración y transformación de plantas de lechuga es un

compendio de las tres (Tabla 2). Se empleó el medio descrito por Murashige y Skoog (1962; ver Apéndice 9.5.3) y los cultivos se incubaron a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad en el cuarto de cultivo de tejidos.

5.5.1.1. Obtención de hojas cotiledonarias

Para obtener los explantes iniciales (hojas cotiledonarias) se utilizaron semillas de lechuga de las variedades Green Wave y local de hoja suelta, las cuales se esterilizaron con etanol al 70% por un minuto. Después, se enjuagaron con agua destilada estéril y se agregaron 100 ml de hipoclorito de sodio comercial al 20%, tween 20 (5 gotas) y el desinfectante comercial Microdín (5 gotas), agitando por 10 minutos. Posteriormente se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril por tres minutos y se sembraron en medio MS. A los siete días, de las plántulas obtenidas se cortaron las hojas cotiledonarias, que se emplearon para los ensayos de regeneración y transformación genética.

5.5.1.2. Ensayos de regeneración

Un prerrequisito importante para contar con un sistema de transformación genética es establecer un sistema de regeneración *in vitro* eficiente. En el laboratorio tenemos estandarizada la regeneración de lechuga de las variedades Green Wave, Grand Rapids y una variedad local de hoja suelta. En este trabajo utilizamos la variedad Green Wave ya que es la que mejor resultados nos dió en estudios anteriores (Martínez-González, 2005).

Se colocaron 10 hojas cotiledonarias en medio de cultivo MSJ (Apéndice 9.5.12). Los explantes fueron subcultivados en medio fresco a las dos semanas, y a los 30 días se evaluó la formación de callos y se cambiaron a medio MS104 (Apéndice 9.5.12) para la formación de brotes; una vez que se obtuvieron brotes definidos, se colocaron en medio MS para inducir la generación de raíz. Las plantas se transfirieron a tierra estéril después de eliminar el medio de cultivo adherido a las raíces y de aplicar una solución del antifúngico Terrazole (1.0 g/l), cubriendo las macetas con una bolsa de plástico para evitar el estrés hídrico la

cual fue perforada gradualmente. Las plantas fueron transferidas a una cámara bioclimática para la obtención de semillas.

5.5.2. Tabaco

En el laboratorio se ha trabajado con anterioridad con plantas de tabaco siguiendo el protocolo de regeneración descrito por en Daniell y col. (2004), en el cual se utiliza como explante inicial hojas jóvenes y como medio de regeneración el RMOP (Apéndice 9.5.12).

Se esterilizaron semillas de tabaco como se describió para las semillas de lechuga. Se colocaron en botes con medio de cultivo (1-3 semillas por bote), a las 3 o 4 semanas después de la germinación se separaron las hojas y se cortaron en fragmentos de 0.5 x 1.0 cm, estos fueron colocados en medio RMOP y subcultivados en medio fresco cada dos semanas; a las cuatro semanas se cortaron los brotes definidos y se colocaron en medio MS sin reguladores de crecimiento para la obtención de raíz, una vez formada la raíz se transfirieron las plantas a tierra.

5.6. Ensayos de transformación genética nuclear vía *A. tumefaciens*

5.6.1. Lechuga

Se utilizaron 300 cotiledones por experimento que fueron heridos con un bisturí, éstos fueron colocados en el medio MSO (ver Apéndice 9.5.12) para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una solución 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 correspondiente. Pasado el periodo de cocultivo (dos días), los explantes se transfirieron al medio de selección (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, seleccionando solo los explantes resistentes a la selección.

Tabla 1. Descripción de los protocolos empleados en la estandarización de la transformación genética de lechuga.

Variable	Protocolo		
	Pileggi y col. (2001)	Nakano y col. (2003)	Curtis y col.(1994)
Variedad de lechuga	Local de "hoja suelta"	Green Wave	Green Wave
Explante utilizado	Cotiledones cortados en 4-6 partes	Cotiledones cortados en 6-8 partes	Cotiledones heridos con bisturí, por la cara abaxial
Carga bacteriana medida en DO _{600nm}	No especificada, (se ajustó a 0.2)	0.2	1.1-1.6
Tiempo de exposición a la bacteria	Un minuto	Un minuto	5-10 minutos en dilución 1:10 de la bacteria.
Tiempo de cocultivo	3 días	3 días	2 días
Medio de cocultivo	MS104 ^a	MSJ ^a	UM ^a
Medio de regeneración	MS104	MSJ	MS 104
Medio de enraizamiento	MSP ^a	MS ^a	MS

^a Ver Apéndice 9.5.12

Tabla 2. Descripción del protocolo usado para la transformación genética de lechuga en este trabajo.

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)

5.6.2. Tabaco

Se utilizaron de 3 a 5 hojas de cuatro semanas de edad por experimento, éstas se cortaron en fragmentos de 0.5 x 1.0 cm sobre papel filtro estéril, los cuales se colocaron en medio MSO para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una solución de *A. tumefaciens* (DO 0.2) que portaba el plásmido de interés durante 10 minutos. Después de eliminar el exceso de bacterias con papel absorbente estéril, se colocaron en el medio RMOP sin antibiótico durante dos días. Pasado el periodo de cocultivo, los explantes se transfirieron al medio RPMOP con 200 mg/L de kanamicina adicionado con 500 mg/L de cefotaxima para eliminar a la agrobacteria. Los tejidos fueron subcultivados cada dos semanas, seleccionando solo los explantes resistentes a la selección, que fueron

colocados en medio de enraizamiento para posteriormente transferirse a tierra tomando cuidados similares a las plántulas de lechuga.

5.7. Ensayos de transformación genética de cloroplastos por el método de biobalística

5.7.1. Obtención del explante

Se obtuvieron en condiciones de esterilidad hojas de tabaco de cuatro semanas de edad (esterilizando las semillas y germinando *in vitro* como ya se describió), estas se colocaron en medio RMOP con la cara abaxial hacia arriba.

5.7.2. 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.

Se pesaron 50 mg de partículas de oro 0.6 μ m (Bio-Rad) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de etanol grado reactivo al 100% y se mezclaron en vórtex durante 3 minutos, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol grado reactivo al 70% y se mezcló con vórtex durante 2 minutos. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando cada 5 minutos, se centrifugó por 3 minutos a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de agua estéril, y se mezcló con vórtex durante 1 minuto, hasta que las partículas estuvieron resuspendidas completamente. Se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto para permitir que las partículas se fueran hacia el fondo. Se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 rpm, y se descartó el sobrenadante. Estos lavados se repitieron cinco veces, finalmente se agregaron 850 μ l de glicerol al 50%. La suspensión partículas de oro preparadas se almacenaron a -20°C hasta al momento de usarlas.

5.7.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco

5.7.3.1. Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés

La suspensión de partículas de oro previamente preparadas se mezcló en vórtex hasta estar completamente resuspendidas. Se tomaron 50µl de estas partículas y en estricto orden se agregaron: 10 µl de ADN plasmídico de concentración 1 µg/µl, 50 µl de CaCl₂ 2.5M recién preparado, 20µl de espermidina 0.1M; después de añadir cada solución se agitó con vórtex durante 5 segundos, posteriormente se mezcló con vórtex durante 20 min a 4°C; se agregaron 200 µl de etanol absoluto a temperatura ambiente y se mezcló en vórtex, durante 5 segundos, la mezcla fue centrifugada durante 30 segundos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se repitieron los lavados con etanol durante al menos 5 veces, hasta que las partículas de oro eran fácilmente resuspendidas. El paso final fue resuspender las partículas en 35µl de etanol al 100% y se dejan en hielo hasta su uso. Este material se utilizó para 6 bombardeos.

5.7.3.2. Bombardeo de las hojas de tabaco (Pistola Bio-Rad)

Se utilizaron discos de ruptura de 1,100 psi. La presión del manómetro de salida se ajustó a 1,400 psi, ya que la presión de salida debe ser mayor a la resistencia del disco de ruptura. Se encendió la bomba de vacío y la cámara de vacío para realizar los disparos. Se colocaron 6µl de la suspensión de micropartículas con ADN en los macroacarreadores previamente esterilizados con etanol, se colocó la caja petri con la hoja, a 9 cm de distancia y se cerró la cámara de vacío. Se generó vacío hasta que el indicador marcó 15 Hg (mm de mercurio). Se mantuvo el vacío y se realizó el disparo de las micropartículas con el ADN. 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. Se seleccionaron los explantes resistentes al agente de selección.

5.8. Análisis de transformantes

Las líneas resistentes al agente de selección fueron analizadas por PCR y por ELISA, para comprobar la presencia del transgén y la antigenicidad de la proteína.

5.8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

5.8.1.1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se aisló de tejido vegetal siguiendo el protocolo de Michiels y col. (2002). Se congelaron 50 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido, se trituraron en un tubo Eppendorff con un pistilo de plástico y se adicionaron 750 µl de buffer de extracción a 60°C [Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, β-mercaptoetanol 0.2%, (PVP 2%, CTAB 2% inmediatamente antes de usarse)]. Se incubó a 65°C por 60 minutos con mezclado ocasional para evitar agregaciones en el homogenizado, se añadió 750 µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) sobre el extracto, se agitó con vórtex, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se transfirió la fase superior a otro tubo y se repitió la extracción hasta limpiar la fase acuosa; ésta se mezcló con 500 µl de isopropanol y se incubó a 25°C por toda la noche, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en 750 µl de solución de lavado (acetato de amonio 10mM, etanol 70%) y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, se centrifugó por 5 minutos y se repitió el lavado, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire, se resuspendió en 50 µl de agua milli Q con RNasa en una concentración final de 10 g/ml, se incubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se añadió un volumen de fenol cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó para formar una emulsión, se centrifugó por 5 minutos, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo alcohol isoamílico (24:1). Se añadió NH₄Ac 7.5 M, pH 7.7 en una concentración final de 2.5 M y dos volúmenes de etanol frío, se mezcló e incubó a -20°C por 30 minutos, se precipitó por centrifugación a 13,000 rpm por 10 minutos. Se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%, se secó a 37 °C y se resuspendió en 30 µl de agua milli Q; el ADN se almacenó a -20°C.

Para la cuantificación de ADN se empleó un fluorómetro Tecan modelo genios, empleando el kit Pico Green. Se preparó una dilución de Pico Green 1:400 en TE 1X y se colocaron 198 μL de esta solución en placas de 96 pozos. Se añadieron 2 μL de la solución problema y se realizó la medición de fluorescencia (a 485nm excitación/535nm emisión). Para la curva de calibración se emplearon estándares de 1,10 y 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y los datos fueron analizados en el software Magellan 4.

El rendimiento promedio de ADN fue de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.8.1.2. Protocolo de PCR

Oligonucleótidos empleados

En la Tabla 3 se describen los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diferentes transgenes.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en las diferentes reacciones de amplificación.

Nombre	Secuencia	Gen para el que fue diseñado
FGN	TAGCCATGGCCAAAACAAGGACC	G
RGDNat	CTCRGCMAAYCACAAAGTYAC	G
FFN	TATCCATGGAGTTGCTAATCCTCA	F
F580	GAGGTCTTAACACTTTGCTGGTTAA	F
F580B	CCAGCAAAGTGTTAGACCTCC	F
F1540	CATTGACTTGAGATATTGATGCATG	F
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), MgCl₂ (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 4.

Tabla 4. Protocolos de PCR para las amplificaciones de los diferentes genes.

Gen	Tamaño de amplicón (pb)	Oligonucleótido	Condiciones				
			Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
F Nativo	900	F580B + RF1540	5 min 94°C	30 s 94°C	30 s 55°C	1 min 72°C	7min 72°C
G Nativo	750	FGN+FGDNat			30 s 53°C		
VSR Nuclear	480	FSN + RSN		20 s 49°C	30 seg. 72°C	5 min 72°C	
VSR Nuclear fragmento	120	FSN + RSNint		20 s 51°C			
VSR Cloroplasto	460	FSC+RSC		20 s 51°C			
VSR Cloroplasto fragmento	220	FSC+RSCint		20 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.

5.8.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

5.8.2.1. Extracción de proteína total soluble

Se homogenizaron 100 mg de tejido vegetal en 500 μ l de buffer de extracción (PBS, PMSF 0.1% y leupeptina 10 μ g/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 colocó 1 μ l de la solución problema y se añadió 1.0 ml del reactivo de Bradford, se midió la absorbancia a 595 nm. Se empleó albúmina de suero bovino como estándar (5-20 ng/ μ l).

5.8.2.2. Protocolo de ELISA

Se siguió un protocolo estandarizado por Clark y Adams en 1977. Entre cada uno de los pasos los pozos fueron lavados tres veces con 300 μ l de PBST (PBS+Tween20, 0.05%) (Ver Apéndice 9.5.17) Las placas fueron sensibilizadas con 500ng de proteína total soluble en buffer de carbonatos (ver Apéndice 9.5.18) durante toda la noche, posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de leche descremada al 5%. Después los pozos se incubaron a 37°C en presencia del anticuerpo policlonal de ratón anti-FVSR (1:1000) durante 4 horas y en seguida con el anti-anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de ratón 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) (ver Apéndice 9.5.19) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y al abrigo 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.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Diseño de genes sintéticos para los epítomos de las proteínas F y G del virus sincicial respiratorio (VSR)

Existen reportes de vacunas generadas en plantas para el VSR que expresan el gen de la proteína F (Shandu y col., 2000) o epítomos de la proteína G completos (Belanger y col., 2000), aislados directamente del virus, que indican que han resultado inmunogénicos y, en el caso de los epítomos de la proteína G, inmunoprotectores. Sin embargo el Dr. Piedra de la Escuela de Medicina de Baylor de Houston Texas, nos informó en una visita que hizo a San Luis Potosí, que al probar estos extractos de genes completos su protección no era eficiente y que los últimos esfuerzos en su grupo para generar vacunas contra VSR se han encaminado a incluir regiones antigénicas de todo el genoma pero que eviten los efectos secundarios y reduzcan la respuesta exacerbada Th2. Una tendencia es generar mutantes las cuales son probadas en ratones previo a su evaluación clínica. Por otro lado, 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 total soluble (Haq y col., 1995); y que la expresión de epítomos 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 dos genes sintéticos optimizados con el uso de codones para la expresión en lechuga por transformación nuclear y otro para transformar cloroplastos.

Para seleccionar las regiones incluidas en los genes sintéticos, se analizaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas F y G con el programa Antheprot, que determina las regiones inmunogénicas dando un valor a cada aminoácido de acuerdo a sus características (hidrofobicidad, estructura, entre otras) (Parker y col., 1986) por otro lado, se tomaron en cuenta estudios previos de las regiones inmunogénicas de la proteína F (López y col., 1998); y de un epítomo de la proteína G expresado en plantas que resultó ser inmunogénico e inmunoprotector (Belanger y col., 2000). Con base a lo anterior se determinó

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 adyuvantes utilizados en una fusión de epítomos de difteria, tos ferina y tétanos (Soria-Guerra y col., 2007) unidos por un linker reportado por Cárdenas y Clements en 1993.

Para la transformación en núcleo se añadió una secuencia SEKDEL para la fijación en el retículo endoplásmico y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI-121.

Para transformación en cloroplastos se añadió un sitio de unión a ribosoma y sitios de restricción para ser clonado en un vector de transformación de cloroplastos, pKCZ.

Algunas vacunas generadas contra el VSR han resultado con una respuesta exacerbada y dañina del sistema inmune; algunos autores adjudican esto a la proteína G, (Shandu y col., 1999). Es por esto que los genes se diseñaron de manera que el epítomo de la proteína G quede flanqueado por sitios de restricción que permitan eliminarlo de la construcción para expresar sólo los epítomos de la proteína F y comparar la respuesta en ratones con la construcción que sí contiene al epítomo de G.

En la Tabla 5 se muestran las secuencias de los epítomos seleccionados para el diseño de los genes sintéticos; en la Figura 9 se muestran los resultados del programa *AntheProt* y las Figuras 10 y 11 muestran las secuencias finales de los genes sintéticos, estos genes fueron optimizados para su expresión en lechuga (tanto nuclear como en cloroplasto) con base al uso de codones en plantas y al análisis para evitar secuencias desestabilizantes del ARNm y fueron sintetizados por la compañía GeneArt.

Tabla 5. Epítomos seleccionados para diseñar los genes sintéticos de VSR.

Descripción	Aminoácidos	Secuencia
Epítopo 1 F	261-273	INDMPITNDQKKL
Epítopo 2 F	378-391	EINLCNVDIFNPKT
Epítopo 3 F	431-451	IIKTFSNGCDYVSNKGMDTV
Epítopo 1 G	170-191	FVPCSICSNPTCWAICKRIPE
Adyuvante 1 (toxina tetánica)	-	QYIKANSKFIGITE
Adyuvante 2 (toxina tetánica)	-	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
Señal de retención RE	-	SEKDEL
Linker o espaciador	-	DPRVPSS

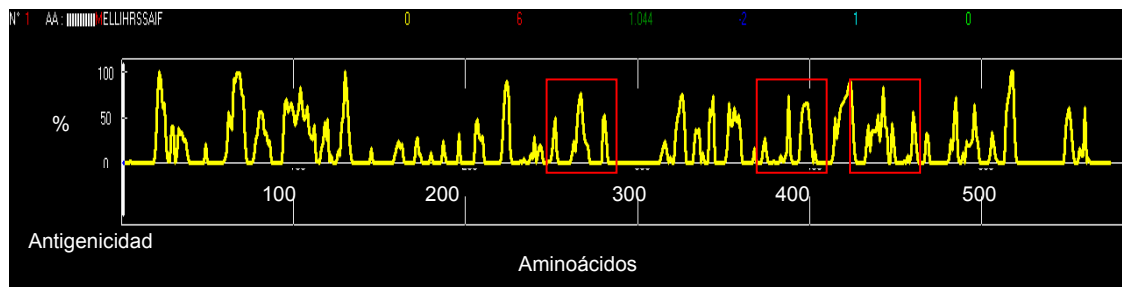
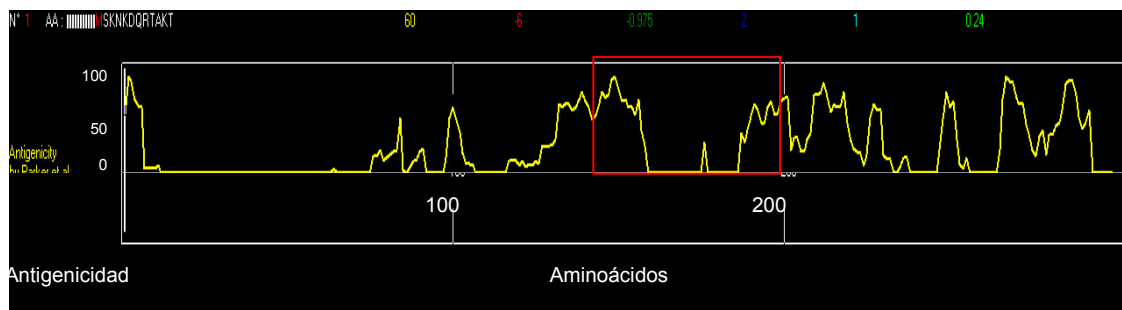
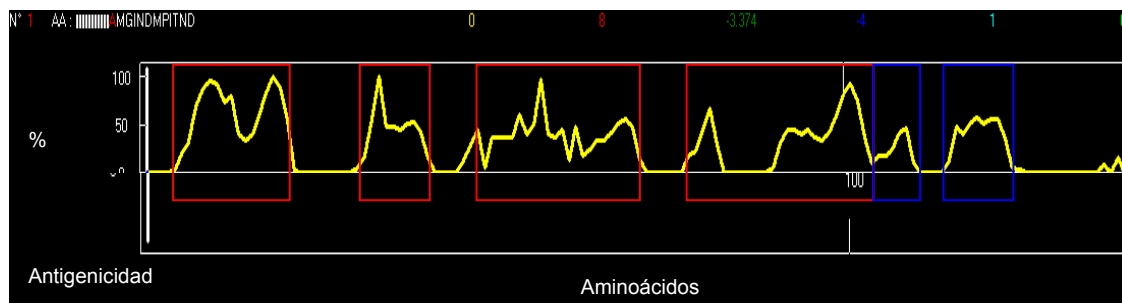
A.

B.

C.


Figura 9. Análisis de las secuencias de los genes sintéticos por medio del programa *Antheprot*. A) Secuencia de la proteína F del VSR nativo, en los recuadros se muestran los picos de antigenicidad que corresponden a los epítomos seleccionados. B) secuencia de proteína G del VSR nativo, en el recuadro se muestra el pico de antigenicidad del epítomo seleccionado. C) Secuencia del péptido sintético, en los recuadros se muestran los picos de antigenicidad de los epítomos (rojo) y de los adyuvantes (azul), como se puede ver la secuencia correspondiente a los espaciadores o linkers no muestra pico de antigenicidad.

Secuencia original	GCC ATG GGA ATC AAT GAT ATG CCT ATA ACA AAT GAT
Secuencia optimizada	GCC ATG GGA ATC AAC GAT ATG CCA ATC ACC AAC GAT
Secuencia aminoácidos	A M G I N D M P I T N D
CAG AAA AAG TTA GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG GAA ATA AAT CTC TGC AAT GTT	
CAA AAG AAG TTG GAT CCA AGA GTT CCA TCC TCC GAG ATC AAC TTG TGC AAC GTG	
Q K K L D P R V P S S E I N L C N V	
GAC ATA TTC AAC CCC AAA TAT GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG ATC ATA AAG ACA	
GAT ATC TTC AAC CCA AAG ACC GAT CCT AGA GTG CCA TCT TCC ATC ATC AAG ACC	
D I F N P K T D P R V P S S I I K T	
TTT TCT AAC GGG TGC GAT TAT GTA TCA AAT AAA GGG ATG GAC ACT GTC TCT AAT	
TTC TCC AAC GGT TGC GAT TAC GTG TCT AAC AAG GGA ATG GAT ACC GTG TCC AAT	
F S N G C D Y V S N K G M D T V S N	
ATT GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG TTT GTA CCC TGC AGC ATA TGC AGC AAC AAT	
ATT GAT CCA AGA GTG CCT TCA TCT TTC GTG CCA TGC TCC ATT TGT TCT AAC AAC	
I D P R V P S S F V P C S I C S N N	
CCA ACC TGC TGG GCT ATC TGC AAA AGA ATA CCA GAG AAT ATT GAT CCC CGG GTA	
CCA ACC TGC TGG GCA ATC TGC AAG AGA ATC CCA GAG AAT ATT GAT CCT AGA GTT	
P T C W A I C K R I P E N I D P R V	
CCG AGC TCG CAG TAT ATA AAA GCA AAT TCT AAA TTT ATA GGT ATA ACT GAA GAT	
CCA AGT TCC CAA TAC ATC AAG GCC AAC TCC AAG TTC ATT GGT ATC ACC GAG GAT	
P S S Q Y I K A N S K F I G I T E D	
CCC CGG GTA CCG AGC TCG GAA TTT AAT AAT TTT ACC GTT AGC TTT TGG TTG AGG	
CCT AGA GTT CCT TCC TCC TTC AAC AAC TTC ACC GTG TCT TTC TGG TTG AGA GTT	
P R V P S S F N N F T V S F W L R V	
GTT CCT AAA GTA TCT GCT AGT CAT TTA GAA AGT GAA AAA GAT GAG TTG TAG GAG	
CCA AAG GTG TCC GCA TCT CAT TTG GAG TCT GAG AAG GAT GAG TTG TGA TGA GAG	
P K V S A S H L E S E K D E L Stop Stop E	
CTC	
CTC	
L	

Figura 10. Secuencia del gen sintético VSRsn optimizado para su expresión en lechuga. Codones en naranja corresponden a la secuencia original, los nucleótidos en negro corresponden a los cambios realizados para optimizar su expresión en plantas. En azul se muestra la secuencia de aminoácidos.


```

Secuencia original      GAT ATC TTA ATT AAC TGA AGT TGT AGG GAG GGA TTT
Secuencia optimizada   GAT ATC TTA ATT AAC TGA AGT TGT AGG GAG GGA TTT
Secuencia Aminoácidos  D I L I N Stop S C R E G F

ATG ATC AAT GAT ATG CCT ATA ACA AAT GAT CAG AAA AAG TTA GAT CCC CGG GTA
ATG ATC AAT GAT ATG CCT ATT ACT AAT GAT CAA AAA AAA CTT GAT CCT CGT GTT
M I N D M P I T N D Q K K L D P R V

CCG AGC TCG GAA ATA AAT CTC TGC AAT GTT GAC ATA TTC AAC CCC AAA TAT GAT
CCT TCT TCT GAA ATA AAT TTG TGT AAT GTT GAT ATT TTC AAT CCT AAA ACT GAT
P S S E I N L C N V D I F N P K T D

CCC CGG GTA CCG AGC TCG ATC ATA AAG ACA TTT TCT AAC GGG TGC GAT TAT GTA
CCT AGA GTA CCT TCT TCT ATT ATC AAA ACT TTC TCT AAT GGT TGT GAT TAT GTT
P R V P S S I I K T F S N G C D Y V

TCA AAT AAA GGG ATG GAC ACT GTC TCT CAC GTG GAT CCC CGG GTA CCG AGC AGC
TCT AAT AAA GGA ATG GAT ACT GTT TCT CAC GTG GAC CCT CGT GTA CCT TCT TCT
S N K G M D T V S H V D P R V P S S

TCG TTT GTA CCC TGC AGC ATA TGC AGC AAC AAT CCA ACC TGC TGG GCT ATC TGC
TTC GTT CCT TGT TCT ATT TGT TCT AAT AAT CCT ACT TGT TGG GCT ATC TGT AAA
F V P C S I C S N N P T C W A I C K

AAA AGA ATA CCA GAG CAC GTG GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG CAG TAT ATA AAA
CGT ATT CCT GAA CAC GTG GAC CCT AGA GTT CCT TCT TCT CAA TAT ATC AAA GCT
R I P E H V D P R V P S S Q Y I K A

GCA AAT TCT AAA TTT ATA GGT ATA ACT GAA GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG GAA
AAT TCT AAA TTC ATT GGT ATT ACT GAA GAT CCT CGT GTT CCT TCT TCT TTC AAT
N S K F I G I T E D P R V P S S F N

TTT AAT AAT TTT ACC GTT AGC TTT TGG TTG AGG GTT CCT AAA GTA TCT GCT AGT
AAT TTC ACT GTT TCT TTC TGG CTT CGT GTT CCT AAA GTT TCT GCT TCT CAT CTT
N F T V S F W L R V P K V S A S H L
CAT TTA GAA TAG TAA
GAA TAA TGA AAG CTT
E Stop Stop L E
    
```

Figura 11: Secuencia del gen sintético VSRsc optimizado para su expresión en cloroplastos de lechuga. Codones en naranja corresponden a la secuencia original, los nucleótidos en negro corresponden a los cambios realizados para optimizar su expresión en plantas. Se presenta en azul la secuencia de aminoácidos.

6.2. Obtención de los genes nativos F y G de VSR

En el laboratorio se cuenta con muestras de ARN de VSR donadas por el Dr. Noyola-Cherpitel; se seleccionaron algunas de ellas y se sintetizó cDNA, con el cual se amplificó un fragmento del gen L de VSR para comprobar la presencia del virus y la calidad del cDNA (Fig. 12). El gen L se ha reportado como un gen muy conservado y es usado para diagnóstico molecular en un proyecto conjunto del grupo del Dr. Alpuche-Solís y el Dr. Noyola-Cherpitel.

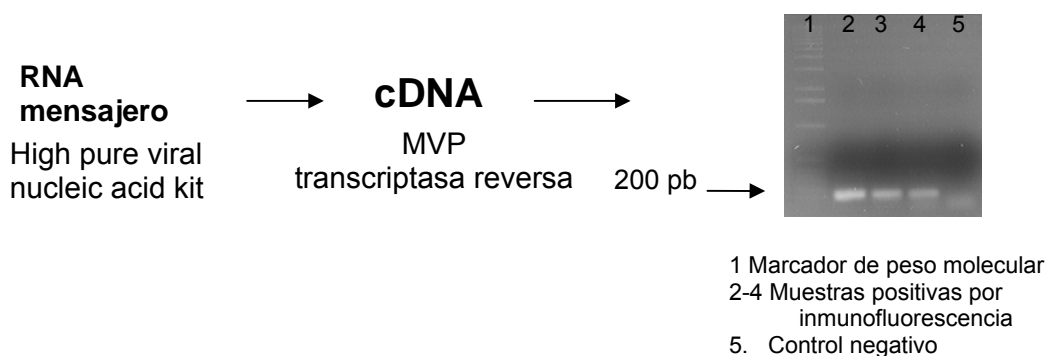


Figura 12. Proceso de obtención de cDNA para el aislamiento de genes F y G nativos.

Una vez comprobada la calidad del cDNA al amplificar al fragmento de 200 pb del gen L, se utilizó dicho cDNA para amplificar los genes nativos F y G.

Con los oligonucleótidos F580B y F1540 (Tabla 3) se amplificó un fragmento de 900 pb en donde se incluyen los tres epítomos utilizados en la construcción del gen sintético, este fragmento fue secuenciado y se confirmó que pertenece al gen F de VSR (Fig. 13).

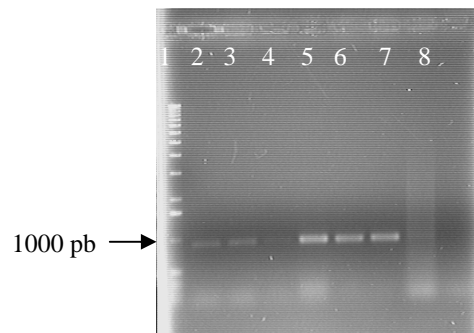


Figura 13. Amplificación de un fragmento del gen F nativo (900pb). Se utilizó la combinación de oligonucleótidos F580B+F1540. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2-7, muestras problema; carril 8, control negativo.

El gen G se amplificó utilizando los oligonucleótidos FFG y DFGnat generando un fragmento de 750 pb (Fig. 14).

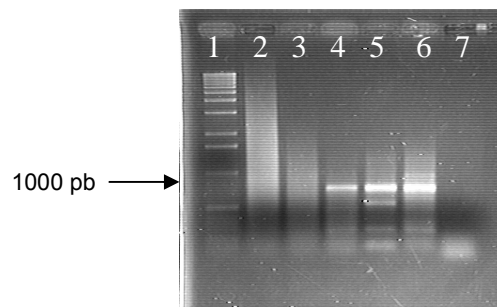


Figura 14. Amplificación del gen G (750 pb). Carril 1, marcador de peso molecular de 1kb; carriles 2-6, muestras problema; carril 7, control negativo.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%, se cortaron y purificaron las bandas con el kit QIAquick gel extraction de Qiagen y fueron clonadas en el plásmido pGEM-T Easy para ser enviadas a secuenciar.

Las proteínas F (fusión) y G (anclaje), que son las proteínas de superficie del virus han sido ampliamente estudiadas para la obtención de vacunas debido a que son las proteínas antigénicas del virus (Dudas y col., 2002). El tener plantas que expresen las proteínas F y G nativas nos permitirá comparar los niveles de

expresión y el tipo de respuesta inmune que generan estas proteínas respecto a las generadas por los genes sintéticos con y sin el epítipo del gen G.

6.3. Construcciones genéticas

6.3.1. Construcciones para transformación nuclear

6.3.1.1. Clonación del gen G nativo en el vector pBI-121

El fragmento de 750 pb correspondiente a la secuencia de G nativo de VSR obtenida mediante PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy, se transformaron células competentes TOP 10 F', las clonas fueron analizadas por PCR y perfil de restricción, se eligieron las clonas 62, 72, 105 y 115 (Fig. 15)

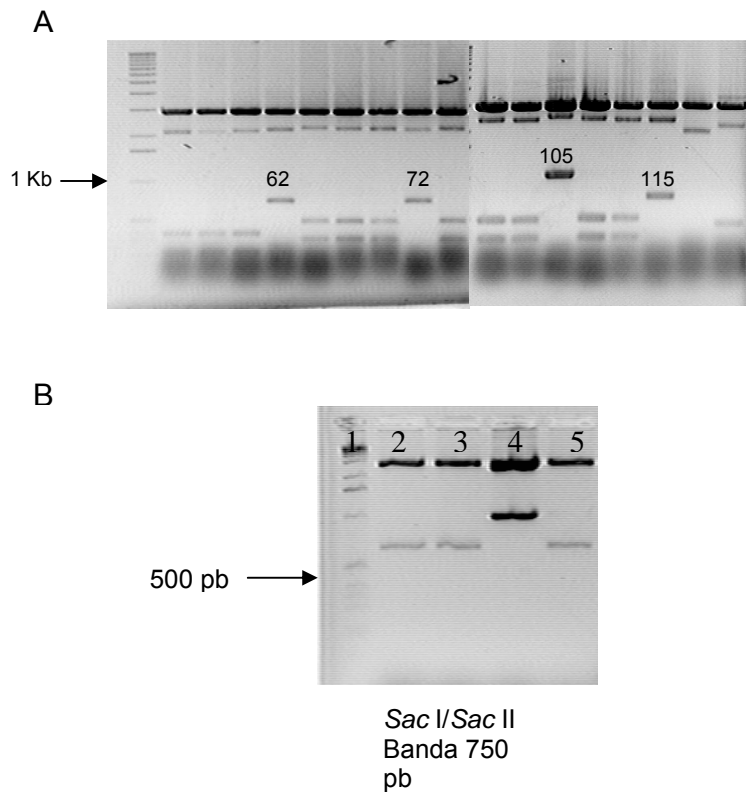


Figura 15. Análisis de clonas VSRG en el plásmido pGEM-T Easy. A) análisis de restricción de las clonas obtenidas (digestión *Sac*I/*Sac*II), se seleccionaron las clonas 62, 72, 105 y 115; B) carril 1 marcador de peso molecular 1 Kb; carril 2 clona 62; carril 3 clona 72; carril 4 clona 105; carril 5 clona 115.

Se seleccionaron las clonas 62, 72 y 115 para subclonar el plásmido pBI-121, la secuencia de G se liberó del plásmido pGEM-T por digestión con las enzimas *Nco*I/*Sac*I y se ligó en el vector binario pBI-121 como se describe en la metodología, la presencia del transgén se confirmó mediante PCR con los oligos FTEV/RGDnat (Fig. 16).

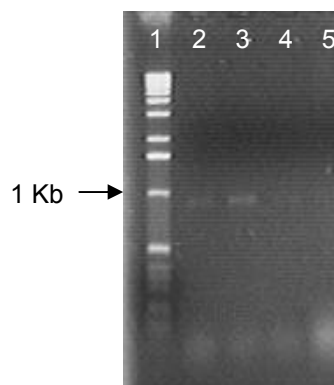


Figura 16. PCR de las clonas de pBI-VSRG. Carril 1 marcador de peso molecular 1Kb; carriles 2-4, clonas problema; carril 5, control negativo. Tamaño de banda esperado 870 pb.

Como se muestra en la figura anterior las clonas analizadas por PCR nos muestran una banda de 870 pb que corresponde a 750pb de la secuencia de G y 120 pb del UTR, con esto se confirmó la clonación de GVSR en pBI-121, dando lugar al plásmido pBI-VSRG (Fig 17). Se utilizó la clona 2 para transformar *A. tumefaciens*.



Figura 17. Vector binario pBI-VSRG usado para la transformación nuclear de tabaco y lechuga. En amarillo se indican los bordes izquierdo (L Border) y derecho (R Border) del T-DNA, el gen VSRG (en azul) esta flanqueado por los sitios de restricción.

6.3.1.2. Clonación del fragmento del gen F nativo en el vector pBI-121

Con los oligonucleótidos F580B y F1540 se amplifica un fragmento de 900 pb del gen nativo en donde se incluyen los tres epítomos utilizados en la construcción del gen sintético. El fragmento de 900 pb correspondiente a la secuencia de F de VSR obtenida mediante PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy, se transformaron células competentes TOP 10 F', las clonas fueron analizadas por PCR y perfil de restricción (Fig. 18), este fragmento fue secuenciado y se confirmó que pertenece al gen F de VSR.

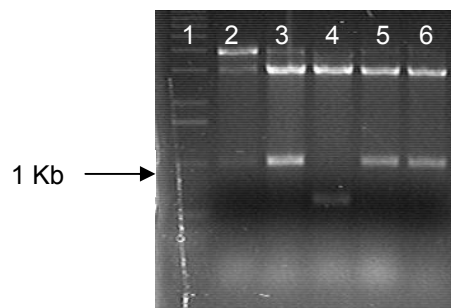


Figura 18. Análisis de restricción de las clonas pGEM-VSRF. Utilizando las enzimas *Sacl*/*Sacl*I, banda esperada 900 pb. Carril 1, marcador de peso molecular; 2-6 muestras problema.

Se seleccionaron las clonas 3 y 5 para subclonar el plásmido pBI-121, la secuencia de F se liberó del plásmido pGEM-T por digestión con las enzimas *Nco*I/*Sac*I y se ligó en el vector binario pBI-121 como se describe en la metodología. La presencia del transgén se confirmó mediante análisis de restricción con las enzimas *Xba*I/*Sac*I, que generaron el fragmento esperado así como cuando se les realizó PCR con los oligos F580B/F1540 (Fig. 19).

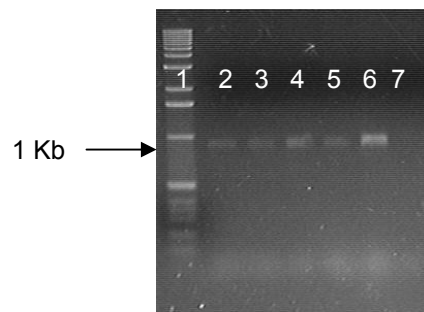


Figura 19. Análisis de las clonas pBI-VSRF por PCR. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 Kb; carriles 2-5, muestras problema; carril 6, control positivo; carril 7, control negativo.

Como se muestra en la figura anterior las clonas analizadas por PCR amplifican la banda esperada de 900pb con lo cual comprobamos la presencia del transgén, verificando la clonación de FVSR en pBI-121, dando lugar al plásmido pBI-VSRF (Fig. 20). Se utilizó la clona 6 para transformar *A. tumefaciens*.

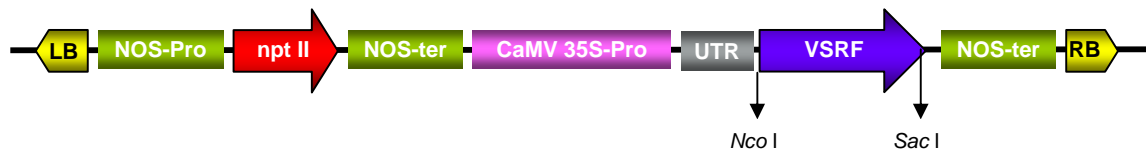


Figura 20. Vector binario pBI-VSRF usado para la transformación de tabaco y lechuga. En amarillo se indican los bordes izquierdo (L Border) y derecho (R Border) del T-DNA, el gen VSRF (en azul) esta flanqueado por los sitios de restricción.

6.3.1.3. Clonación del gen sintético VSR en el vector pBI-121

El gen VSR_{sn} originalmente fue clonado por la compañía GeneArt en el plásmido pGA4, flanqueado por los sitios de restricción *Nco*I y *Sac*I en los sitios 5' y 3', respectivamente. Al digerir con estas enzimas se libera un fragmento de 460 pb (Fig. 21).

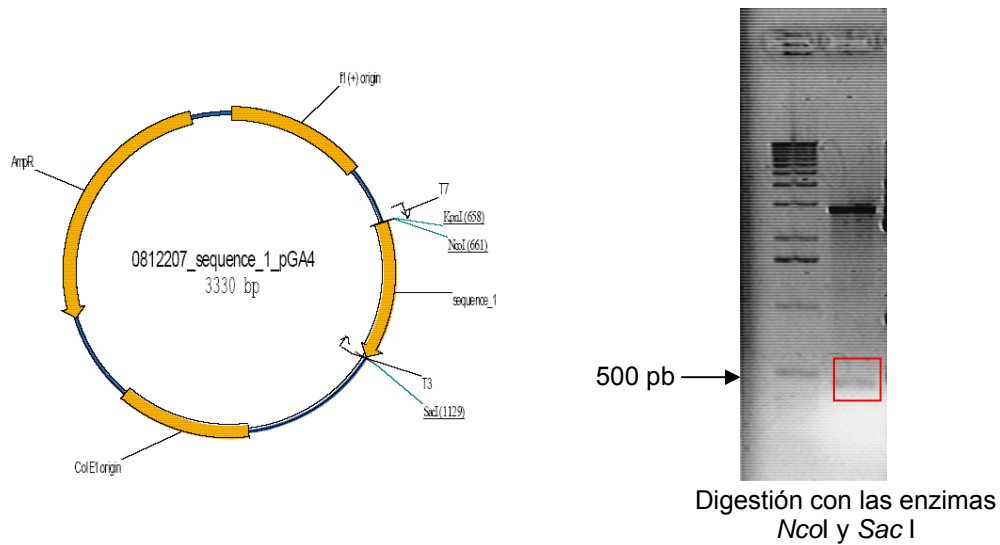


Figura 21. Producto de la digestión del plásmido pGA4 con las enzimas *Nco* I y *Sac* I. El gen sintético está flanqueado por sitios de restricción, al hacer la digestión se libera un fragmento de 460pb.

El fragmento liberado (*gen VSRsn*) fue ligado al vector binario pBI121 como se describió en la sección de metodología. El vector binario pBI121 contiene el gen de selección *npt* II (que confiere resistencia a kanamicina a las células vegetales transformadas) el cual está bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). El plásmido resultante fue nombrado pBI-VSR (Fig. 22).



Figura 22. Vector binario pBI-VSR usado para la transformación nuclear de tabaco y lechuga. En amarillo se indican los bordes izquierdo (L Border) y derecho (R Border) del T-DNA, el gen *VSRsn* (en azul) está flanqueado por los sitios de restricción.

Colonias positivas para la construcción pBI-VSR en *E. coli* TOP 10 F' fueron identificadas por análisis de restricción y por PCR. En la Figura 23 se muestra la digestión de las clonas positivas con: A: *Nco*I / *Sac*I (fragmento esperado: 460 pb que corresponde al gen sintético) y B: *Xba*I y *Sac*I (fragmento esperado 580 pb que corresponde al gen sintético y al TEV). En Figura 24 se muestran los resultados del análisis por PCR, A: Del gen completo y B: De un fragmento de 220 pb con un oligonucleótido interno (RSNint).

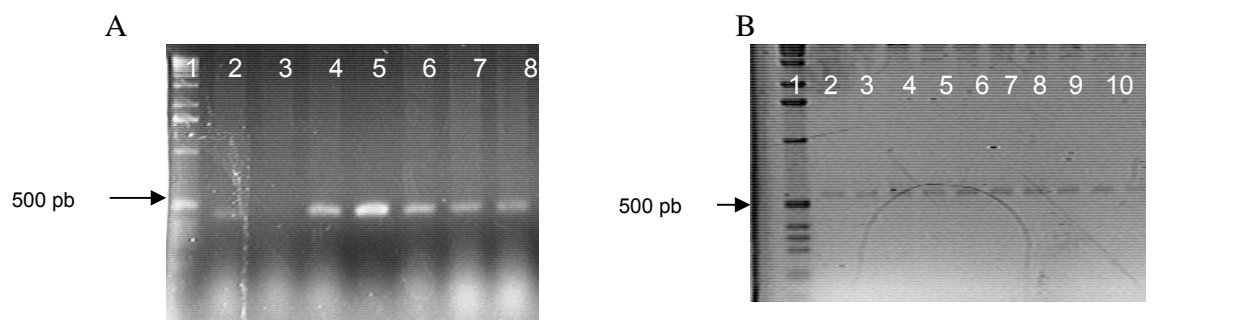


Figura 23. Análisis de restricción de clonas positivas para la construcción pBI-VSR en células de *E. coli* TOP10 F'. A. Digestión con *Nco*I/ *Sac*I; B. Digestión con *Xba*I / *Sac*I. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 Kb; carriles 2-11, muestras problema



Figura 24. Análisis por PCR de clonas positivas para la construcción pBI-VSR en células de *E. coli* TOP 10 F'. A) PCR con oligonucleótidos específicos (FSN/RSN); B) PCR utilizando un oligonucleótido interno (FSN/RSNint). Carril 1, Marcador de peso molecular 1 Kb; carril 2, clona 3; carril 3, clona 7; carril 4, control negativo.

Se analizaron un total de 24 clonas, de las cuales solo se muestra el análisis de restricción de algunas de ellas. Se consideraron positivas las que presentaron las bandas de 460 y 600 pb que se esperaban; estas clonas se analizaron también por PCR y se confirmó la presencia del gen al amplificarlo completo y un fragmento interior, con esto se confirmó la clonación de VSRsn en pBI-121. Se utilizaron las clonas 3 y 7 para la transferencia a *A. tumefaciens*.

6.3.1.4. Construcción de pBI-VSR sin la secuencia del epítipo de la proteína G

Una vez obtenida la construcción pBI-VSR, esta se digirió con la enzima *SspI*, con la cual está flanqueada la secuencia del epítipo de la proteína G en VSRsn, el vector se religó para dar lugar a la construcción pBI-VSR Δ G; esta clonación se confirmó mediante análisis por PCR con los oligos FSN/RSN que daría una banda de 373 pb, la Figura 25 muestra los resultados de este análisis.

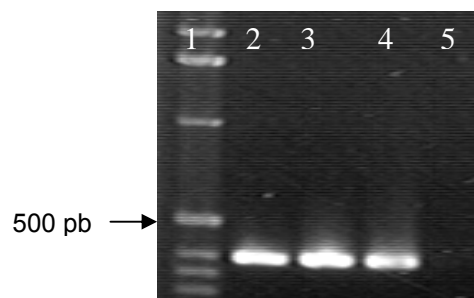


Figura 25. PCR para las clonas pBI-VSR Δ G. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2-4, clonas estudiadas; carril 5, control negativo.

La digestión con la enzima *SspI* libera un fragmento de 87pb que corresponde a la secuencia del epítipo del gen G y uno de los linkers, al amplificar

el gen VSRsn la banda esperada es de 460pb, eliminando los 87pb nos resulta una banda esperada de 373pb; como se puede ver en la Figura 19 las clonas analizadas son positivas. Se tomó la clona 1 para la transformación de *A. tumefaciens*.

6.3.2. Construcciones para la transformación de cloroplastos

6.3.2.1. Clonación del gen VSRsc en el vector pKCZ

El gen VSRsc originalmente fue clonado por la compañía GeneArt en el plásmido pMK, flanqueado por los sitios de restricción *Xba*I y *Eco*RV en los sitios 5' y 3', respectivamente. Al digerir con estas enzimas se libera un fragmento de 480 pb (Fig. 26).

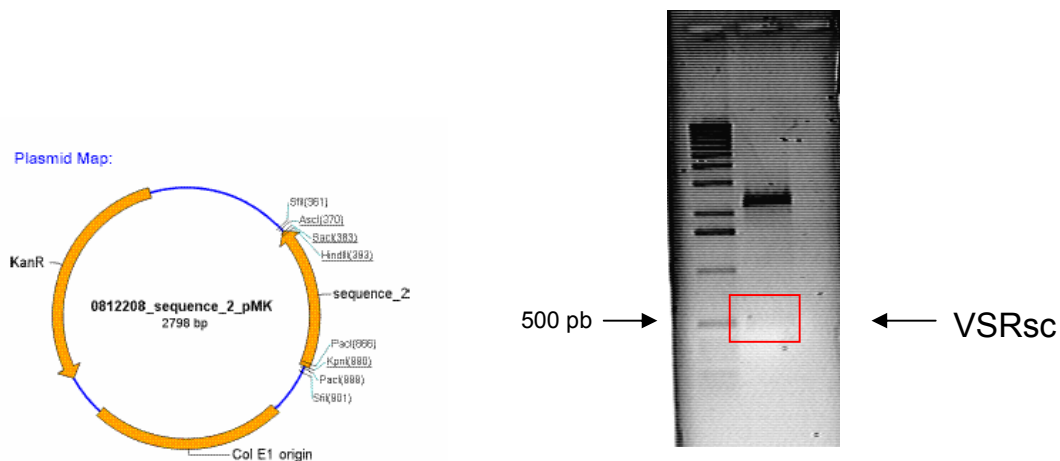


Figura 26. Producto de la digestión del plásmido pMK con las enzimas *Xba*I y *Eco*RV. El gen sintético está flanqueado por sitios de restricción, al hacer la digestión se libera un fragmento de 480pb.

El fragmento liberado (*gen VSRsc*) fue ligado al para transformación de cloroplastos como se describió en la sección de metodología. El vector pKCZ contiene el gen de selección *aadA* (que confiere resistencia a espectinomicina a las células vegetales transformadas). Los genes *VSRsc* y *aadA* están colocados en tandem, convirtiendo al vector en bicistrónico bajo el promotor de origen plasmídico *Prrn*. El plásmido resultante fue nombrado pKCZ-VSR (Fig. 27).

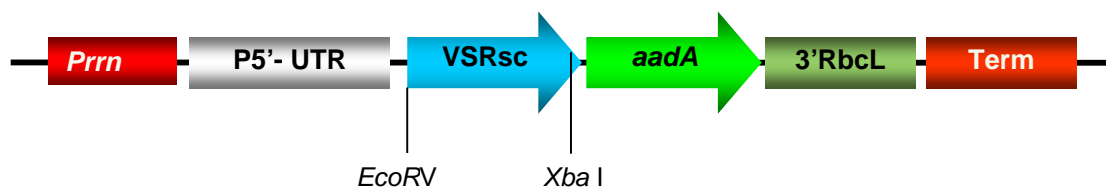


Figura 27. Vector bicistrónico pKCZ-VSR conteniendo los epítotos F y G del VSR para transformación de cloroplastos de tabaco. En Azul *VSRsc* flanqueado por los sitios de restricción.

Las colonias positivas para la construcción pKZC-VSR en *E. coli* TOP 10 F' fueron identificadas por análisis de restricción y por PCR. En la Figura 28 se muestran los resultados obtenidos de la digestión de las clonas positivas con: A: *EcoRV* / *XbaI* (fragmento esperado: 480 pb) y B: *PmlI* / *KpnI* (fragmento esperado 300 pb) el sitio *PmlI* se encuentra dentro de la secuencia de *VSRsc*, el sitio *KpnI* se encuentra en el vector pKCZ. En C y D se muestran los resultados del análisis por PCR, C: de un fragmento de 120 pb con un oligonucleótido interno (FSCint); D: del gen completo.

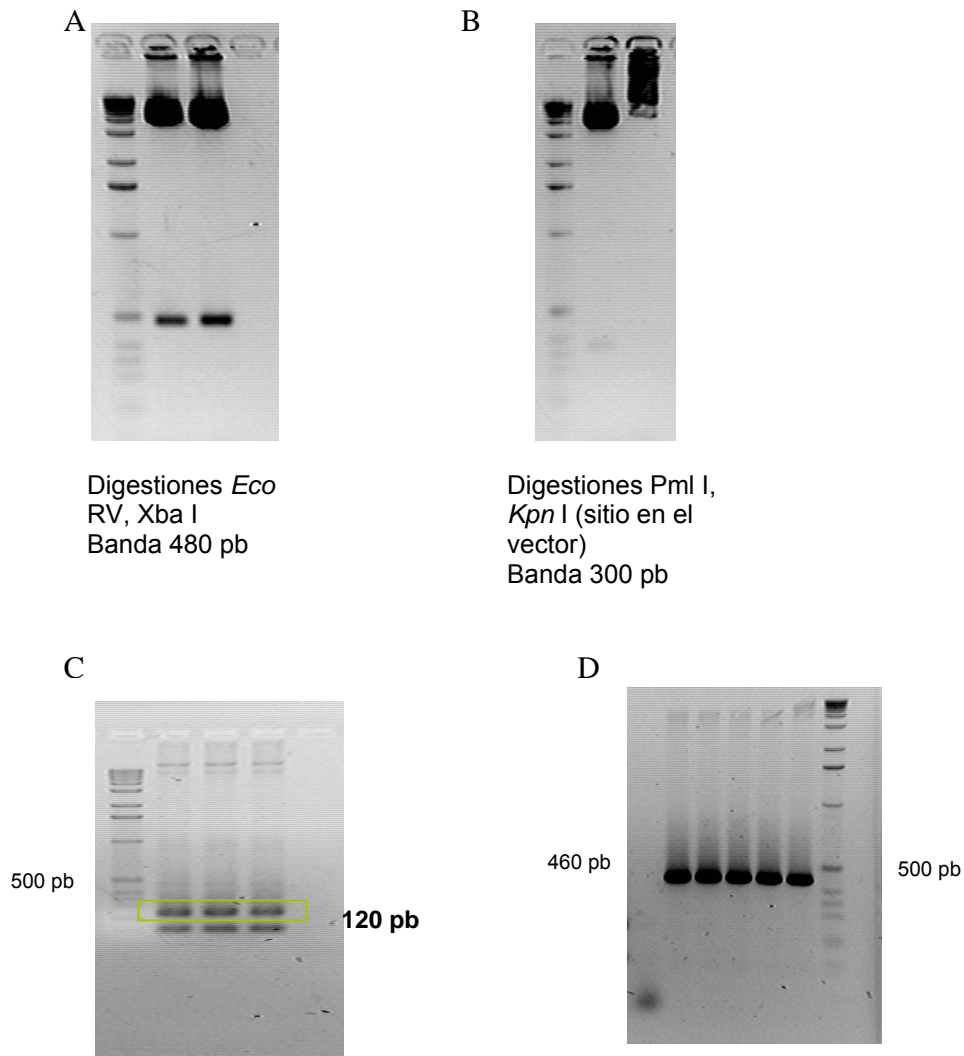


Figura 28. Análisis de clonas pKCZ-VSR por perfil de restricción y análisis de PCR. A) digestión con *Eco* RV/*Xba* I, fragmento esperado 480pb; B) digestión con las enzimas *Pml*I/*Kpn*I, fragmento esperado 300 pb; C) PCR con los oligonucleótidos FSCint/RSC, fragmento esperado 120 pb; D) PCR con los oligonucleótidos FSC/RSC, fragmento esperado 460 pb.

Las clonas se consideraron positivas al obtener la bandas esperadas y con esto se confirmó la clonación de VSRsc en pKCZ. Se utilizó las clona 1 para recubrir las micropartículas de oro usadas en el bombardeo de hojas de tabaco.

6.3.2.2. Construcción pKCZ-VSRsc sin la secuencia del epítipo de la proteína G

Una vez obtenida la construcción pKCZ-VSR, esta se digirió con la enzima *Pml*, la cual flanquea la secuencia del epítipo de la proteína G en VSRsc, el vector se religó para dar lugar a la construcción pKCZ-VSR Δ G; esta clonación se confirmó mediante análisis por PCR con los oligos FSC/RSC que daría una banda de 373pb; la Figura 29 muestra los resultados de este análisis.

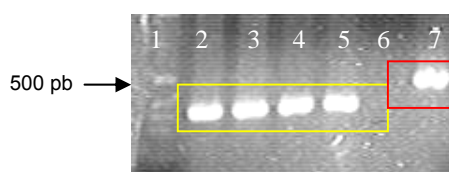


Figura 29. PCR para confirmar la construcción pKCZ-VSR Δ G. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2-5 muestras problema; carril 6, control negativo; carril 7, control positivo (pKCZ-VSR).

La digestión con la enzima *Pml* libera un fragmento de 87pb que corresponde a la secuencia del epítipo del gen G y uno de los linkers, al amplificar el gen VSRsc la banda esperada es de 460pb, eliminando los 87pb nos resulta una banda esperada de 373pb, como se puede ver en la Figura 28 las clonas analizadas son positivas. Se tomó la clona 1 para recubrir las micropartículas de oro utilizadas en el bombardeo de hojas de tabaco.

6.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Los vectores binarios fueron transferidos a *A. tumefaciens* empleando electroporación. Después de tres días de cultivo en medio selectivo se presentó desarrollo bacteriano, indicio de que la transformación fue exitosa. La presencia del plásmido fue confirmada realizando su extracción y análisis en un gel de agarosa, en el que se visualizó el plásmido en todos los casos (resultados no mostrados).

6.5. Proceso general para obtención de plantas transgénicas de lechuga y tabaco vía *A. tumefaciens*

La estandarización de la regeneración de plantas de tabaco y lechuga fue realizada en el laboratorio con anterioridad, en el caso de lechuga este proceso toma aproximadamente 6 meses (Fig. 30); para el caso del tabaco el proceso es de 4 meses.

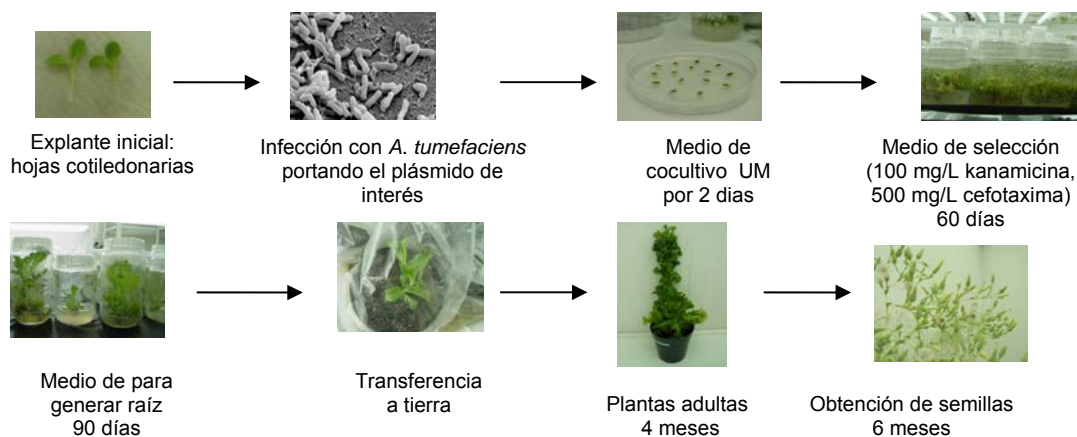


Figura 30. Representación esquemática de la transformación de plantas vía *Agrobacterium* y regeneración de plantas de lechuga.

6.6. Transformación genética nuclear vía *A. tumefaciens* conteniendo secuencias del VSR

6.6.1. Lechuga

La transformación de plantas de lechuga fue realizada mediante la infección de cotiledones con la cepa de *A. tumefaciens* que porta las construcciones generadas y se llevó a cabo como se describió en la sección de Metodología; los cotiledones infectados se colocaron en medio de selección (MSJ +100mg/L kanamicina + 500 mg/L cefotaxima), se cambiaron de medio cada dos semanas hasta la formación de callos mostrados en la Figura 31.

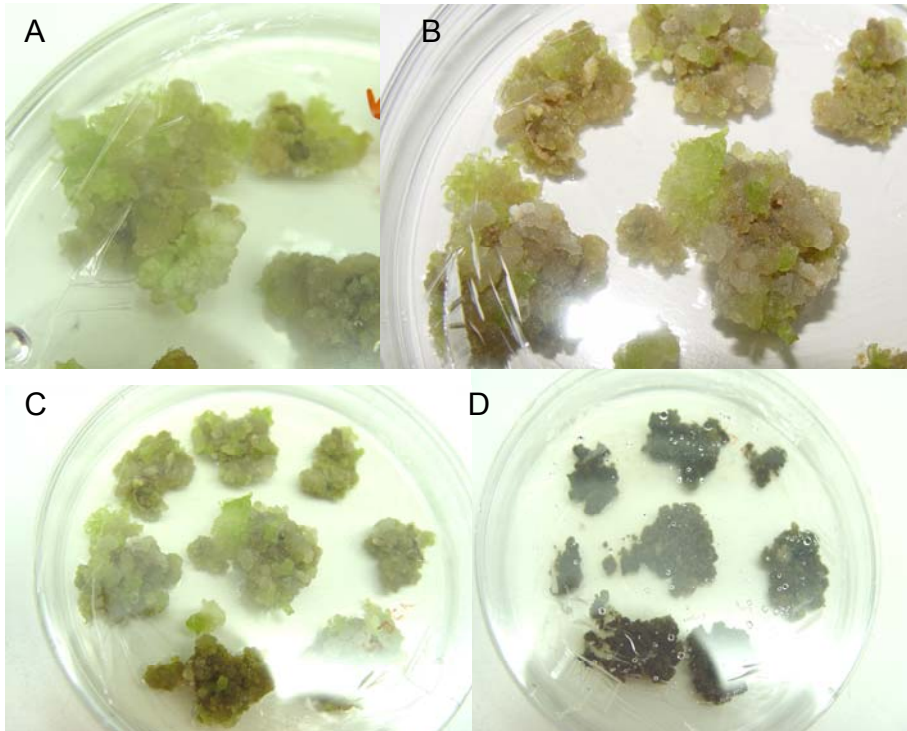


Figura 31. Callos de lechuga regenerados a partir de cotiledones infectados con los plásmidos binarios. A) plásmido pBI-VSR; B) plásmido pBI-VSR Δ G; C) plásmido pBI-VSRG; D) control negativo.

En la figura anterior podemos observar callos posiblemente transgénicos para las diferentes construcciones: A) con los epítotos F y G; B) solamente epítotos de F y C) gen G nativo, los callos generados a partir de cotiledones infectados con los plásmidos binarios crecen en presencia del agente de selección, el control negativo (Fig. 31D) (cotiledones sin infectar) muere en presencia del agente de selección. Todos los callos de lechuga con la construcción pBI-VSRF conteniendo el gen F nativo se murieron.

6.6.2. Tabaco

La infección de hojas de tabaco con los plásmidos binarios se realizó como se describe en la metodología. Las hojas de tabaco infectadas con el plásmido pBI-VSR se colocaron en medio de selección (RMOP) hasta la formación de callo y brotes organogénicos, estos brotes se colocaron en medio MS sin reguladores de crecimiento para la formación de raíz y posteriormente se pasaron a tierra. Para las construcciones pBI-VSRG y pBI-VSRF se ha regenerado callo en medio de selección (Fig. 32)

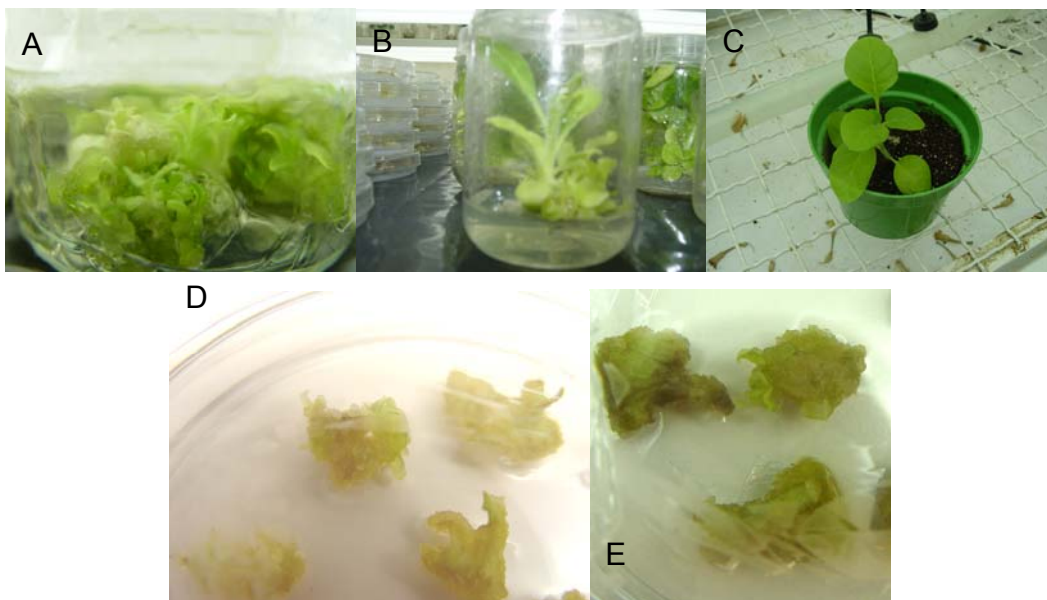


Figura 32. Resultados de la transformación nuclear de tabaco con los plásmidos binarios pBI-VSR, pBI-VSRG y pBI-VSRF. A-C) proceso de regeneración de tabacos transformados con el plásmido pBI-VSR conteniendo los epítomos de las proteínas F y G; D) callos de tabaco transformado con el plásmido pBI-VSRG conteniendo el gen nativo G; E) callos de tabaco transformados con el plásmido pBI-VSRF conteniendo el gen nativo F.

La regeneración de plantas de tabaco en medio de selección nos indica una transformación exitosa para la construcción pBI-VSR; la formación de callos de tabaco en agente de selección para las construcciones pBI-VSRG y pBI-VSRF nos indica que podremos obtener plantas transgénicas para estas construcciones a

partir de ellos. No se obtuvieron callos con la construcción conteniendo el gen sintético sin el epítipo G (pBI-VSRΔG).

6.7. Transformación genética de cloroplastos de tabaco por el método de biobalística

La transformación y regeneración de hojas de tabaco ha sido estandarizada con anterioridad en el laboratorio (Herrera-Díaz, 2005; Patiño-Rodríguez, 2006), el proceso de regeneración se lleva a cabo en aproximadamente cuatro meses (Fig. 33).



Figura 33. Proceso de transformación de hojas de tabaco por el método de biobalística.

El bombardeo de hojas de tabaco se llevó a cabo como se describe en la metodología, las hojas se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5x3 mm y se colocaron en medio de selección, se cambiaron de medio cada dos semanas, a las 6 semanas se obtuvieron callos resistentes al agente de selección (Fig. 34)



Figura 34. Callos de tabaco resistentes al agente de selección, transformados por biobalística a partir de hojas. Se usaron plásmidos para transformación de cloroplastos conteniendo diferentes construcciones. A) plásmido pKCZ-VSR; B) plásmido pKCZ-VSR Δ G; C) control negativo.

6.8. Análisis de transformantes

6.8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para comprobar la presencia del transgén VSR_{sn}, se realizó un análisis por PCR de las líneas resistentes a kanamicina, como se describió anteriormente. Estos análisis demostraron la presencia del gen sintético VSR en 12 de 18 plantas analizadas (Fig. 35).

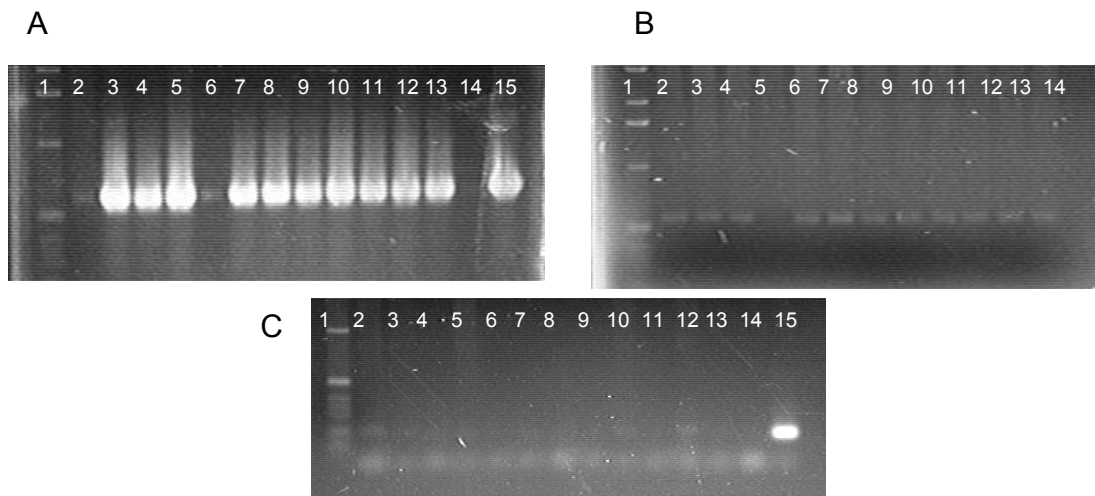


Figura 35. Análisis de los productos de amplificación por PCR de plantas de tabaco transformadas con la construcción pBI-VSR vía *Agrobacterium*. Carril 1), marcador de Peso Molecular 1 Kb; carriles 2-13, plantas transformadas; carril 14, control negativo (planta sin transformar); carril 15, control positivo (plásmido pBI-VSR); A) gen *nptII*; B) gen VSR; C) fragmento de epítomos F del gen VSR.

En la Figura 33A se observa la banda esperada de 570 pb en las 12 plantas regeneradas en medio de selección que corresponde al gen *nptII* que confiere la resistencia a kanamicina en las células transformadas; la Figura 33B muestra la banda de 460 pb que corresponde al transgén VSRsn y la Figura 33C muestra en fragmento de 220 pb del transgén VSRsn, en todos los casos en planta sin transformar no se observa producto de amplificación.

6.9. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

6.9.1. pBI-VSR

A las plántulas positivas 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 extrajeron proteínas de las plántulas 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 Bio-Rad, en la Figura 36 se grafica la lectura de las 12 plantas

transgénicas y la planta silvestre, la línea negra corresponde a la intensidad de señal de la planta silvestre.

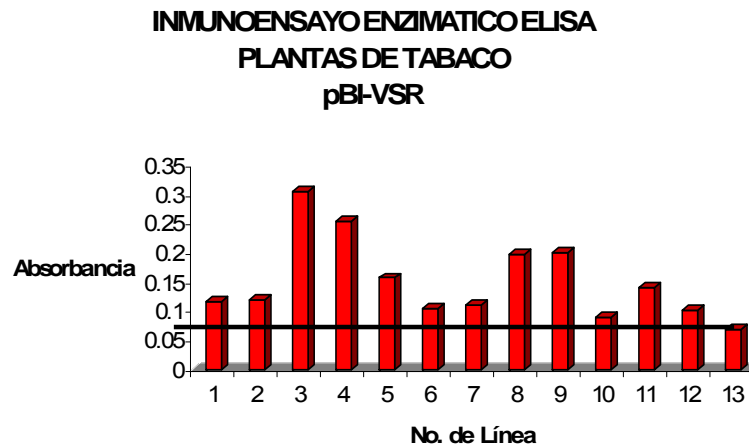


Figura 36. Análisis por ELISA para la detección de VSRsn en plántulas de tabaco. Líneas 1-12, plántulas positivas por PCR; línea 13, planta silvestre. La línea negra indica la intensidad de la señal de la línea silvestre.

Las 12 líneas transformantes para VSRsn que crecieron en el agente de selección (kanamicina) analizadas por ELISA, observan una señal de Absorbancia a 405nm superior a la planta silvestre, (de 0.1 a 0.3 en comparación con la silvestre que es de .063), lo que nos indica que la proteína heteróloga es reconocida por su anticuerpo y que hay diferentes niveles de producción de las mismas en las 12 líneas destacando la 3, 4, 8 y 9.

La variabilidad observada en la expresión del antígeno de planta a planta, ha sido reportada previamente. 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 (Mlynárová y col., 1994; Leeuwen y col., 2001).

Se realizaron análisis de PCR y ELISA solo para las plantas de tabaco transformadas vía *Agrobacterium* con el plásmido pBI-VSR ya que fueron las únicas que produjeron plántulas con hoja suficiente para su análisis, en contraparte con las otras transformaciones en donde solo se ha logrado regenerar

callo resistente a la transformación, esto se debe a que la transformación con pBI-VSR se realizó cuatro semanas antes que las otras transformaciones nucleares y que en la transformación de cloroplastos por biobalística, la regeneración de plántulas a partir de callos tarda aproximadamente 3-4 semanas más que en la transformación nuclear, sin embargo al tener callos resistentes al agente de selección nos permite considerar la posibilidad de obtener plantas transgénicas o transplastómicas con las otras construcciones, trabajo a realizarse posteriormente.

La transformación de tabaco, si bien no es una buena opción para generar una vacuna comestible por los altos niveles de compuestos tóxicos que tiene, entre los que sobresale la nicotina, es un buen sistema para obtener resultados rápidos en los análisis de los transgenes y demostrar que las construcciones pueden producir proteínas funcionales *in vitro*, mismas que se pueden analizar *in vivo* en un menor tiempo que las producidas en lechuga.

El presente trabajo permitió la generación de 3 construcciones para transformación nuclear de tabaco y lechuga conteniendo genes sintéticos optimizados para plantas con epítomos de las proteínas F y G del VSR. También se obtuvieron 3 construcciones para transformación de cloroplastos de tabaco, mismas que se subclonarán en un vector para cloroplastos de lechuga.

Se tienen plántulas de tabaco que demostraron tener el transgén mediante análisis de PCR y que en análisis *in vitro* demostraron la funcionalidad de la proteína antigénica al ser reconocida por un anticuerpo contra la proteína F del VSR, lo cual es un resultado positivo para poder seleccionar las líneas más prometedoras como la 3 y 4, para análisis *in vivo* en ratones.

El darle continuidad al presente trabajo nos permitirá aislar líneas vegetales de tabaco y lechuga para comparar la respuesta inmunológica en ratones de plantas transformadas nuclearmente contra plantas transformadas en los cloroplastos, además de comparar el tipo de anticuerpos producidos al tener o no el epítomo G y su balance Th1 y Th2 de los genes sintéticos comparados con los de origen viral.

7. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demuestran que:

- 1) La transformación de tabaco permite analizar la funcionalidad de los transgenes en menor tiempo que otros sistemas vegetales.
- 2) La transformación nuclear de tabaco mediante co-cultivo de *Agrobacterium* con el vector binario pBI121 portador del gen sintético VSRsn permite la obtención de plantas transgénicas que contienen los epítomos de las proteínas F y G del virus sincicial respiratorio, como se muestra en los análisis de PCR.
- 3) La proteína recombinante (rVSR) producida en tabaco, es reconocida por un anticuerpo dirigido contra la proteína F, demostrando su antigenicidad *in vitro* mediante el ensayo de ELISA.
- 4) La transformación de plantas de lechuga mediante co-cultivo de *Agrobacterium* con los vectores binarios pBI-VSR, pBI-VSRG y pBI-VSRF permite la obtención de callos resistentes al agente de selección.
- 5) La transformación de cloroplastos de tabaco con los plásmidos bicistrónicos pKCZ-VSR y pKCZ-VSR Δ G, permite la obtención de callos resistentes al agente de selección.

8. PERSPECTIVAS

1. Extraer el cassette de transformación del plásmido pKCZ y subclonarlo en el vector pADCT que está diseñado para la transformación de cloroplastos de lechuga.
2. Transformar por biobalística cloroplastos de lechuga con la construcción obtenida de VSRsc y VSRscΔG usando un vector específico para lechuga (pADCT).
3. Obtener generaciones estables (T2) de plantas transgénicas de tabaco y (T1) de lechuga, para todas las construcciones en el plásmido pBI-121 a partir de los callos resistentes al agente de selección.
4. Obtener plantas transplastómicas homoplásticas de tabaco (con por lo menos tres rondas de selección) a partir de los callos resistentes a la selección transformados con las construcciones pKCZ-VSR y pKCZ-VSR sin G.
5. Analizar las plantas transgénicas y transplastómicas obtenidas con todas las construcciones por PCR, RT-PCR, Southern blot y ELISA.
6. Una vez comprobada la presencia de los transgenes y la antigenicidad de las proteínas heterólogas, analizar la inmunogenicidad en ratones Balb/c.
7. Finalmente comprobar la inmunoprotección de las proteínas heterólogas en ratas de la raza algodón mediante el reto en mucosas nasales.

9. APÉNDICE

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

Se prepararon células competentes a partir de un cultivo de *E. coli* Top 10 F' de 24 horas, crecido en caldo LB a 37 °C. De este preinóculo se tomaron 250 µl y se añadieron a 25 ml de caldo LB, se incubó por 90 minutos a 37°C y agitación de 150 rpm. El cultivo se enfrió en baño de hielo y se centrifugó 35 segundos a 12,000 rpm. La pastilla se lavó con 4 ml de cloruro de calcio 0.1M y glicerol al 15%, y se volvió a empacar por centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en 630 µl de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 30 µl.

Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron sobre hielo y se añadió 3.0µl del ADN de interés, se mezcló y se incubaron en hielo por 15 minutos. Los tubos se llevaron a un baño a 43°C por 1 minuto y se regresaron inmediatamente al hielo por 10 minutos. Se añadió 1 ml de medio de cultivo LB y se incubó 40 minutos a 37°C y 150 rpm. Después, 100 µl del cultivo se inocularon en agar LB con 100 mg/L de kanamicina o ampicilina, según el caso.

9.2. Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Se prepararon de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col (1991). La cepa LBA4404 se inoculó en medio de cultivo YM por dos días, de este cultivo (DO. 0.04-0.08 a 600nm), se tomaron 5 ml y se les agregó medio YM hasta 100 ml y se incubó a 28 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (aproximadamente 4 h), se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la bacteria en 40 ml de buffer HEPES 1mM pH 7, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la bacteria en 40 ml de buffer HEPES 1mM pH 7 y 10% de glicerol. Se centrifugó y se resuspendió la bacteria en 2 ml de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol y finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se

resuspendió la pastilla en 400 μ l de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50 μ l y se almacenaron a -80°C.

9.3. Selección de transformantes

Para seleccionar las clonas transformadas con el plásmido pGEM-T Easy, se prepararon placas de agar LB con 100 mg/L de ampicilina, posteriormente se agregó sobre la superficie de la placa 0.5 M de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) que es el inductor de la enzima β -galactosidasa, y 80 mg/L de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido), sustrato de la enzima β -galactosidasa, después de que estos compuestos se absorbieron (aproximadamente 30 minutos) se sembraron las bacterias transformadas por choque térmico y se incubaron a 37 °C por 24 horas; el vector pGEM-T Easy tiene sitios múltiples de clonación dentro del gen de la β -galactosidasa, la cual si se interrumpe con la clonación de ADN foráneo pierde su capacidad de reaccionar con el sustrato X-gal y desencadenar una coloración azul en las colonias, por lo tanto las colonias formadas son blancas y de esta forma se pueden seleccionar.

9.4. Extracción de ADN plasmídico

Se basó en el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Se tomó 1.5 ml de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, se eliminó parte del sobrenadante, se resuspendió la pastilla con vórtex y se añadió 150 μ l de la solución I de Birnboim (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 10 mM), se mezcló en vortex y se agregaron 300 μ L de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién preparada, se agitó por inversión 5 veces, se añadieron 225 μ l de la solución III de BD (Acetato de sodio 3M, pH 4.8), se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se adicionó un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7 y un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se

precipitó a -20°C por 30 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 300 μl de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se agregó RNAsa y se incubó a 37°C por una hora, nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN con acetato de sodio e isopropanol frío, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm y se secó la pastilla a $50-60^{\circ}\text{C}$, se resuspendió en 20 μl de agua milli Q.

9.5. Preparación de soluciones y medios de cultivo

9.5.1 TAE 50X

Para preparar un litro mezclaron 98.8 g de Tris base, 22.84 ml de ácido acético, 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8, se aforó con agua destilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

9.5.2. Agarosa 1%

Para preparar 100 ml se añadió un gramo de agarosa a 100 ml de TAE 1X, se calentó hasta disolver y se almacenó a temperatura ambiente.

9.5.3. 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 disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 250 ml a 4°C.

9.5.4. 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 disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 ml a -20 °C.

9.5.5. 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 disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 ml a -70 °C.

9.5.6. Kanamicina

Para preparar un stock de 50 mg/ml, se disolvieron 5 gramos de sulfato de kanamicina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20 °C.

9.5.7. Ácido naftalenacético (ANA)

Para preparar un stock de 1.5 mg/ml, se disolvieron 150 mg de ANA en 1.0 ml de hidróxido de sodio. Se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

9.5.8. Benciladenina (BA)

Para preparar un stock de 0.6 mg/ml, se pesaron 60 mg de BA y se disolvieron en 1.0 ml de ácido clorhídrico 1 N, se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

9.5.9. Cinetina (Cin)

Para preparar un stock de 1.0 mg/ml, se pesaron 100 mg de cinetina y se disolvieron en 1.0 ml de ácido clorhídrico 1 N, se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

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

Para preparar un stock de 1.0 mg/ml, se pesaron 100 mg de 2,4-D y se disolvieron en 1.0 ml de hidróxido de sodio 1 N, se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

9.5.11. Procedimiento general para la preparación de medios de cultivo

Para preparar un litro de medio de cultivo, se añadieron 10 ml de cada solución MS (MS I – MS V) a 700 ml de agua desionizada. Se adicionaron 30 gramos de sacarosa y, después de añadir reguladores de crecimiento y vitaminas apropiados, el pH fue ajustado a 5.7 con hidróxido de sodio 1 N / ácido clorhídrico 1 N y se aforó con agua destilada estéril. Para los medios semisólidos se añadieron 7 gramos de agar. Los medios se esterizaron a 15 lb/pulgada² por 15 minutos.

Cuando fue necesario, la kanamicina previamente esterilizada (stock 50 mg/ml), se añadió al medio después de esterilizar una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50 °C.

9.5.12. 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	-	-	-

9.5.13. Medio de cultivo YM

Para preparar un litro de medio YM se pesaron 400 mg de extracto de levadura, 10 g de manitol, 100 mg de cloruro de sodio, 200 mg de sulfato de magnesio y 500 mg de fosfato de potasio. Se disolvieron en agua destilada, el pH se ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó con agua destilada y se esterilizó.

9.5.14. Medio de cultivo LB

Para preparar un litro de medio LB se pesaron 20 g de base para medio de cultivo LB, se disolvió, se aforó con agua destilada y se esterilizó. Cuando fue necesario se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico.

9.5.15. Soluciones Bradford

9.5.15.1. Solución A

Para preparar la solución A se mezclaron 25 ml de etanol al 95%, 50 ml de ácido fosfórico al 85% y 87.5 mg de azul de Coomassie, se agitó hasta disolver completamente, se filtró con papel filtro y se almacenó a 4°C.

9.5.15.2. Solución B

La solución B se preparó mezclando 7.5 ml de etanol al 95%, 15 ml de ácido fosfórico y 15 ml de la solución A. Se aforó a 250 ml con agua destilada estéril y se almacenó a 4 °C.

9.5.16. Buffer salino de fosfatos (PBS)

Para preparar un litro se pesaron 1.42 g de fosfato de sodio, 408 mg de fosfato de monobásico de potasio y 5.85 g de cloruro de sodio, se disolvieron en agua destilada estéril, se ajustó el pH a 7.2 con ácido clorhídrico 1 N / hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó con agua destilada.

9.5.17. Buffer de carbonatos

Para preparar 100 ml se pesaron 159 mg de carbonato de sodio, 294 mg de bicarbonato de sodio, se disolvieron en agua destilada estéril, se ajustó el pH a 9.6 con ácido clorhídrico 1 N y se aforó.

9.5.18. Buffer de fosfatasa alcalina

Para preparar 100 ml se pesaron 1.017 g de cloruro de magnesio, 1.211 g de Tris base y 584.4 mg de cloruro de sodio, se disolvieron en agua destilada estéril, se ajustó el pH a 9.5 con ácido clorhídrico 1 N/hidróxido de sodio 1.0 N, y se aforó.

11. REFERENCIAS

- 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. Pp. 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.
- Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, Hosakote YM, Atmar RL, Macias CG y Piedra P. (2007) Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 195: 1532-1540.
- Bogorad L (2000) Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol* 18: 257–263.
- 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 a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol.* 64(4): 1590-1597.
- Chanock R y Finberg L (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 66:291-300.
- Chanock R, Roizman B y Myers R (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.* 66:281-290.
- Claridades Agropecuarias (2001). Tabaco y soya. ASERCA.
- Claridades Agropecuarias (1999). Lechuga y trigo. ASERCA.
- Clements CJ, Larsen G y Jodar L (2004). Technologies that make administration of vaccines safer. *Vaccine.* 22: 2054-2058.
- Curtis IS, Power JB, Blackhall NW, Laats AMM y Davey MR (1994) Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Exp Bot.* 45: 1441-1449.
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7:84-91.
- Daniell H, Ruiz ON y Dhingra A (2005). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol Transgenic Plants.* 286:111-138.
- 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, 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.
- 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.

- Dellaporta SL, Wood J y Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep.* 1:19-21.
- 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.
- Falsey AR y Walsh EE (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev.* 13:371-384.
- Feans R, Peeples ME y Collins PL (2002). Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 76:1663.
- Goldschmidt-Clermont M (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of chlamydomonas. *Nucl Acid Res.* 19:4083-4089.
- 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-Diaz A (2005). Transformación nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos. Tesis de maestría. IPICYT.
- Kaprowski H y Yusibov V (2001). The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine.* 19 (17-19): 2735-2741.
- Kneyber MCJ, Moll HA y Groot R (2000). Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur J Pediatr.* 159: 399-411.
- Koziel MG, Carozzi NB y Desai N (1996). Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol Biol.* 32:393-405.
- Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrens 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.
- Lopez 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.
- Maliga P (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotech.* 21:20-28.
- Martínez-González L (2005). Transformación genética de lechuga (*Lactuca sativa* L) con un gen sintético de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura UASLP.
- 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.
- 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. *Plant Cell.* 6: 417-426.
- Morris JA, Blount RE y Savage RE (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 92:544-549.
- Murashige T y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Nakano M, Makino M y Sueyoshi K (2003). *Agrobacterium*-mediated transformation of Lettuce widely cultivated in Japan. *Jap Crop Sci.* 56 (2): 59-66.
- Napier JA, Richard G y Shewry R (2005) Trafficking and stability of heterologous proteins in transgenic plants. En: *Methods in Biotechnology: Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds.* Cunningham LC and Porter AJR (Eds.) Totowa, NJ: Human Press. 3:189-202.
- 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.

- Noyola DE, Alpuche-Solís AG, Herrera-Díaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J y López-Revilla R (2005). Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol* 54: 969-974
- Openshaw PJM y Tregoning JS (2005). Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 18:541-545.
- 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.
- Rigano MM y Walmsley AM (2005). Expression system and developments in plant-made vaccine. *Immunol Cell Biol.* 83:271-277.
- Romagnani S (1991). Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol today.* 12:256-7.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 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.
- 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

- 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.
- Streatfield SJ y Howard JA (2003). Plant production systems for vaccines. *Expert Rev Vacc.* 2 (6): 763-775.
- 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 high plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 8526-8530.
- Trigiano RN y Gray DJ (2000). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, CRC Press, 2^{da} Edición.
- Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L y Nagy E (2000). Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine.* 18: 2023-2028.
- Tyagi AK (2001). Plant genes and their expression. *Curr Sci.* 80:161-169.
- 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. *Revisiónes básicas.* 22 135-153.
- Walmsley AM y Arntzen CJ (2000) Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opinion Biotech.* 11: 126-129.
- Yu J y Landrige WH (2001). A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol.* 19: 548-552.
- Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper D C y Koprowski H (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric

plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 5784-5788.

Zambrysky PC (1992). Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Plant Mol Biol*. 43: 465-490.