

IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Producción de antígenos inmunogénicos en
plantas: un enfoque para mejorar la vacuna
contra la tos ferina**

Tesis que presenta

Karla Sánchez Álvarez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dr. Sergio Rosales Mendoza

San Luis Potosí, S.L.P., Junio de 2010



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Producción de antígenos inmunogénicos en plantas: un enfoque para mejorar la vacuna contra la tos ferina**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karla Sánchez Álvarez** y aprobada el **30 de Junio de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Codirector de la tesis)

Dr. Sergio Rosales Mendoza
(Codirector de la tesis)

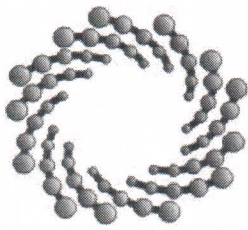
Dr. Rubén López Revilla
(Asesor de la tesis)



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 co-dirección de los Dres. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Sergio Rosales Mendoza.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 270808) y el apoyo del proyecto CONACYT 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 069 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular esta asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de julio del año 2010, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Carlos Barajas López	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Sergio Rosales Mendoza	Sinodal externo	UASLP

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustenta la C.

Karla Sánchez Alvarez

sobre la Tesis intitulada:

Producción de antígenos inmunogénicos en plantas: un enfoque para mejorar la vacuna contra la tos ferina.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dr. Sergio Rosales Mendoza (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determino

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:45 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., Mexico, a los 8 días del mes de julio de 2010.

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

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios, por permitirme llegar hasta donde estoy, así como por darme la oportunidad de estar aquí.

A mis padres, Antonio Sánchez y Guadalupe Álvarez, que me han apoyado y me han dado su amor incondicional en los momentos más difíciles, sus consejos, comprensión, por ser mi guía y mis primeros maestros, a ustedes mi amor, admiración y respeto por siempre.

A mi hermana, Claudia, por ser mi amiga, por ser una parte fundamental en mi vida, y a mi cuñado, Ricardo, porque siempre ha confiado en mí y ha sabido siempre darme el consejo adecuado.

A mi abuelita Socorro Silva, porque siempre ha estado conmigo y me ha impulsado a ser mejor persona.

A mis abuelitos Ma. de Jesús Silva y Juan Álvarez, porque desde allá arriba siguen guiando mis pasos a donde quiera que voy.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial para el Dr. Ángel Alpuche Solís por sus enseñanzas, así como el tiempo, paciencia y el apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Rosales por aceptar codirigir este trabajo, así como por todas sus enseñanzas, consejos, apoyo, y también por la amistad brindada.

Al Dr. Rubén López Revilla por aceptar fungir como mi sinodal, por todos sus consejos y aportaciones para mejorar mi trabajo.

A mis padres, porque siempre me han alentado a seguir adelante, y porque ellos son mi guía y mis maestros.

A mi hermana y mi cuñado, porque siempre están conmigo para darme el consejo adecuado.

A mis amigos Julia Acosta, Ivonne González, Enrique Maldonado, por su amistad, estar conmigo y apoyarme en estos 7 años de conocernos.

A mis compañeros y amigos de generación, Silvia Salas, Francisco Pérez, Jorge Sáenz y Zazil Alvarado, por su amistad, consejos, así como por hacer más amenos los días de trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 1 de Biología Molecular de Plantas, especialmente a Lucy, por ser mi amiga, consejera y maestra, Benita, Omar y Mayra, por sus consejos y apoyo, Armando, Yair, Mariana, por su amistad.

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

Al CONACYT por la beca otorgada durante la realización de este trabajo

ÍNDICE

	Página
Carátula	i
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen de grado	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Anexos	xiv
1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Vacuna DTP	5
2.2. Tos ferina	6
2.2.1. Tos ferina en México	7
2.2.2. Epidemiología de la infección por pertussis	8
2.3. Aspectos relativos a la salud pública	9
2.4. El agente patógeno y la enfermedad	12
2.4.1. Aspectos moleculares de la patogénesis de <i>B. pertussis</i>	14
2.4.2. Adhesinas	15
2.4.2.1. Hemaglutinina Filamentosa (FHA)	15
2.4.2.2. Pertactina (PRN)	16
2.4.3. Toxinas	17
2.4.3.1. Toxina pertúsica (PT)	17
2.5. Vacunas antitosferínicas	18
2.5.1. Vacunas antitosferínicas de células completas	18
2.5.2. Vacunas antitosferínicas acelulares	19

2.6. Plantas transgénicas para la producción de nuevas vacunas	21
2.6.1. Sistemas de expresión de vacunas recombinantes en plantas	28
2.6.1.1. Transformación nuclear estable	29
2.6.1.2. Transformación de cloroplastos	31
2.6.1.2.1. Biobalística	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo general	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. REACTIVOS Y SUPLEMENTOS	34
4.1. Material biológico	34
4.2. Vectores	34
4.3. Reactivos	35
4.4. Equipo	37
5. METODOLOGÍA	40
5.1. Diseño de genes sintéticos	40
5.2. Construcciones genéticas	41
5.2.1. Construcción para transformación nuclear	42
5.2.1.1. Clonación del gen BPSn en el vector pBI-121	42
5.2.2. Construcción para transformación de cloroplastos	42
5.2.2.1. Clonación del gen BPsc en el vector pBic	42
5.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción pBI121-BPSn	43
5.4. Protocolos de obtención de plantas transgénicas de lechuga y tabaco	43
5.4.1. Lechuga	43
5.4.2. Tabaco	44
5.5. Obtención de los explantes	45
5.5.1. Lechuga	45
5.5.1.1. Obtención de hojas cotiledonarias	45
5.5.2. Tabaco	45

5.6. Ensayos de transformación genética nuclear vía <i>A. tumefaciens</i>	45
5.6.1. Lechuga	45
5.7. Ensayos de transformación genética de cloroplastos por el método de biobalística	46
5.7.1. Obtención del explante	46
5.7.2. Preparación de la suspensión de micropartículas de oro	46
5.7.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco	47
5.7.3.1. Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés	47
5.7.3.2. Bombardeo de las hojas de tabaco (Pistola de helio Bio-Rad)	47
5.8. Análisis de las líneas transformantes	48
5.8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	48
5.8.1.1. Extracción de ADN genómico	48
5.8.1.2. Protocolo de PCR	49
5.8.1.2.1. Oligonucleótidos empleados	49
5.8.2. Extracción de ARN	50
5.8.2.1. Análisis por RT-PCR	51
5.8.2.1.1. Síntesis de ADNc	51
5.8.2.1.2. PCR con ADNc para β -actina	52
5.8.3. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	53
5.8.3.1. Extracción de proteínas	53
5.8.3.1.1. Protocolo de extracción de proteínas	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
6.1. Diseño de genes sintéticos	56
6.2. Construcciones genéticas	60
6.2.1. Construcción para transformación nuclear	60
6.2.1.1. Digestión del gen B _{Psn} y del vector binario pBI-121	60

6.2.1.2. Clonación del gen BPs _n en el vector binario pBI-121	61
6.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62
6.3.1. Proceso general para obtención de plantas transgénicas de lechuga y tabaco vía <i>A. tumefaciens</i>	63
6.3.1.1. Transformación genética nuclear vía <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido pBI121-BPs _n	63
6.3.1.1.1. Lechuga	63
6.4. Construcción para la transformación de cloroplastos	65
6.4.1. Clonación del gen BPsc en el vector pBic	65
6.4.2. Transformación genética de cloroplastos de tabaco por el método de biobalística	67
6.5. Análisis de transformantes	69
6.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa	69
6.5.2. Análisis por RT-PCR	70
6.5.3. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	71
7. CONCLUSIONES	75
8. PERSPECTIVAS	76
9. ANEXO	77
10. BIBLIOGRAFÍA	84

Lista de tablas

Número	Título	Página
1	Vacunas de antígenos recientes expresadas a través del genoma nuclear de plantas reportan inmunogenicidad o protección	24
2	Proteínas biofarmacéuticas expresadas en el genoma de la planta vía nuclear	25
3	Vacunas funcionales de antígenos y proteínas biofarmacéuticas expresadas en el genoma de cloroplasto	27
4	Descripción del protocolo usado para la transformación genética de lechuga en este trabajo	44
5	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los transgenes	49
6	Protocolos de PCR empleados para el escrutinio de líneas candidatas	50
7	Componentes de la mezcla maestra usada para la síntesis de ADNc	51
8	Protocolo de síntesis de ADNc	51
9	Componentes de la mezcla maestra usada para la amplificación de β -actina mediante PCR	52
10	Protocolo de amplificación para β -actina mediante PCR	53

Lista de figuras

Número	Título	Página
1	Cobertura de inmunización global con tres dosis de la vacuna triple DTP en niños	6
2	Reporte anual global de incidencia de tos ferina y cobertura de vacunación (vacuna triple DTP) en el periodo 1980-2008	12
3	Representación esquemática de la producción de vacunas y biofarmacéuticos en plantas y su evaluación final en modelos animales	22
4	Transformación de células vegetales mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
5	Gen sintético para la transformación nuclear	40
6	Gen sintético para transformación de cloroplastos	41
7	Gen para transformación nuclear (BPsn)	58
8	Gen para transformación de cloroplastos (BPsc)	59
9	Digestión del gen BPsn y del vector binario pBI-121 con las enzimas de restricción <i>Xba</i> I y <i>Sac</i> I	61
10	Análisis de las clonas pBI-BPsn por PCR	61
11	Vector binario pBI121-BPsn utilizado para la transformación nuclear de lechuga	62
12	Representación esquemática de la transformación de plantas vía <i>Agrobacterium</i> y regeneración de plantas de lechuga	63
13	Formación de callos y brotes de lechuga regenerados a partir de cotiledones infectados con el plasmido binario pBI121-BPsn	64
14	Análisis de restricción de las clonas con las enzimas <i>Xba</i> I y <i>Xho</i> I de cinco clonas resistentes a la selección después de haber sido transformadas con la construcción pKCZ-BPsc bic	66

15	Vector bicistrónico pKCZ-BPsc bic para transformación de cloroplastos de tabaco	66
16	Proceso de transformación de hojas de tabaco por el método de biobalística	67
17	Transformación de cloroplastos de tabaco	68
18	Análisis de los productos de amplificación por PCR de las plantas de tabaco transformadas con la construcción pKCZ-BPsc bic por biobalística	69
19	Productos de PCR para comprobar integración del gen BPsc al genoma de cloroplasto	70
20	Análisis por RT-PCR de plantas de tabaco transformadas con el gen BPsc (transcrito específico de 566 pb)	71
21	Curva estándar para la cuantificación de PTPFHA	72
22	Análisis por ELISA para la detección de la proteína PTPFHA en hojas de tabaco	72

Anexos

9.1. Preparación de células químicamente competentes y transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.	77
9.2. Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	78
9.3. Extracción de ADN plasmídico.	78
9.4. Preparación de soluciones y medios de cultivo.	78
9.4.1. TAE 50X.	78
9.4.2. Agarosa 1%.	79
9.4.3. Mezcla basal de sales MS.	79
9.4.4. Vitaminas MS.	80
9.4.5. Vitaminas B5	80
9.4.6. Kanamicina	80
9.4.7. Ácido naftalenacético (ANA)	81
9.4.8. Benciladenina (BA)	81
9.4.9. Cefatoxima	81
9.4.10. Cinetina (Cin)	81
9.4.11. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	81
9.4.12. Procedimiento general para la preparación de medios de cultivo.	81
9.4.13. Composición de medios de cultivo.	82
9.4.14. Medio de cultivo YM	82
9.4.15. Medio de cultivo LB	82
9.4.16. Soluciones Bradford	83
9.4.16.1. Solución A	83
9.4.16.2. Solución B	83
9.4.17. Buffer salino de fosfatos (PBS)	83
9.4.19. Buffer de fosfatasa alcalina	83

1. RESUMEN

La tos ferina es una enfermedad infecciosa de distribución mundial en la que se ha observado un aumento en la incidencia de la enfermedad en adolescentes y niños menores de 6 meses de edad. Además se ha establecido que la inmunidad adquirida con la vacuna se pierde alrededor de los siete años posteriores a la última aplicación, lo que aumenta el riesgo de contagio a partir de los diez años de edad. En la actualidad existen las vacunas acelulares contra tos ferina, pero su alto precio limita su aplicación. Por lo anterior, el presente trabajo se enfoca a expresar epítomos de *Bordetella pertussis* relevantes en plantas como un primer paso en el desarrollo de una vacuna comestible contra la tos ferina, que produzca una respuesta inmune más duradera y/o permita el suministro de dosis de refuerzos vía oral, la cual es una vía más aceptada por el público.

Se desarrollaron construcciones que codifican para epítomos relevantes de la toxina pertúsica, la hemaglutinina filamentosa y la pertactina, además, cuentan con espaciadores ricos en prolina y cola de histidinas, esta última para su purificación. Las secuencias fueron optimizadas para su expresión estable tanto en citoplasma de lechuga vía *Agrobacterium tumefaciens*, como en cloroplastos de tabaco vía biobalística.

Se obtuvieron plantas adultas T0 transplastómicas, a las que se verificó la integración del transgén por PCR, así como la presencia del transcrito específico del tamaño esperado por RT-PCR, y se confirmó la concentración de proteína de manera indirecta medio de un ensayo inmunoenzimático con anticuerpos específicos contra la cola de histidinas.

En la transformación nuclear de lechuga, se logró regenerar callos y brotes resistentes al agente de selección con la construcción utilizada.

El material obtenido será analizado *in vivo* para ver demostrar su inmunogenicidad, para posteriormente realizar retos en ratones y demostrar su inmunoprotección.

Este es el primer trabajo de la expresión de un polipéptido donde se han incluido 3 diferentes epítomos de regiones antigénicas de *B. pertussis*, el cual se ha expresado en plantas.

ABSTRACT

Whooping cough is an infectious disease of worldwide distribution where an increased incidence of the disease in adolescents, and children under 6 months of age has been observed. In addition It has been established that the immunity acquired by vaccination is lost about seven years after the last application, which increases the risk of contagion from the ten years of age. Currently there are acellular vaccines against whooping cough, but their high prices have restricted their application. Therefore, this work focuses on the expression of multiple epitope expression of *Bordatella pertussis* on plants as a first step on the development of an edible vaccine against whooping cough, producing a long lasting response and/or the availability of doses that allow the boosting by oral administration which is preferred instead of the parenteral vaccination.

Constructions were developed that encode for relevant epitopes of pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and pertactin, also, harbor spacers rich in proline and a histidine tail, the latter for its purification. The sequences were optimized for stable expression both in lettuce cytoplasm via *Agrobacterium tumefaciens*, and tobacco chloroplasts via biolistic.

T0 transplastomic adult plants were regenerated, and the transgene presence and integration of these were confirmed by PCR as well as the presence of specific transcripts of the expected size by RT-PCR. In addition, the protein concentration was obtained by an immunosorbent assay with specific antibodies against the histidine tail.

In the lettuce nuclear transformation, it was possible to regenerate *calli* and shoots resistant to the selection agent with the construction designed.

The material obtained by the two transformations methods will be used for *in vivo* assays in order to demonstrate its immunogenicity and then to perform challenges in mice to test their immunoprotective properties.

This is the first study of the expression of a polypeptide which includes 3 different epitopes of relevant antigenic regions of *B. pertussis*, which has been expressed in plants.

2. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades infecciosas son la causa de más del 45% del total de muertes en países en desarrollo y el 63% de muertes de niños en todo el mundo (Arntzen, 2005). Si bien la vacunación es el medio más eficaz de prevenir enfermedades infecciosas, aproximadamente 30 millones de niños que nacen cada año no son debidamente inmunizados contra enfermedades prevenibles (www.care.org/campaigns/childrenpowerty/facts.asp). En 2002, se estimó que hubo 2.2 millones de decesos, los cuales fueron resultado de enfermedades prevenibles por vacunación (Richter y col., 2000). Uno de los factores implicados en estas estadísticas es son los enfoques utilizados actualmente para la producción de vacunas, los cuales son tecnológicamente complejos y costosos (Floss y col., 2007).

Aun en el siglo 21 persisten desigualdades globales en cuestiones de salud. Varios factores contribuyen a esta situación: enfermedades emergentes y re-emergentes, el tamaño cada vez mayor de la población mundial y el fantasma de la guerra biológica, colocan una demanda sin precedentes a las compañías farmacéuticas. Actualmente en muchos casos, la demanda global excede la capacidad de producción. Adicionalmente, independientemente de la disponibilidad de vacunas, el costo por dosis sigue siendo el principal factor limitante del éxito de los programas nacionales de vacunación. De hecho, como la composición de las vacunas es cada vez más compleja, esto repercute en el tiempo para el desarrollo de una nueva vacuna y eventualmente en los precios del mercado (Thanavala y col., 2006).

En la cumbre mundial para los niños en 1992 se propuso que la vacuna ideal debería tener las siguientes características: ser efectiva si se administró como una dosis sencilla, preferentemente vía oral; ser estable al calor; que pueda ser administrada poco después del nacimiento y ser fácilmente accesible para facilitar la vacunación de la población infantil a nivel mundial (Mitchell y col., 1993). Otro factor limitante en la eficacia de la vacunación se relaciona con las prácticas inseguras de inyección que exponen a las personas al riesgo de infecciones por patógenos de transmisión sanguínea, tales como la hepatitis B y

C, y el VIH. Se ha estimado que más del 30% de las inmunizaciones con inyecciones no es segura, debido principalmente a la reutilización de agujas y jeringas. Las lesiones accidentales por pinchazos con agujas también son un problema importante de salud pública (Thanavala y col., 2006).

Como una alternativa a la administración de vacunas por vía parenteral, la administración por mucosas ofrece evidentes ventajas en términos de seguridad. Particularmente las vacunas orales ofrecen ventajas significantes logísticas, como las campañas para la erradicación de la polio lo han demostrado .

La vacunación universal de la niñez tendría efectos profundos en la nivelación de las desigualdades de salud en muchas partes del mundo, en este contexto, se han logrado avances importantes gracias a los esfuerzos asombrosos de la OMS, la Iniciativa Internacional de Vacunas, la Alianza Mundial para Vacunas e Inmunización y la Fundación Bill y Melinda Gates (Thanavala y col., 2006).

Las vacunas de patógenos muertos o atenuados fueron la base para todas las vacunas "clásicas" (Thanavala y col., 2006). Avances en las técnicas de biología molecular durante la década de los 80s, ayudaron en el desarrollo de nuevas estrategias para la producción de vacunas de subunidades. Estas nuevas vacunas, están compuestas de proteínas derivadas de patógenos, como virus, bacterias o parásitos. Por otro lado, a pesar de que las células de mamífero y sus tejidos han sido ampliamente utilizados para la producción comercial de vacunas, estos sistemas son caros y su escalamiento no es fácil (Larrick y Thomas, 2001; Houdebine, 2009). Además, tales sistemas de producción están propensos a contaminación por patógenos de humanos los cuales algunas veces escapan a la detección aún en vacunas purificadas. Esto incluye priones, virus y toxinas.

Por otro lado, la expresión de proteínas antigénicas recombinantes funcionales en *E.coli* a menudo tiene limitaciones debido a la falta de una variedad de modificaciones post-traduccionales. Algunas de las modificaciones y procesamientos post-traduccionales de proteínas similares a las de mamífero ocurren en levaduras y líneas celulares de insectos. Sin embargo, las diferencias en los patrones de las modificaciones post-traduccionales limitan su potencial

debido a las implicaciones inmunológicas que suelen tener, tales como el desarrollo de alergias o respuestas inmunes no deseadas. (Streatfield y Howard, 2003a,b; Chen y col., 2005; Houdebine, 2009). Como una alternativa importante, las plantas se están convirtiendo en un sistema prometedor para fabricar una amplia gama de proteínas funcionalmente activas de gran valor para la industria biofarmacéutica (Tiwari, 2009). En estas aplicaciones se encuentran implicadas varias tecnologías, entre ellas, los métodos modernos de reproducción, propagación clonal, la hibridación somática, protoplastos / cultivos de células en suspensión, el cultivo de raíces aéreas y la transformación genética. Uno o más antígenos inmunoprotectores de patógenos se pueden producir en las plantas por la expresión de gene(s) que codifica la proteína(s). En los últimos años, nuevos sistemas de producción basados en plantas destinadas a desarrollar vacunas "comestibles" u "orales" también se han estudiado (Ma y col., 2003; 2005a,b; Koprowski, 2005; Lal y col., 2007; Mishra y col., 2008; Houdebine, 2009). A comparación de las vacunas tradicionales, las vacunas comestibles ofrecen simplicidad en su uso, costos más bajos, almacenamiento adecuado, entrega económica y respuesta inmune de mucosas.

2.1. Vacuna DTP

La vacuna difteria-tétanos-pertussis fue la primera vacuna combinada, introducida hace mas de 65 años, y protege contra las enfermedades causadas por las tres bacterias *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* y *Bordetella pertussis*, respectivamente (Edwards y Decker, 2004). Se ha reconocido desde el desarrollo de la vacuna contra la tos ferina que, a diferencia del efecto protector de toxoides diftérico y tetánico, la vacunación con anatoxina de tos ferina por sí sola no era suficiente para la inmunidad. Las vacunas celulares DTP contienen *Bordetella pertussis* inactivada por calor o con formaldehído y toxoides de tetánico y diftérico. Esta vacuna combinada ha sido universalmente usada en el primer año de vida para prevenir la morbilidad y mortalidad por tos ferina, difteria y tétanos (Figura 1) (Higashi y col., 2009).

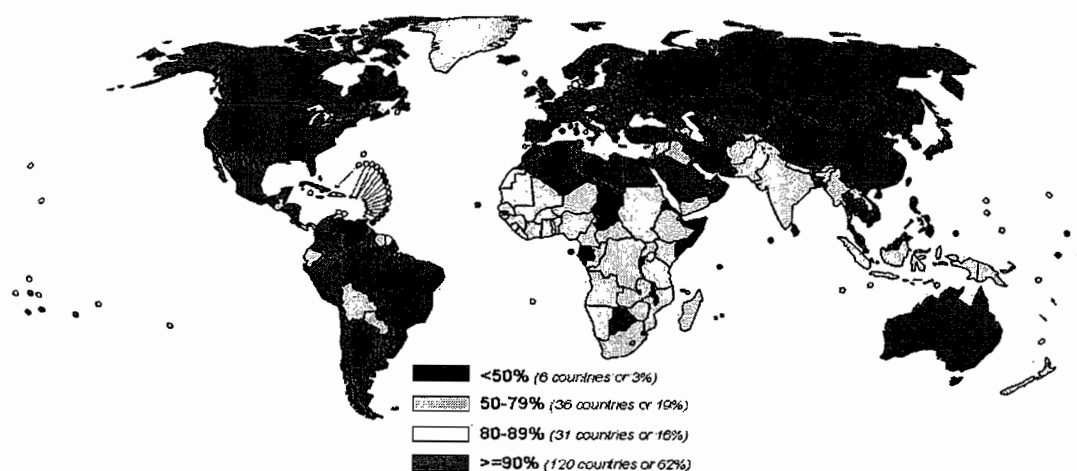


Figura 1. Cobertura de inmunización global con tres dosis de la vacuna triple DTP en niños (2008) (WHO, 2010).

Las vacunas DTP difieren de un fabricante a otro en su eficacia, debido a las diferentes cepas usadas de *Bordetella pertussis* para su producción. Algunos fabricantes suelen incluir dos cepas. Debido a ésto, aunque no común, se han presentado riesgos de eventos adversos severos relacionados al componente de pertussis en la vacuna DTP. El riesgo de encefalopatía y convulsiones varía de acuerdo al origen de la vacuna y de la cepa utilizada para su producción. Estos riesgos han sido estimados a ser 1/19,496 convulsiones por fiebre, 1/76,133 convulsiones sin fiebre y 3/106 de encefalopatía (Edwards y Decker, 2004).

2.2. Tos ferina.

La pertussis, tos ferina o coqueluche es una infección aguda del tracto respiratorio causada principalmente por *Bordetella pertussis*, una bacteria fastidiosa gram-negativa. Esta enfermedad, aunque puede prevenirse mediante vacunación, sigue siendo una de las primeras 10 causas de muerte en todo el mundo. Hoy en día, la morbilidad de pertussis es significativa no solo en niños menores de 1 año de edad, sino también en adolescentes y adultos. Se hipotetizaba que la inmunización confería inmunidad de por vida debido a la escasez de casos de tos

ferina en niños en edad escolar y adultos en periodos pre-vacuna y vacuna temprana, sin embargo, debido a que desde la década de 1980 el número de casos ha aumentado de manera constante entre los niños pequeños, adolescentes (11-18 años de edad) y adultos, el principio de protección de por vida después de la inmunización en la infancia o la tos ferina ha sido rechazado. Además, adolescentes y adultos son cada vez más reconocidos como vectores de transmisión de *B. pertussis* a los niños pequeños, que tienen el mayor riesgo de complicaciones relacionadas con la tos ferina, hospitalización y la muerte (Guris y col., 1999; von Koning y col., 2002; Hoey, 2003; Ntezayabo y col., 2003; Tanaka y col., 2003; Leung y col., 2007; Roberts y col., 2008).

2.2.1. Tos ferina en México

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en sus lineamientos de integración de estrategias sanitarias de las naciones, promueve el diseño de esquemas de inmunizaciones epidemiológicamente relevantes, inmunológicamente eficaces, operacionalmente factibles y socialmente aceptables para cada país (WHO, 2006).

En México, la vacunación masiva tiene una historia que inició en 1973, cuando se creó el Programa Nacional de Inmunizaciones, el cual estableció la aplicación obligatoria de cuatro vacunas: antipoliomielítica, difteria-tos ferina-tétanos (DPT), antituberculosa (BCG) y antisarampión, además del toxoide tetánico (Tt). En 1991 se fundó el Programa de Vacunación Universal, de los más completos en América Latina. Las modificaciones posteriores respondieron a las necesidades nacionales (Hurtado y Matias 2005; Ulloa y Ávila, 2008).

Recientemente la Secretaría de Salud de Nuevo León, México, lanzó una alerta epidemiológica por un brote de tos ferina en esa entidad, al registrarse 49 casos (21 confirmados) hasta marzo de 2009, con dos muertes neonatales a consecuencia de la enfermedad. El padecimiento se extendió a otros lugares del norte del país, como Monterrey y Tamaulipas, lo que obligó a la Secretaría de Salud a emitir una alerta nacional, pues se notificó la muerte de al menos siete niños. La principal estrategia de control se orientó a revacunar a las personas de

entre 15 y 20 años de edad (<http://elbiruniblogspotcom.blogspot.com/2009/03/tosferinaen-nuevo-leon-mexico.html>). Brotes como el descrito, y algunos ya documentados, obligan a replantear estrategias en busca de mejores alternativas, como la vacunación materna con DPT acelular en el último trimestre del embarazo (<http://www.ansa.it/ansalatina/notizie/notiziari/mexico/20090330210134851997.html>). En 2010, debido a las 900 muertes presentadas en California por tos ferina, Baja California ha tomado cartas en el asunto con.

2.2.2. Epidemiología de la infección por pertussis.

Aunque la difteria se consideró durante muchos años una enfermedad obligada de la infancia con tasas de ataque en la comunidad de 80 a 100% en la época prevacunal, en la población vacunada la tasa de ataque es aún significativa: de 50 a 80%. La tasa de ataque medida es de ~40%, con variaciones significativas según la edad de los expuestos: de 80 a 90% en menores de 1 año y de 14% en adultos mayores de 40 años. De estos últimos, a pesar de darles quimioprofilaxis, el 60% sigue presentando la enfermedad durante los primeros 15 días, esto debido a que tal vez el tratamiento no es funcional (Schellekens y col., 2005; Dylag y Shah, 2008; Akinsanya-Beysolow y Wolfe, 2009).

En relación con los datos reportados de México, en 1990, Navarrete y colaboradores (1990) describieron un brote de tos ferina en 85 pacientes en Veracruz, a finales de 1987, con duración de 13 semanas y el pico más alto en enero de 1988. La tasa de ataque en niños de 7 a 11 meses de edad fue de 85%. En Jalisco se estudiaron 103 casos de síndrome pseudo-*pertussis*, de los cuales 16.5% se diagnosticaron como tos ferina; 60% de éstos se confirmó por análisis de laboratorio y el resto por asociación epidemiológica. El grupo de edad más afectado fue el de 3 a 11 meses; 71% de los pacientes requirió hospitalización, la tasa de fatalidad fue de 11.7% y se identificó contacto domiciliario en 85% de los casos (Capuchino y col., 2005).

En fechas más recientes, Tomé Sandoval y colaboradores (2008) estudiaron la seroprevalencia de *B. pertussis* aislado entre estudiantes de 12 a 15

años de edad y sus contactos, en 14 escuelas secundarias en la Ciudad de México de septiembre de 2002 a marzo de 2003. Durante este periodo se confirmó infección por *B. pertussis* en 32.8% de los 61 estudiantes con tos persistente por más de dos semanas; entre los 152 contactos escolares, 10.6% fue positivo por técnica de PCR y ocho tuvieron tos prolongada.

En todo el mundo se estima que ocurren más o menos de 20 a 40 millones de casos de tos ferina, de los cuales mueren de 200.000 a 400,000 niños. Cerca de 90% de estas muertes ocurre en países en vías de desarrollo.

Las razones del resurgimiento de la tos ferina y sus cambios de epidemiología son numerosas. Por ejemplo, la disminución de la inmunidad con el paso del tiempo es uno de los factores más importantes del aumento de la incidencia de la enfermedad entre adolescentes y adultos identificados como fuente de infección para niños no vacunados o con esquema de inmunización incompleto (MMWR, 2006). En el cuadro 1 se comparan estrategias de vacunación con sus respectivos porcentajes de reducción de la enfermedad.

Cuadro 1
Comparación de disminución de casos de *pertussis* de acuerdo con la simulación por computadora de seis estrategias de vacunación.

Estrategia de inmunización	Porcentaje a que se reducen los casos habituales ^a	Porcentaje a que se reduce la enfermedad moderada	Porcentaje a que se reducen los casos asintomáticos	Número necesario por vacunar ^a
No inmunización	83%	68%	95%	N/D ^a
Lactantes	65%	44%	28%	N/D ^a
Adolescentes	13%	20%	22%	853
Adolescentes y adultos	30%	45%	45%	2325
Estrategia "capullo" ^b	9%	12%	12%	444
Adolescentes y estrategia "capullo"	23%	31%	33%	605
Adolescentes, adultos y estrategia "capullo"	36%	50%	50%	1340

Modificado de van Rie A y col., 2004.

^a Para prevenir un caso (0 a 3 meses de edad).

^b Vacunación de los miembros del hogar para protección del recién nacido.

2.3. Aspectos relativos a la salud pública

La tos ferina es una causa importante de muerte de lactantes en todo el mundo y continúa siendo un problema de salud pública incluso en los países con una

cobertura de vacunación alta. Según cálculos recientes de la OMS, en 2003 se produjeron alrededor de 17,6 millones de casos de tos ferina en todo el mundo, el 90% en países en desarrollo, y aproximadamente 279.000 personas murieron a causa de la enfermedad. Se calcula también que en 2003, la vacunación contra la tos ferina evitó en todo el mundo alrededor de 38,3 millones de casos y 607,000 muertes.

En su fase catarral inicial, la tos ferina es fácilmente transmisible, con una tasa de ataque de hasta el 90% en personas no inmunes que mantienen contacto en el hogar con el enfermo. Los pacientes que no reciban tratamiento podrán contagiar la enfermedad durante tres semanas o más a partir de la aparición de los accesos de tos característicos, aunque el riesgo de transmisión disminuye rápidamente tras la fase catarral. Son poco habituales los portadores crónicos y asintomáticos de *Bordetella pertussis*. El desenlace clínico de la tos ferina depende de factores como la edad y el estado de vacunación. Aunque la mayoría de los casos clínicamente reconocibles de tos ferina aparecen en niños de uno a cinco años, los casos notificados de la forma grave de la enfermedad y de fallecimientos corresponden principalmente a lactantes de muy corta edad no inmunes. En niños de mayor edad, adolescentes y adultos, la tos ferina no suele detectarse debido a que con frecuencia se desarrolla de forma atípica. Sin embargo, los grupos de población de mayor edad constituyen una fuente importante de infección de los lactantes vulnerables.

Antes de que las vacunas tuvieran una amplia disponibilidad, la tos ferina era una de las enfermedades infantiles más comunes. En los países industrializados, su incidencia anual media era del orden de 150 a 200 casos por cada 100,000 habitantes. Tras las campañas masivas de vacunación contra la tos ferina realizadas durante las décadas de 1950 y 1960, se produjo una reducción espectacular (superior al 90%) de la incidencia y mortalidad de la enfermedad en los países industrializados. La vacuna antitosferínica (en combinación con los toxoides de la difteria y el tétanos) ha formado parte del Programa Ampliado de Inmunización de la OMS desde su concepción en el año 1974. Desde finales de la

década de 1980, han sido vacunados contra la tos ferina alrededor del 80% de los lactantes de todo el mundo.

Pese a su prevención eficiente de la enfermedad clínica, la vacuna afecta escasamente a la circulación de *B. pertussis*, incluso en países con una cobertura de vacunación alta. Los niños no inmunizados y las personas de mayor edad con inmunidad debilitada pueden convertirse en reservorios de la infección y transmitir ocasionalmente *B. pertussis* a lactantes de corta edad no inmunizados. Además, la cantidad considerable de adolescentes y adultos vulnerables hace posible la aparición de brotes de tos ferina, aunque una cobertura de vacunación alta puede prolongar los intervalos entre brotes. De este modo, en grandes ciudades de Inglaterra y Gales, los intervalos entre epidemias de tos ferina aumentaron de entre 2 y 2.5 años en la década de 1950 a 4 años tras la vacunación antitosferínica a gran escala de las décadas de 1960 y 1970.

Durante la década de 1990, se observó en muchos países industrializados un cambio significativo del perfil epidemiológico: aumentó la incidencia de tos ferina en niños en edad escolar vacunados anteriormente con vacunas antitosferínicas de células enteras o acelulares, así como en adolescentes y adultos. En Finlandia, por ejemplo, donde la cobertura nacional de inmunización es del 98%, la incidencia de tos ferina en el grupo etario de 10 a 16 años pasó en el periodo de 1995 a 1999 de 30 a 60 casos por 100,000. La transmisión por los grupos de población de mayor edad probablemente explique el aumento simultáneo, de 30 a 150 casos por 100,000, de la incidencia de tos ferina en lactantes de corta edad del país. Otros países europeos, así como Australia, el Canadá, el Japón y los Estados Unidos, han notificado observaciones similares. Aunque el cambio del perfil epidemiológico es evidente en algunos países, en otros podría deberse, al menos en parte, a las crecientes tasas de detección de la tos ferina en adolescentes y adultos junto a la mejora del diagnóstico de la enfermedad en laboratorio y de su vigilancia y notificación (WHOWER, 2005).

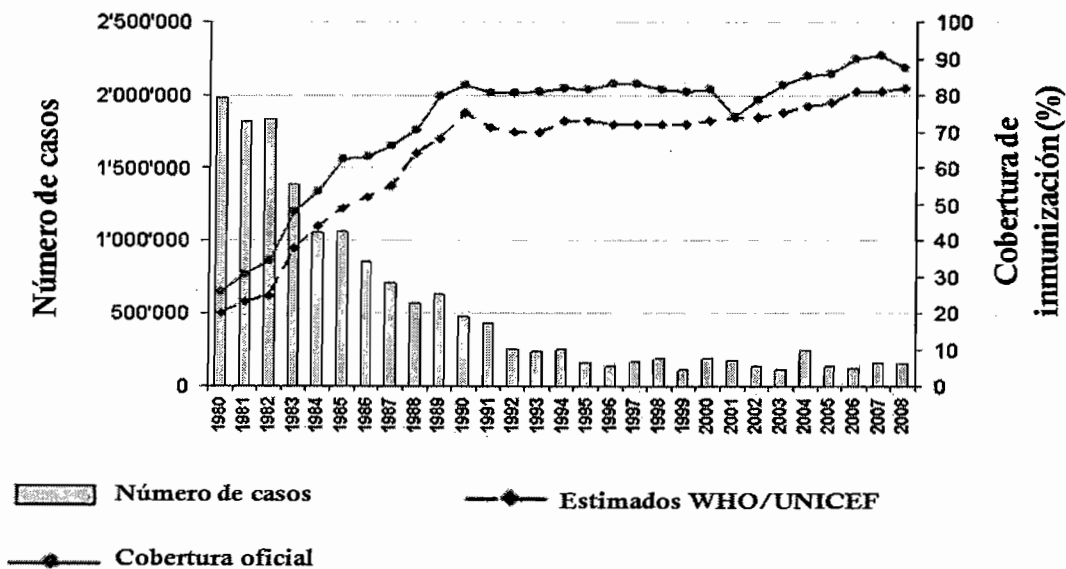


Figura 2. Reporte anual global de incidencia de tos ferina y cobertura de vacunación (vacuna triple DTP) en el periodo 1980-2008 (WHO, 2010).

2.4. El agente patógeno y la enfermedad

B. pertussis, el agente causal de la tos ferina, es un pequeño cocobacilo gramnegativo de cultivo exigente con afinidad exclusiva por las mucosas de las vías respiratorias humanas. Ocasionalmente, otros agentes infecciosos, en particular *B. parapertussis*, pueden producir enfermedades parecidas a la tos ferina. Por lo tanto, es importante confirmar en laboratorio los casos clínicamente sospechosos, especialmente para el diagnóstico de casos índice. Las especies del género *Bordetella* pueden alterar su estado fenotípico en función de las condiciones ambientales, y los factores de virulencia pueden manifestarse de diferentes modos. Estos factores incluyen la toxina pertúsica (PT), la hemaglutinina filamentosa (FHA), la pertactina (PRN), las fimbrias (FIM), la hemolisina adenilato ciclasa (AC), la citotoxina traqueal (TCT) y la endotoxina bacteriana de *B. pertussis*. Las adhesinas, como la FHA, la PRN y las fimbrias, facilitan la unión a las células hospederas destinatarias, y la PT, la TCT y la AC permiten a la bacteria destruir el tegumento epitelial y eludir el sistema inmune del hospedero. No obstante, aún no se comprende plenamente la patogenia de la tos ferina.

A lo largo del tiempo, se han observado pequeños cambios en las secuencias genómicas de la PRN y PT bacterianas. Existe preocupación por la posible pérdida gradual de eficacia de las actuales vacunas antitosferínicas debido a la deriva antigénica (*drift*) y a la selección continua de las clonas menos sensibles a la vacuna, aunque esto no se ha corroborado hasta ahora. Asimismo, parece que la resistencia creciente de este patógeno a los antibióticos evoluciona muy lentamente.

La respuesta inmune inicial generada por los anticuerpos puede limitar la colonización del organismo por las bacterias y reducir al mínimo los daños ocasionados por las toxinas bacterianas en las células epiteliales y del sistema inmune, pero no hay una correlación alta ni con el tipo ni con la concentración de anticuerpos. Los anticuerpos maternos no parecen proteger a los recién nacidos frente a la tos ferina grave. En lactantes y niños de corta edad, la respuesta celular se produce preferentemente por las células Th1, mientras que en los niños de mayor edad y los adolescentes intervienen, al parecer, tanto células de tipo Th1 como de tipo Th2 que es una respuesta humoral.

Las personas infectadas transmiten la *B. pertussis* a las personas vulnerables por la vía aérea. Tras un periodo de incubación de entre 7 y 10 días, los enfermos desarrollan síntomas catarrales, incluida la tos. En el transcurso de una o dos semanas, puede aparecer la tos convulsiva con el característico silbido final. En los casos típicos, la tos es especialmente fuerte por las noches y frecuentemente acompañada de vómitos. En los lactantes de corta edad, la tos ferina puede provocar únicamente apnea y cianosis, mientras que en los adolescentes y adultos, una tos persistente y poco común puede ser la única manifestación de la enfermedad. Las distintas fases de la enfermedad (catarral, convulsiva y de convalecencia) pueden durar en total de uno a varios meses. Entre el 5 y al 6% de los enfermos de tos ferina sufren complicaciones, más frecuentemente los lactantes menores de 6 meses. El problema más destacado es la bronconeumonía (5.2%), con una mortalidad relativamente alta. La incidencia de encefalopatía asociada a la tos ferina es de 0.9 casos por 100,000. En los países industrializados, la tasa de letalidad de la tos ferina es muy baja

(inferior a 1/1000), pero se calcula que la letalidad promedio en los países en desarrollo es del 3.9% de los lactantes y el 1% de los niños de uno a cuatro años (WHO/WER, 2005).

2.4.1. Aspectos moleculares de la patogénesis de *B. pertussis*.

El género *Bordetella* contiene una gran cantidad de especies patogénicas generalmente asociadas con infecciones del tracto respiratorio superior en animales de sangre caliente. *Bordetella pertussis* es el agente etiológico de la tos ferina, *Bordetella parapertussis* provoca un síndrome leve parecido a la tos ferina, mientras que *Bordetella bronchiseptica* se aísla raramente de humanos, esencialmente solo de pacientes severamente inmunocomprometidos. *B. pertussis* y *B. parapertussis* son típicamente patógenos de humanos, aunque *B. parapertussis* ha sido también encontrada en ovejas. Por otro lado, *B. bronchiseptica* es encontrada en muchas especies de mamíferos, en los cuales por lo general permanece silenciosa. Estas 3 especies de *Bordetella* tienen secuencias de ADN muy similares, aunque los cromosomas de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* son aproximadamente 1Mb más largos que los de *B. pertussis*. El entendimiento de los mecanismos moleculares de la patogénesis de *Bordetella* es cada vez mayor, especialmente para *B. pertussis*. Desde su descubrimiento en 1960 por Bordet y Gengou, *B. pertussis* clásicamente ha sido considerada como un patógeno extracelular, sin embargo, durante la última década se ha comprobado que también puede sobrevivir dentro de una variedad de tipos de células eucariotas, incluyendo macrófagos y células epiteliales (Ewanowich y col., 1989; Bordet y Gengou, 1909 Porter y col., 1994; Stibitz y Yang, 1997; Loch, 1999).

B. pertussis coloniza el epitelio respiratorio por medio de la acción potentes factores de virulencia, tales como la PT, PRN, FIM, FHA, AC y TCT. Estos factores permiten a la bacteria unirse y dañar el epitelio de las vías respiratorias e interfiere con la actividad normal respiratoria, dando como resultado complicaciones serias y a veces la muerte (Bassiniet y col., 2000; Carbonetti y col., 2005; Matoo y Cherry, 2005; Poolman y Hallander, 2007).

Los factores de virulencia de *B. pertussis* están divididos típicamente en 2 categorías principales: adhesinas y toxinas. La mayoría son proteínas y la expresión de sus genes estructurales está regulada coordinadamente a nivel transcripcional en respuesta a señales del ambiente (Lacey, 1960; Locht, 1999).

2.4.2. Adhesinas.

2.4.2.1. Hemaglutinina Filamentosa (FHA).

Es la adhesina mejor estudiada en *B. pertussis*. Ésta es producida como un precursor de 370 kDa codificado por el gen *fhaB*. El precursor FhaB sufre un procesamiento proteolítico en el N-terminal y en el C-terminal, resultando una FHA madura de 220 kDa (Locht y Antoine, 1995; Renauld-Mongénie y col., 1996; Locht, 1999). El modelo estructural de la FHA madura, basado en microscopía electrónica de alta resolución y mediciones de difracción circular, así como predicciones de la estructura secundaria, es una molécula monomérica filamentosa de aproximadamente 50 nm de longitud y plegada como una horquilla (Makhov y col., 1994; Locht, 1999). Tiene la forma de una barra con un diámetro de 4 nm y contiene en un extremo una estructura globular formada por los extremos N-terminal y C-terminal de la molécula.

La región N-terminal de la molécula precursora contiene un péptido señal no ortodoxo (Jacob-Dubuisson y col., 1996; Locht, 1999), y consta de 2 partes; la primera parte, la extensión N-terminal es homóloga a los extremos N-terminales de muchos otros precursores de adhesinas de organismos Gram-negativos. Su función es desconocida. Este es seguido por una secuencia con las características de un típico péptido señal, sugiriendo que el precursor de FHA es transportada a través de la membrana citoplásmica por un sistema clásico Sec. El residuo N-terminal de la FHA madura es piroglutamato, un residuo de glutamina modificado (Lambert-Buisine y col., 1998, Locht, 1999).

La región N-proximal de la FHA madura es homóloga a un dominio encontrado en varias hemolisinas y otras adhesinas de patógenos Gram-negativos. Este dominio de aproximadamente 120 residuos es esencial para la

translocación de FHA a través de la membrana externa (Jacob-Duibisson y col., 1996; Locht, 1999).

La secreción de FHA requiere de una proteína accesoria localizada en la membrana externa. Esta proteína, la FhaC, es homóloga a las proteínas accesorias involucradas en la secreción de hemolisinas y adhesinas de otros microorganismos que contienen un dominio N-proximal homólogo a FHA (Willems y col., 1994; Locht, 1999).

FHA ha sido considerada como la principal adhesina de *B. pertussis* (Thomas y col., 1989; Lotch, 1999). Ésta es altamente inmunogénica, con 2 regiones inmunodominantes principales, identificadas como dominio tipo I y dominio tipo II. El dominio tipo I en el carboxilo terminal, el cual contiene la mayoría de los epítomos reactivos, parece ser mas inmunodominante que el N-terminal tipo II (Di Tomasso y col., 1991; Leininger y col., 1997; Wilson y col., 1998; Zhao y col., 2008).

2.4.2.2. Pertactina (PRN).

Proteína de membrana externa con un peso molecular aparente de 69 kDa. El gen estructural, *prn*, codifica una proteína de 94 kDa la cual es transportada dentro del periplasma por un mecanismo de secreción dependiente de péptido señal. Este después sufre un procesamiento proteolítico resultando la remoción de una región de 30 kDa de la región C-terminal (Charles y col., 1989; Holland, 1998).

La estructura de la pertactina ha sido determinada mediante cristalografía. (Emsley y col., 1996). Se trata de un monómero conformado por 16 cadenas paralelas que forman una β hélice. Varias colas sobresalen del núcleo de la β hélice. Estas colas han sido asociadas con las actividades biológicas de la pertactina. Una secuencia de Arg-Gly-Asp involucrada en la unión de la pertactina a las células del huésped, en particular a las integrinas en la superficie de células epiteliales, está localizada adyacente a una de estas colas que contienen repetidos ricos en prolina (GGXXP). La región C-terminal de la pertactina

contiene repetidos ricos en prolina (PQP)₅, los cuales son los epítomos protectivos principales de la proteína.

La PRN es polimórfica entre las especies de *Bordetella*, aún entre diferentes cepas dentro de una misma especie (Mooi y col., 1998). *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* producen pertactinas con pesos moleculares ligeramente diferentes, 70 y 68 kDa, respectivamente (Li y col., 1992). Estas diferencias se atribuyen principalmente a diferencias en el número de copias de los repetidos ricos en prolina.

2.4.3. Toxinas.

2.4.3.1. Toxina pertúsica (PTx).

La toxina pertúsica consta de 5 subunidades diferentes, llamadas S1 hasta S5, de acuerdo a la disminución de sus pesos moleculares y están arregladas en una estequiometría 1S1:1S2:1S3:2S4:1S5 (Tamura y col., 1982). Las subunidades, de la S2 a la S5 forman la fracción B de la toxina, la cual es responsable de la interacción de la toxina con los receptores de la célula blanco. La subunidad S1, también llamada el promotor A, tiene actividad enzimática que es responsable de la mayoría de las actividades biológicas. PTx es por lo tanto un miembro del grupo de proteínas de toxinas bacterianas A-B.

S1 tiene actividad ADP-ribosiltransferasa usando NAD como donador de ADP y activa una transducción de señales mediadas por proteínas G. El mecanismo molecular de la toxina puede ser dividida en 3 etapas:

- 1) Unión de la toxina los receptores de la célula blanco vía el oligomero B.
- 2) Translocación de membrana de la subunidad S1 dentro del citosol.
- 3) Actividad ADP-ribosiltransferasa por la subunidad S1 translocada.

Como consecuencia, se incrementa la producción de AMPc alterando las vías metabólicas principales, pero sin causar la muerte celular. Dependiendo del tipo de célula, la toxina puede tener una variedad de efectos fisiológicos, tales como sensibilización de histaminas, activación de la secreción de insulina, o linfocitosis (Muñoz, 1985).

Todas las subunidades de la toxina son transportadas a través de la membrana interna, usando un péptido señal. Después de remover este péptido señal, las subunidades se ensamblan en una estructura holotoxina dentro del periplasma, y la toxina completamente ensamblada es secretada dentro del medio de cultivo de *B. pertussis* (Weiss y col., 1993; Lochter, 1999).

2.5. Vacunas antitosferínicas.

En la década de 1940 y 1950, vacunas de células completas de pertussis (CP) que contenían bacterias completas muertas o vivas atenuadas, fueron introducidas al mercado. Estas vacunas provocaron un dramático decremento en la incidencia de pertussis y complicaciones asociadas a pertussis. Sin embargo, preocupaciones acerca de la reactogenicidad de las vacunas CP y avances en la tecnología de las vacunas llevaron a la introducción de vacunas acelulares (AP). Estas vacunas contienen un número limitado de proteínas específicas de *B. pertussis* (Cherry y col., 1998; Storsaeter y col., 1998; Storsaeter y col., 2003).

En países donde las vacunas CP o AP de eficacia probada han sido usadas por años, la incidencia reportada de pertussis entre lactantes y niños pequeños ha disminuido dramáticamente. Aunque la vacunación masiva ha reducido la incidencia y transmisión de pertussis en todo el mundo en la población infantil, un gran número de países con alta cobertura de vacunación han reportado un incremento en pertussis entre niños mayores, adolescentes y adultos (Matoo y Cherry, 2005; Poolman y Hallander, 2007).

2.5.1. Vacunas antitosferínicas de células completas

Las vacunas antitosferínicas de células completas son suspensiones de células de *B. pertussis* que han sido inactivadas, normalmente con formol. Los diferentes fabricantes de vacunas antitosferínicas de células enteras emplean métodos de producción diferentes, por lo que este grupo de vacunas es relativamente heterogéneo. Cada lote de la vacuna debe superar una evaluación de su potencia (prueba de protección inmunitaria en ratones), un análisis de su toxicidad (prueba de incremento de peso en ratones), un control de su esterilidad y un análisis de su

opacidad para excluir las vacunas con un exceso de bacterias. La mayoría de las vacunas antitosferínicas de células enteras sólo se comercializan en combinación con los toxoides diftérico y tetánico. Todas las vacunas antitosferínicas de células enteras (o DTwP) contienen un adyuvante de sal de aluminio, y en la mayor parte de los casos, el conservador tiomersal. Estas vacunas no deben congelarse, sino almacenarse entre 2 y 8 °C. Todas las vacunas antitosferínicas de células completas tienen una caducidad de entre 24 y 36 meses.

La inmunización con vacunas antitosferínicas de células completas se asocia con frecuencia (en 1 de cada 2 a 10 inyecciones) con reacciones adversas leves como eritema y tumefacción local, fiebre y agitación. El llanto prolongado y las convulsiones son menos comunes (menos de un caso de cada 100), mientras que los episodios hipotónicos-hiporreactivos son escasos (menos de un caso de cada 1000 a 2000). Las investigaciones exhaustivas realizadas no han confirmado la sospecha de que la vacunación contra la tos ferina podría inducir encefalopatía. Las reacciones locales tienden a aumentar con la edad y el número de inyecciones, por lo que no se recomienda el uso de vacunas antitosferínicas de células completas para la inmunización de adolescentes y adultos.

2.5.2. Vacunas antitosferínicas acelulares

Las vacunas antitosferínicas acelulares contienen la toxina inactivada de la tos ferina, bien por separado o en combinación con otros componentes de *B. pertussis*, como la FHA, los antígenos fimbriales y la PRN. Las vacunas actuales se diferencian unas de otras por la cepa bacteriana, el número y la cantidad de componentes, los métodos de purificación y destoxificación, los adyuvantes, excipientes y conservadores, como el tiomersal, empleados.

Las mejores vacunas antitosferínicas acelulares han mostrado una eficacia protectora similar a la de las mejores vacunas antitosferínicas de células completas (superior al 85%). Aún se debate si las vacunas antitosferínicas acelulares monovalentes (que contienen únicamente la toxina inactivada de la tos ferina) y bivalentes (que contienen dicha toxina en combinación con la FHA) son igual de eficaces que las vacunas antitosferínicas acelulares polivalentes (que

contienen de 3 a 5 componentes). No obstante, todas las vacunas antitosferínicas acelulares con autorización de comercialización han demostrado ser muy eficaces para controlar la tos ferina en lactantes y niños de corta edad siempre y cuando se consigan alcanzar las tasas de cobertura adecuadas (superiores al 90%). En principio, debería administrarse el mismo tipo de vacuna antitosferínica acelular en toda la serie primaria de vacunación. Independientemente del número de componentes presentes en la vacuna, la frecuencia de acontecimientos adversos tras la vacunación primaria con vacunas antitosferínicas acelulares no difiere de la observada en el grupo tratado con placebo o tras la inyección de toxoides DT únicamente. Sin embargo, después de la serie primaria, tiende a aumentar la frecuencia y gravedad de las reacciones locales con cada dosis sucesiva de DTaP. Tras la cuarta y quinta dosis de DTaP, se ha notificado la tumefacción benigna y transitoria de la extremidad entera en hasta un 2.7% de los vacunados, aunque en la mayoría de los estudios esta complicación es infrecuente (inferior al 1%). Se desconoce la contribución relativa de los distintos componentes de la DTaP a esta tumefacción. Con el objeto de reducir la reactogenicidad de las inyecciones de refuerzo administradas a adolescentes y adultos, se han formulado vacunas antitosferínicas acelulares con una concentración reducida de antígeno.

Existen vacunas comercializadas que contienen un componente antitosferínico acelular combinado con algunos o todos los componentes siguientes: toxoides diftérico y tetánico, poliomeilitis (Hib), antígenos de virus de la hepatitis B (HepB) y antígenos de (Hepatitis B) y antígenos del virus de la influenza tipo B (IPV).

La poliomeilitis (Hib) es una enfermedad producida por un poliovirus, es un enterovirus que se divide en tres tipos antigénicos: 1, 2 y 3; los tres pueden provocar parálisis, pero el tipo 1 lo hace con mayor frecuencia, el tipo 3 en menor medida, y el tipo 2 rara vez. La mayoría de las epidemias se deben al poliovirus de tipo 1. Los casos relacionados con la vacuna, que contiene los tres tipos de virus, generalmente son producidos por los tipos 2 ó 3 (PAHO, 2005). La hepatitis B (HepB) es una enfermedad común infecciosa del hígado causada por

el virus de la hepatitis B (HBV) que afecta a millones de personas en todo el mundo. El virus HBV es un virus envuelto que contiene DNA de doble cadena, circular, y es clasificado dentro de la familia de los hepadnavirus (WHO, 2002).

La bacteria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) es una de las principales causas de infección en lactantes y niños pequeños, mientras que en los adultos es poco frecuente la manifestación grave de la enfermedad. En las regiones donde se ha estudiado detenidamente, esta bacteria suele ser la causa fundamental de meningitis bacteriana aguda en lactantes y en niños menores de 5 años, lo que representa entre un tercio y la mitad de todos los casos de meningitis bacteriana en este grupo de edad (OMS, 2002).

Cabe mencionar que estas vacunas son caras y son aplicadas por vía parenteral, siendo estas limitantes para su aplicación en países en vías de desarrollo o en países muy pobres.

Existen ya fusiones genéticas de varios epítomos de *B. pertussis* que pueden conducir al desarrollo de vacunas basadas en proteínas de fusión multiepítomo, las cuales podrían ser más eficaces.

2.6. Plantas transgénicas para la producción de nuevas vacunas.

La fabricación de vacunas y productos terapéuticos en plantas se refiere a los productos proteínicos con aplicaciones clínicas o veterinarias producidas en sistemas de expresión de proteínas recombinantes en plantas. Estos sistemas se pueden dividir en aquellos que utilizan la tecnología transgénica nuclear, la tecnología de cloroplastos transplastómicos y la tecnología viral de plantas (Figura 3). En todos los casos, los antígenos o terapéuticos se expresan en tejidos vegetales, de donde pueden ser purificados o el tejido vegetal puede ser procesado de tal manera que puede aplicarse por vía tópica o, mejor aún, por vía oral. La principal ventaja de los sistemas de expresión en plantas frente a otros sistemas de producción de vacunas es el bajo costo de fabricación. Los fermentadores y biorreactores pueden ser reemplazados por cuartos de cámaras de crecimiento para plantas o invernaderos o plantas que se pueden cultivar en el campo con estrategias de contención apropiada de genes foráneos, tales como la

herencia materna o la esterilidad masculina o la expresión en tejidos vegetales cosechados antes de la aparición de cualquier estructura reproductiva. Esto debería conducir a la reducción de costos. En el caso de vacunas orales producidas en plantas y terapéuticos, los costos de procesamiento también se reducen (Daniell y col., 2009).

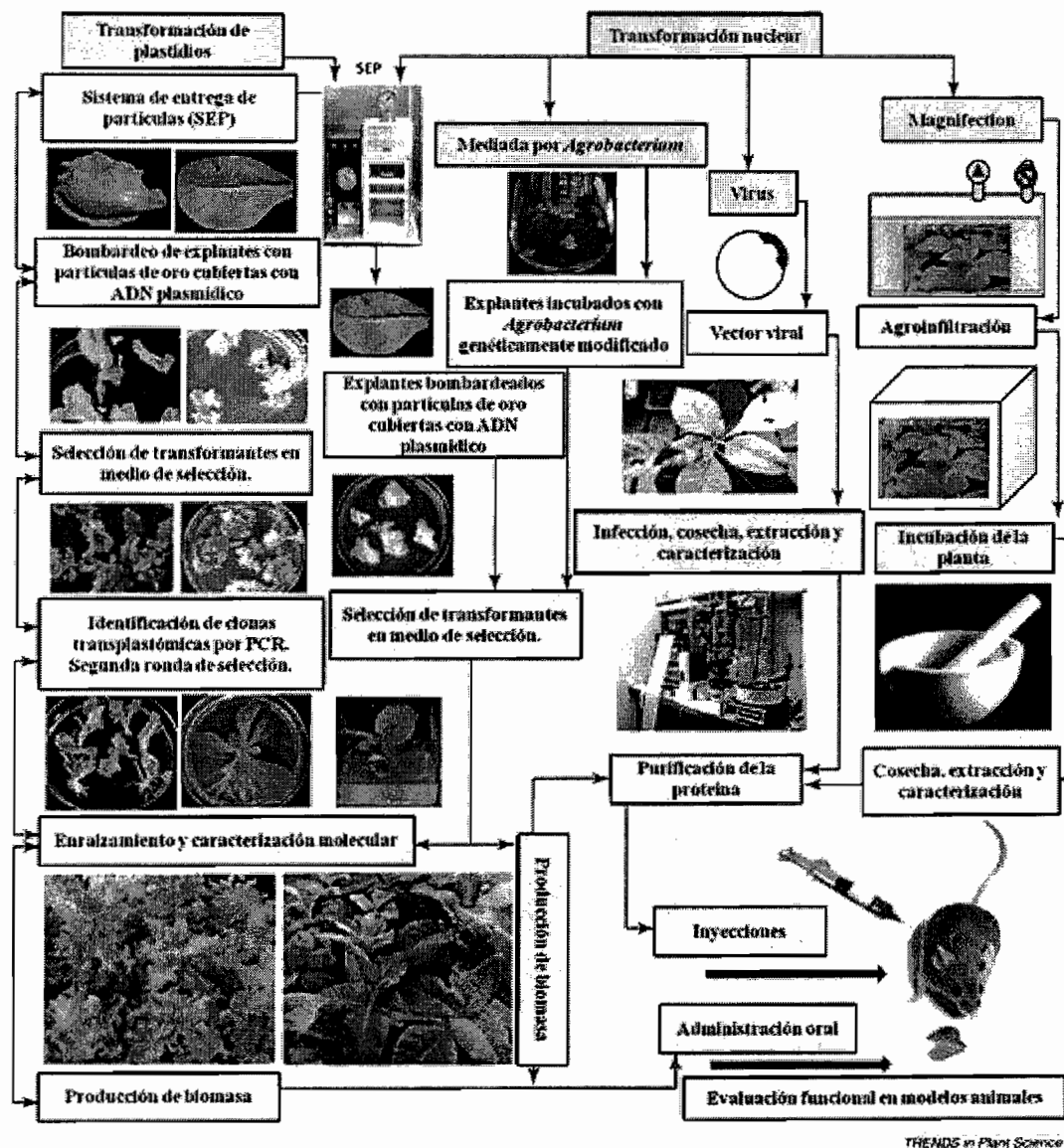


Figura 3. Representación esquemática de la producción de vacunas y biofarmacéuticos en plantas y su evaluación final en modelos animales. Los explantes son tejidos que tienen potencial de regeneración a plantas adultas. Aquí se muestran lechuga y tabaco como ejemplos. Daniell y col. (2009).

Al igual que con otros sistemas eucariotas, las vacunas producidas en plantas permiten la introducción de modificaciones post-traduccionales. El plegamiento correcto y la formación de enlaces disulfuro ocurre en los cloroplastos (Davoodi-Semiromiy col., 2009) o en el retículo endoplásmico (RE) (Moravec y col., 2007). Las modificaciones adecuadas de lípidos de vacunas de antígenos han sido también observadas en cloroplastos (Glenz y col., 2006). Las proteínas terapéuticas no son glicosiladas en los cloroplastos pero son glicosiladas cuando son dirigidas al RE, y aunque los patrones de glicosilación no son idénticos a los sistemas de mamíferos las proteínas producidas en plantas han demostrado ser funcionales, ya que son reconocidas como antígenos, son inmunogénicas e inducen inmunidad protectora. Aunque numerosas proteínas terapéuticas han sido expresadas en células vegetales (Tablas 1-3) varios desafíos continúan. El silenciamiento de transgenes en plantas transgénicas nucleares requiere investigación futura y mejoras. Dentro de las mejoras, se ha trabajado en la contención de transgenes para facilitar la producción en campo de vacunas o productos biofarmacéuticos cuando son expresados a través del genoma nuclear.

Es bien sabido que el nivel de expresión varía en función de la etapa de desarrollo de las hojas, la hora del día y las secuencias reguladoras utilizadas, , subrayando la importancia de la etapa de desarrollo de las plantas y el tiempo de cosecha. Lo más importante es lograr la consistencia de los niveles de expresión del transgén en lotes diferentes, lo cual es un reto importante. Por lo tanto, las hojas cosechadas deberían ser homogeneizadas y el nivel de proteína terapéutica debe ser determinado para cada lote cosechado. Hay pocos estudios sobre la determinación de la estabilidad de las proteínas terapéuticas después de la cosecha, procesamiento y almacenamiento por lo que más investigaciones deben hacerse al respecto.

En las últimas dos décadas, vacunas de antígenos expresadas en el genoma nuclear de plantas, han tenido respuestas adecuadas de inmunoglobulinas y han conferido protección al momento de la entrega oral (Arntzen, 2008; Yusibov y Rabindran, 2008), pero ninguna vacuna basada en

plantas transgénicas ha ido mas allá de la fase I de ensayos clínicos (Yusibov y Rabindran, 2008). Sin embargo, al menos 2 productos terapéuticos desarrollados por Biolex (<http://www.biolex.com>) y Protalix (<http://www.protalix.com>) están en las Fase II y Fase III (Shaaltiel y col., 2007; Aviezer y col., 2009).

Tabla 1. Vacunas de antígenos recientes expresadas a través del genoma nuclear de plantas reportan inmunogenicidad o protección.

Vacunas de antígenos para humanos	Sistemas de expresión	Niveles de expresión	Evaluación funcional	Referencia
Antígenos bacterianos				
Subunidad B de la toxina enterotoxigénica termolábil de <i>E.coli</i> (LTB)	Zanahoria	0.3% PTS	Inmunogénica y protectora contra el reto a CT	Rosales y col. (2008)
	Soya	2.4% PTS	Inmunogénica y protección parcial contra el reto LT en ratones	Moravec y col. (2007)
Subunidad B de la toxina de cólera (CTB)	Tomate	0.081% PTS	Inmunogénica por vía oral en ratones	Jiang y col. (2007)
	Arroz	2.1% PTS	Inmunogénica y protectora contra el reto a CT en ratones seguida de la administración oral	Nochi y col. (2007)
Antígenos virales				
Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg)	Papa	8.5 µg/g PF	Respuesta inmunogénica en humanos seguida de la administración oral	Thanavala y col. (2005)
Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B fusionado con el epítipo preS1	Arroz	31.5 µg/g PS	Inmunogénica por administración intraperitoneal a ratones	Quian y col. (2008)
	Alfalfa	0.06-0.28% PTS	Inmunogénica en ratones y las crías desarrollaron diarrea menos severa después del reto con rotavirus SA-11 de simio, lo que indica que los anticuerpos generados en las	Dong y col. (2005)

			crías brindaron protección pasiva	
Rotavirus (VP7)	Tubérculos de papa	0.3-0.4% PTS	Inmunogénica en ratones después de su administración oral. Actividad de neutralización contra rotavirus	Li y col. (2006)
Proteína de la cápside del virus Norwalk (PCVN)	Fruto del tomate y papa	8% y 0.4% PTS	Permite respuesta sistémica de anticuerpos y de mucosas en ratones después de su administración oral	Zhang y col. (2006)
Vacunas Humanas (expresión viral transitoria) - Antígenos bacterianos				
Antígenos F1 y LcrV de <i>Yersinia pestis</i>	Tejido de hojas de tabaco	380 y 120 µg/g PF	Inmunogénica y protectora en monos contra <i>Y. pestis</i> después de la inyección subcutánea	Mett y col. (2007)
Antígenos F1-V de <i>Yersinia pestis</i>	Hojas de tabaco	1 y 2 mg/g	Inmunogénica y protectora en cerdos de guinea vacunados contra el reto en aerosol de <i>Y. pestis</i>	Santi y col. (2006)

PTS: Proteína Total Soluble

PF: Peso Fresco

Tabla 2. Biofarmacéuticos expresados en plantas vía nuclear.

Proteína farmacéutica	Sistema de expresión	Niveles de expresión	Evaluación final	Referencia
Hormona de crecimiento humana (hGH)	Células de arroz en suspensión	57 mg/L	La actividad biológica de la shGH acumulada en cultivo de células de arroz transgénicas en suspensión fue similar a la hGH recombinante de <i>E. coli</i>	Kim y col. (2008)
Interleucina 12 (IL-12) de ratón	Hojas y frutos de tomate	2.7-7.3 y 1-3.4 µg/g PF	Biológicamente activa <i>in vitro</i> . Las plantas que produjeron mL-12 indujeron la secreción de IFN-γ en células T	Gutiérrez-Ortega y col. (2005)
Factor de	Tabaco	0.09-0.3% PTS	La planta que	Bar y col. (2007)

crecimiento epidermico (hEGF)			produce hEGF estimulo significativamente la expansion y proliferacion de células Vero E6	
Factor de crecimiento básico de fibroblastos humano (bFGF)	Soya	2.3% PTS	Ensayos de proliferación demostraron la actividad del bbFGF en células 3T3 de Balb/c de manera dosis-dependiente, indicando actividad biológica similar al bFGF nativo	Ding y col. (2006)
Factor estimulador de las colonias de macrófagos granulocíticos humanos (GM-CSF)	Caña de azúcar	No detectable- 0.02% PTS	Las células de la médula ósea (TF-1), las cuales requieren GM-CSF para la división celular, proliferaron cuando crecieron en medio que fue suplementado con extractos transgénicos de caña de azúcar y tenían niveles de actividad idénticos	Wang y col. (2005)
Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) 1	Tabaco	0.02-1.92% PTS	M-CSFsR derivado de planta inhibe la formación de colonias de células J6-1	Zheng y col. (2006)
Proteína morfogénica de huesos 2 (BMP2)	Tabaco	0.02%	La aplicación de BMP2 a la línea celular C2C12 de ratón incremento significativamente la actividad celular de ALP pero es menor que el rhBMP2 comercial	Hong y col. (2006)
IA-2 humano (IA-2ic), un	Tabaco (transitoria)	0.5% PTS	Proteína IA-2ic de origen vegetal es	Mett y col. (2007b)

autoanticuerpo asociado con la diabetes		específicamente reconocido por los autoanticuerpos humanos IA-2ic	
---	--	---	--

PTS: Proteína Total Soluble

Tabla 3. Vacunas funcionales de antígenos y proteínas biofarmacéuticas expresadas en el genoma de cloroplasto.

Antígenos de la vacuna	Sistema de expresión	Niveles de expresión	Evaluación final	Referencia
Antígenos bacterianos				
Toxina tetánica	Tabaco	18-27% y 7-10 % PTS	Ratones desarrollaron respuesta inmune sistémica y sobrevivieron al reto con la toxina tetánica	Tregoning y col. (2005)
Anticuerpo protector del Antrax (Pag)	Tabaco	4.5-14.2% PTS	Ensayo de lisis de macrófagos, respuestas inmune sistémica, ensayo de neutralización de toxinas, 100% de los ratones sobrevivieron al desafío con dosis letales de la toxina	Koya y col. (2005)
Enterotoxina B de <i>E. coli</i> (LTB)	Tabaco	2.3% PTS	Ensayo de unión del gangliósido GM1; la inmunización oral protegió parcialmente a los ratones del reto con CT	Rosales-Mendoza y col. (2009)
Antígenos virales				
Virus de la hepatitis E (<i>HEV E2</i>)	Hojas de tabaco, semillas	0.63-1.09 ng, 0.015-0.018 ng/ μ g	Respuesta inmune en ratones	Zhou y col. (2006)
Virus de la peste porcina (<i>CSFV E2</i>)	Tabaco	1-2% PTS	Respuesta inmune en ratones	Shao y col. (2008)
Virus del Papiloma Humano (<i>L1</i>)	Tabaco	20-26% PTS	Respuesta inmune sistémica en ratones después de la inyección intraperitoneal y	Fernández-SanMillan y col. (2008)

			anticuerpos neutralizantes fueron detectados.	
Antígenos de protozoarios				
Amebiasis (<i>LecA</i>)	Tabaco	7% PTS	Respuesta inmune sistémica en ratones	Chebolu
Malaria (CTB-ama1 y CTB-msp1)	Tabaco y lechuga	12.3% y 9.4% PTS	Suero de ratones inmunizados inhibió completamente la proliferación de parásitos de la malaria y hubo reacción cruzada con el parásito nativo. proteína/parásito en inmunoblots y ensayos de inmunofluorescencia en las etapas de anillo, trofozoito y esquizonte del parásito	Davoodi-Semiromi y col. (2009) y Davoodi-Semiromi y col. (en prensa)
Autoanticuerpos				
Diabetes tipo 1 (<i>hGAD65</i>)	Clamydomonas	0.25-0.3% PTS	Inmunoreactividad a suero de paciente diabético	Wang y col. (2008)
Proteínas biofarmacéuticas				
Factor de crecimiento tipo insulina (<i>IGF-1n</i> , <i>IGF-1s</i>)	Tabaco	32.4-32.7% PTS	Respuesta de crecimiento en cultivo de células HU-3	Daniell y col. (2009)
Antitripsina alfa 1 humana (<i>A1AT</i>)	Tabaco	2% PTS	Actividad completa y unión a la elastasa pancreática porcina	Nadai y col. (2008)
Péptido antimicrobiano (Proteína 2 tipo lisina)	Tabaco	~30% PTS	Actividad bactericida en <i>Streptococcus pneumoniae</i> , el agente causante de la neumonía	Oey y col. (2009)

PTS: Proteína Total Soluble

2.6.1. Sistemas de expresión de vacunas recombinantes en plantas.

En los últimos 15 años, un número creciente de grupos de investigación en todo el mundo han investigado extensivamente a las plantas como fábricas para la

producción de vacunas. Las plantas proveen muchas ventajas sobre los sistemas recombinantes de mamíferos, incluyendo la ausencia de contaminación potencial con virus y priones, una capacidad escalable mucho más alta y costos muy bajos de producción a gran escala).

Existen 2 estrategias principales para la producción de vacunas en plantas: transformación nuclear estable y la transformación de cloroplastos.

2.6.1.1. Transformación nuclear estable.

La transformación nuclear provoca la integración de ADN recombinante dentro del genoma nuclear de las células vegetales. El ADN puede ser transferido dentro de las plantas ya sea por métodos directos o indirectos, dependiendo de las especies a las que va dirigida. El método directo involucra un patógeno natural de plantas, *Agrobacterium tumefaciens*, el cual puede infectar eficientemente células vegetales de la mayoría de de especies de dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas, llevando el ADN recombinante dentro de las células de las plantas y dirigiéndolo al núcleo para su integración cromosomal en sitios al azar (Zambryski, 1988). *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria Gram negativa del suelo que infecta a una gran cantidad de plantas dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas. La infección por esta bacteria comienza en una herida en la planta. Las cepas virulentas de *A. tumefaciens* contienen un plásmido de aproximadamente 200 kb denominado Ti (Tumor-inducing). El plásmido Ti presenta 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 y borde 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 (Zambryski, 1992).

Sin embargo, algunas especies de plantas de importancia agronómica (la soya y la mayoría de los cultivos de cereales, por ejemplo) son difíciles de transformar por *Agrobacterium*; para estas plantas el método de transferencia directa de ADN, llamado "biobalística" o bombardeo de microproyectiles, es frecuentemente utilizado (Figura 2) (Sanford y col., 1993). La biobalística causa que el ADN transferido se integre al azar en el genoma nuclear, y múltiples inserciones podrían ocurrir, incrementando la probabilidad de la expresión de genes inestable, el silenciamiento génico y patrones complejos de herencia de transgenes, además de que el daño físico del tejido es mayor que en la transformación nuclear.

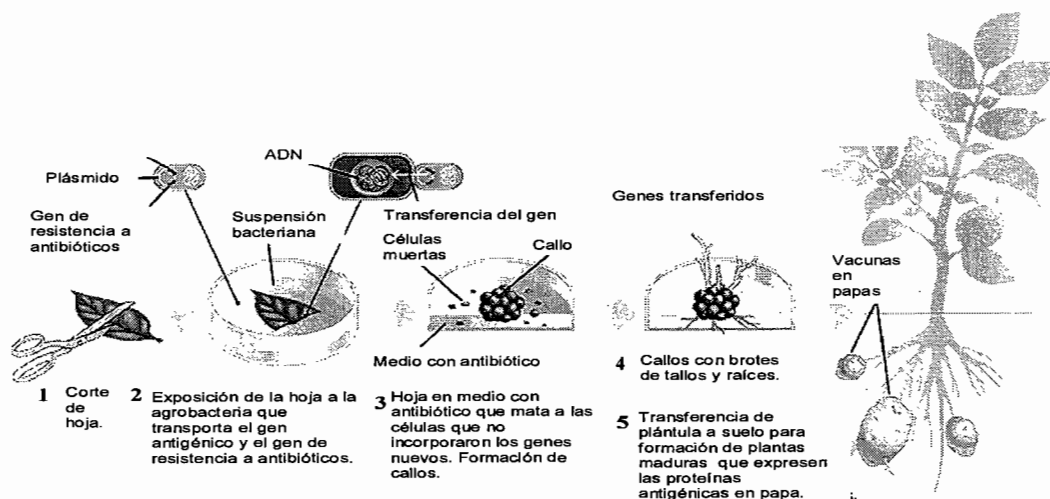


Figura 4. Transformación de células vegetales mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Langridge, 2000).

2.6.1.2. Transformación de cloroplastos.

Fragmentos de ADN foráneo que contienen cassettes con genes de expresión pueden también ser introducidos dentro de los cloroplastos por el bombardeo con el método llamado biobalística e integrarse dentro del genoma de cloroplastos por recombinación homóloga (Svab y Maliga, 1993). Las plantas “transplastómicas” resultantes tienen muchas ventajas sobre las plantas transgénicas nucleares. En primer lugar, el alto número de copias del genoma de cloroplastos en las células vegetales provee el potencial de una alta expresión de proteínas recombinante. También, el genoma de cloroplastos es de herencia materna en la mayoría de las plantas, minimizando la posibilidad del flujo génico indeseado a través del polen (Daniell y col., 2002).

En general, la transformación de cloroplastos para la expresión de proteínas de interés terapéutico se presenta como una alternativa importante en la mejora de la producción de proteínas recombinantes (Sytnik y col., 2005).

2.6.1.2.1. Biobalística.

El bombardeo con micropartículas para la introducción de ADN en las células fue una técnica desarrollada en 1987 por Sanford y sus colaboradores que le dieron el nombre de “biolística”, o bien, balística biológica. El sistema consiste en disparar micropartículas de aproximadamente 1 μm de diámetro, cubiertas con ADN hacia tejidos o células vegetales (Rusell y col., 1992). En los primeros experimentos se usaron partículas de tungsteno aceleradas con un dispositivo a base de pólvora (Klein y col., 1988). El daño celular es uno de los principales factores que dificultaron, la recuperación de plantas con transformación estable, ya que tanto el trauma físico causado por el impacto del gas y el choque acústico como la toxicidad del tungsteno contribuían a este daño celular y reducían la eficiencia de la transformación. La técnica fue mejorada usando partículas de oro y un acelerador de partículas con flujo de helio (Rusell y col., 1992; Kim y Minamikawa, 1996). Esta metodología de transformación tiene ciertas limitaciones. Algunos tejidos oponen una resistencia natural a la penetración de

las partículas, dada por cutículas endurecidas o paredes celulares lignificadas. Sin embargo, el principal problema del método continúa siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente y estable la información genética transferida. A pesar de esta desventaja, la versatilidad de la aceleración de partículas para introducir transgenes ha superado muchas de las barreras asociadas a otros métodos de transformación. El método de biobalística ha sido reportado como el mejor método de transformación de organelos como mitocondrias y cloroplastos, además de ser un método de transformación casi universal útil para una gran variedad de organismos principalmente monocotiledóneas (Daniell y col., 1999). La biobalística ha sido utilizada con éxito para producir plantas transgénicas a partir de una gran variedad de tejidos vegetales, entre los que se incluyen hojas, meristemas, embriones en desarrollo, embriones maduros, callos embriogénicos, suspensiones celulares, entre otros. Los logros más sobresalientes en la generación de plantas transgénicas por medio de este método, incluyen especies de gran importancia económica como son la soya, el maíz, el arroz, el sorgo, la papaya, la caña de azúcar, el trigo y el espárrago.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Generar plantas transplastómicas de tabaco y plantas transgénicas de lechuga que expresen una proteína de fusión con epítopos múltiples de la toxina pertúsica, la pertactina y la hemaglutinina (PTPFHA) y probar posteriormente su antigenicidad *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos.

- Diseñar y obtener genes sintéticos optimizados para expresión en vegetales, que codifiquen para una proteína de fusión que comprenda regiones de epítopos relevantes de *B. pertussis*.
- Obtener los vectores funcionales para la expresión de los genes sintéticos en núcleo y cloroplastos de lechuga y tabaco, respectivamente.
- Obtener líneas transformadas para los genes y cultivos de interés.
- Caracterizar las líneas transformadas mediante PCR, RT-PCR y ELISA.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño de genes sintéticos.

Se diseñaron dos genes sintéticos, uno para la transformación nuclear (BPsn) y otro para la transformación de cloroplastos (BPsc), ambos genes están optimizados para el uso de codones en plantas. Estos genes poseen epítomos relevantes de *Bordetella pertussis*: se eligieron 2 epítomos de la subunidad S1 de la toxina pertúsica previamente reportados como relevantes e inmunogénicos por Askelof y col., (1990); Barbieri y col., (1992) correspondientes a los primeros 17 aminoácidos de la S1 y a otros 17 aminoácidos de la posición 99-115; así como una proteína de fusión diseñada en este trabajo que comprende el dominio inmunodominante tipo I de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y la región inmunodominante II de la pertactina (PRN) (Zhao y col., 2008). Los epítomos de la subunidad S1 de la toxina pertúsica y la proteína de fusión están unidos por espaciadores o "linkers", los cuales son ricos en prolina (GPGPG). Dichos espaciadores han permitido el despliegue apropiado de epítomos en otras proteínas de fusión para epítomos lineales (Livingston y col. 2002).

Ambos genes se les agregó en el extremo 5' seis codones que codifican para una etiqueta de histidinas con la finalidad de purificar la proteína recombinante y también se añadió un sitio de proteasa (TEV), el cual permite eliminar las histidinas una vez que la proteína ha sido purificada. Al gen diseñado para transformación nuclear se le añadió una secuencia que codifica para SEKDEL en el extremo 3' con la finalidad de retener a la proteína recombinante en el retículo endoplásmico; así como los sitios de restricción *Xba* I y *Sac* I para su clonación en el vector binario pBI121 (Figura 5).



Figura 5. Gen sintético para la transformación nuclear. His: Histidinas; TEV: Sitio de proteasa; TPS1: Epítomos subunidad S1 toxina pertúsica; FHA/PRN: Proteína de fusión de hemaglutinina y pertactina; L: Espaciador; SEKDEL señal de retención en el retículo endoplásmico. Se muestran sitios de restricción en los extremos.

En el caso del gen diseñado para transformación de cloroplastos, se le añadió un sitio de unión a ribosoma y los sitios de restricción *Xba* I y *Xho* I para ser clonado en el vector pBic (Figura 6).



Figura 6. Gen sintético para transformación de cloroplastos. RBS, sitio de unión a ribosoma; His, histidinas; TEV: sitio de proteasa; TPS1: Epítomos subunidad S1 toxina pertúsica; FHA/PRN: Proteína de fusión de hemaglutinina y pertactina; L: Espaciador. Se muestran sitios de restricción en los extremos.

5.2. Construcciones genéticas.

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). Los productos de 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.

Los genes diseñados por nuestro grupo fueron sintetizados por la compañía GenScript en EUA. Los genes fueron originalmente clonados en el vector pUC19 los cuales fueron disueltos en 20µl de agua destilada estéril, quedando a una concentración de 0.2 µg/µL, de este volumen se tomaron 3µl (600 ng) para transformar células químicamente competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (Anexo 9.1). Los vectores pUC cuentan con un gen de resistencia a ampicilina, por lo cual se seleccionaron cinco clonas de cada gen resistente a este antibiótico, se extrajo ADN plasmídico de cada una de ellas y se comprobó la identidad de cada construcción mediante digestión con *Xba* I / *Xho* I y *Xba* I / *Sac* I para los genes BPs_n y BPs_c, respectivamente.

Una vez comprobada la identidad de cada gen se procedió a realizar un stock en glicerol de cada una de las construcciones y se almacenaron a -80°C.

5.2.1. Construcción para transformación nuclear.

5.2.1.1. Clonación del gen BPSn en el vector pBI-121.

El gen BPSn fue subclonado en el vector binario pBI-121, sustituyendo el marco de lectura abierto del gen reportero *uidA* por el gen de interés. Dicho vector dirige la expresión del gen con el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV), además contiene un gen de selección que le confiere resistencia a kanamicina a las células vegetales que han sido transformadas.

Para eliminar el gen reportero GUS, se realizó una doble digestión con las enzimas *Xba* I y *Sac* I, posteriormente se purificó el plásmido digerido con el kit QIAquick gel extraction (Qiagen).

Para obtener las construcciones nucleares se realizaron con los sitios *Xba* I y *Sac* I. Las mezclas de ligación se emplearon para transformar células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (ver Anexo 9.1). Las clonas resistentes a kanamicina se seleccionaron y propagaron para aislar ADN plasmídico de acuerdo a Sambrook y col. (1989). El ADN de las clonas obtenidas fue analizado mediante el perfil de restricción obtenido con las enzimas *Xba* I y *Sac* I.

5.2.2. Construcción para transformación de cloroplastos.

5.2.2.1. Clonación del gen BPsc en el vector pBic.

El vector pBic es una modificación del vector pKCZ, el cual fue donado por el Dr. Sergio Rosales, es especial para transformación de cloroplastos de tabaco ya que tiene sitios de recombinación homóloga para integrarse al genoma del cloroplasto en los sitios *trnN* y *trnR*. Este vector fue digerido con las enzimas *Xba* I y *Xho* I, a la par el gen BPsc fue digerido con las mismas enzimas, ligado en el vector pBic y transferido a células competentes de *E. coli* top 10 F' para finalmente analizar las clonas por perfil de restricción.

5.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción pBI121-BPsn.

Para transferir la construcción pBI121-BPsn a *Agrobacterium tumefaciens*, se empleó la técnica de electroporación. Se prepararon células competentes de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col. (1991) (Apéndice 9.2). Se agregaron 500 ng de ADN plasmídico a 50 μ L de células competentes y después de incubar en hielo por 2 minutos se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2 mm 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 9.4.14), se transfirió la suspensión a un tubo Eppendorff de 1.5 mL y las células se recuperaron a 28°C y 200 rpm 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 (agar YM con 50 mg/L de kanamicina) para su cultivo por 2 días a 28°C. Solo las bacterias transformadas se desarrollan en el medio de selección, debido a que el plásmido transferido confiere resistencia a kanamicina.

5.4. Protocolos de obtención de plantas transgénicas de lechuga y tabaco.

5.4.1. 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. En nuestro grupo de trabajo en 2005, Martínez-González probó 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), por lo tanto, se concluyó que una combinación de los tres métodos era la mejor opción, por lo que en este trabajo la metodología usada para la regeneración y transformación de plantas de lechuga es un compendio de los tres (Tabla 4). Se empleó el medio descrito por Murashige y Skoog (1962) (Apéndice 9.4.3) y los cultivos se incubaron a 25°C bajo un

fotoperiodo de 16 horas de luz ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad en el cuarto de cultivo de tejidos.

Tabla 4. 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)
Explantado utilizado	Cotiledones heridos con bisturí, por la cara abaxial	Curtis y col. (1994)
Carga bacteriana medida en $\text{DO}_{600\text{nm}}$	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 ^a	Curtis y col. (1994)
Medio de regeneración	MS104, MSJa	Nakano y col. (2003) Pileggi y col. (2001)
Medio de enraizamiento	MSa	Curtis y col. (1994) Nakano y col. (2003)

^a Ver Anexo 9.4.13

5.4.2. Tabaco

El protocolo de regeneración para tabaco está bien establecido en nuestro laboratorio y es el descrito por Daniell y col., 2001, en el cual se utiliza como explante inicial hojas jóvenes de plantas germinadas *in vitro* en medio MS y como medio de regeneración RMOP (sales MS suplementado con benciladenina y ácido naftalén acético).

5.5. Obtención de los explantes.

5.5.1. Lechuga.

5.5.1.1. Obtención de hojas cotiledonarias.

Para la transformación nuclear, se utilizaron como explantes hojas cotiledonarias, las cuales se obtuvieron al germinar semillas de la variedad Green Wave. Las semillas se esterilizaron con etanol al 70% durante un minuto, después se lavaron con agua destilada estéril y posteriormente se agregaron 100 mL de hipoclorito de sodio comercial al 20%, cinco gotas de Tween 20 y cinco gotas del desinfectante comercial Microdín, agitando por diez minutos. Finalmente se dieron tres lavados de tres minutos cada uno con agua destilada estéril y las semillas fueron sembradas en medio MS. A los siete días de su germinación, de las plántulas obtenidas se cortaron las hojas cotiledonarias, las cuales se emplearon para los ensayos de regeneración y transformación genética.

5.5.2. Tabaco.

Para la obtención de hojas jóvenes de tabaco, se esterilizaron semillas de tabaco, se siguió el mismo protocolo para la esterilización de semillas de lechuga. Se colocaron de tres a cuatro semillas en frascos con medio de cultivo MS (Anexo 9.4.12), después de dos semanas se obtuvieron plántulas y se transfirieron a contenedores con medio de cultivo MS al cabo de cuatro semanas después de la germinación. Las hojas jóvenes fueron utilizadas para los ensayos de regeneración y transformación genética.

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

5.6.1. Lechuga.

Se utilizaron 150 cotiledones por experimento, los cuales fueron heridos con un bisturí, éstos fueron colocados en el medio MSO (ver Anexo 9.4.13) para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una solución de *A. tumefaciens* que portaba el plásmido pBI121-BPsn, durante 5 minutos. 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 con kanamicina.

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 utilizaron para el bombardeo se prepararon de acuerdo al 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 50 µL 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, 20 µL de espermidina 0.1M; después de añadir cada solución se agitó con vórtex durante 5 segundos, posteriormente se mezcló con vórtex durante 20 minutos 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 por al menos por 5 veces, hasta que las partículas de oro eran fácilmente resuspendidas. El paso final fue resuspender las partículas en 35 µL de etanol al 100% y se dejaron en hielo hasta su uso.

5.7.3.2. Bombardeo de las hojas de tabaco (Pistola de helio 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 6 µL 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 25 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 48 horas a 25 °C en la oscuridad. Después de este periodo, cada hoja se cortó en fragmentos de alrededor de 5 mm² y se colocaron en medio RMOP con espectinomicina (500 mg/L) para inducir la selección de las plantas transplásticas.

Los explantes se cambiaron a medio nuevo cada dos semanas. Se seleccionaron los explantes resistentes al agente de selección.

5.8. Análisis de las líneas transformantes.

Las líneas resistentes al agente de selección fueron analizadas por PCR, RT-PCR y por ELISA, para comprobar la presencia del transgén, transcripción y la antigenicidad *in vitro* de la proteína, respectivamente.

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. (2003). 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 μ L de buffer de extracción a 60°C que contenía: Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, β -mercaptoetanol 0.2%, (y PVP 2%, CTAB 2% preparados inmediatamente antes de usarse). Se incubó a 65°C por 60 minutos con mezclado ocasional para evitar agregaciones en el homogenizado, se añadieron 750 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) sobre el extracto, se agitó con vórtex, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se repitió la extracción hasta limpiar la fase acuosa; ésta se mezcló con 500 μ L 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 μ L 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 disolvió en 50 μ L de agua milli Q con RNasa en una concentración final de 20 μ 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 NH_4Ac 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 disolvió en 30 μ L 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.

5.8.1.2.1. Oligonucleótidos empleados.

A continuación en la Tabla 5 se muestran los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los diferentes transgenes:

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los transgenes.

Nombre	Secuencia
BPsnF	GGAGATGATCCACCAGCAAC
BPsnR	GGTTGAGGAGGTTGTGGTCC
BPscF	GCTGGACTTTCTCCTGCTACTTGG
BPscR	TGTCCGTTTCCGTTAGCAGC
GCF	CATCGATTTTGTCCGGATCCCACCT
GCR	TTGGCACCTCGATGTCGGCTCTTCG
Oligo F 35S	CCACTGACGTAAGGGATGACG
Oligo R pBI121	GCCAGGGTTTTCCAGTCAC
Oligo Actina 1	AACTGGGATGACATGGAGAA
Oligo Actina 2	ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA

BPsnF y BPsnR: Oligonucleótidos del gen sintético nuclear

BPscF y BpscR: Oligonucleótidos del gen sintético de cloroplasto

GCF y GCR: Oligonucleótidos dentro del genoma de cloroplasto

Oligo F 35S y Oligo R pBI121: Oligonucleótidos dentro del promotor 35s y del vector pBI121

Oligo Actina 1 y Oligo Actina 2: Oligonucleótidos de las actinas de jitomate

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

La amplificación se llevó a cabo en un equipo de Techne mediante los protocolos descritos en la Tabla 6.

Tabla 6. Protocolos de PCR empleados para el escrutinio de líneas candidatas.

Gen	Tamaño de amplicón (pb)	Oligonucleótido	Condiciones				
			Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
BPsn	731	BPsnF+BPsnR	5 min 94°C	30 s 94°C	30 s 52°C	1 minutos 72°C	5 minutos 72°C
BPsc	566	BPscF+BPscR			30 s 55°C		
BPsc-Genoma cloroplasto	3000	BPscF+GCR			30 s 54°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. Extracción de ARN.

El ARN total fue extraído de las plantas transplastómicas de tabaco bombardeadas (generación T0), utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se pesaron 50 mg de tejido (hoja), el cual fue congelado con nitrógeno líquido y triturado, se añadió 1 mL de Trizol y se incubaron las muestras por 5 min a temperatura ambiente, se realizó un lavado con cloroformo y se precipitó con 500 μ L de isopropanol. Después de centrifugar se lavó la pastilla con etanol al 70% y se resuspendió la pastilla en 30 μ L de agua

DEPC (Dietilpicocarbonato, para eliminar Ribonucleasas). La concentración de ARN fue determinada usando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Las muestras fueron almacenadas a -70°C .

5.8.2.1. Análisis por RT-PCR.

5.8.2.1.1. Síntesis de ADNc.

El cDNA se sintetizó a partir de $3\ \mu\text{g}$ de ARN utilizando el kit "TaqMan Reverse Transcription Reagents" (Applied Biosystem, Roche). Se preparó la mezcla como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes de la mezcla maestra usada para la síntesis de ADNc

Componente	Concentración de la solución madre (stock)	Volumen de stock necesario para una reacción
Agua DEPC	-	9 μL
Buffer RT	10X	4 μL
dNTPs	10 mM	1 μL
Oligo dT	50 μM	1 μL
DDT	25 mM	2 μL
MultiScribe (Transcriptasa reversa)	50 U/ μL	1 μL
ARN problema	---	1 μL
Vol. Final		19 μL

Se utilizó el equipo TouchGene (Techne), el protocolo de síntesis empleado se describe en la Tabla 8.

Tabla 8. Protocolo de síntesis de ADNc

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (minutos)
65	5
42	2

5.8.2.1.2. PCR con ADNc para β -actina

El ADNc recién sintetizado se utilizó para el PCR utilizando los oligos y las condiciones antes mencionadas. Como control de carga se amplificó una región de β -actina utilizando los oligos reportados para actina de jitomate: Actina 1 aactgggatgacatggagaa, y Actina 2 atcacacttcatgatggagttgta, previamente probados en nuestro grupo; la mezcla de reacción fue de 25 μ L y fue preparada como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Componentes de la mezcla maestra usada para la amplificación de β -actina mediante PCR.

Componente	Concentración de la solución madre (stock)	Volumen de stock necesario para una reacción
Agua DEPC	-	15.62 μ L
Buffer de PCR	5X	5 μ L
dNTPs	10 mM	0.5 μ L
Oligo sentido	10 μ M	0.38 μ L
Oligo antisentido	10 μ M	0.38 μ L
MgCl ₂	25 mM	2.5 μ L
Taq ADN polimerasa	5 U/ μ L	1 μ L
ADNc problema	---	0.5 μ L
Vol. final		25 μ L

Se utilizó el equipo TouchGene (Techne), el protocolo de amplificación es el que se describe en la Tabla 10. Se utilizaron 25 ciclos en el programa ya que con esta cantidad aún no se observa saturación.

Tabla 10. Protocolo de amplificación para β -actina mediante PCR.

Temperatura (° C)	Tiempo	Evento	
94	5 min	Desnaturalización inicial	
94	30 s	Desnaturalización	25 ciclos
56	50 s	Alineamiento de oligos	
72	1.30 min	Extensión	
72	7 min	Extensión final	

5.8.3. Inmunoensayo enzimático (ELISA).

5.8.3.1. Extracción de proteínas.

Se homogenizaron 50 mg de tejido vegetal en 500 μ L de buffer de extracción (PBS, Tritón 0.1% y leupeptina 10 μ g/mL). El homogenado se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford (1968). Se colocaron 25 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).

5.8.3.1.1. 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 250 μ l de PBST (PBS+Tween20, 0.05%). Las placas fueron sensibilizadas con 500ng de proteína total soluble en 25 μ L de buffer de carbonatos durante toda la noche (Anexo 9.4.18), posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de leche descremada al 5%. Después los pozos se incubaron a 37°C en presencia de antisuero policlonal de cabra anti-toxina pertúsica (1:200) durante 2 horas y en seguida con el anti-anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (1:10,000) durante dos horas. Por último, se agregó *p*-nitrofenilfosfato como sustrato disuelto en el buffer de fosfatasa alcalina (1 mg/mL)

(Anexo 9.4.19), 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.

La vacuna de la difteria, pertussis y tétanos (DPT) es ampliamente usada para la vacunación de lactantes y niños en todo el mundo y ha reducido notablemente los casos reportados de estas enfermedades. Aunque su eficacia es bien documentada, se siguen reportando efectos secundarios y se han hecho esfuerzos para producir vacunas acelulares que reduzcan estos efectos indeseables, sin embargo este tipo de vacunas son costosas debido al proceso de producción, el cual involucra sistemas de reactores de alto costo y procesos de purificación de proteínas recombinantes de tres bacterias. Una alternativa para producir una vacuna DPT recombinante multicomponente a bajo precio es planteada por Soria-Guerra y col. (2009).

Por otro lado, *Bordetella pertussis* es el principal agente etiológico de la tos ferina o coqueluche, una enfermedad respiratoria aguda con un incremento en prevalencia e incidencia, particularmente en neonatos (Greenberg y col., 2005; McIntyre y Wood, 2009). A pesar del amplio uso de vacunas eficaces, *B. pertussis* sigue representando un importante problema mundial de salud pública y una de las principales 10 causas de mortalidad infantil (von Konig y col., 2002; Edwards y col., 2004). Recientemente se han presentado brotes de tos ferina a nivel mundial causando muertes, lo cual cuestiona el principio de vacunación de una sola dosis contra tos ferina. Hay 2 tipos de vacunas contra la tos ferina que están disponibles actualmente (Storsaeter y col., 1998). La primera generación de vacunas consiste en células completas muertas de *B. pertussis* (wcPV), las cuales tienen una eficacia protectora de 90% (Jefferson y col., 2003). Sin embargo, estas vacunas han sido asociadas con efectos secundarios locales y sistémicos, incluyendo fiebre alta, inflamación local y, en algunos casos, encefalopatía e incluso la muerte. Debido a estos inconvenientes, se ha dado la tarea del desarrollo de la nueva generación de vacunas acelulares (aPV). A pesar de que las vacunas acelulares han demostrado ser mucho menos reactogénicas que las wcPV, se requieren tres inyecciones para una óptima protección, y la eficacia protectora de la mejor aPV ha sido consistentemente menor que la mejor vacuna wcPV (Storsaeter y col., 1998; Olin y col., 1997). Además, la producción de las vacunas

aPV es mucho más cara que la de wcPV, haciendo que sea menos accesible para los países en desarrollo.

Gracias al mejoramiento de las técnicas de biología molecular, han sido desarrolladas nuevas estrategias para la producción de vacunas de subunidades en plantas, sobresaliendo empresas como Dow AgroScience, Ventria y Bayer con los resultados más prometedores que proyectan que un futuro cercano podamos ver los productos en el mercado. Por otro lado, a nivel de laboratorio hay reportes en los cuales se demuestra que al expresar genes sintéticos que codifican para proteínas de origen bacteriano o viral que fueron diseñados para su expresión en plantas, mejora considerablemente la expresión de la proteína heteróloga (Haq y col., 1995), así como que la expresión de epítomos relevantes en lugar de proteínas completas reduce el riesgo de generar reacciones adversas, como en el caso de las wcAP (Yu y Landrige, 2001).

Tomando en cuenta esto, y debido a que la tos ferina es considerada una enfermedad reemergente, en el presente trabajo planteamos la posibilidad de generar plantas transplastómicas de tabaco y transgénicas de lechuga, las cuales expresen un gen sintético optimizado para plantas, el cual codifica un polipéptido, que contiene epítomos relevantes con probables propiedades inmunoprotectoras de los principales agentes de patogenicidad de *Bordetella pertussis*, esto como fase inicial para el desarrollo de una vacuna comestible.

6.1. Diseño de genes sintéticos.

Para seleccionar las regiones incluidas en los genes sintéticos, se eligieron los epítomos de la subunidad S1 de la toxina pertúsica (Askelof y col., 1990; Barbieri y col., 1992; Soria-Guerra y col., 2007); la toxina pertúsica es el factor de virulencia más importante de *B. pertussis*, el cual ha sido usado en las formulaciones de las vacunas acelulares contra la pertussis. La toxina pertúsica está compuesta de 5 subunidades, dentro de las cuales la subunidad S1 es inmunodominante, además de que induce inmunidad protectora (Boucher y col., 1994). Por otro lado, también se tomó en cuenta el trabajo realizado por Zhao y col. (2008) en donde inmunizaron ratones con una proteína de fusión, la cual contenía el dominio

inmunodominante tipo I de la FHA y el dominio inmunogénico tipo II de la PRN, estas regiones las tomaron de *Bordetella bronchiseptica*, patógeno respiratorio gramnegativo que causa enfermedades en cerdos y perros, sin embargo se tomó esta construcción debido a que análisis inmunológicos y de estructura de proteínas sugieren que las proteínas FHA de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* son similares y tienen un conjunto común de epítomos inmunogénicos (Ohgitani y col., 1991; Menozzi y col., 1994). De tal forma que el gen diseñado incluye regiones de epítomos, tanto los de la subunidad S1 de la toxina pertúsica, como la proteína de fusión de la FHA y la PRN. Se diseñaron dos genes en total, uno para transformación nuclear (BPSn) y otro para transformación de cloroplastos (BPsc), ambos genes contenían espaciadores ricos en prolina (GP GPG), los cuales ayudan a mantener la estructura de los epítomos expuestos.

Al gen para transformación nuclear BPSn, se le añadió una secuencia codificante de SEKDEL para la retención en el retículo endoplásmico ya que se ha reportado reducen la degradación de proteínas recombinantes y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI-121.

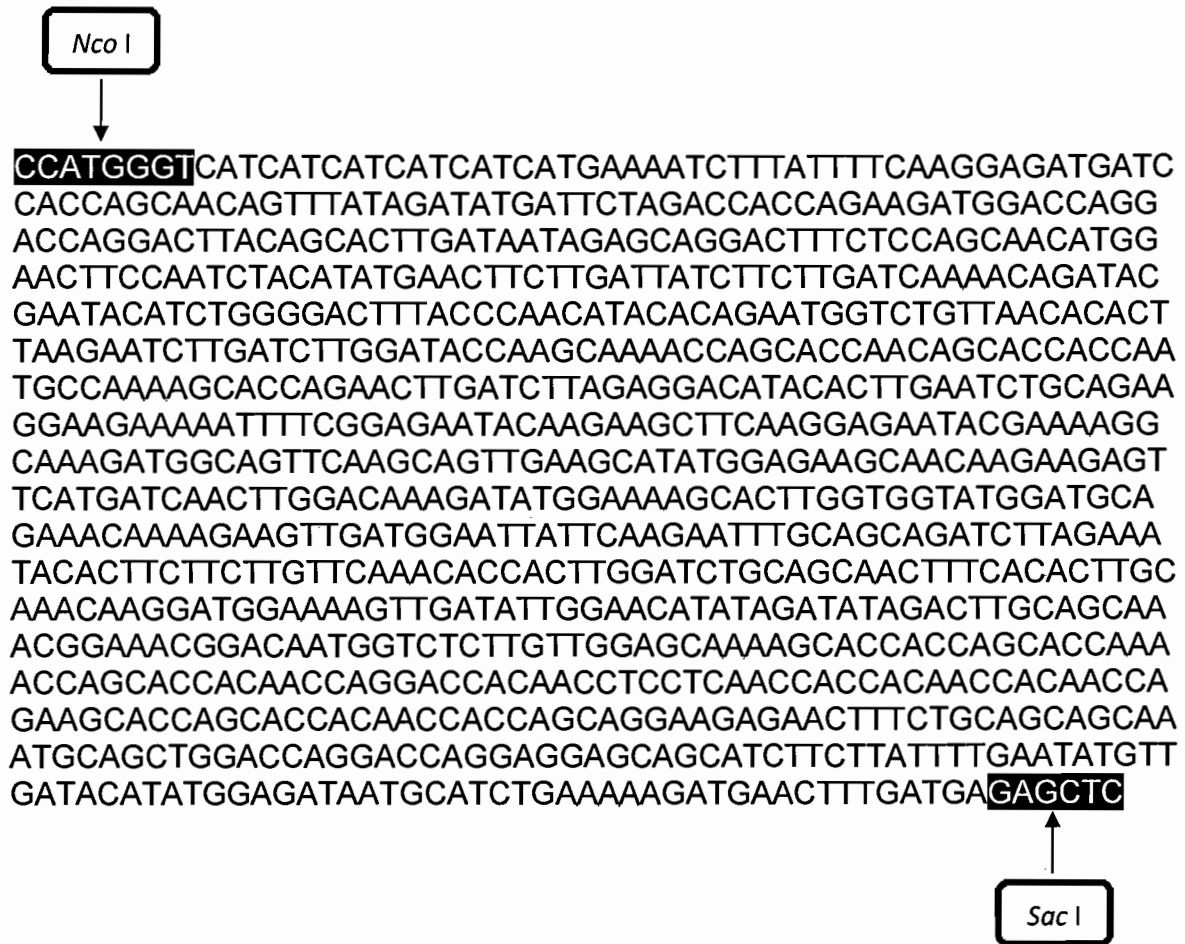
Para el diseño del gen de transformación de cloroplastos se añadió un sitio de unión a ribosoma y sitios de restricción para ser clonado en un vector de transformación de cloroplastos bicistrónico (pKCZ bic).

A ambas construcciones se les añadió en el extremo 5' seis codones que codifican para histidina con la finalidad de permitir la purificación de la proteína recombinante y también se añadió un sitio de proteasa (TEV) que permite eliminar las histidinas una vez purificada la proteína. La idea es poder purificar esta proteína para usarla como control en los ELISAs y cuantificar la cantidad de proteína recombinante producida en plantas.

Ambos genes se optimizaron para su expresión en lechuga en base al uso de codones en plantas y al análisis evitando secuencias desestabilizantes del ARNm, los genes fueron sintetizados por la compañía GeneScript y mantienen la secuencia de aminoácidos de origen bacteriano.

En las Figuras 7 y 8 se muestra el diseño de cada uno de los genes antes descritos.

A)

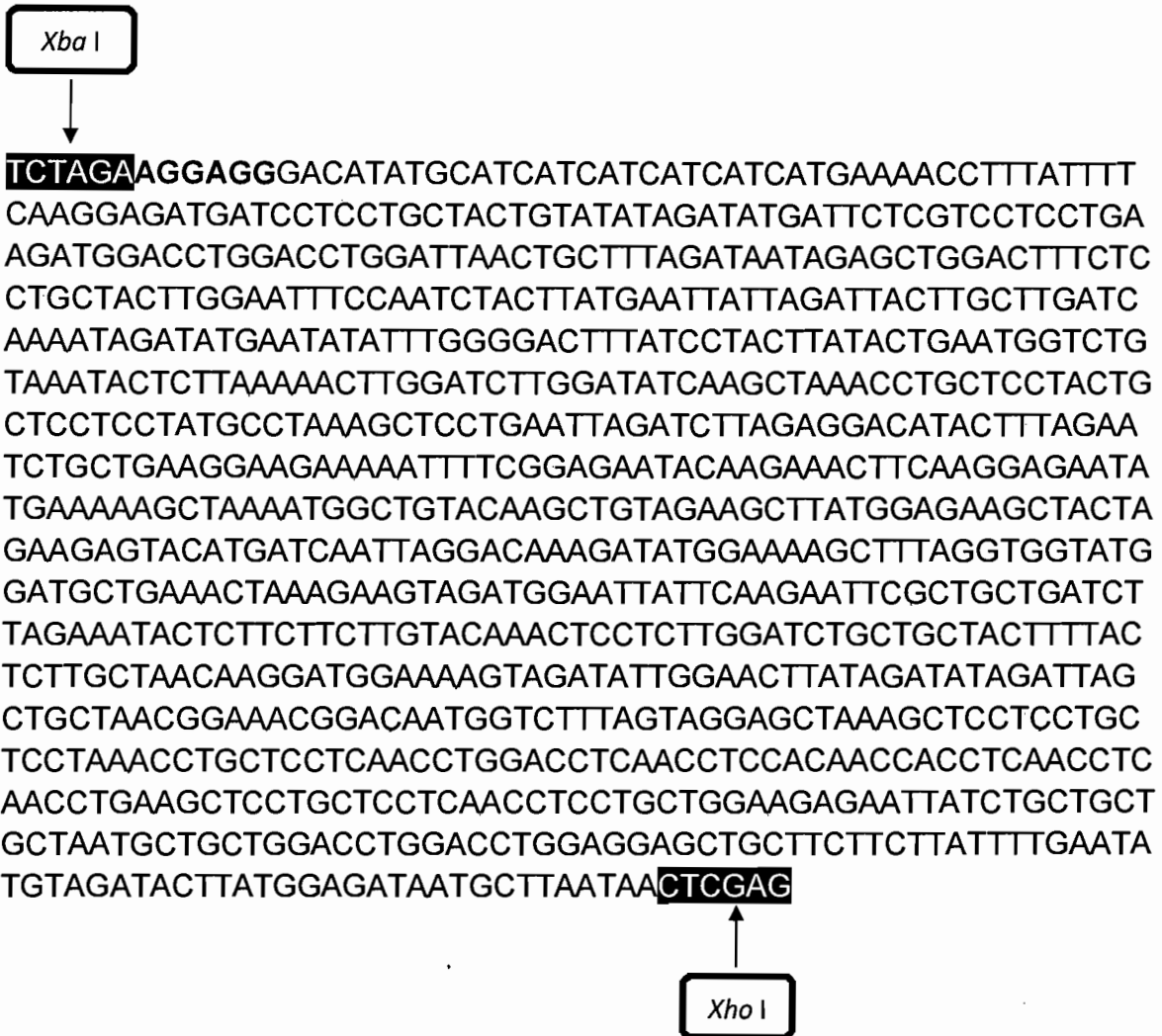


B)

HHHHHHENLYFQGDDPPATVYRYDSRPPEDGPGPGLTALDNRAGLSPATWNFQSTYEL
 LDYLLDQNRYEYIWGLYPTYTEWSVNTLKNLDLGYQAKPAPTAPPMPKAPELDLRGHTL
 ESAEGRKIFGEYKQLQGEYEKAKMAVQAVEAYGEATRRVHDQLGQRYGKALGGMDAET
 KEVDGIIQEFAADLRNTLLLVTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLV
 GAKAPPAPKPAPQPQPQPQPQPEAPAPQPPAGRELSAANAAGPGPGGAASSY
 FEYVDTYGDNASEKDEL

Figura 7. Gen para transformación nuclear (BPsn). **A)** Secuencia de nucleótidos del gen BPsn optimizada para su expresión en plantas por la compañía GenScript. Longitud del gen: 947 pb. En color azul y letras blancas se encuentran los sitios de restricción *Nco* I y *Sac* I. **B)** Secuencia de aminoácidos codificada por el gen BPsn.

A)



B)

HHHHHHENLYFQGDDPPATVYRYDSRPPEDGPGPGLTALDNRAGLSPATWNFQ
 STYELLDYLLDQNRYEYIWGLYPTYTEWSVNTLKNLDLGYQAKPAPTAPMPKA
 PELDLRGHTLESAEGRKIFGEYKKLQGEYEKAKMAVQAVEAYGEATRRVHDQLG
 QRYGKALGGMDAETKEVDGIIQEFADLRNTLLLVTPLGSAATFTLANKDGKVD
 IGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAPQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQPP
 GRELSAAANAAGPGPGAASSYFEYVDTYGDNA

Figura 8. Gen para transformación de cloroplastos (BPsc). **A)** Secuencia de nucleótidos del gen BPsc optimizada para su expresión en plantas por la compañía GenScript. Longitud del gen: 941 pb. En color azul y letras blancas se encuentran los sitios de restricción *Xba I* y *Xho I*. **B)** Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen BPsc. Letras en rojo: sitio de unión a ribosoma.

Se diseñaron dos genes sintéticos con el fin de ser traducidos en plantas de manera más eficiente que los genes de origen bacterianos, y obtener niveles de expresión más altos de las proteínas en las plantas transformadas, tanto de tabaco como de lechuga. Trabajos previos en nuestro grupo han demostrado que los niveles de proteínas aumentan de manera significativa después de modificar la secuencia del gen (Rosales-Mendoza y col., 2007; Soria-Guerra y col., 2007).

6.2. Construcciones genéticas.

6.2.1. Construcción para transformación nuclear.

6.2.1.1. Digestión del gen BPSn y del vector binario pBI-121

Las construcciones genéticas fueron clonadas en el vector pUC por la compañía GenScript. En cuanto se tuvieron en el laboratorio, se procedió a disolver el liofilizado y a transformarlo por choque térmico en células competentes TOP 10 F' (Anexo 9.1). Se realizó miniprep del cultivo obtenido y éste se digirió con las enzimas de restricción *Xba I* y *Sac I* para liberar la secuencia del gen BPSn. A la par, el vector binario pBI-121 también fue digerido con las mismas enzimas, con la finalidad de liberar el gen codificante de GUS. 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). Después, tanto el vector digerido como el gen BPSn liberado fueron purificados con el kit QIAquick gel extracción de Qiagen, y de esta manera se procedió con la ligación de los mismos. En la Figura 10 se muestra la digestión del vector binario pBI-121 y la digestión del vector pUC.

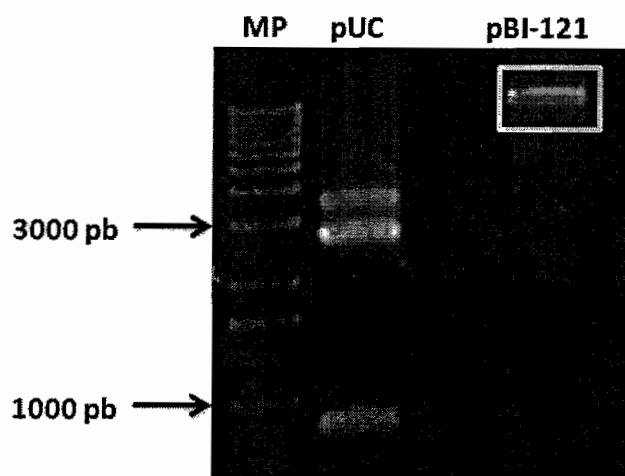


Figura 9. Digestión del gen BPs_n y del vector binario pBI-121 con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sac* I. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb. pUC: Gen BPs_n digerido del vector pUC; se muestra la banda de 947 pb correspondiente al gen. pBI-121: Vector binario digerido.

6.2.1.2. Clonación del gen BPs_n en el vector binario pBI-121.

Se realizó una ligación del gen BPs_n y el vector binario pBI-121, dicha ligación se transformó en células competentes *E. coli* TOP 10 F', éstas se inocularon en medio de selección (LB + 50 mg/mL Kanamicina) y se obtuvieron 7 clonas, las cuales fueron analizadas por PCR, utilizando los oligonucleótidos: oligo F 35S y oligo R pBI121 (Figura 10), los cuales flanquean el sitio de clonación del vector. La construcción fue secuenciada por el método de Sanger con el oligonucleótido. Se confirmó la secuencia esperada.

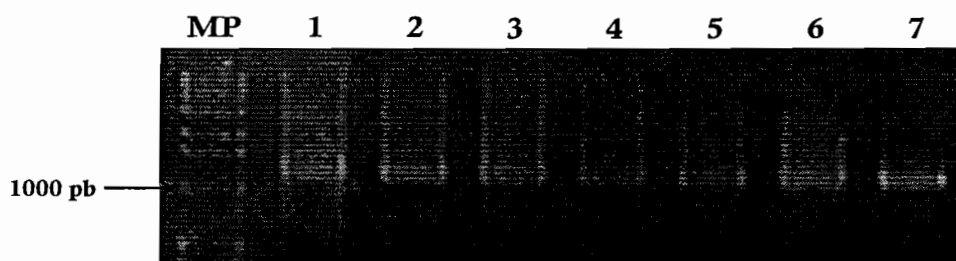


Figura 10. Análisis de las clonas pBI-BPs_n por PCR. MP: Marcador de peso molecular de 1 Kb; carriles 1-7, muestras problema.

Como se muestra en la Figura 10, las clonas analizadas por PCR muestran el amplicón esperado de 1,347 pb, con lo cual comprobamos la presencia del transgén, verificando la clonación de BPsn en pBI-121, dando lugar al plásmido pBI121-BPsn (Figura 11). Se utilizó la clona 1 para transformar *A. tumefaciens*.

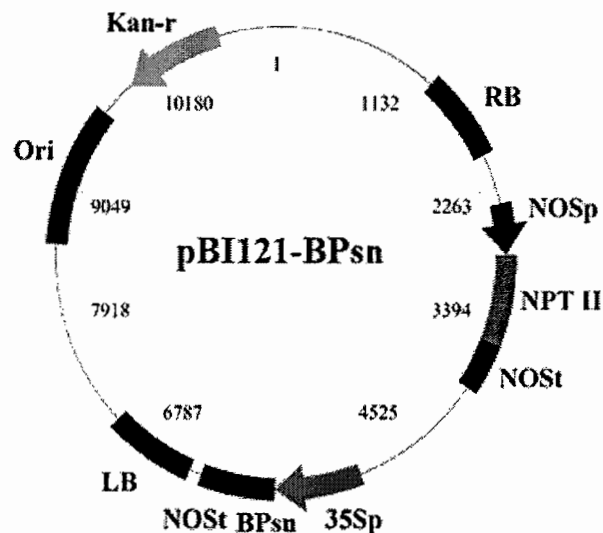


Figura 11. Vector binario pBI121-BPsn utilizado para la transformación nuclear de lechuga. LB y RB: Borde izquierdo y borde derecho, respectivamente, del T-DNA; se muestra el gen BPsn en rojo; en gris se muestra el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV 35S-Pro) y en verde el gen de selección (*nptII*).

6.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

El plásmido pBI121-BPsn fue introducido en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. Después de dos días de cultivo en medio selectivo (YM + 50 mg/mL Kanamicina) 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).

6.3.1. 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 por Martínez-González (2005), en el caso de lechuga este proceso toma aproximadamente 6 meses (Figura 12); para el caso del tabaco el proceso es de 4 meses.

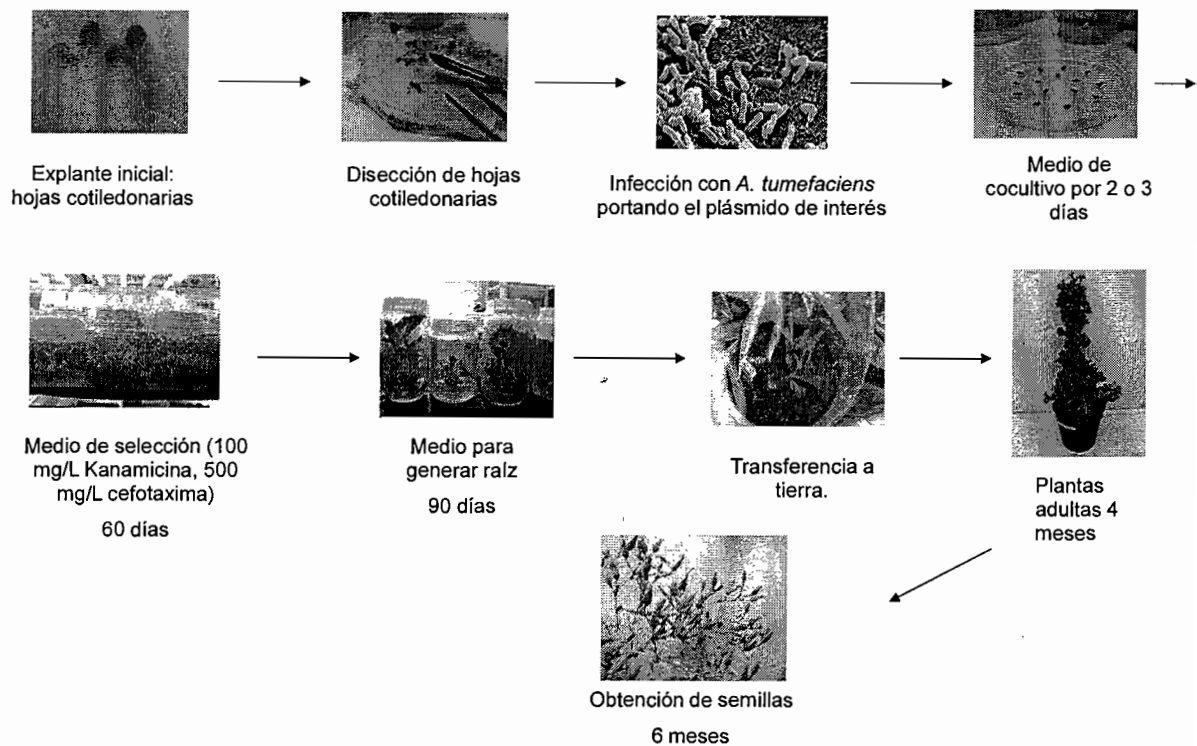


Figura 12. Representación esquemática de la transformación de plantas vía *Agrobacterium* y regeneración de plantas de lechuga. Se muestra el tiempo requerido para llegar a cada una de las etapas.

6.3.1.1. Transformación genética nuclear via *A. tumefaciens* con el plásmido pBI121-BPsn.

6.3.1.1.1. 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 +100 mg/L

kanamicina + 500 mg/L cefotaxima), se cambiaron de medio cada dos semanas hasta la formación de callos mostrados en la Figura 13.

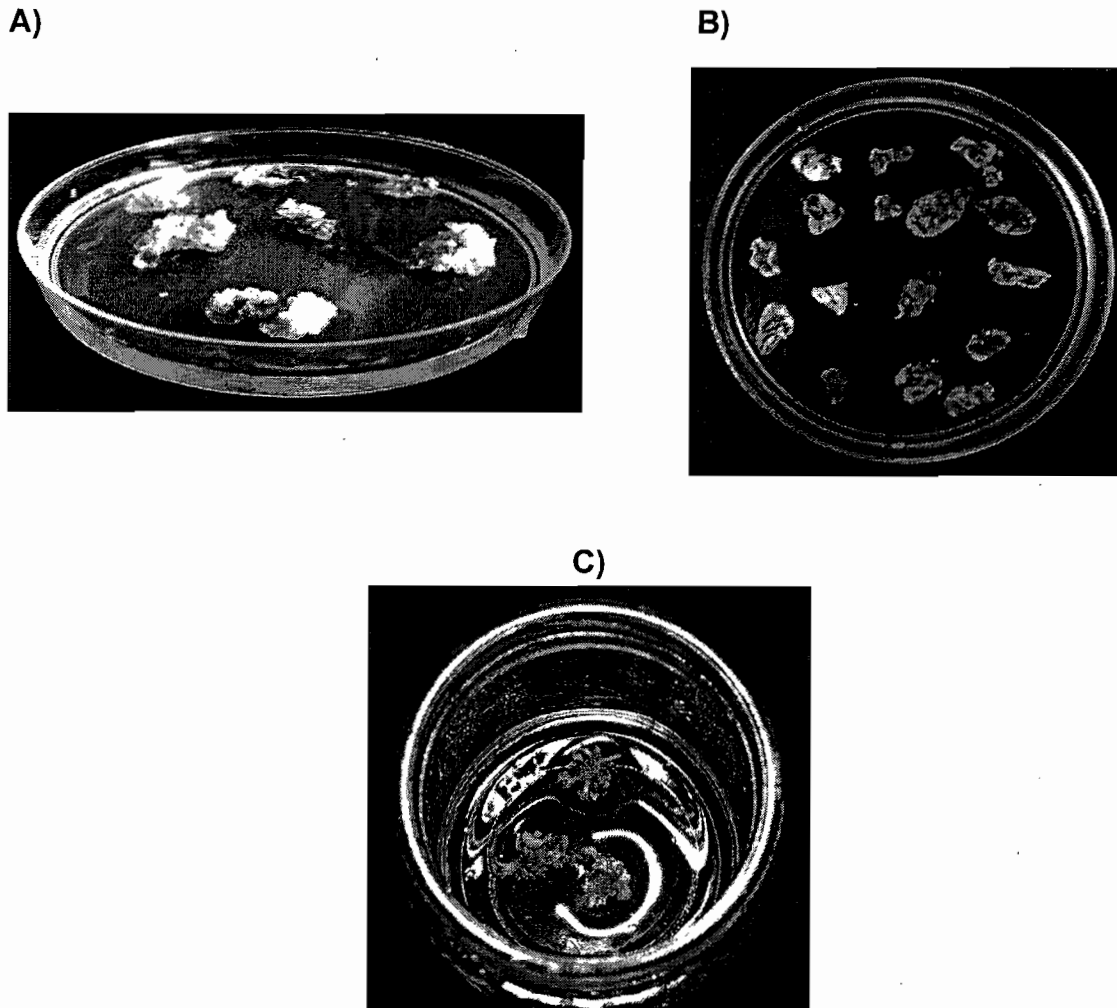


Figura 13. Formación de callos y brotes de lechuga regenerados a partir de cotiledones infectados con el plásmido binario pBI121-BPsn. **A)** Callos de lechuga con 4 semanas post-infección (p.i.); **B)** Control negativo (cotiledones sin infectar); **C)** Brotes de lechuga a los 5 meses p.i. Las Figuras A) y B) medio MSJ+100 mg/L Kan+500 mg/L Cef; C) medio MS104+100 mg/L Kan+500 mg/L Cef. Kan= Kanamicina; Cef: Cefotaxima.

En la Figura 13 se presentan los posibles callos y brotes transgénicos para la construcción pBI121-BPsn, solamente los callos generados a partir de cotiledones infectados con el plásmido binario crecieron en presencia del agente de selección, mientras que el control negativo no se desarrolló exitosamente en presencia del agente de selección.

6.4. Construcción para la transformación de cloroplastos.

6.4.1. Clonación del gen BPsc en el vector pBic.

Los vectores bicistrónicos para la transformación de cloroplastos ofrecen varias ventajas, dentro de éstas podemos mencionar que la expresión de ambos genes se da de forma paralela, ya que éstos se encuentran regulados por un mismo promotor, y de esta manera las células capaces de crecer en medio selectivo también expresan el gen de selección, a diferencia de los vectores monocistrónicos y co-bombardeo.

El gen BPsc para transformación de cloroplastos fue liberado a partir del vector pUC mediante la digestión con las enzimas de restricción *Xba* I y *Xho* I, a la par se digirió con las mismas enzimas el vector pBic. La banda liberada de 941 pb correspondiente fue clonada en el vector previamente digerido. La ligación del gen BPsc en dicho vector se realizó empleando la T4 ADN ligasa y 5 µL de esta ligación fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli* (TOP 10 F'), se inoculó en medio de selección (LB + 50 mg/mL de carbenicilina). De las colonias resistentes a la selección se eligieron cinco, las cuales fueron sometidas a un ensayo de restricción con las enzimas *Xba* I y *Xho* I, a fin de confirmar la presencia del gen de interés. Sólo 2 de estas clonas fueron positivas (Figura 14).

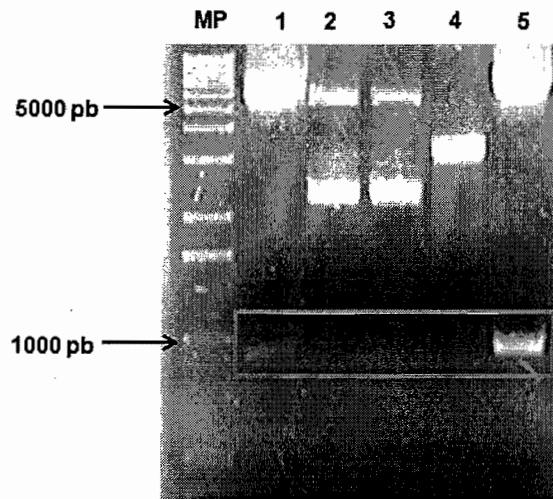


Figura 14. Análisis de restricción de las clonas con las enzimas *Xba* I y *Xho* I de cinco clonas resistentes a la selección después de haber sido transformadas con la construcción pKCZ-BPsc bic. Se muestra el fragmento liberado de 941 pb (recuadro verde) que corresponde al gen BPsc. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb; 1-5: Clonas problema.

Las clonas se consideraron positivas al obtener el perfil de restricción esperado y con esto se confirmó la clonación de BPsc en el vector pBIC, dando lugar a la construcción pKCZ-BPsc bic (Figura 15). La clona 1 se utilizó para recubrir las micropartículas de oro usadas en el bombardeo de hojas de tabaco.

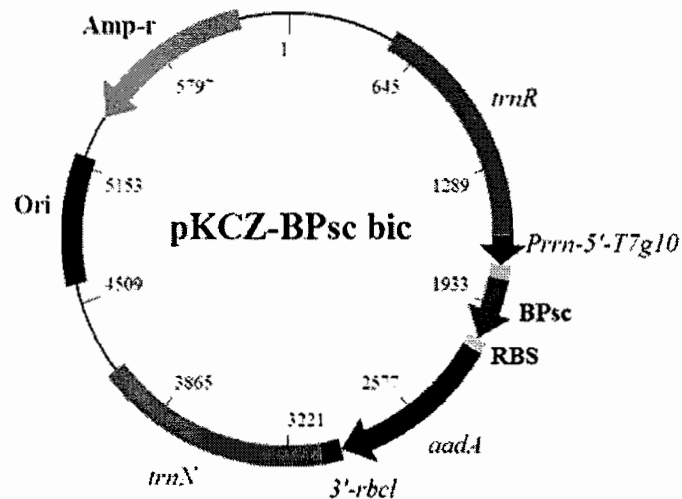


Figura 15. Vector bicistónico pKCZ-BPsc bic para transformación de cloroplastos de tabaco. En gris se muestran los sitios *tmN* y *tmR*, los cuales son sitios de recombinación homóloga en el genoma del cloroplasto; en rojo se muestra tanto el promotor (*Prn-5'T7g10*: Promotor constitutivo de cloroplastos, 5'-UTR del fago 7 del gen 10), como el terminador (*3'-rbcl*: 3'-UTR del gen de la

subunidad grande de Rubisco); en amarillo los sitios de unión a ribosomas (RBS); en verde el gen sintético BPsc; en negro el origen de replicación bacteriano, en rosa y azul, los genes de resistencia a antibióticos (Ampicilina y Espectinomicina, respectivamente).

El gen BPsc quedó bajo el control del promotor de origen plastídico *Prrn*, además el cassette contiene el gen de selección (*aadA*), el cual le confiere resistencia a espectinomicina a las células vegetales transformadas.

6.4.2. 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; Rosales y col., 2008), el proceso de regeneración se lleva a cabo en aproximadamente cuatro meses (Figura 16).

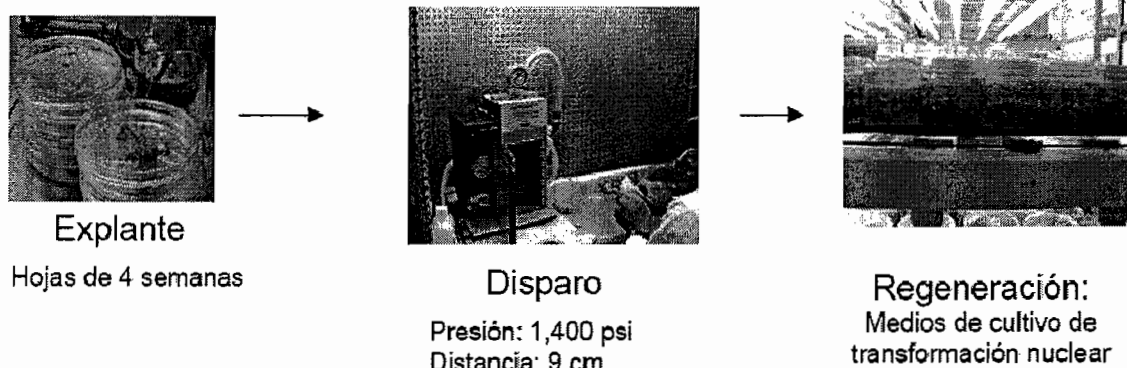
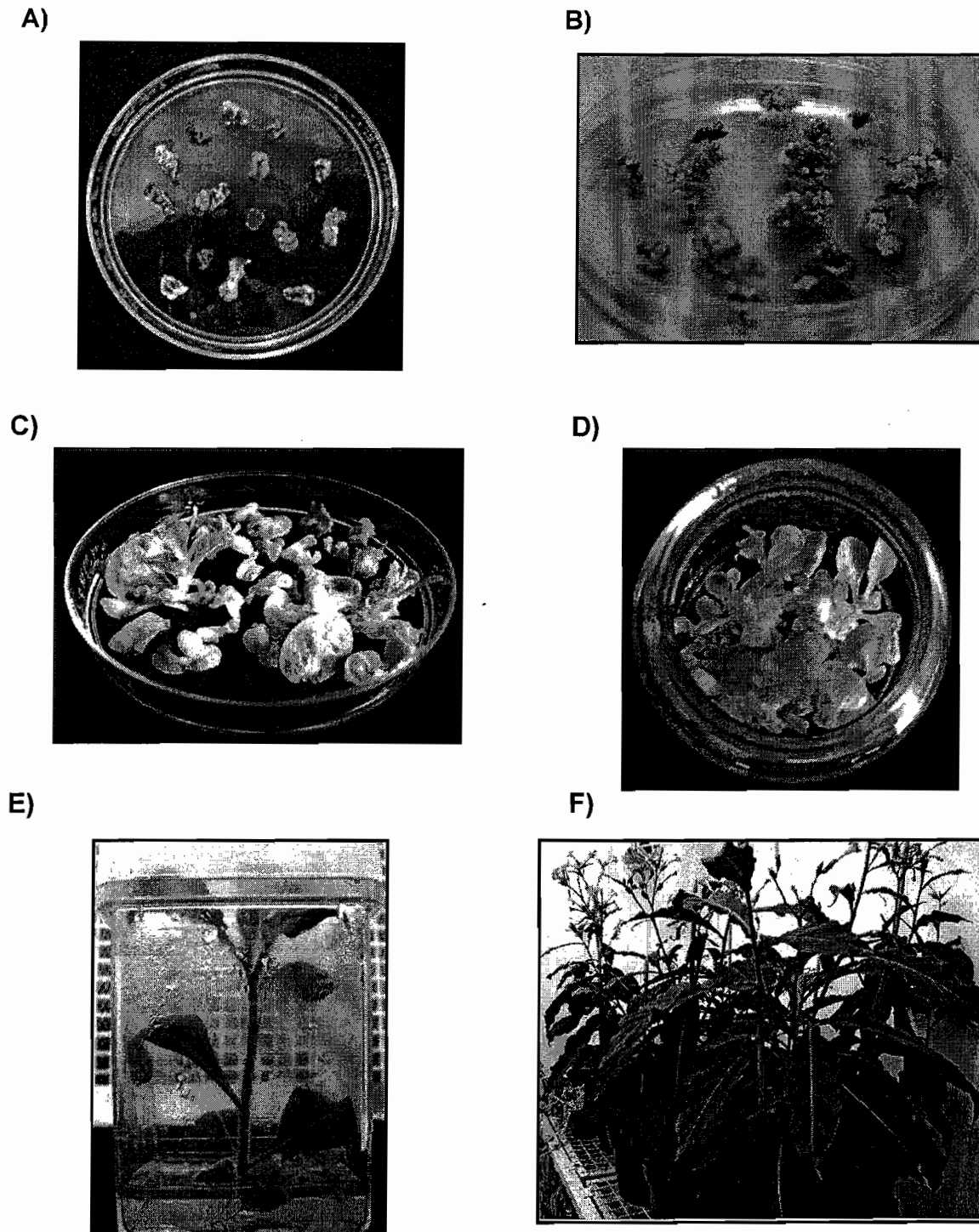


Figura 16. Proceso de transformación de hojas de tabaco por el método de biobalística.

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 (RMOP + 250 mg/mL espectinomicina), se transfirieron a medio nuevo cada dos semanas, a las 6 semanas se obtuvieron callos resistentes al agente de selección (Figura 17).



El tiempo aproximado desde el bombardeo de hojas de tabaco hasta la obtención de plantas en tierra fue de aproximadamente 10 meses, se obtuvieron aproximadamente 8 brotes resistentes al antibiótico, de los cuales solo sobrevivieron 2, y se originaron las líneas A y B, de éstas se tienen 6 plantas de A y 4 de B, éstas lograron formar raíz y al transferir a suelo se desarrollaron hasta estado adulto.

6.5. Análisis de transformantes.

6.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa.

Para confirmar la presencia del transgén BPsc, se realizaron dos análisis de PCR a las líneas resistentes a espectinomicina, como se describió en la Metodología.

En el primer PCR se utilizó como control positivo la construcción pKCZ-BPsc bic y como controles negativos ADN de plantas de tabaco no transformadas. Los oligos que se utilizaron para este análisis fueron BPscF y BPscR, los cuales están diseñados para que amplifiquen parte de la secuencia del gen BPsc. Este análisis demostró la presencia del gen sintético BPsc en 10 de las 14 líneas analizadas. No se observó producto de PCR en plantas sin transformar (Figura 18).

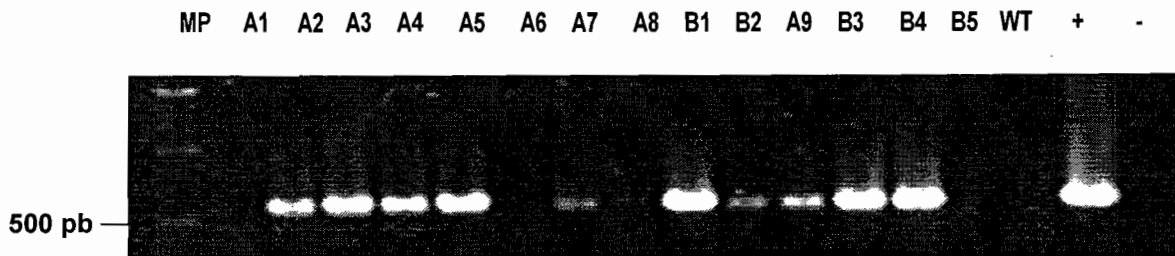


Figura 18. Análisis de los productos de amplificación por PCR de las plantas de tabaco transformadas con la construcción pKCZ-BPsc bic por biobalística. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb; A1-A9; B1-B5: Plantas transformadas; WT: Planta sin transformar; +: Control positivo (plásmido pKCZ-BPsc bic). Análisis de productos en un gel de agarosa al 1% corrido en TAE 1X a 70V.

En la Figura 18 se observa la banda esperada de 566 pb en 10 de las 14 plantas regeneradas a partir del medio RMOP con antibiótico, mientras que en la planta sin transformar no se observa producto de amplificación.

Para confirmar que el gen BPsc se integró al genoma de cloroplasto, se realizó otro análisis de PCR, utilizando el oligo GCF, el cual está diseñado para que se una antes de la zona de recombinación del genoma de cloroplasto y el oligo BPscR, que se une dentro de la secuencia del gen BPsc (Figura 19).

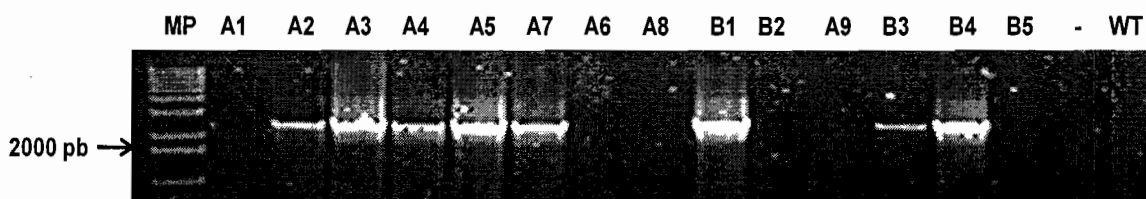


Figura 19. Productos de PCR para comprobar integración del gen BPsc al genoma de cloroplasto. MP: Marcador de peso molecular 1Kb; A1-A9; B1-B5: Plantas transformadas; -: Control negativo. Análisis de productos en un gel de agarosa al 1% corrido en TAE 1X a 70V.

En la Figura 19 se puede observar que para las 14 plantas analizadas, solo 8 de éstas dieron el producto de PCR esperado, indicándonos que estas plantas tienen el gen BPsc integrado al genoma de cloroplasto de tabaco.

Cuando se analizaron ambos PCR, se vio que, a pesar de que se hubiera esperado que todas las líneas que dieron positivas para el primer PCR (Figura 19) dieran también en el segundo PCR, esto no fue así. Este fenómeno se puede explicar debido a que a pesar de que los genes que están diseñados para su expresión en cloroplastos, algunas copias se podrán integrar en el genoma nuclear de las células vegetales, aunque no puedan expresarse (Carrer y col., 1993; Cornelissen y Vandewiele, 1989).

6.5.2. Análisis por RT-PCR

Se llevaron a cabo análisis por RT-PCR para determinar la presencia de un transcrito específico para el gen BPsc. Para ello se seleccionaron las plantas positivas por PCR para el gen BPsc. Un DNAc de 566 pb fue detectado en todas las plantas transgénicas analizadas. La planta sin transformar no mostró señal.

Como control de carga se amplificó una región de actina con oligos diseñados para jitomate (Figura 20).

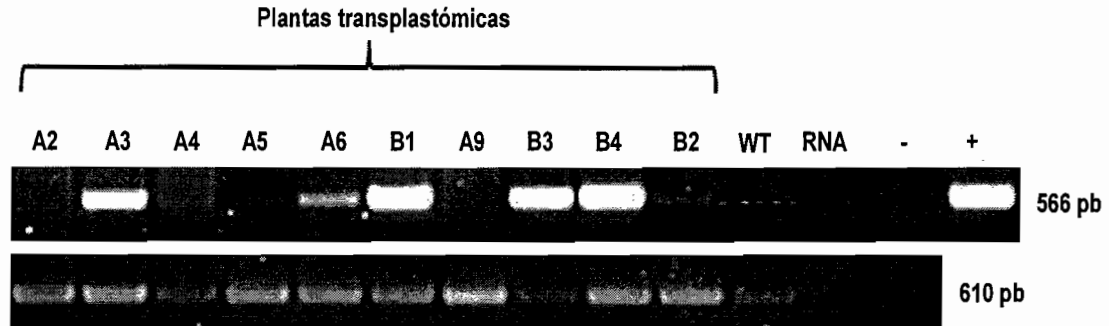


Figura 20. Análisis por RT-PCR de plantas de tabaco transformadas con el gen BPsc (transcrito específico de 566 pb). Se amplificó una región de actina como control de carga (610 pb). (-): Control negativo de reactivos. (+): Control positivo plásmido pKCZ-BPsc bic. WT: Planta sin transformar; RNA: Control sin transcriptasa reversa para verificar ausencia de ADN genómico.

Estos resultados preliminares nos indican que el gen BPsc insertado está siendo transcrito adecuadamente solo en ocho de las diez plantas analizadas (A3, A4, A5 A6, B1, B2, B3 Y B4), y es específico al no detectarse banda en el tejido no transformado.

6.5.3. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

A la par del análisis de RT-PCR de las 10 líneas que dieron positivo por PCR, se realizó el análisis de ELISA, como se describe en la metodología, para comprobar la antigenicidad de la proteína heteróloga *in vitro*. Se extrajeron proteínas de las plantas de tabaco de la generación T0. En este ensayo se incluyó una curva estándar en la que se interpolaron las lecturas obtenidas de las plantas transformadas, se utilizó como estándar el péptido C4V3 (péptido que contiene las regiones más inmunogénicas del virus de VIH, unido a una cola de Histidinas) donado por la Dra. Leticia Moreno de la UNAM para la cuantificación de la proteína PTPFHA (Figura 21).

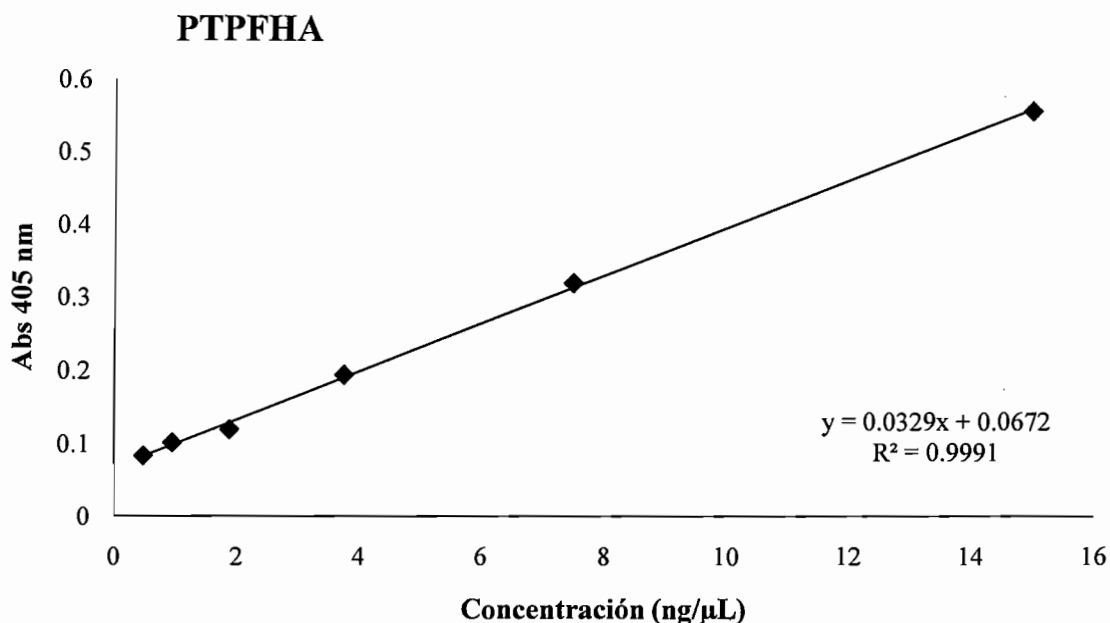


Figura 21. Curva estándar para la cuantificación de PTPFHA. Se utilizó como estándar el péptido C4V3.

La Figura 22 muestra los resultados obtenidos para las diferentes líneas transplásticas para la proteína PTPFHA en hojas. El rango de expresión de la proteína en las hojas de las plantas transplásticas obtenidas en % de proteína total soluble (PTS) va desde 0.1-0.5 %PTS.

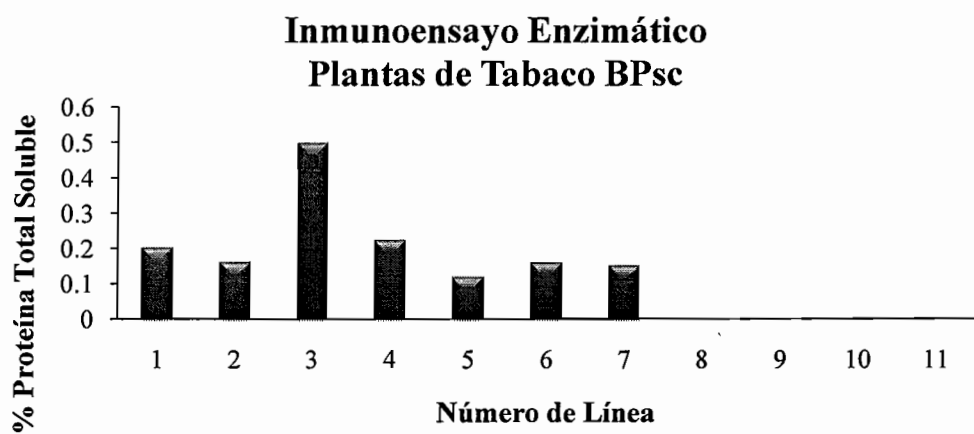


Figura 22. Análisis por ELISA para la detección de la proteína PTPFHA en hojas de tabaco. Los resultados se expresan en % PTS. 1: Línea A3; 2: Línea A4; 3: Línea A5; 4: Línea A6; 5: Línea B1;

6: Línea B2; 7: Línea B3; 8: Línea B4; 9: Línea A2; 10: Línea A9. La línea 11 corresponde a la planta sin transformar.

La variabilidad en la producción de antígenos observada en estos resultados preliminares de planta a planta, puede ser debida a que no se ha alcanzado la homoplastia. Se realizaron análisis de PCR, RT-PCR y ELISA solo a las plantas de tabaco transformadas por el método de biobalística transformadas con el plásmido pKCZ-BPsc bic, ya que fueron las únicas que produjeron plantas adultas para su análisis, a diferencia de la transformación nuclear con *A. tumefaciens*, en donde solo se ha logrado regenerar pequeños brotes resistentes a la transformación y al agente de selección, esto se debe a que la transformación con pBI121-BPsn se realizó 3 meses posterior a la transformación de tabaco por biobalística, sin embargo, el tener brotes resistentes al agente de selección nos permite considerar la posibilidad de obtener plantas transgénicas con las construcciones, datos a verificar posteriormente.

El método de transformación de tabacos tiene la limitante en cuanto a usar el tejido para inmunización oral ya que cuenta con altos niveles de compuestos tóxicos, entre los que destaca la nicotina, un alcaloide soluble y polar que representa el 5% del peso de la planta, y lo recomendable sería incluir un paso de purificación adicional para eliminación de alcaloides, sin embargo hay reportes de pruebas en ratones donde se ha comprobado la inmunogenicidad de proteínas recombinantes sin afectar el desarrollo del ratón y ha servido para prueba de concepto ya que se pueden obtener resultados rápidos en cuanto a los análisis de los transgenes, así como para demostrar que las construcciones pueden producir las proteínas funcionales *in vitro*, analizadas en un menor tiempo que las producidas en lechuga por transformación nuclear. El obtener plantas transplásticas de lechuga es otro trabajo que se está realizando en nuestro grupo de investigación con algunas dificultades en el regeneración de esta especie.

Para la realización de este trabajo se diseñaron dos construcciones genéticas, las cuales incluyen los epítomos mencionados anteriormente. Ambas

construcciones pudieron ser subclonadas en los vectores adecuados y no se observaron problemas de crecimiento de *E. coli* ni de *A. tumefaciens*.

Se cuenta con plantas adultas de tabaco en tierra, las cuales demostraron tener el transgén por medio de los análisis realizados de PCR, además, a estas plantas también se les realizaron análisis de RT-PCR, para comprobar la presencia del transcrito, y que en análisis *in vitro* demostraron la funcionalidad de la proteína antigénica al ser reconocida por un anticuerpo contra la cola de Histidinas, lo cual es un resultado positivo para poder seleccionar las líneas más prometedoras para análisis *in vivo* en ratones.

La producción de vacunas comestibles es una opción viable la cual en un futuro cercano tendrá beneficios sociales y económicos, además de ambientales debido a los costos de producción reducidos y la facilidad en la producción lo cual involucra el uso de invernaderos controlados en comparación con sistemas de biorreactores usados en estos días. Nuestra estrategia biotecnológica puede ayudar a la producción de una vacuna comestible contra la tos ferina, como lo demanda la organización Mundial de la Salud y ser de interés a las compañías farmacéuticas productoras de vacunas.

7. CONCLUSIONES.

Los resultados del presente trabajo demuestran que:

- 1) Las 2 construcciones generadas (pBI121-BPsn para la transformación nuclear y pKCZ-PBsc bic para transformación de cloroplastos) se replican en *E. coli*.
- 2) El vector pKCZ-PBsc bic es funcional para la transformación por bombardeo de tabaco.
- 3) La transformación de cloroplastos de tabaco con la construcción pKCZ-PBsc bic permite la obtención de plantas transplastómicas generación T0, como se demuestra en los análisis de PCR y ELISA.
- 4) La transformación nuclear de lechuga mediante el co-cultivo de *Agrobacterium* con el vector binario pBI121 portador del gen sintético BPsn, permite la obtención de brotes resistentes al agente de selección presumiblemente transgénicos.

8. PERSPECTIVAS

1. Purificar la proteína recombinante PTPFHA producida en tabaco transplastómico por el método de biobalística, usando resinas de afinidad de histidina y mediante el uso de proteasa; dicha proteína servirá como control para la curva estándar en los ensayos de ELISA, así como para producir anticuerpos específicos contra la proteína recombinante.
2. Subclonar el transgén BPsc en el vector pADCT que está diseñado para la transformación de cloroplastos de lechuga.
3. Transformar por el método de biobalística cloroplastos de lechuga usando el vector específico mencionado anteriormente, que cuente sitios de recombinación homóloga en lechuga (pADCT).
4. Obtener generaciones estables (T1) de plantas transplastómicas de tabaco y (T0) de plantas transgénicas de lechuga para las construcciones utilizadas a partir de semillas y brotes, respectivamente.
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 *in vitro* de las proteínas heterólogas, analizar la inmunogenicidad en animales.
7. Realizar ensayos de retos contra *B. pertussis*, en animales inmunizados con los materiales vegetales transformados.

9. ANEXO

9.1. Preparación de células químicamente 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 inóculo 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 sobre 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 añadieron entre 10-100 ng 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 GV3101 se inoculó en medio de cultivo YM por dos días, de este cultivo (DO. 0.04-0.08 a 600 nm), 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. Extracción de ADN plasmídico.

Se basó en el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 16 horas y se centrifugó a 13,000 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 vórtex 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 13,000 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 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 μ L de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 13,000 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 °C; se resuspendió en 30 μ L de agua milli Q.

9.4. Preparación de soluciones y medios de cultivo.

9.4.1. 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.

9.4.2. 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.

9.4.3. 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.

9.4.4. 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.

9.4.5. 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.

9.4.6. 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.

9.4.7. 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.

9.4.8. 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.

9.4.9. Cefatoxima

Para preparar un stock de 500 mg/mL, se disolvieron 2 gramos de cefatoxima en agua desionizada estéril y se aforó a 4 mL, se almacenó a -20 °C.

9.4.10. 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.

9.4.11. 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.

9.4.12. 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 (en el caso de medio de cultivo para lechuga) o 5.8 (para medio de cultivo de tabaco) 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 esterilizaron a 15 lb/pulgada² por 15 minutos.

Cuando fue necesario, la kanamicina o la espectinomicina previamente esterilizadas por filtración, se añadieron al medio después de esterilizar una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50°C.

9.4.13. Composición de medios de cultivo.

Medio	Vitaminas	ANA (mg/L)	BA (mg/L)	Cinetina (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Caseína (g/L)	pH
MS	MS						5.7
MSO	B5	-	-	-	-	-	5.7
MS104	B5	0.05	0.02	-	-	-	5.7
MSJ	MS	1.0	0.5	-	-	-	5.7
UM	MS	-	-	0.25	2.0	2.0	
RMOP	B5	1.0	0.1	-	-	-	5.8

9.4.14. 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.

9.4.15. 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.

9.4.16. Soluciones Bradford.**9.4.16.1. 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.

9.4.16.2. 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.

9.4.17. 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.

9.4.18. 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.

9.4.19. 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.

X. REFERENCIAS

- Akinsanya-Beysolow I, Wolfe CS (2009). Update: Vaccines for women, adolescence through adulthood. *J. Womens Health*. 18: 1101-1108.
- 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.
- Arntzen C (2005). Plant-derived vaccines and antibodies: potential and limitations. *Vaccine*. 23:1753–6.
- Askelof P, Rodmalm K, Wrangsell G, Larsson U, Svenson S, Cowell J, Bartfais T (1990) Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of *Bordetella pertussis* toxin subunit S1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1347-1351.
- Arntzen C (2008). Using tobacco to treat cancer. *Plant Science*. 321: 1052–1053.
- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrahi S, Liberman Y, Freeman A, Zimran A, Galun E (2009). A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme – a preclinical and phase I investigation. *PLoS ONE*. 4(3):e4792.
- Bai JY, Zeng L, Hu YL, Li YF, Lin ZP, Shang SC, Shi YS (2007). Expression and characteristic of synthetic human epidermal growth factor (hEGF) in transgenic tobacco plants. *Biotechnol. Lett*. 29: 2007–2012.
- Barbieri JT, Armellini D, Molkenkin J, Rappuoli R (1992) Construction of a diphtheria toxin A fragment-C180 peptide fusion protein which elicits a neutralizing antibody response against diphtheria toxin and pertussis toxin. *Infect Immun* 60:5071-5077.
- Bassinat L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N (2000). Role of adhesions and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun*. 68 (4): 1934-1941.
- Biolex Therapeutics (2009). Biolex therapeutics researchers present Locteron1 U.S. phase 2a hepatitis C trial results at EASL conference (<http://www.biolex.com>).

- Bordet J, Gengou O (1909). L'endotoxine coquelucheuse. *An Institute Pasteur*. 23: 415-419.
- Boucher P, Sato H, Sato Y, Loch C (1994) Neutralizing antibodies and immunoprotection against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein. *Infect Immun* 62: 449-456.
- Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G y Nestei EW (1991). Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Meth Enzymol*. 204: 384-397.
- Carbonetti N H, Artamonova GV, Andreasen C, Bushar N (2005). Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin provide an one-two punch for establishment of *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect. Immun*. 73 (5): 2698-2703.
- Capuchino MY, Salazar ML, Cárdenas RC. "Perfil clínico epidemiológico de la tosferina en Jalisco en el periodo comprendido entre enero del año 2004 a septiembre del 2005", en http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:gIBJmdlfrFcJ:www.pediatriajal.org.mx/downloads/tosfe_jalisco.pdf+brote+de+tosferina+en+jalisco&hl=es&gl=mx. 24 marzo de 2009.
- Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P (1993). Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol. Gen. Genet*. 241:49-56
- Charles IG, Dougan G, Pickard D, Chatfield S, Smith M, Novotny P, Morresseu P, Fairweather NF (1989). Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:3554-3558.
- Chebolu S, Daniell H (2007). Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. *Plant Biotechnol. J*. 5: 230-239.
- Chen M, Liu X, Wang Z, Song J, Qi Q, Wang PG (2005). Modification of plant N-glycans processing: the future of producing therapeutic protein by transgenic plants. *Med. Res Rev*. 25:343-60.

- Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K (1998). A search for serologic correlates of immunity for *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*. 16 (20): 1901-1906.
- Cornelissen M, Vandewiele M (1989). Nuclear transcriptional activity of the tobacco plastid *psbA* promoter. *Nucleic Acids Res.* 17:19–29.
- 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, Kota M, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ (1999). Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:1840-1845.
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7(2), 84-91.
- Daniell H, Ruiz ON, Dhingra A (2004). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol.* 286:111-38.
- Daniell H, Ruiz G, Denes B, Sandberg L, Langridge W (2009). Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. *BMC Biotechnol.* 9:23.
- Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.* Dec;14(12):669-79.
- Davoodi-Semiromi A, Samson N, Daniell H (2009). The green vaccine: a global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. *Hum. Vaccine.* 5: 488–493.
- Ding SH, Huang LY, Wang YD, Sun HC, Xiang ZH (2006). High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. *Biotechnol. Lett.* 28: 869–875.

- 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.
- Di Tommaso A, Domenighini M, Bugnoli M, Tagliabue A, Rappuoli R, De Magistris MT (1991). Identification of subregions of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin that stimulate human T-cell responses. *Infect. Immun.* 59: 3313–3331.
- Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T (2005). Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 339, 153–163.
- Dylag AM, Shah SI (2008). Administration of tetanus, diphtheria, and acellular *pertussis* vaccine to parents of high-risk infants in the neonatal intensive care unit. *Pediatrics.* 122: e550-e555.
- Edwards KM, Decker MD (2004). Pertussis vaccine. En: Plotkin, S y Orestein, WA (Eds). *Vaccine.* 4. ed. Philadelphia, Saunders.
- Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW (1996). Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature.* 381:90–92.
- Ewanowich CA, Melton AR, Weiss AA, Sherburne RK, Peppler MS (1989). Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 57:2698–2704.
- Fernández-SanMillan,A, Ortigosa SM, Hervás-Stubbs S, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM, Gaétan J, Coursaget P, Veramendi J (2008). Humanpapillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.* 6: 427–441.
- Floss DM, Falkenburg D, Conrad U (2007). Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res.* 16:315–32.
- Glenz K, Bouchon B, Stehle T, Wallich R, Simon MM, Warzecha H (2006). Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* 24: 76–77.

- Greenberg DP (2005). Pertussis in adolescents: increasing incidence brings attention to the need for booster immunization of adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 24(11):983.
- Guris D, Strebel PM, Bardenheier B, Brennan M, Tachdjian R, Finch E (1999). Changing epidemiology of *pertussis* in the United States: increasing reported. *Clin. Infect. Dis.* 28(6):1230–1237.
- Gutiérrez-Ortega, A, Sandoval-Montes C, de Olivera-Flores TJ, Santos-Argumedo L, Gómez-Lim MA (2005). Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.* 14: 877–885.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral Immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.
- Herrera-Díaz A (2005). Transformación nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos. Tesis de maestría. IPICYT.
- Higashi HG, Luna E, Precioso AR, Vilela M, Kubrusly FS, Dias WO, Raw I (2009). Acellular and “low” pertussis vaccines: Adverse events and the role of mutations. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 51(3):131-134.
- Hoey J (2003). Pertussis in adults. *CMAJ.* 168 (4): 453-454.
- Holland B (1998). Autotransporters: protein contortionists whose carboxyl termini translocate their own amino-terminal domains. *Trends Microbiol.* 6:388–389.
- Hong, SY, Kwon TH, Jang YS, Kim SH, Yang MS (2006). Production of bioactive human granulocyte colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expr. Purif.* 47: 68–73.
- Houdebine LM (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32:107–21.
- Hurtado OC, Matías JNA (2005). Historia de la vacunación en México. *Vac Hoy Rev. Mex. Puer. Pediatr.* 13: 47-52.
- Jacob-Dubuisson F, Buisine C, Mielkarek N, Clement E, Menozzi FD, Loch C (1996). Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Mol. Microbiol.* 19:65–78.

- Jefferson T, Rudin M, DiPietrantonj C (2003). Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine*. 21(17-18), 2003-2014.
- Jiang XL, He ZM, Peng ZQ, Qi Y, Chen Q, Yu SY (2007). Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Res*. 16: 169–175.
- Kim JW, Minamikawa T (1996). Transformation and regeneration of French bean plants by the particle bombardment process. *Plant Science*. 117:131-138.
- Kim TG, Baek MY, Lee EK, Kwon TH, Yang MS (2008). Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture. *Plant Cell Rep*. 27: 885–891.
- Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME, Maliga, P (1988). Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:8502-8505.
- Koprowski H (2005). Vaccines and sera through plant biotechnology. *Vaccine*. 23:1757–63.
- Koya V, Moayeri M, Leppla SH, Daniell H (2005). Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun*. 73, 8266–8274.
- Lacey BW (1960). Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *Jou. Hyg.* 58:57-93.
- Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R (2007). Edible vaccines: current status and future. *Ind. J. Med. Microbiol*. 25:93-102.
- Lambert-Buisine C, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F (1998). N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol*. 28:1283–1293 .
- Langridge WHR (2000). Edible vaccines. *Scientific American* 283(3): 48-53.
- Larrick W, Thomas DW (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin. Biotechnol*. 12:411–8.
- Leininger E, Bowen S, Renauld-Mongenie G, Rouse JH, Menozzi FD, Locht C (1997). Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis*

- vaccine component filamentous hemagglutinin. *J. Infect. Dis.* 175:1423–1431.
- Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrens AW, Plas LHW, Krol AR (2001). Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Exp. Bot.* 52 (358): 949-959.
- Leung Ak, Robson WI, Davies HD (2007). Pertussis in adolescents. *Adv. Ther.* 24(2):353–61.
- Li J, Fairweather NF, Novotny P, Dougan G, Charles IG (1992). Cloning nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. *J Gen Microbiol.* 138:1697–1705
- Li JT, Fei L, Mou ZR, Wei J, Tang Y, He HY, Wang L, Wu YZ (2006). Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology.* 356: 171–178.
- Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Appella E, Sidney J y Sette A (2002). A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J. of Immunology* 168: 5499–5506.
- Locht C, Antoine R (1995). A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie.* 77:333–340.
- Locht C. (1999). Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *Int. Microbiol.* 2:137-144.
- Ma JK-C, Barros E, Bock R, Christou P, Dale PJ, Dix PJ, Fischer R, Irwin J, Mahoney R, Pezzotti M, Schillberg S, Sparrow P, Stoger E, Twyman RM (2005). Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep.* 6:593–9.
- Ma JK-C, Drake PMW, Christou P (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* 4:794–805.
- Makhov AM, Hannah JH, Brennan MJ, Trus BL, Kocsis E, Conway JF, Wingfield PT, Simon MN, Steven AC (1994). Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: a bacterial adhesin formed as a 50 nm monomeric rigid rod based

- on a 19-residue repeat motif rich in β -strands and turns. *J. Mol. Biol.* 241:110–124.
- 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
- Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC (2007). The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A a TRFI-biased agonist of TLR4. *Science*. 316: 1628-1232.
- Matoo S, Cherry JD (2005). Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2):326-382.
- Menzio FD, Boucher PE, Riveau G, Gantiez C, Loch C (1994). Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 62:4261–9.
- Mett, V, Lyons J, Musiychuk K, Chichester JA, Brasil T, Couch R, Sherwood R, Palmer GA, Streatfield SJ, Yusibov V (2007a). A plant-produced plague vaccine candidate confers protection to monkeys. *Vaccine*. 25: 3014–3017.
- Mett, V, Shamloul AM, Hirai H, Zhou Z, Notkins A, Yusibov V (2007b). Engineering and expression of the intracellular domain of insulinoma-associated tyrosine phosphatase (IA 2ic), a type 1 diabetes autoantigen, in plants. *Transgenic Res.* 16, 77–84.
- 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.
- Mitchell V.S., Philipose M.M., Sanford J.P. (1993). The Children's Vaccine Initiative: achieving the vision. Washington DC, USA, 23.
- Mishra N, Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, Vyas SP (2008). Edible vaccines: a new approach to oral immunization. *Ind. J. Biotechnol.* 7:283–94.
- Mlynárová L, Loonen A, Heldens J, Jansen RC, Keizer P, Stiekema WJ, Nap JP (1994). Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *Plant Cell* 6:417-426.

- Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T (2007). Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine*. 25, 1647–1657.
- Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HGJ, Gaastra W, Willems RJL (1998). Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun*. 66:670–675.
- Muñoz JJ (1985). Biological activities of pertussigen (pertussis toxin). En: Sekura RD, Moss J, Vaughn M (eds) *Pertussis Toxin*. Orlando, FL: Academic Press, 1–18.
- Murashige T y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-497.
- MMWR. "Preventing tetanus, diphtheria, and *pertussis* among adults: Use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular *pertussis* vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP". *PubMed* 2006; 55(17): 1-44.
- Nadai, M, Bally J, Vitel M, Job C, Tissot G, Botterman J, Dubald M (2008). High-level expression of active human alpha1-antitrypsin in transgenic tobacco chloroplasts. *Transgenic Res*. 18:173–183.
- Nakano M, Makino M y Sueyoshi K (2003). *Agrobacterium*–mediated transformation of lettuce widely cultivated in Japan. *Jap Crop Sci*. 56 (2): 59-66.
- Nascimento IP, Dias WO, Quintilio, N, Christ AP, Moraes JF, Vancetto MD, Ribeiro-Dos-Santos G, Raw I, Leite LC (2008). Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against *Bordetella pertussis* intracerebral challenge. *Microbes and Infection*. 10: 198-202.
- Navarrete NS, González RM, Ruiz MC, Casasola FJ (1990). Estudio epidemiológico de un brote de tosferina en Rincón Grande, Veracruz. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 47(5): 304-312.

- Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, Kiyono H (2007). Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 10986–10991.
- Ntezayabo B, De Serres G, Duval B (2003). Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 22(1):22–27.
- Oey M, Lohse M, Scharff LB, Kreikemeyer B, Bock R (2009). Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 6579–6584.
- Ohgitani T, Okabe T, Sasaki N (1991). Characterization of haemagglutinin from *Bordetella bronchiseptica*. *Vaccine.* 9:653–8.
- Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, Hallander HO, Heijbel H (1997). Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet.* 350(9091), 1569-1577.
- OMS (2002). Departamento de vacunas y productos biológicos. *CH-1211 Ginebra 27, Suiza*
- Patiño-Rodríguez O (2007). Transformación de cloroplastos de lechuga con tres genes sintéticos de protegrinas con actividad antimicrobiana. Tesis de maestría. IPICYT.
- PAHO (2005). Erradicación de la Poliomielitis. Guía práctica 3ª Edición.
- PAHO – (2007) *Immunization newsletter*, 29(6), December.
- 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.
- Porter JF, Connor K, Donachie W (1994). Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology.* 140:255–261.

- Poolman JT, Hallander HO (2007). Acellular pertussis vaccines and role of pertactine and fimbriae. *Expert Rev. Vaccines*. 6(1): 47-56.
- Qian B, Shen H, Liang W, Guo X, Zhang C, Wang Y, Li G, Wu A, Cao K, Zhang D. (2008). Immunogenicity of recombinant hepatitis B virus surface antigen fused with preS1 epitopes expressed in rice seeds. *Transgenic Res*. 17, 621–631
- Renauld-Mongénie G., Cornette J., Mielcarek N., Menozzi F. D., Locht C. (1996) Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Bacteriol*. 178:1053–1060.
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnol*. 18(11): 1167-1171.
- Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Graieb A, Rumbo M, Hozbor D (2008). Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*. 26: 4639-4646.
- Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solís AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martínez-González L, Herrera-Díaz A, Korban SS (2008). Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *The Plant Journal*.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, López-Revilla R, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solís AG (2007). Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Rep*. 27: 79–84.
- Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solís AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martínez-González L, Herrera-Díaz A, Korban SS (2009). Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J*. 57, 45–54.

- Russell JA, Mihir MK, Sanford JC (1992). Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* 98:1050-1056.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanford JC, Smith FD, Russel JA (1993). Optimizing the biobalistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 217, 483-509.
- Santi L, Giritch A, Roy CJ, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y, Webb R, Arntzen CJ, Mason HS (2006). Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 861–866.
- Schellekens J, Heinz C, Gardner P (2005). *Pertussis* sources of infection and routes of transmission in the vaccination era. *Pediatr. Infect. Dis J.* 24: S19-S24.
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, Dym O, Boldin-Adamsky SA, Silman I, Sussman JL, Futerman AH, Aviezer D (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol. J.* 5: 579–590.
- Shao, HB, He DM, Qian KX, Shen GF, Su ZL (2008). The expression of classical swine fever virus structural protein E2 gene in tobacco chloroplasts for applying chloroplasts as bioreactors. *C. R. Biol.* 331: 179–184.
- Soria-Guerra RE, Alpuche-Solís AG, Rosales-Mendoza S, Moreno-Fierros L, Bendik EM, Martínez-González L, Korban SS (2009). Expression of a multi-epitope DPT fusion protein in transplastomic tobacco plants retains both antigenicity and immunogenicity of all three components of the functional oligomer. *Planta.* 229(6):1293-302.
- Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Márquez-Mercado C, López-Revilla R, Castillo-Collazo R, 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(7):961.

- Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P (1998). Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*. 16(20): 1907-1916.
- Stibitz S, Yang M-S (1997). Genomic fluidity of *Bordetella pertussis* assessed by a new method for chromosomal mapping. *J Bacteriol*. 179:5820–5826.
- Storsaeter J, Hallander H O, Gustafsson L, Olin P (2003). Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*. 21(25-26): 3542-3549.
- Streatfield SJ, Howard JA (2003a). Plant-based vaccines. *Int. J. Parasitol*. 33:479–93.
- Streatfield SJ, Howard JA (2003b). Plant production systems for vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. 2:763–75.
- Svab Z, Maliga P (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90 (3): 913-917.
- Sytnik E, Komarnytsky, Gleba Y, Kuchuk N (2005). Transfer of transformed chloroplast from *Nicotina tabacum* to the *Lycium barbarum* plants. *Cell Biology International*. 29:71-75.
- Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S (1982). Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry*. 21:5516–5522.
- Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N, Goodwin P, Arntzen CJ, Mason HS (2005). Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 102: 3378–3382.
- Thanavala Y, Huang Z, Mason HS (2006). Plant-derived vaccines: a look back at the highlights and a view to the challenges on the road ahead. *Expert Rev. Vaccines*. 5(2): 249-260.
- Thomas MGK, Ashworth LAE, Miller E, Lambert HP (1989). Serum IgG, IgA and IgM responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and

- agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and immunization with whole-cell pertussis vaccine. *J Infect Dis.* 159:838–845
- Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S (1982). Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry.* 21:5516–5522.
- Tanaka M., Vitek C. R., Pascual F. B., Bisgard K. M., Tate J. E., Murphy T. V. (2003). Trends in pertussis among infants in the United States, 1980–1999. *JAMA* 290(22):2968–75.
- Tiwari S(2008). Genetic transformation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and studies on the expression of promoters and a δ -endotoxin coding insecticidal gene. Ph.D. Thesis, University of Lucknow, India.
- Tomé SP, Torres ALP, Romero QG, Guiscafré GH (2008). *Bordetella pertussis* in adolescents students in Mexico City. *Rev. Saúde Pública.* 42(4): 679-683.
- “Tosferina brote: Alerta epidemiológica”, en: <http://elbiruniblogspotcom.blogspot.com/2009/03/tosferinaen-nuevo-leon-mexico.html>. 30 de marzo de 2009.
- Tregoning JS, Clare S, Bowe F, Edwards L, Fairweather N, Qazi O, Nixon PJ, Maliga P, Dougan G, Hussell T (2005). Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine. *Eur. J. Immunol.* 35, 1320–1326.
- Ulloa GR, Ávila AML (2008). *Pertussis* in Latin America: Current situation and future vaccination challenges. *Expert Rev. Vaccines.* 7: 1569-1580.
- UM Médico. “Alertan en Sonora sobre brote de tosferina en estados fronterizos”, en <http://www.ansa.it/ansalatina/notizie/notiziari/mexico/20090330210134851997.html>. 30 de marzo de 2009.
- van Rie A Hethcote HW (2004). Adolescent and adult *pertussis* vaccination: Computer simulations of five new strategies. *Vaccine.* 3154-3165
- von Konig CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N. (2002). Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis.* 2(12):744–50.

- Wang ML, Goldstein C, Su W, Moore PH, Albert HH (2005). Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. *Transgenic Res.* 14, 167–178.
- Wang X, Brandsma M, Tremblay R, Maxwell D, Jevnikar AM, Huner N, Ma S (2008). A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnol.* 8: 87.
- Willems RJL, Geuijen C, van der Heide HGJ, Renauld G., Bertin P, van der Akker WMR, Locht C, Mooi FR (1994). Mutational analysis of the *Bordetella pertussis fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol. Microbiol.* 11:337–347.
- Weiss AA, Johnson FD, Burns DL (1993). Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2970–2974.
- Wilson DR, Siebers A, Finlay BB (1998). Antigenic analysis of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with phage display libraries and rabbit anti-filamentous hemagglutinin polyclonal antibodies. *Infect. Immun.* 66:4884–4894.
- WHO (2006). Challenges in global immunization and the global immunization vision and strategy 2006-2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 81: 190.
- WHO/WER (2005) (<http://www.who.int/>).
- WHO (2010) (<http://www.who.int/>).
- WHO (2002) (<http://www.who.int/emc>).
- www.care.org/campaigns/childrenpower/facts.asp
- Yu J, Langridge WH (2001). A plant based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol.* 19:548–52
- Yusibov V, Rabindran S (2008). Recent progress in the development of plant derived vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 7, 1173–1183.
- Zambryski P (1988). Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu. Rev. Genet.* 22: 1-30.

- Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS (2006). Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol. J.* 4: 419–432.
- Zhao Z, Xuea Y, Tanga X, Wu B, Cheng X, Hea Q, Zhangb C, Guoa A, Jin M, Chen H (2008). Immunogenicity of recombinant protective antigen and efficacy against intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica*. *Vaccine.* 27(18): 2523-2528.
- Zheng GG, Yang YH, Rao Q, Lin YM, Zhang B, Wu KF (2006). Expression of bioactive human M-CSF soluble receptor in transgenic tobacco plants. *Protein Expr. Purif.* 46: 367–373.
- Zhou YX, Lee MY, Ng JM, Chye ML, Yip WK, Zee SY, Lam E (2006). A truncated hepatitis E virus ORF2 protein expressed in tobacco plastids is immunogenic in mice. *World J. Gastroenterol.* 12: 306–312.