



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Expresión en tomate de un polipéptido
antigénico con epítopos de 3 exotoxinas
bacterianas (DPT) codificado por un gen sintético**

Tesis que presenta

Ruth Elena Soria Guerra

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Co-Directores de Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dr. Rubén López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., Enero del 2007



Constancia de aprobación de la tesis

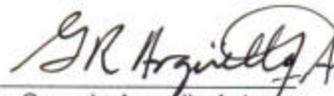
La tesis “**Expresión en tomate de un polipéptido antigénico con epítomos de 3 exotoxinas bacterianas (DPT) codificado por un gen sintético**” presentada para obtener el Grado de de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ruth Elena Soria Guerra** y aprobada el **29 de Enero de 2007** 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. Angel G. Alpuche Solís
(Director de la tesis)



Dr. Rubén López Revilla
(Codirector de la tesis)



Dr. Gerardo Argüello Astorga
(Asesor de la tesis)



Dra. Leticia Moreno Fierros
(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. y en el laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, bajo la co-dirección de los Drs. Ángel G. Alpuche Solís y Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 171307) y el apoyo del proyecto CONACYT 37048.



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

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 13:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dra. Leticia Moreno Fierros	Sinodal externo	UNAM
Dr. Rubén López Revilla	Sinodal	IPICYT

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ruth Elena Soria Guerra

sobre la Tesis intitulada:

Expresión en Tomate de un Polipéptido Antigénico con Epítopos de 3 Exotoxinas Bacterianas (DPT) Codificado por un Gen Sintético

que se desarrolló bajo la dirección de:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dr. Rubén López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes enero de 2007.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Dr. Marcial Bonilla M...
Secretario Académico



Dedicatoria

A Dios por darme la oportunidad de estar aquí y permitirme llegar a donde estoy.

A mi familia por todo el apoyo que siempre me han dado en cada una de las metas fijadas, por estar siempre conmigo, escucharme y darme ánimos.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Dr. Ángel Alpuche Solís por su guía, enseñanzas, tiempo, paciencia y apoyo durante este tiempo. Por su amistad y confianza hacia mí para la realización de este proyecto, por sus consejos, por contribuir a formar en mí lo que soy, pero sobre todo por ser una excelente persona y hacerme participe de sus conocimientos: gracias maestro y amigo.

Al Dr. Gerardo Arguello Astorga y al Dr. Rubén López Revilla, por aceptar fungir como mis sinodales, por todos sus consejos y aportaciones para mejorar mi trabajo.

A Sergio Rosales por darme un gran ejemplo a seguir, por hacer amenos todos los días de trabajo y por impulsarme siempre a ser mejor persona.

A mis amigas Marcela, Silvia y Coco por ayudarme, aconsejarme y apoyarme durante la realización de este proyecto, por su comprensión, amistad y confianza en todo momento.

A los compañeros, técnicos y demás personal del laboratorio 1 de “Biología Molecular de Plantas” por su ayuda brindada durante la realización del presente trabajo y por estar siempre dispuestos a apoyarme en todo lo posible.

A todos mis amigos sinceros que han pasado por cada una de las páginas escritas de mi vida, por orientarme y compartir conmigo esos momentos, gracias por encontrarse o haber estado en mi vida y por dejarme estar o haber estado en cada una de sus historias.

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

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

ÍNDICE

Carátula	i
Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Lista de figuras	xii
Lista de tablas	xiv
I. RESUMEN	xv
I. ABSTRACT	xvii
II. INTRODUCCIÓN	1
2.1. VACUNAS	1
2.2. DIFTERIA	2
2.2.1. Definición	2
2.2.2. Causas, incidencia y factores de riesgo	3
2.2.3. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	3
2.2.4. Estructura antigénica	4
2.2.5. Epidemiología	5
2.3. TOS FERINA	6
2.3.1. Definición	6
2.3.2. Causas, incidencia y factores de riesgo	6
2.3.3. <i>Bordetella pertussis</i>	7
2.3.4. Estructura antigénica	7
2.3.5. Epidemiología	8
2.4. TÉTANOS	10
2.4.1. Definición	10
2.4.2. Causas, incidencia y factores de riesgo	10

2.4.3. <i>Clostridium tetani</i>	11
2.2.4. Estructura antigénica	11
2.2.5. Epidemiología	12
2.5. VACUNA TRIPLE DPT	13
2.6. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN	16
2.6.1. Vacunas recombinantes por subunidades	16
2.6.2. Vacunas basadas en vectores recombinantes	17
2.7. ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA MEJORARA LA VACUNA TRIPLE DPT	17
2.8. EL SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS	18
2.9. PLANTAS TRANSGÉNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE NUEVAS VACUNAS	21
2.9.1. Sistema de expresión de proteínas recombinantes en plantas	23
2.9.2. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.9.3. Estrategias utilizadas para optimizar la producción de proteínas recombinantes en plantas	26
2.9.4. Estudios de respuesta inmune en animales alimentados con plantas transgénicas	28
2.10. <i>Lycopersicon esculentum</i>	32
III. OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVO GENERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
IV. HIPÓTESIS	36
V. MATERIALES Y EQUIPO	37
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	37
5.2. VECTORES UTILIZADOS	37
5.3. REACTIVOS Y SUPLEMENTOS	38
5.4. EQUIPO	41
VI. MÉTODOS	43
6.1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pB1DPT	43

6.1.1. Reacción de ligación	43
6.1.2. Preparación de medios de cultivo para bacterias	43
6.1.3. Preparación de <i>E. coli</i> calcio competente	43
6.1.4. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico	44
6.1.5. Extracción de ADN plasmídico: Método de lisis alcalina	44
6.1.6. Digestión para caracterización de clonas positivas	45
6.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
6.2.1. Preparación de células electrocompetentes	45
6.2.2. Electroporación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
6.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PLANTAS DE TOMATE	46
6.3.1. Preparación de vitaminas MS	48
6.3.2. Preparación de antibióticos y reguladores de crecimiento	49
6.4. TRANSFORMACIÓN NUCLEAR MEDIANTE <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
6.4.1. Esterilización y germinación de semillas	50
6.4.2. Transformación nuclear de tomate	50
6.5. EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS	51
6.6. REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN EN CADENA (PCR)	52
6.7. SOUTHERN BLOT	54
6.7.1. Tratamiento del ADN	54
6.7.2. Tratamiento del gel	54
6.7.3. Tratamiento de la membrana de nylon	54
6.7.4. Transferencia a membrana	55
6.7.5. Tratamiento de la membrana después de la transferencia	55
6.7.6. Marcaje de la sonda	55
6.7.7. Hibridación	56
6.7.8. Detección inmunológica por luminiscencia	56
6.8. EXTRACCIÓN DE ARN	57
6.9. ANÁLISIS POR RT-PCR	57

6.9.1. Síntesis de ADNc	57
6.9.2. PCR con ADNc para β -actina	58
6.10. ANÁLISIS INMUNOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	60
6.10.1. Extracción de proteína total soluble de tejido vegetal	60
6.10.2. ELISA	60
6.11. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	60
6.11.1. Esquema de inmunización	61
6.11.2. Obtención de muestras	61
6.11.3. Evaluación de anticuerpos IgA, IgG e isotipos	63
6.11.4. Análisis estadístico	63
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
7.1. DISEÑO DEL GEN SINTÉTICO DPT	65
7.2. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PB1DPT	68
7.3. ELECTROPORACIÓN DEL PLÁSMIDO pBI-DPT EN <i>A. tumefaciens</i>	69
7.4. TRANSFORMACIÓN DEL TOMATE	70
7.5. ANÁLISIS POR PCR	71
7.6. ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT	72
7.7. ANÁLISIS POR RT-PCR	73
7.8. ANÁLISIS POR ELISA	74
7.9. ANÁLISIS DE LA ANTIGENICIDAD DE LA PROTEÍNA DPT	79
7.9.1. Evaluación de anticuerpos anti-DPT en suero	81
7.9.2. Evaluación de anticuerpos traqueopulmonares anti-DPT	82
7.9.3. Evaluación de anticuerpos intestinales anti-DPT	83
7.9.4. Evaluación de sero anticuerpos anti-DPT (IgG1, IgG2a)	84
VIII. CONCLUSIONES	89
IX. PERSPECTIVAS	90
X. BIBLIOGRAFÍA	91
XI. APÉNDICE	105
11.1. Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing	

epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene	105
11.2. Expression of <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in carrot (<i>Daucus carota</i> L.)	107
11.3. Immunogenicity of a polypeptide encoded by a synthetic gene containing <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> and <i>Clostridium tetani</i> exotoxin antigen sequences expressed in tomato plants	108
11.4. Expresión del gen sintético DPT en cloroplastos de tabaco y lechuga	110
11.5. Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics	113
11.6 Detección de sepsis neonatal por PCR	115
11.7 Aislamiento de un cDNA que codifica para una expansina de guayaba	117

Lista de Figuras

Fig.		Pág.
1	Reporte anual global de incidencia de difteria y cobertura de vacunación (vacuna triple DPT) en el periodo 1980-2002	5
2	Reporte anual global de incidencia de tos ferina y cobertura de vacunación (vacuna triple DPT) en el periodo 1980-2002	9
3	Reporte anual global de incidencia de tétanos y cobertura de vacunación (vacuna triple DPT) en el periodo 1980-2002	13
4	Estimado de muertes anuales por enfermedades que son prevenibles por vacunación	14
5	Cobertura de inmunización global con tres dosis de la vacuna triple DPT en el año 2002	15
6	Respuesta del sistema inmune de mucosas ante un agente infeccioso.	20
7	Transformación de células vegetales mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
8	Secuencia del gen sintético DPT optimizado para su expresión en tomate	67
9	Vector binario pBI-DPT usado para la transformación de tomate	68
10	Análisis de restricción de clonas positivas para la construcción pBI-DPT en células de <i>E. coli</i> TOP10	69
11	Productos de amplificación por PCR de clonas positivas de la construcción pBI-DPT en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	70
12	Representación esquemática de la transformación de plantas vía <i>Agrobacterium</i> y regeneración de plantas de tomate	71
13	Análisis por PCR de plantas de tomate transformadas con la construcción pBI-DPT vía <i>Agrobacterium</i>	72
14	Análisis por Southern blot para determinar la integración del gen DPT en plantas de tomate	73
15	Análisis por RT-PCR de plantas de tomate transformadas con el gen	

DPT	74
16 Curva estándar para la cuantificación del toxoide diftérico, tetánico y pertúsico	75
17 Análisis por ELISA para la detección de epítopes DPT en hojas de tomate	76
18 Análisis por ELISA para la detección de epítopes DPT en frutos de tomate	77
19 Respuesta anti-DPT en suero (IgG)	82
20 Respuesta anti-DPT en líquido traqueopulmonar	83
21 Respuesta anti-DPT en fluídos intestinales	84
22 Respuesta anti-DPT en suero, IgG1/ IgG2a	86

Lista de Tablas

Tabla		Pág.
1	Reportes de plantas transgénicas productoras de antígenos en el desarrollo de vacunas comestibles para humanos	29
2	Mezcla basal de sales MS	47
3	Medios para cultivo <i>in vitro</i> de para tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	48
4	Composición de las vitaminas MS	49
5	Componentes de la mezcla maestra usada para la amplificación mediante PCR	53
6	Protocolo de amplificación por PCR	53
7	Componentes de la mezcla maestra usada para la síntesis de cDNA	57
8	Protocolo de síntesis de cDNA	58
9	Condiciones para la amplificación de β -actina mediante PCR	58
10	Protocolo de amplificación para β -actina mediante PCR	59
11	Epítomos seleccionados para diseñar el gen DPT.	66

I. RESUMEN

Una prioridad actual en el campo de vacunas es el desarrollo de vacunas de subunidades y multicomponentes que no produzcan reacciones adversas y protejan contra varios patógenos. Los problemas de salud causados por las exotoxinas de *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* y *Clostridium tetani* van desde síntomas leves hasta la muerte. El presente trabajo se enfoca al desarrollo de una vacuna comestible contra la difteria, tos ferina y tétanos en plantas. Se transformó genéticamente a plantas de tomate por medio de *Agrobacterium tumefaciens* portador de un gen sintético optimizado para plantas el cual codifica para un polipéptido novedoso que contiene dos adyuvantes y seis epítomos inmunoprotectores de las toxinas DPT, unidos por péptidos conectores. Se verificó la integración del gen sintético DPT (sDPT) por PCR en las plantas transgénicas de tomate y se confirmó por Southern blot observándose de 1-2 copias del gen en diversas líneas. Así mismo se detectó un transcrito específico del tamaño esperado (570 pb) por RT-PCR. El polipéptido codificado por el gen sDPT fue detectado por inmunoensayos *in vitro* con anticuerpos específicos, con valores equivalentes a 1.9-5.8 µg/g de toxoide diftérico, 0.0003-0.15 µg/g de toxoide pertúsico y 4.5-16.8 µg/g de toxoide tetánico en hojas de tomates transgénicos. Además, se observó que la proteína recombinante expresada en las plantas de tomate fue capaz de inducir anticuerpos específicos en animales. Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía oral con el tejido vegetal en tres dosis semanales. En el suero analizado se encontró respuesta del tipo IgG a las exotoxinas diftérica, pertúsica y tetánica inducida por el polipéptido sintético. En el fluido traqueopulmonar se observó una modesta respuesta del tipo IgG. Una respuesta alta del tipo IgA hacia el epítome tetánico fue evidente en los lavados intestinales. Los niveles de respuesta en estos grupos fueron más altos que en el grupo de ratones alimentado con tomate no transformado. Estos resultados sugieren que la proteína recombinante DPT expresada en plantas de tomate puede inducir anticuerpos específicos *in vivo* y faltaría retar con las toxinas a ratones preinmunizados con tomates que contienen el gen sDPT para ver si

existe protección. Este es el primer reporte de la expresión de un polipéptido codificado por un gen no presente en la naturaleza, con secuencias antigénicas de las exotoxinas diftérica, pertúsica y tetánica, en un sistema vegetal y podría ser utilizado como una vacuna comestible práctica contra la difteria, tos ferina y tétanos. Este trabajo prueba además, que es posible diseñar genes que codifiquen multiepítomos que induzcan inmunidad protectora en ratones.

ABSTRACT

A current priority of vaccinology is the development of subunit and multicomponent vaccines which protect and avoid secondary effects. The health problems caused by the exotoxins of *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* and *Clostridium tetani* range from light symptoms to death. We have attempted to develop an edible vaccine against diphtheria, pertussis and tetanus in plants. By means of *Agrobacterium* mediated transformation we generated transgenic tomatoes with a plant-optimized synthetic gene encoding a novel polypeptide containing two adjuvant and six DPT immunoprotective exotoxin epitopes joined by peptide linkers. We detected the integration of the synthetic DPT (sDPT) gene by PCR in transformed tomato plants and confirmed it by Southern blot observing 1-2 copies of the gene in diverse plants. A specific transcript of the expected molecular size (570 bp) was detected by RT-PCR. In addition we detected a polypeptide encoded by the sDPT gene by immunoassay *in vitro*, with specific antibodies with average values of 1.9-5.8 µg/g of diphtheria toxoid, 0.0003-0.15 µg/g of pertussis toxoid and 4.5-16.8 µg/g of tetanus toxoid in leaves of transgenic tomatoes. We also assayed if the recombinant protein expressed in tomato plants could induce specific antibodies in animals. Balb/c mice were immunized by the route with the plant material in three weekly doses. Sera tested for IgG antibody to pertussis, tetanus and diphtheria toxin showed responses to the synthetic polypeptide. In the tracheopulmonary fluid a modest IgG response was observed. High IgA response against tetanus toxin was evident in gut washes. The levels of response in these groups were higher than those of mice that had been fed with wild-type tomatoes. Our results suggest that the recombinant DPT protein expressed in tomato plants induces specific antibodies *in vivo*. Challenge with toxins in mice previously immunized with the tomatoes containing sDPT would be needed to test for protection. This is the first report of the expression of a polypeptide encoded by a gene, which does not exist in nature, containing diphtheria, pertussis and tetanus exotoxin antigen sequences in plants, and may be used as a practical edible vaccine against diphtheria, pertussis and tetanus. Our work also demonstrates that

it is possible to design genes encoding multiepitopes polipeptides that induce protective immunity in mice.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. VACUNAS

Las vacunas son la acción preventiva más importante descubierta por la medicina. Una vacuna es una suspensión de microorganismos muertos, debilitados o de fragmentos de los mismos, que al introducirla en el organismo, desencadena la producción de anticuerpos contra el agente infeccioso (Langridge, 2000). Es una forma artificial de estimular al sistema inmune para que fabrique defensas contra estos agentes y de activar la memoria inmune. La memoria inmune permite al cuerpo reaccionar rápida y eficientemente a la exposición futura a un antígeno antes de que pueda causar daño (Gerathy, 1984; Van Ginkel y col., 2000).

Las dos grandes propiedades que deben reunir las vacunas son la eficacia y la inocuidad. La eficacia depende de que la vacuna contenga los antígenos responsables del poder inmunógeno, es decir, aquellos que inducen una buena respuesta inmune. Un antígeno es una molécula que puede inducir la formación de anticuerpos debido a que el sistema inmune la reconoce como una amenaza. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas y los polisacáridos (Mayer y col., 2000). Las bacterias y los virus están compuestos por numerosos antígenos que pueden ser constitutivos o estructurales, contenidos en determinadas estructuras de la bacteria o secretados, de los cuales sólo algunos pueden considerarse inmunizantes (Mayer y col., 2000; Gardner y Peter, 2001).

La inocuidad es un aspecto que debe garantizarse en una vacuna y supone que la vacuna está desprovista de poder patógeno, y este objetivo ha de lograrse sin modificar los antígenos responsables de la inmunización. Las vacunas tradicionales se clasifican en dos grandes grupos: vacunas vivas o atenuadas y muertas o inactivadas. Estas últimas pueden dividirse, a su vez, en vacunas con bacterias o virus totales y vacunas con antígenos purificados (Gardner y Peter, 2001).

En las vacunas vivas el principal problema que se plantea es el de su inocuidad, es decir, que la vacuna no produzca enfermedad en los pacientes. Esto se consigue mediante la selección de mutantes atenuados que sean estables. Durante mucho tiempo se han obtenido éstas por medios empíricos (mediante la conservación de cepas debilitadas por pases sucesivos en huéspedes o nuevos medios). En la actualidad estas cepas atenuadas pueden originarse en un laboratorio mediante técnicas de ingeniería genética, que hace posible la inactivación de genes implicados en la virulencia de la infección (Campins y Moraga, 2001).

Las vacunas muertas o inactivadas se preparan inactivando suspensiones bacterianas o de virus virulentos por métodos físicos o químicos. Las vacunas con bacterias o virus totales se emplean cuando no han sido aislados los componentes antigénicos de un determinado patógeno; mientras que las de antígenos purificados son aquellas que se somete a un tratamiento adicional para aislar únicamente aquellos componentes que se incluirán en la vacuna como puede ser elementos antigénicos de origen no protéico, como polisacáridos, lipopolisacáridos o extractos ribosómicos (Campins y Moraga, 2001).

2.2. DIFTERIA

2.2.1. Definición

Enfermedad aguda muy infecciosa que afecta principalmente a la infancia, caracterizada por la formación de falsas membranas en las vías del tracto respiratorio superior. El agente causal de la enfermedad, descubierto en 1883, es el bacilo *Corynebacterium diphtheriae* (Simonsen y col., 1986; Mortimer y col., 1986). El bacilo diftérico penetra en el organismo a través de la boca o de la nariz y afecta a las membranas mucosas, donde se multiplica y produce una toxina muy potente.

2.2.2. Causas, incidencia y factores de riesgo

La difteria es una enfermedad infecto-contagiosa re-emergente en gran parte del mundo. Fue causante de gigantescos brotes epidémicos y considerada dentro de las primeras causas de notificación por morbilidad infecciosa hasta mediados del presente siglo. El único huésped natural es el hombre. En forma artificial, algunos animales de experimentación pueden ser afectados por este microorganismo, se transmite por emanaciones respiratorias de personas infectadas o portadores asintomáticos (Simonsen y col., 1986). El período de incubación es de 1 a 4 días. En principio, la bacteria infecta nariz y garganta, aunque podría también infectar la piel y producir lesiones. *C. diphtheriae* produce una toxina que causa daño al tejido (necrosis) en el área adyacente a la infección, por lo general nariz y garganta. Cinco días después de la exposición a la bacteria, se forma un exudado blancogrisáceo que afecta las superficies de la nariz y de la garganta. Este exudado aumenta de tamaño y espesor convirtiéndose en una falsa membrana grisácea que puede llegar a obstruir el conducto respiratorio. A veces es necesaria la cirugía para evitar la asfixia (Mortimer y col., 1986).

La enfermedad puede ser leve e irreconocible, o puede tornarse progresiva. Si la toxina entra al torrente sanguíneo, el paciente puede presentar inflamación del músculo cardíaco (miocarditis) que es la complicación más conocida y preocupante. Los efectos tóxicos en el sistema nervioso pueden causar parálisis temporal. Los factores de riesgo son, entre otros: hacinamiento, higiene deficiente y falta de inmunización (Miler y Rush, 1994).

2.2.3. *Corynebacterium diphtheriae*

Es un bacilo grampositivo, no encapsulado, no esporulado, pleomórfico e inmóvil, que crece en condiciones ambientales de calor seco. El bacilo (de 0.5 a 1 μm de diámetro por algunos μm de largo) presenta dilataciones irregulares características en uno de sus polos lo que le confiere un aspecto de maza, clava o letras chinas. Puede permanecer en fragmentos secos de pseudomembranas hasta tres meses. Pertenece al grupo de las corinebacterias cuyo nombre, de raíz griega, significa

piel de cuero, en remembranza de la membrana que aparece en las zonas afectadas por dicha enfermedad y que le da un sello característico. Es sensible al calor y a los desinfectantes habituales (Harcus y col., 1989; Frankel y col., 1999). Su patogenicidad viene derivada fundamentalmente de la elaboración de una exotoxina, responsable del cuadro clínico. La exotoxina inhibe la síntesis protéica ocasionando la destrucción celular (Harcus y col., 1989).

2.2.4. Estructura antigénica

La contención en su interior de un fago β -lisogénico que codifica el gen *tox* (productor de la exotoxina), diferencia al bacilo en cepas toxigénicas y no toxigénicas. Las cepas no toxigénicas rara vez producen lesiones locales. La toxina es una proteína termolábil de alto peso molecular, cuya dosis letal es de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso y consta de dos porciones: A y B, existe también un precursor de la toxina diftérica que presenta actividad de ADP ribosil transferasa, que es sintetizado como una pro enzima que, después de la activación, cataliza la unión covalente de la ADP ribosa del NAD al factor de elongación 2 que tiene actividad catalítica. La subunidad B es la responsable de la adhesión a los receptores de membrana citoplasmática y es necesario para el movimiento del fragmento A a la célula, de tal modo que la subunidad A es la responsable de causar el daño mediante el bloqueo de la síntesis enzimática que lleva a la muerte celular. La toxina producida por los bacilos es absorbida del interior de la lesión local y se distribuye vía sanguínea a otros órganos (Kjeldsen y col., 1985; Rappuoli y col., 1993).

Posee, además de la toxina, un antígeno somático (O) y un antígeno proteico y termolábil (K) localizado en la superficie, que desempeña un importante papel en la inmunidad antibacteriana (aporta a la bacteria propiedades antifagocitarias), y es lo que permite diferenciar a *C. diphtheriae* en serotipos (Mortimer y col., 1986; Boucher y col., 1994).

Existen trabajos en los cuales se ha demostrado que ciertas regiones de la toxina diftérica (DT) son capaces de inducir anticuerpos protectores. Estas

incluyen las regiones correspondientes a los aminoácidos 383 a 535 de la porción A de DT y el lazo conector de los fragmentos A y B (aminoácidos 188 a 201) (Audibert y col., 1981; Hayakawa y col., 1983; Yoshimori y col., 1984; Zucker y Murphy, 1984; Bigio y col., 1987; Rolf y Eidels, 1993).

2.2.5. Epidemiología

La difteria es una de las seis enfermedades inmunoprevenibles controladas a nivel mundial por el Programa Ampliado de Inmunizaciones, cuyos frutos comenzaron a apreciarse a mediados del presente siglo, en la medida que los programas fueron siendo sistemáticos, las coberturas se acercaron al 100%. Antes del descubrimiento de la antitoxina diftérica en 1894 por el bacteriólogo francés Pierre Roux y el médico alemán Emil von Behring, la tasa de mortalidad de la difteria alcanzaba un promedio del 35% y en los casos de afectación diftérica de la laringe, era tan elevada que alcanzaba un 90% (WHO, 2002). El uso generalizado de la antitoxina en el tratamiento se tradujo en una violenta caída en las tasas de incidencia y letalidad, logrando ser controlada e incluso eliminada por décadas en grandes áreas geográficas del planeta (Fig. 1).

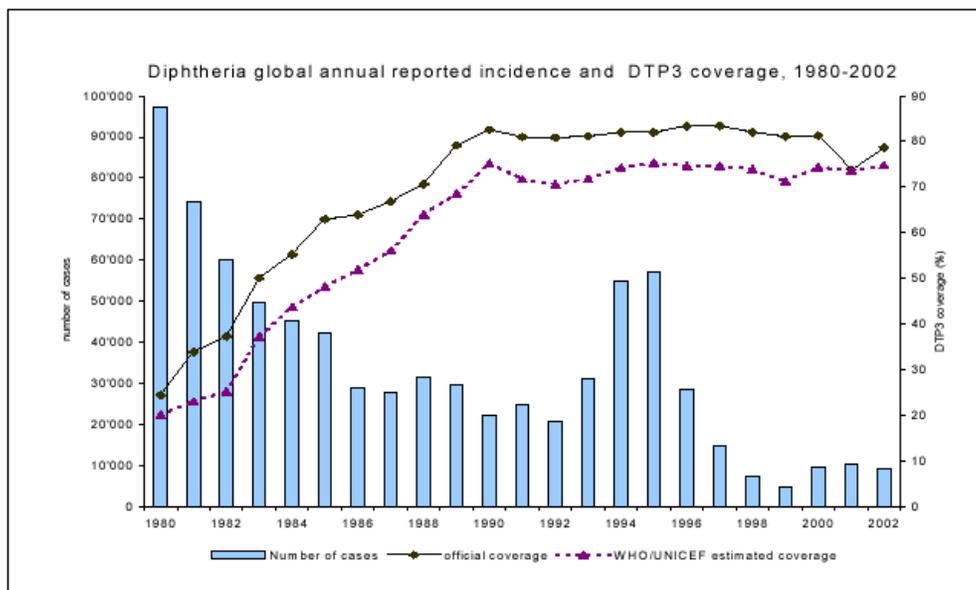


Fig. 1. Reporte anual global de incidencia de difteria y cobertura de vacunación (vacuna triple DPT) en el periodo 1980-2002 (WHO, 2002).

Hoy, sin embargo, la difteria es considerada una enfermedad reemergente y se ha vuelto a considerar un problema para la salud pública, aunque su perfil ha cambiado, desplazándose a edades mayores y con prevalencia de cepas menos toxigénicas. Constituye una amenaza mundial, dado el inmenso volumen de personas susceptibles existentes en todos los continentes y una no despreciable letalidad (5 a 10%) a pesar de tener un tratamiento oportuno, según datos de la WHO anualmente se registran 1000 muertes atribuidas a este padecimiento (WHO, 2002).

2.3. TOS FERINA

2.3.1. Definición

La pertussis, tos ferina o coqueluche, es una enfermedad altamente contagiosa que afecta las vías respiratorias. Es causada por la bacteria *Bordetella pertussis* que se encuentra en la boca, la garganta y la nariz de una persona infectada (Ivanoff y col., 1997).

2.3.2. Causas, incidencia y factores de riesgo

La tos ferina se contagia principalmente a través del contacto directo con secreciones de la nariz y la garganta de personas infectadas. La tos ferina comienza como una infección leve de las vías respiratorias superiores. Inicialmente, los síntomas son similares a los del resfriado común, incluyendo estornudos, moqueo, fiebre baja y tos leve. En el plazo de dos semanas, la tos se vuelve más grave y la caracterizan episodios de tos rápida. Es posible que haya secreción mucosa clara y espesa. Las personas mayores y los niños parcialmente inmunizados generalmente presentan síntomas más leves. El período de incubación es generalmente de 5 a 10 días, aunque puede ser de hasta 21 días (WHO, 2002).

Las complicaciones de la pertussis pueden incluir neumonía, infección del oído medio, pérdida del apetito, deshidratación convulsiones, encefalopatías

(trastornos cerebrales), episodios de apnea (cese breve de la respiración) y muerte (Olin y col, 1997).

2.3.3. *Bordetella pertussis*

Es un cocobacilo (bacilo corto), aerobio, gramnegativo, inmóvil, muy pequeño que aparece solo o en pares. Las bacterias son nutricionalmente exigentes y se cultivan generalmente en medios ricos suplementados con sangre. Pueden ser crecidas incluso en agar sangre y requiere de 3-6 días para formar colonias. Pueden elaborar un gran número de sustancias biológicas relacionadas con la enfermedad que producen, entre ellas componentes de superficie como la hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN) y aglutinógenos; y toxinas como la adenilato ciclasa (ACT), citotoxina traqueal y la toxina pertúsica (PTx) (WHO, 1999; Nascimento y col., 2000).

2.3.4. Estructura antigénica

Los anticuerpos contra los componentes de PTx previenen la colonización de la bacteria a las células epiteliales y proporcionan una protección eficaz contra la infección. La toxina PTx está implicada en adherencia al epitelio traqueal, es una proteína de 105 kDa integrada por seis subunidades: S1, S2, S3, (2) S4, y S5. Algunos componentes de la toxina (S2 y S3) funcionan como adhesinas, y parecen unir las bacterias a las células huésped. S2 y S3 utilizan diversos receptores en las células huésped. S2 se une específicamente a un glicolípido llamado lactosilceramida, que se encuentra sobre todo en las células epiteliales (Runeberg-Nyman y col., 1987).

La subunidad S1 de la toxina pertúsica tiene actividad de ADP ribosil transferasa. Las cinco subunidades restantes (S2 a S5) se unen a carbohidratos específicos en la superficie de la célula. Aunque el mecanismo de acción no está muy claro, hay una cierta evidencia que *B. pertussis* puede comprometer las actividades bactericidas de los fagocitos para persistir en ellos como parásito intracelular, esto permitiría explicar porqué la inmunidad a pertussis correlaciona

mejor con la presencia de las células citotóxicas específicas (células T) que con la presencia de anticuerpos a los productos bacterianos (Olin y col., 1997; Nascimento y col., 2000).

FHA posee la capacidad de aglutinar a los eritrocitos e interviene en la adhesión al epitelio ciliado respiratorio, aunque *B. pertussis* produce otros tipos de adhesinas y pertactinas, su papel en adherencia y patogenia aún no se establece claramente (Nascimento y col., 2000).

Se ha demostrado, además que la subunidad S1 es inmunodominante. Askelof y col., (1990) han clonado y secuenciado toda la subunidad S1 e identificaron dos péptidos (de 15 a 22 aminoácidos de longitud) correspondientes a los aminoácidos 1-17 y 169 a 186 de PT capaces de inducir respuesta inmune protectora (Barbieri y col., 1992)

2.3.5. Epidemiología

La tos ferina sigue siendo un problema importante en todo el mundo, ya que no está aún controlada epidemiológicamente. Si bien es cierto que la mayoría de casos se dan en países en vías desarrollo, en los países industrializados se han originado problemas importantes de control de la enfermedad por el abandono de la vacunación sistemática debido a los frecuentes efectos adversos de la vacuna (Fig. 2) (WHO, 2002).

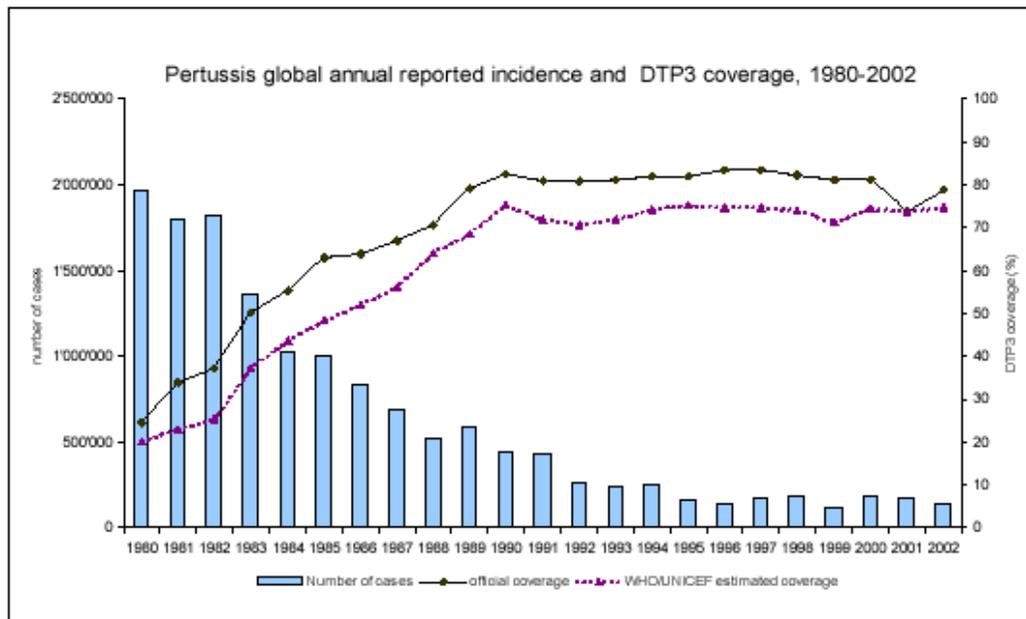


Fig. 2: Reporte anual global de incidencia de tos ferina y cobertura de vacunación (vacuna triple DPT) en el periodo 1980-2002 (WHO, 2002).

Actualmente, con la implantación de las vacunas acelulares, han aumentado de nuevo las tasas de vacunación y ha mejorado mucho el control epidemiológico de esta infección en niños. En los últimos años, sin embargo, se ha incrementado el número de casos en adolescentes y adultos, que son la población no protegida con la vacuna (la última dosis de vacuna contra la tos ferina se administra a los 6 años de edad, y su memoria inmunológica no es muy buena) y ello supone un problema importante al ser un foco de contagio para lactantes menores de 6 meses de edad, que aún no están protegidos porque aún no se le han administrado las tres primeras dosis de vacuna. La WHO reporta 300,000 muertes anuales a causa de tos ferina (WHO, 1999).

2.4. TÉTANOS

2.4.1. Definición

El tétanos es una infección grave producida por toxinas causada por la bacteria anaeróbica *Clostridium tetani*. Esta enfermedad infecciosa aguda se caracteriza por severos espasmos y contracciones musculares. En general se contrae luego de una lastimadura benigna o de heridas contaminadas. El tétanos neonatal se produce cuando se corta el cordón umbilical con un instrumento no esterilizado contaminado con esporas tetánicas (Wassilak y Orentein, 1988).

2.4.2. Causas, incidencia y factores de riesgo

La bacteria del tétanos generalmente se encuentra en el suelo, pero puede estar prácticamente en cualquier sitio. La infección se produce a través de heridas traumáticas, quirúrgicas, heridas puntiformes, úlceras cutáneas, quemaduras, muñón umbilical, contaminadas con esporas de *Clostridium tetani*. Si sus esporas entran en una herida más allá del alcance del oxígeno, germinan y producen una toxina que interfiere con los nervios que controlan los músculos, esta neurotoxina impide la liberación de un neurotransmisor inhibitorio en la médula espinal, conduciendo a la parálisis espástica. Una infección de tétanos es seria, y puede acabar en la muerte si no se ha inmunizado uno previamente. Puede desarrollarse días o incluso semanas después de la herida, dando lugar a una rigidez de los músculos de la mandíbula y de otros músculos, y puede llegar incluso a las convulsiones y a la incapacidad para respirar (WHO, 1986).

Existen varios factores que permiten anticipar la severidad del tétanos: Incidencia en extremos de la vida, presencia de disfunción autonómica, existencia de varias cepas de *Clostridium tetani*, etc. Las complicaciones propias de la enfermedad están caracterizadas por la rigidez músculo-esquelética y las contracturas musculares que pueden causar fracturas de huesos largos y columna vertebral, otra complicación el síndrome de disfunción autonómica cuyas manifestaciones simpáticas cardiovasculares pueden causar paro cardíaco inesperado (Sutter y col., 1990).

2.4.3. *Clostridium tetani*

El microorganismo es un bacilo que tiene forma de un bastoncillo delgado, mide de 2 a 5 μm de longitud y de 0.3 a 0.5 μm de ancho, es anaerobio estricto, crece óptimamente entre 33 y 37°C, grampositivo, móvil, que forma una espora oval incolora y situado en un extremo, dándole una forma similar a una raqueta de tenis; se encuentran en suelo, medio inorgánico, en heces de animales y a veces en las heces del hombre, las esporas pueden vivir durante años en algunos medios y son resistentes a algunos desinfectantes y a 20 minutos de ebullición (Wassilak y Orentein, 1988).

2.4.4. Estructura antigénica

El patógeno elabora dos toxinas: tetanolisina y tetanospasmina. La primera, tetanolisina, es una hemolisina que no participa en el desarrollo de la enfermedad, mientras que la tetanoespasmina es sin duda la más importante (toxina tetánica) y extremadamente tóxica. Tiene carácter neurotrópico (neurotoxina), viaja a lo largo de las fibras nerviosas y es responsable de las manifestaciones patológicas fundamentales de esta enfermedad (Makoff y col., 1989).

La toxina producida se acumula en las terminaciones nerviosas de las fibras motoras. El transporte retrógrado de la toxina ocurre vía intraaxonal y periaxonal desde las terminaciones nerviosas a los cuernos ventrales de la médula espinal o núcleos motores de los nervios craneales. Si la toxina es producida en grandes cantidades, ésta se acumularía en el sistema linfático para invadir los músculos, entrar en el torrente sanguíneo a través del ducto torácico y así diseminarse a través del cuerpo. La toxina puede pasar de la sangre al músculo esquelético, acumulándose en las terminaciones nerviosas de las fibras motoras y llegar a los cuernos ventrales o tomar el sistema linfático y recircular en la sangre. El efecto de la toxina tetánica en la unión neuromuscular es la inhibición presináptica de la acetil-colina liberada, lo cual puede producir parálisis muscular (Wassilak y Orentein, 1988; Boucher y col., 1994).

La toxina es codificada por un plásmido presente en las cepas toxigénicas y es sintetizada como una única cadena polipéptica de peso molecular de 150KDa y por acción de proteasas se divide en dos cadenas una ligera de 50KDa y una pesada de 100KDa. Su cadena pesada (o fragmento C) parece ser la responsable de la unión con la célula a través de receptores celulares, mientras que la cadena ligera ocasiona la inhibición presináptica de la liberación del transmisor, dejando a las neuronas motoras sin inhibición, ocasionando la sintomatología clínica del tétanos (Boucher y col., 1994).

Figueiredo y col., (1995), caracterizaron las propiedades protectoras del fragmento C de la toxina tetánica, identificaron 2 secuencias cortas del fragmento C (correspondientes a los aminoácidos 1 a 92 y 271 a 451) que son capaces de proteger contra la enfermedad.

2.4.5. Epidemiología

El tétanos provoca cada año miles de muertes en todo el mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo. Su forma más frecuente, el neonatal, es responsable de 500 muertes de recién nacidos al año en todo el mundo en las cuales las madres no estaban inmunizadas. En mujeres puede darse por contaminación de la herida post-parto, post-aborto o post-quirúrgico. En los países desarrollados, tanto la morbilidad como la mortalidad han descendido de forma espectacular debido a la introducción de la vacunación y a la mejoría de la salud pública; en la actualidad sólo se ven algunos casos en adultos mayores. Varios estudios muestran que el 100% de los niños nacidos de madres vacunadas durante el embarazo poseen anticuerpos protectores (WHO, 2002) (Fig. 3).

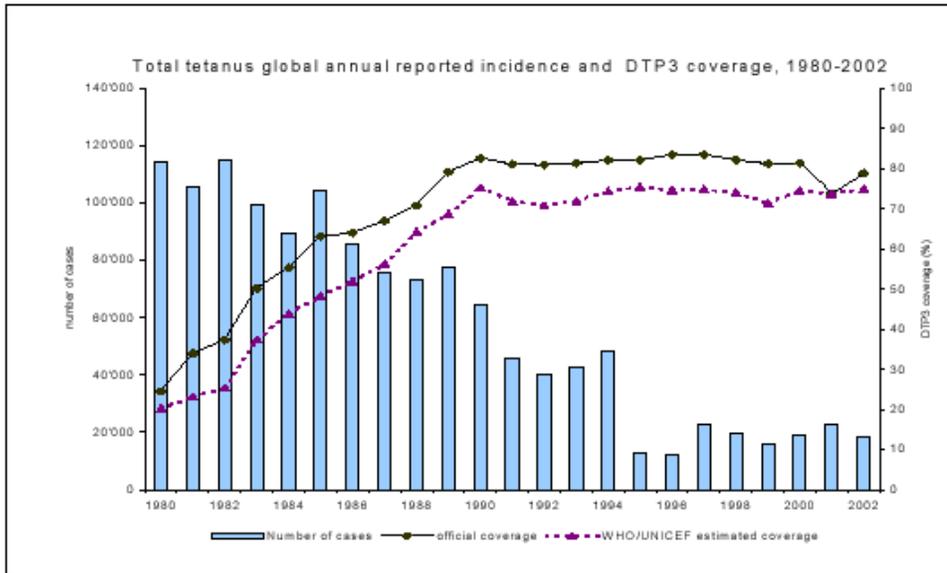


Fig. 3: Reporte anual global de incidencia de tétanos y cobertura de vacunación (vacuna triple DPT) en el periodo 1980-2002 (WHO, 2002).

Al igual que ocurre con la difteria, debe potenciarse la revacunación con dosis de refuerzo cada 10 años en la edad adulta.

2.5. VACUNA TRIPLE DPT

Sin lugar a dudas el desarrollo de vacunas ha sido una de las mayores contribuciones a la medicina, sin embargo, a pesar de que las vacunas son efectivas, son sub empleadas. Según datos de la WHO y la UNICEF anualmente se registran 10, 468,000 muertes en niños menores de 5 años prevenibles por vacunas (WHO, 2002) (Fig. 4).

Diseases	deaths < 5 years of age (000)	deaths total (000)
Diseases for which vaccination is part of most national immunization schedules		
Measles	540	610
Hib	386	386
Pertussis	294	294
Tetanus	198	213
Yellow Fever	15	30
Diphtheria	4	5
Polio	<1	<1
Hepatitis B	<1	600
Diseases for which a licenced vaccine is available		
Japanese encephalitis	5	14
Meningococcal	10	26
Rotavirus	402	449
Pneumococcal	716	1,612
Total deaths from all causes	10,468	57,029

Fig. 4. Estimado de muertes anuales por enfermedades prevenibles por vacunación (WHO, 2002).

El uso de la vacuna triple contra la difteria, tos ferina y tétanos (DPT), desde 1940, disminuyó en forma espectacular la incidencia de estas tres enfermedades. El éxito de la vacunación contra la difteria, tos ferina y tétanos deriva de que los principales factores patogénicos de cada enfermedad, tales como las exotoxinas, al ser químicamente inactivados (toxoides), conservan aún la capacidad de inducir inmunidad protectora (WHO, 1993).

En México, según datos de la OMS, en el 2004 se registraron 72 casos de tos ferina o pertussis, 82 casos de tétanos y no se presentaron casos de difteria. La cobertura de vacunación para el año 2002 en niños menores de un año con esquema completo fue superior a un 90%. Mientras que en algunos países de África las coberturas para el año 2002 en esquema completo fueron inferiores al 50% (Fig. 4).

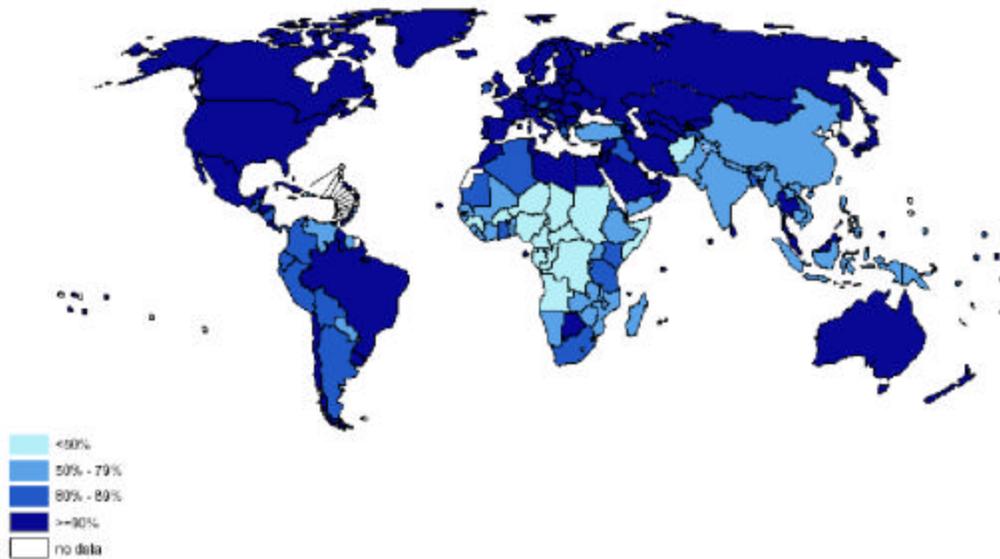


Fig. 5: Cobertura de inmunización global con tres dosis de la vacuna triple DPT en el 2002 (WHO, 2002).

A la vacuna triple DPT se le atribuyen una serie de reacciones adversas que se deben a su fracción antipertussis (tos ferina). La reactogenicidad a estas preparaciones realizadas con células completas ha conducido a resistencia contra las campañas de vacunación, y en algunos países se ha interrumpido la inmunización resultando en nuevos brotes de tos ferina (Hinman y Koplan, 1984; Gerathy, 1984; VDR, 1998).

Actualmente existe una vacuna acelular contra la tosferina (no contiene células completas de *B. pertussis*), junto con los toxoides tetánico y diftérico (DPT acelular). La vacuna DPT acelular se ha aceptado para sustituir a las vacunas DPT convencionales, de células enteras. La ventaja principal de las vacunas acelulares es que las reacciones secundarias (fiebre, dolor local, irritación, etc) son mucho menores que con la vacuna DPT entera. Esta vacuna ha demostrado ser eficiente y menos reactogénica que la vacuna DPT preparada con células completas. Sin embargo, la vacuna acelular aún requiere múltiples dosis para

alcanzar su máxima eficiencia además de que involucra altos costos de producción (Olin y col, 1997).

El desarrollo de una vacuna contra la tos ferina a bajo costo, que inmunice eficientemente con solo una dosis, es particularmente importante para países en desarrollo, donde es difícil acceder a centros de salud y se dificulta completar el esquema de vacunación de los infantes.

2.6. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN

Durante los últimos 10 años la biotecnología ha provisto de nuevas estrategias para el diseño de vacunas. Estos avances están basados en técnicas de aislamiento de genes de origen vírico o bacteriano, cuya expresión produce la aparición de patologías tanto en animales como en humanos. El futuro de la vacunación parece estar enfocado a la protección vía mucosas, pues ésta propicia protección tanto local (en las mucosas) como sistémica. Aunque la vacunación tradicional parenteral ha sido exitosa con algunas enfermedades, es menos efectiva al proporcionar protección contra enfermedades entéricas y respiratorias (Van Ginkel y col., 2000; Rigano y Walmsley, 2005).

Dentro de la nueva generación de vacunas a partir de microorganismos modificados genéticamente se encuentran las vacunas recombinantes de subunidades y las vacunas basadas en vectores recombinantes (Dixon, 1995).

2.6.1. Vacunas recombinantes de subunidades

Consisten de uno o más epítopes antigénicos o proteínas obtenidas a partir de microorganismos modificados genéticamente, en las que la proteína de interés es purificada antes de su administración, de modo que no queda ningún agente infeccioso, y poco o nada de proteína o ADN procedente del vector en la preparación final. Cultivos de células de mamíferos, de levaduras e insectos han sido usados para producir vacunas de subunidades debido a su habilidad para

procesar proteínas recombinantes de una manera similar al organismo nativo (Dixon, 1995; Rigano y Walmsley, 2005).

2.6.2. Vacunas basadas en vectores recombinantes

Consisten en el uso de vectores microbiológicos para el envío de antígenos a las células. Las vacunas de vectores recombinantes que expresan genes foráneos se clasifican en: (a) Vectores virales vivos, (b) Vectores bacterianos vivos ó (c) ADN desnudo (Dixon, 1995).

2.7. ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA MEJORARA LA VACUNA TRIPLE DPT

La biotecnología recombinante ofrece la posibilidad de generar fragmentos de proteínas, los cuales pueden ser estructuralmente organizados como dominios exentos de toxicidad. Varios estudios han sido realizados en esta área. Una fusión modificada genéticamente de los primeros 388 aminoácidos de la toxina diftérica (DT) a la interleucina-3 humana se expresó en *Escherichia coli*, los ensayos biológicos confirmaron la actividad funcional de esa proteína de fusión (Urieto y col, 2004). Otro grupo expresó una proteína de fusión compuesta por el dominio catalítico y el dominio de translocación de DT fusionado al factor estimulador de granulocitos y macrófagos humanos en *E. coli*. Sin embargo, en los ensayos biológicos se encontró una eficiencia limitada y toxicidad en el hígado al administrarse varias dosis (Frankel y col., 1999). DT ha sido fusionada por ingeniería genética usando dominios repetidos de unión de inmunoglobulina (Ig) a la proteína A y expresada en *E. coli*, ensayos *in vivo* han demostrado que la fusión proteica estimula la producción de anticuerpos en conejos, sin embargo, es necesario purificar la proteína por cromatografía de afinidad (Lobeck y col., 1998).

Hay también algunos reportes cuyo objetivo fue clonar y expresar la subunidad S1 de la toxina pertúsica. En un inicio, esta aproximación fue confinada principalmente a bacterias gram-negativas, tales como *E. coli* (Barbieri y col, 1992;

Boucher y col, 1994;) y *Salmonella typhimurium* (Walker y col, 1992; Dalla-Pozza y col, 1998). Después aparecieron reportes en bacterias gram-positivas, como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces lividans* (Runeberg-Nyman y col., 1987). En *B. subtilis* se demostró que S1 es inmunogénica en animales, sin embargo no se ha podido demostrar que los anticuerpos que se produjeron fueran protectores (Runeberg-Nyman y col., 1987). En *S. lividans*, S1 recombinante fue degradada por proteasas (Nascimento y col., 2000).

Por otro lado, el fragmento C de la toxina tetánica (TetC) ha sido expresado en *E. coli* (Makoff y col., 1989) y levaduras (Romanos y col., 1991); sin embargo, la expresión de TetC en *E. coli* es limitada por el desfavorable uso de codones que tiene una mayor tendencia en *C. tetani* a secuencias ricas en AT (Makoff y col, 1989). Ya que las proteínas expresadas en *E. coli* pueden contener pirógenos tóxicos, se ha intentado expresar TetC en hospederos no tóxicos tales como *Saccharomyces cerevisiae*, pero ha habido algunos problemas debido a la presencia de varios sitios fortuitos de poliadenilación ocasionando mRNAs truncados, lo cual dificulta su expresión en levaduras (Romanos y col., 1991).

2.8. EL SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS

La superficie mucosa del cuerpo humano incluye las mucosas de la cavidad oral, las vías respiratorias, el tracto genitourinario y el gastrointestinal. Las superficies mucosas son altamente vulnerables a la penetración, colonización e invasión de microorganismos particularmente patógenos. Cuando penetra un agente nocivo se desencadena un proceso a nivel de las mucosas, donde la adherencia bacteriana constituye un paso clave en el desarrollo del proceso patológico; el agente infeccioso permanece en el hospedero, ganando acceso a los nutrientes a través de este mecanismo de adherencia (Mayer, 2000).

La infección de las mucosas producidas por patógenos intracelulares induce a la inmunidad mediada por células, como es la que se pone de manifiesto

en las células T tipo 1 (CD4 +, CD8+) y en los linfocitos citotóxicos (Van Ginkel y col., 2000).

La inducción de respuesta inmune en mucosas empieza con el reconocimiento del antígeno por unas células especializadas llamadas células M. Las células M, localizadas en la superficie de las células del intestino, han sido usadas como estrategia para unir varios antígenos diferentes a un mismo tiempo y así generar vacunas simples que puedan proteger contra enfermedades múltiples simultáneamente, se consideran a las células M como componentes del sistema inmune y su función es la captación y transporte de antígenos (tales como bacterias, virus o parásitos) de la luz intestinal al tejido linfoide de la capa subyacente (Langridge, 2000), donde las células presentadoras de antígeno (CPA) lo procesan y provocan la asistencia de los linfocitos T de ayuda (Walmsley y Arntzen, 2000), los cuales se encargan de reconocer los fragmentos extraños y pueden inducir a los linfocitos B a madurar a células plasmáticas y al migrar a las mucosas secretan inmunoglobulina A (s-IgA). Ante una primera infección se generan también linfocitos T de memoria, los cuales son los encargados en una reinfección de estimular rápidamente la secreción de anticuerpos (Langridge, 2000) (Fig. 6).

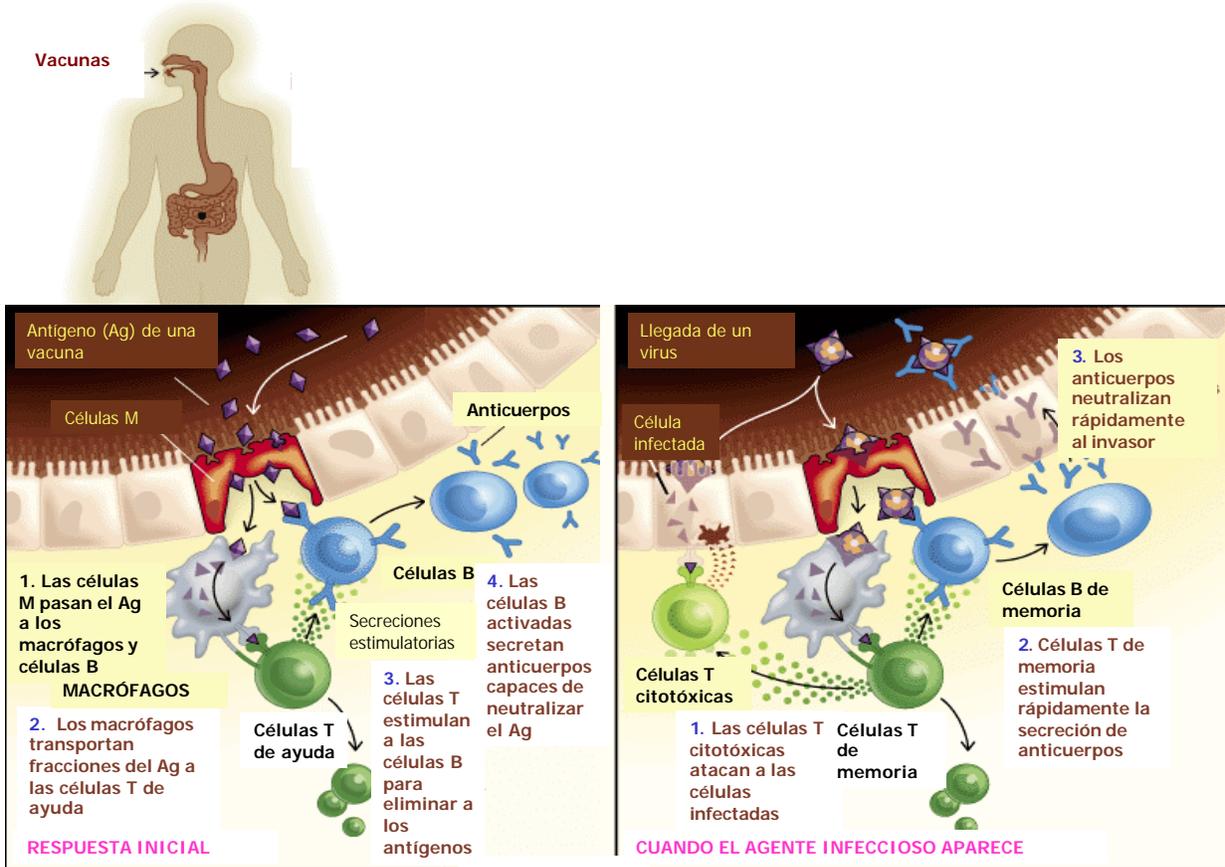


Fig. 6. Respuesta del sistema inmune de mucosas ante un agente infeccioso (Langridge, 2000)

En el organismo la s-IgA constituye más del 80% de todos los anticuerpos producidos por el sistema inmune de mucosas. Además, los anticuerpos de s-IgA no solo están presentes en las secreciones externas, sino también poseen propiedades antimicrobianas a las células epiteliales durante su transporte a través del epitelio. Representan la clase de inmunoglobulina predominante en las secreciones externas, lo que brinda una protección inmunológica específica para todas las superficies mucosas, entre sus funciones están la de inhibir la adherencia bacteriana y la neutralización de enzimas, virus y toxinas. Puede unirse de forma específica a moléculas presentes en la superficie bacteriana mediadora de la unión de esta célula epitelial, y su unión a la bacteria aumenta la afinidad de este complejo a la mucina, lo cual facilita la inmovilización del microorganismo a la capa mucosa con la consiguiente eliminación (Lamm, 1997;

Corthesy y Spertin, 1999). La neutralización de enzimas y toxinas puede ocurrir por bloqueo del sitio de unión de la toxina con un receptor, o por modificación conformacional de este sitio (Hathaway y Kraehenbuhl, 2000).

La IgM también aparece en las secreciones, aunque su concentración es menor que la de IgA. Por su parte, la concentración de IgG en secreciones puede ser igual, o incluso mayor que para la IgM. Pequeñas concentraciones de IgE pueden aparecer en secreciones, fundamentalmente en casos en que reacciones alérgicas afecten la permeabilidad del tejido mucoso (Corthesy y Spertin, 1999).

El estudio del sistema inmune de mucosas ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación que pueden ser capaces de reducir grandemente la morbilidad por infecciones. Una respuesta inmune de mucosas se alcanza mejor al aplicar directamente la vacuna en la superficie de las mucosas ya que esto induce respuesta inmune humoral y mediada por células.

2.9. PLANTAS TRANSGÉNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE NUEVAS VACUNAS

A principios de 1990 el grupo de investigación de Charles J. Arntzen del BTI (Boyce Thompson Institute) abrió una nueva línea de investigación para la obtención de nuevas vacunas a un precio muy reducido. Dicha línea consiste en la manipulación genética de células vegetales y en la obtención de plantas completas a partir de estas células vegetales, conteniendo en estas una concentración adecuada de la proteína antigénica capaz de estimular una respuesta inmune, lo cual haría posible inmunizar a la población, principalmente a los niños que no tienen un acceso fácil a las vacunas. Como resultado se conseguiría salvar la vida de millones de niños que cada año mueren a causa de enfermedades como la diarrea, cólera, difteria, tos ferina, poliomielitis, sarampión, tétanos, tuberculosis, etc. Su idea fue generar dichas vacunas en frutas y vegetales cultivados en países en desarrollo para ser consumidos crudos (Langridge, 2000).

El uso de vegetales transgénicos y frutos para la expresión y desarrollo de proteínas antigénicas como vacunas comestibles ha llegado a ser una alternativa atractiva (Daniell y col., 2001; Rice y col., 2005). Las plantas son una fuente potencial de proteínas antigénicas que no dependen de un proceso tecnológico independiente para asegurar el plegamiento de la proteína y/o ensamblaje de esta. En breve, entre las ventajas de usar plantas para la producción de proteínas antigénicas se incluyen: un ahorro en los costos de producción respecto a los sistemas tradicionales como producción en bacterias, levaduras y células animales ya que se pueden producir grandes volúmenes de biomasa a costos menores con el uso de infraestructura ya existente. Aunado a lo anterior, no se requeriría de una red fría para su conservación, se evitarían problemas de contaminación por el uso de agujas contaminadas. Además, por ser las plantas organismos eucariotes se lograría un plegamiento correcto de la proteína además de modificaciones postraduccionales incluyendo glicosilaciones, S-acilación, N-miristoilación, fosforilación y acetilación, lo cual para ciertas proteínas es de especial importancia para preservar su antigenicidad (Moffat, 1995; Tacket y Mason, 1999; Horn y col., 2003; Gomord y Faye, 2004).

Una ventaja adicional de las vacunas producidas en plantas, a diferencia de las vacunas orales suministradas en suspensiones, es que tienen la característica de ser capaces de proteger a las proteínas antigénicas de la degradación por los cambios de pH en el estómago e intestino (Tacket y Mason, 1999; Rigano y Walmsley, 2005) debido a que hay una protección adicional contra la digestión que brindan las paredes de las células vegetales tales como una bioencapsulación dentro de las paredes de las células de las plantas y en los compartimentos en las membranas, lo que permite el éxito de la inmunización oral (Walmsley y Arntzen, 2000; Molina y col., 2005). Varios trabajos han confirmado el potencial de usar la tecnología de transformación de plantas como un medio para generar vacunas comestibles, logrando inmunizar por vía oral a animales al alimentarse con los tejidos transformados (Haq y col., 1995; Mason y col., 1996; Modelska y col.,

1998; Tacket y col., 1998; Kong y col., 2001; Walmsley y Arntzen, 2003; Jani y col., 2004).

2.9.1. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes en plantas transgénicas

Las vacunas producidas en plantas pueden ser expresadas de forma transitoria o estable. La expresión transitoria puede ser utilizada para verificar la expresión de la construcción y producir pequeñas cantidades del producto para análisis funcionales. Aún así, la expresión transitoria por agroinfiltración en hojas de tabaco puede ser usada para producir grandes cantidades de proteína (mg de anticuerpos recombinantes en días o semanas) (Rigano y Walmsley, 2005). Los virus que infectan plantas también han sido usados para producir proteínas farmacéuticas incluyendo anticuerpos y vacunas de subunidades (Verch y col., 1998; McCormick y col., 1999). La ventaja de estos, al igual que la agroinfiltración es que se puede obtener la proteína recombinante de una manera rápida, pero también hay desventajas, por ejemplo, en la agroinfiltración hay una baja capacidad de escalamiento y con los vectores virales hay preocupaciones en términos de su contención.

Una alternativa a los sistemas de expresión transitorios son las plantas transgénicas y los cultivos de suspensiones de células vegetales. Las suspensiones celulares son útiles cuando están definidas las condiciones de producción y se requieren protocolos de purificación extensivos, estas condiciones son particularmente aplicables a la producción de proteínas terapéuticas (Doran, 2000, Hellwig y col., 2004; Rigano y Walmsley, 2005). Las proteínas recombinantes expresadas en suspensiones celulares pueden ser secretadas al sobrenadante del cultivo o retenidas dentro de las células. Aún así, *Agrobacterium tumefaciens* sigue siendo usada rutinariamente para transformar células vegetales, aunque se ha discutido sobre la posibilidad de que ocurra silenciamiento de genes, la probabilidad es reducida al seleccionar líneas que tengan bajo número de copias del transgen insertadas (Rigano y Walmsley, 2005).

Nicotiana tabacum ha sido usada ampliamente como sistema de expresión modelo para generar plantas transgénicas de manera estable, pero se han usado otras plantas incluyendo *Nicotiana bethamiana* y *Arabidopsis thaliana*, debido a su fácil transformación y regeneración (Giddings y Allison, 2000). Sin embargo, estos cultivares producen altos niveles de alcaloides tóxicos por lo que no se consideran óptimos para la expresión de vacunas comestibles; se han propuesto, varios modelos vegetales, como frutas y verduras que proporcionen tejidos comestibles para estudios inmunogénicos (Tacket y Mason, 1999; Sala y col., 2005), sin embargo se les ha encontrado una serie de ventajas y desventajas que limitan su uso. Por ejemplo las papas se tomaron en cuenta en un principio debido a que no requieren refrigeración, pero generalmente se cocinan para consumirlas, y al estar expuestas al calor se desnaturalizan las proteínas con lo cual se destruye o reduce la actividad del antígeno. En cuanto a los plátanos, éstos no necesitan cocinarse pero su desventaja es que se requieren de varios años para que el árbol produzca el fruto.

Entre los otros productos que se han considerado para generar plantas transgénicas se encuentran la lechuga, alfalfa, zanahorias, tomate, maíz y soya (Langridge, 2000). La alfalfa es útil porque produce una gran cantidad de biomasa seca por hectárea y puede ser cosechada hasta nueve veces en un año (Khouidi y col., 1999). La lechuga también es un buen modelo para expresar proteínas antigénicas (Kapusta y col., 1999), sin embargo una gran desventaja de estos dos modelos es que la proteína recombinante al ser sintetizada en un ambiente acuoso, frecuentemente es inestable, resultando en un bajo rendimiento (Twyman y col., 2003). El tomate también se ha utilizado porque produce grandes cantidades de fruto consumible, crece rápidamente y es ampliamente cultivado (Rigano y Walmsley, 2005).

Una gran ventaja de las plantas transgénicas es el bajo costo al producirlas a gran escala. Kusnadi y col., (1998) han estimado que el costo de producción de proteínas recombinantes en plantas podría ser de 10 a 50 veces más bajo que produciendo la misma proteína por fermentación de *E. coli*, dependiendo del

cultivo. Giddings (2001) ha estimado que una proteína recombinante puede ser producida en plantas con solo 2-10% del costo que tendría la misma proteína expresada en un sistema de fermentación bacteriana y a un 0.1% del costo en un cultivo de células de mamíferos, dependiendo del cultivo.

2.9.2. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Muchas técnicas han sido usadas para la transformación de plantas, sin embargo, el método más común es la transformación mediada por *Agrobacterium*, el cual contiene varias copias de un plásmido inductor de tumores (Ti) que transfiere información al genoma de la planta. Este plásmido es fácilmente manipulado de tal modo que los genes de interés son introducidos entre los bordes secuenciales del T-DNA para luego ser transferido a *A. tumefaciens* (Langridge, 2000). Después de la infección a las células hospederas, el T-DNA es cortado por los bordes, transportado hacia el núcleo e insertado al azar en el ADN cromosomal en uno o más sitios. Durante el cultivo de tejidos, las células transformadas son seleccionadas positivamente y regeneradas a plantas transgénicas (Fig. 7).

Una manera de generar vacunas comestibles se basa en el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, la cual puede introducir a células vegetales genes que codifiquen para proteínas antigénicas de origen viral o bacteriano que estimulen la respuesta inmune en animales alimentados con dichos vegetales.

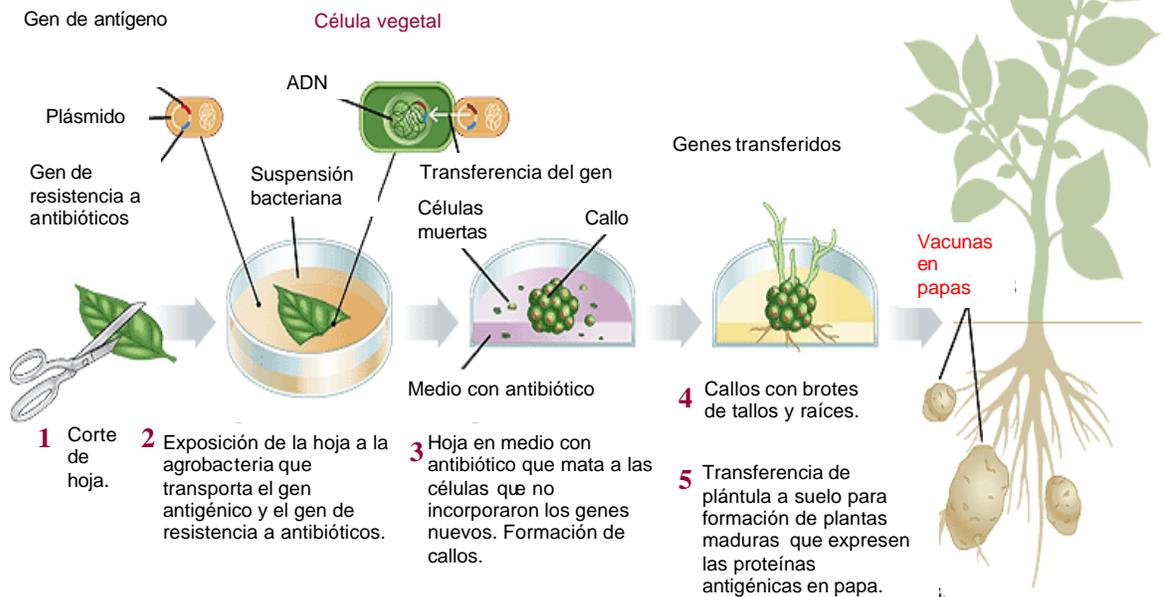


Fig 7. Transformación de células vegetales mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Langridge, 2000)

El tiempo que toma en regenerarse una planta transgénica depende de la especie y varía de 6 semanas a 18 meses (Walmsley y Arntzen, 2000). Una de las principales ventajas que representa la transformación estable es que la nueva información introducida a la planta se hereda a las siguientes generaciones (Kaprowski y Yusibov, 2001; Rice y col, 2005).

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

Los esfuerzos para desarrollar vacunas en plantas han sido grandemente expandidos en los últimos años. Antígenos virales y bacterianos han sido sintetizados en diversas especies de plantas; ensayos preclínicos recientes con proteínas producidas en plantas son muy alentadores; se ha demostrado además que las plantas transgénicas tienen un potencial considerable para la producción

económica de proteínas. Sin embargo, las proteínas foráneas en plantas se acumulan en niveles relativamente bajos (0.1-1% de la proteína total soluble (PTS). Una de las estrategias para incrementar la producción de proteínas en plantas transgénicas ha sido el uso de promotores constitutivos como el 35S del virus del mosaico de la coliflor (Tyagi, 2001), promotores de opinas y el uso de codones utilizados frecuentemente en plantas mediante genes sintéticos, no solo para maximizar la velocidad en la síntesis de la proteína sino para eliminar inestabilidad en las secuencias (Koziel y col., 1996). También hay trabajos en donde se establece que añadir en el extremo 3' una señal de retención en el retículo endoplásmico (como la secuencia SEKDEL o KDEL) incrementa la acumulación de proteínas antigénicas en las células vegetales de 2 a 10 veces más (Yu y Langridge, 2000; Napier y col., 2005; Rigano y Walmsley, 2005). Otra estrategia para mejorar la acumulación de antígenos en los tejidos vegetales incluye el diseño de genes sintéticos expresados en tejidos específicos (Christensen y Quail, 1996; Walmsley y Arntzen, 2000).

Otra alternativa para producir una alta expresión del transgén en la planta es la transformación de cloroplastos, ya que producen hasta 10 veces más PTS y además se logra reducir el flujo genético de los transgenes mediante el polen ya que los plástidos se heredan de forma materna (Bogorad, 2000; Daniel y col., 2002). Por otro lado, al transformar cloroplastos tampoco se conocen efectos epigenéticos como el silenciamiento de genes y efectos pleiotróficos, además se pueden producir varias proteínas mediante operones (Goldschmidt-Clermont, 1991). Existen varios trabajos publicados de transformación de cloroplastos de tabaco en los que se han expresado: hormona de crecimiento humano en niveles superiores al 8% de proteína total soluble (PTS) (Zhang y col., 1995), albúmina sérica humana (11% de PTS) (Liljeqvist y col., 1997), fragmentos de la toxina tetánica y del cólera (arriba del 25% de PTS) (Bagdasarian y col., 1999; O'Dowd y col., 1999) entre otros. Sin embargo el uso de este sistema como una estrategia general en biotecnología es limitado debido a la incapacidad de los cloroplastos de

realizar modificaciones postraduccionales, incluyendo glicosilaciones (Backstrom y col., 1995).

Los niveles de proteínas recombinantes producidas en plantas transgénicas mediante transformación nuclear es bajo (el rendimiento generalmente oscila entre 0.1 y 1% de PTS), es la dosis mínima requerida para que la proteína pueda ser purificada. Sin embargo existen reportes en los cuales con solo un 0.4% de PTS expresado en vegetales es suficiente para inducir respuesta inmunológica (Daniell y col., 2001; Streatfiel y Howard., 2003; Artzen y col., 2005; Sala y col., 2005) reportan que aún una expresión menor del 1% de anticuerpos recombinantes en tabaco es suficientemente competitivo con los otros sistemas de expresión haciendo a las plantas una opción económicamente viable.

2.9.4. Estudios de respuesta inmune en animales alimentados con plantas transgénicas

En los pasados 15 años se ha expresado en plantas una amplia variedad de antígenos médicamente importantes, varias proteínas expresadas en plantas han sido probadas para demostrar su potencial como vacunas comestibles, entre estos se incluyen el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), rotavirus, parvovirus, toxina termolábil de *E. coli*, subunidad B de la toxina del cólera, glicoproteínas del virus de la rabia, proteínas de la cápside del virus Norwalk, etc. (Mason y Ball, 1996), lo cual ha llevado a realizar estudios de inmunogenicidad básica en animales y humanos (Kirk y Webb, 2005). Estudios en ratones han demostrado que la ingestión de vacunas expresadas en plantas puede provocar respuesta inmune en mucosas (Tabla 1).

Tabla 1. Reportes de plantas transgénicas productoras de antígenos en el desarrollo de vacunas comestibles para humanos.

Subunidad antigénica / patógeno	Características del transgén	Vector de expresión	Planta	Características de la proteína recombinante	Niveles de expresión	Referencia
Proteína SpaA de <i>Streptococcus mutans</i>	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Tabaco	Inmunogénica por vía oral	-	Curtiss y Cardineau, 1990
Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Tabaco y papa	Inmunogénica por vía parenteral y oral	0.01% PTS ^a	Mason y col., 1992; Thanavala y col., 1995
Glicoproteína del virus de la rabia	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Jitomate	-	0.0001-0.001% PTS	McGarvey y col., 1995
Proteína del la capsida del virus Norwalk	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Tabaco y Papa	Inmunogénica por vía oral	Aprox. 0.23% PTS	Mason y col., 1996
Glicoproteína del virus de la rabia y el antígeno MNV3 del VIH	Nativo	TMV ^b (con CP ^c de AMV ^d)	Tabaco	Inmunogénicas por vía parenteral	No cuantificados	Yusibov y col., 1997
LTB ^e	Sintético, con señales de retención para RE	<i>A. tumefaciens</i>	Papa	Inmunogénica por vía oral	0.19% PTS (7.3-17.2 µg/g)	Mason y col., 1998
Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Lechuga	Inmunogénica	5.5 ng/g	Kapusta y col., 1999
Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Altramuz	Inmunogénica	150 ng/g	Kapusta y col., 1999
Fragmento de 10 aa de la proteína S del Coronavirus de la hepatitis murina.	Nativo, fusionado a la proteína CP del TMV	TMV	Tabaco	Inmunogénica	No cuantificados	Koo y col., 1999
Epítomos de proteína G del virus sincicial respiratorio humano	Sintético, fusionado a la proteína CP del TMV	AMV	Tabaco	Inmunogénicas	0.8 mg/g PF ^f	Belanger y col., 2000
Proteína F del virus sincicial respiratorio	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Jitomate	Inmunogénica por vía oral	1-32.5 µg/g PF	Sandhu y col., 2000
LTB	Rediseñado con codones de plantas	<i>A. tumefaciens</i>	Maiz	Inmunogénica por vía oral	No reportados	Streatfield y col., 2001
LTB	Sintético, con señales de retención para RE	<i>A. tumefaciens</i>	Papa	Inmunogénica por vía subcutánea y oral.	10-17 µg/g PF	Laurterslager y col., 2001
LTB	Nativo, expresado en cloroplastos	Biobalística	Tabaco	Se ensambla correctamente	4.1% PTS	Daniell y col., 2001

Tabla 1. Continuación

LTB	Sintético, con señales de retención para RE	Biobalística	Maíz	Inmunogénica por vía oral	3.7% TPS	Chiwamba y col., 2002
Subunidad B de la toxina del cólera (CTB)	Nativo con señales de retención para RE	<i>A. tumefaciens</i>	Tomate	Se ensambla correctamente	0.02-0.04% TPS	Jani y col., 2002
Hemaglutinina del virus de la rubeola	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Zanahoria	Inmunogénica por vía oral	No reportado	Marquet-Blouin y col., 2003
Fragmento C de la toxina tetánica	Rediseñado con codones de plantas	Biobalística	Tabaco	Inmunogénicas por vía parenteral	25-10% PTS	Tregoning y col., 2003
Proteína L1 de HPV ^g 16	Rediseñado con codones de plantas	<i>A. tumefaciens</i>	Tabaco Papa	Inmunogénica in vitro	0.5-0.2% PTS	Biemelt y col., 2003
Antígeno de tuberculosis	Nativo fusionado a LTB	<i>A. tumefaciens</i>	Arabidopsis	Se ensambla correctamente	No reportado	Rigano y col., 2004
Proteína Tat-1 de HIV ^h	Rediseñado con codones de plantas	TMV ^b	Espinacas	Inmunogénica por vía oral	300-500 µg/g PFF	Karasev y col., 2005
Proteína L1 de HPV ^g 16	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Tabaco	Inmunogénica in vitro	0.034% -0.076% PTS	Liu y col., 2005
Proteína VP6 de rotavirus	Rediseñado con codones de plantas	<i>A. tumefaciens</i>	Alfalfa	Inmunogénica por vía oral	0.28% PTS	Dong y col., 2005
Antígeno protector de <i>Bacillus anthracis</i>	Nativo, expresado en cloroplastos	Biobalística	Tabaco	Inmunogénica por vía subcutánea	14.2% PTS	Koya y col., 2005
Proteína VP7 de rotavirus	Nativo fusionado a CTB	<i>A. tumefaciens</i>	Papa	Se ensambla correctamente	0.01% PTS	Choi y col., 2005
LTB	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Siberian ginseng</i>	Se ensambla correctamente	0.36% PTS	Kang y col., 2006
Proteína HspA de <i>Helicobacter pylori</i>	Nativo	<i>A. tumefaciens</i>	Tabaco	Inmunogénica	No reportado	Zhang y col., 2006
FimA de <i>P. gingivalis</i>	Nativo fusionado a CTB	<i>A. tumefaciens</i>	Papa	Se ensambla correctamente en pentámeros	0.33% PTS	Shin y col., 2006

^aPTS= Proteínas Totales Solubles; ^bTMV= Virus del Mosaico del Tabaco; ^cCP= proteína de la cápside; ^dAMV= Virus del Mosaico de la Alfalfa; ^eLTB= Subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli*; ^fPF= Peso Fresco; ^gHPV= Virus del Papiloma Humano, ^hHIV= Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

Debido a que la inmunogenicidad demostrada en animales con las vacunas comestibles ha sido exitosa, se ha fomentado el diseño de ensayos en humanos usando frutas y vegetales comestibles transgénicos (Tacket y Mason, 1999). Los primeros ensayos clínicos publicados entre 1997 y 2005 utilizaron voluntarios que consumieran grandes cantidades de papa cruda, lechuga y maíz. En 1997, el grupo de Arntzen, demostró resultados prometedores en voluntarios alimentados con papas crudas que contenían segmentos de la toxina de *E. coli* (LT-B) (Mason y col., 1998). Otro grupo en la Universidad Thomas Jefferson, de Estados Unidos, reportó una respuesta inmunológica satisfactoria en dos de los tres voluntarios alimentados con lechugas transgénicas que contenía el gen que codifica para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) (Kaprowski y Yusibov, 2001). En el 2004, nueve voluntarios fueron alimentados con maíz transgénico que contiene LTB y después de 3 dosis se observó un aumento en el nivel de IgG anti-LTB en suero en 7 de 9 voluntarios y un aumento en el nivel de IgA en 4 de 9 voluntarios (Tacket y col., 2004). También se ha observado la generación de respuesta inmune en 9 de 17 personas que fueron alimentadas con papas que expresaban el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (8.5 µg/g de tubérculo) sin la necesidad de co-administrar un adyuvante (Thanavala y col., 2005).

El éxito en el desarrollo de un producto basado en una nueva tecnología requiere una integración de varias disciplinas incluyendo la biología molecular, biología, química analítica, biología clínica, inmunología, ingeniería de procesos, toxicología, farmacología, etc. Una debilidad percibida para esta tecnología es la falta de una ley o marco regulatorio, y esto ha sido citado como una razón por la cual las compañías farmacéuticas han sido renuentes a entrar a este campo (Arntzen y col., 2004; Vermij, 2004).

De hecho, para materiales crecidos en campo, se exigen múltiples requisitos, tanto para demostrar la eficacia del producto como para su adecuada administración y contención en las plantas. Además, dependiendo del tipo de sistema vegetal utilizado para expresar el antígeno, el costo de inscripción y el

costo potencial de contención, puede tener un impacto significativo en la viabilidad comercial del producto final. Otra cuestión es el riesgo de inducir tolerancia oral. De hecho, la administración oral de auto-antígenos puede conducir a tolerancia oral y reversión o reducción de la autoinmunidad (Arakawa y col., 1998; Carter y Langridge, 2002; Snowden y Langridge, 2003; Ma y col., 2004 Difusión). Sin embargo, las evidencias indican que la inducción de tolerancia esta asociada al régimen de administración (Arntzen y col., 2005).

Hasta la fecha, solo Dow AgroSciences ha logrado un proceso regulatorio aprobado por la FDA y USDA para una vacuna dirigida contra el virus Newcastle de aves expresada en células vegetales (Dow AgroSciences, 2006).

2.10. *Lycopersicon esculentum*

El tomate es una de las principales hortalizas en nuestro país. Los tomates son ricos en sustancias fitoquímicas, con propiedades anticancerígenas tales como los carotenoides como el licopeno, compuesto que protege a las células de los efectos de la oxidación, otras propiedades nutricionales del tomate, incluyen la presencia de minerales como fósforo, hierro, calcio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, potasio y sodio, y es rico en Vitaminas A y C, además que contiene glutatión, un antioxidante natural.

Pertenece a la familia de las Solanáceas. Se multiplican a partir de semilla. El tomate florece a los dos meses del trasplante y a los tres meses comienza la recolección. Es poco exigente en cuanto a la calidad del suelo, la planta y su fruto son particularmente sensibles a las bajas temperaturas y a la humedad ambiental. Alrededor del 80% de la superficie sembrada pertenece a áreas de riego. México ocupa el décimo lugar a nivel mundial como productor de jitomate, pero es el tercer comercializador del producto en el mundo. A nivel nacional, ocupa el primer lugar de exportaciones hortícolas. Entre las diferentes variedades que se producen en México se encuentran el tomate rojo saladette, cherry, jitomate y verde, de los cuales el primero es el más importante. El estado tomatero más importante es

Sinaloa (alrededor del 40% de la producción total del país), seguido por Baja California Norte, San Luis Potosí y Michoacán (<http://www.infoagro.com>).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El trabajo esta dirigido a generar plantas transgénicas que expresen un gen sintético optimizado para plantas, el cual codifique un polipéptido recombinante no existente en la naturaleza, que contenga los principales eptopes inmunoprotectores de las exotoxinas diftérica, pertúsica y tetánica (los principales antígenos de la vacuna triple DPT contra difteria, tos ferina y tétanos) y dos adyuvantes unidos por péptidos conectores para preservar la inmunogenicidad de los epítopes de las exotoxinas. El polipéptido antigénico de este trabajo (sDPT) se producirá en plantas de tomate transgénicas y será administrado a animales a través del consumo directo del fruto transgénico, como fase inicial en el desarrollo de una vacuna comestible.

3.2. Objetivos específicos

1. Diseño de un gen sintético que codifica para un polipéptido con dos epítopos inmunoprotectores de las exotoxinas de la difteria, tos ferina y tétanos con codones optimizados para la expresión de polipéptidos antigénicos (sDPT) en tomate.
2. Construcción de un vector que exprese sDPT.
3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el vector de expresión.
4. Establecimiento de un sistema eficiente de regeneración de plantas de tomate transformadas con *Agrobacterium tumefaciens*.
5. Obtención plantas transgénicas con el gen sDPT.
6. Análisis de la integración y transcripción del transgén
7. Análisis de la actividad antigénica del polipéptido DPT *in vitro*
8. Evaluación de la inmunogenicidad del polipéptido DPT por vía oral en ratones

IV. Hipótesis

1. El polipéptido DPT codificado por el gen *sDPT* puede ser expresado y conservar su antigenicidad en plantas de tomate
2. La ingestión de tomates que expresan el polipéptido *sDPT* es capaz de inducir inmunidad local y sistémica en ratones

V. MATERIAL Y EQUIPO

5.1. Material biológico

Material biológico	Proveedor
<p><i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> <p>LB4404: Fondo cromosómico TiAch5 marcador de selección cromosómico a rifampicina, Plásmido Ti: pAL4404 marcadores de selección del plásmido Ti: espectinomycin y estreptomycin.</p>	<p>Cepario donado por el Dr. W. Cress al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).</p>
<p><i>Escherichia coli</i></p> <p>Top 10 F': F' {lacIq Tn10 (TetR)} mcrA .(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZ.M15 .lac? 74 recA1 deoR araD139 .(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</p>	<p>Donadas por el Dr. Gerardo Argüello Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.</p>
<p>Semillas de Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>). Variedad isogénica Ailsa Craig (AC)</p>	<p>Donada por el Profesor Don Grierson de la Universidad de Nottingham, Inglaterra.</p>

5.2. Vectores utilizados

Vector y características	Proveedor
<p>pBI121: Vector binario que incluye un cassette de expresión con el promotor 35S completo del virus del mosaico de la coliflor, fusionado al gen <i>gusA</i> y al terminador NOS</p>	<p>Cepario donado por el Dr. W. Cress al IPICYT.</p>
<p>pGEM-easy: Vector de clonación</p>	<p>Promega, USA</p>

5.3. Reactivos y suplementos

Reactivo	Proveedor
Ácido ascórbico	Sigma Chemical Co. USA
Ácido bórico	Sigma Chemical Co. USA
Ácido Indol Acético (AIA)	Phyto Tecnology Lab. USA
Ácido maléico	Sigma Chemical Co. USA
Ácido molíbdico	Sigma Chemical Co. USA
Ácido naftalenacético (ANA)	Sigma Chemical Co. USA
Acido clorhídrico	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Agar grado bacteriológico	Invitrogen., USA
Agar grado micropropagación	Phyto Technology Lab USA
Agarosa	Promega USA
Albúmina de suero bovino	Sigma Chemical Co. USA
Ampicilina	Sigma Chemical Co. USA
Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma Chemical Co. USA
Anticuerpos peroxidados de cabra anti-IgG y anti-IgA	Pierce Laboratorios USA
Anticuerpos biotinilados anti-IgG1 e IgG2a	Zymed Laboratorios, España
Antisuero policlonal de cabra anti-toxina diftérica	USBiological, USA
Antisuero policlonal de cabra anti-toxina pertúsica	Donado por el Dr. Song Lee, 2002
Antisuero policlonal de cabra anti-toxina tetánica	USBiological, USA
Bencilaminopurina	Sigma Chemical Co. USA
Bisulfito de sodio	Sigma Chemical Co. USA
Bromuro de etidio	Promega. USA
Buffer de reacción para PCR	Promega. USA

Cefotaxima	Laboratorios Kendrick. México
Citrato de sodio	Sigma Chemical Co. USA
Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Cloruro de calcio	Riedel de Haen. USA
Cloruro de cobalto	PhytoTechnology Lab. USA
Cloruro de sodio	J.T. Baker. USA
Desoxinucleótidos trifosfato (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	Promega. USA
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB. USA
EDTA	Phyto Technology Lab. USA
Enzimas de restricción	Promega, Roche y New England Biolabs. USA
Etanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Extracto de levadura	Fluka. USA
Fenol	Invitrogen. USA
Fosfato de potasio	J.T. Baker. USA
Glicerol	USB. USA
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V.México
Hipoclorito de sodio	Cloralex. México
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Kanamicina	GIBCO BRL. USA
Kit QIAEXII® gel extraction kit (purificación de ADN de fragmentos de agarosa) Cat No. 20021	Qiagen. USA

Kit QIAquick® PCR purification Cat No. 28104	Qiagen. USA
Leupeptina	Sigma Chemical Co. USA
Manitol	Sigma Chemical Co. USA
Marcador de ADN de 1 kb	Invitrogen. USA
Medio RPMI 1X	Sigma Chemical Co. USA
Myoinositol	Phyto Technology Lab. USA
Nitrato de amonio	Sigma Chemical Co. USA
Nitrato de potasio	Riedel de Haen. USA
Oligonucleótidos	Invitrogen. USA
o-fenilendiamina	Sigma Chemical Co. USA
Piridoxina	Sigma Chemical Co. USA
p-Nitro fenil fosfato	Sigma Chemical Co. USA
p-hidroximercurobenzoato	Sigma Chemical Co. USA
Polietilenglicol 8000	USB. USA
Proteinasa K	USB. USA
RNAsa	Roche. USA
Sacarosa	Phyto Technology Lab. USA
Sorbitol	Sigma Chemical Co. USA
Streptoavidina peroxidada	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de cobre	Phyto Technology Lab USA
Sulfato de magnesio	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de manganeso	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de zinc	Phyto Technology Lab USA
Sulfato ferroso	Sigma Chemical Co. USA
T4 ADN Ligasa	Invitrogen. USA
Taq ADN Polimerasa	Roche, Invitrogen USA
Tiamina	Phyto Technology Lab USA
Toxina de cólera (CT)	Sigma Aldrich Chemical Co., USA

Toxoide diftérico	NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) UK
Toxoide pertúsico	NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) UK
Toxoide tetánico	NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) UK
Tris base	Promega. USA
Tritón X-100	Sigma Chemical Co. USA
Trizol	Invitrogen. USA
Tween 20	Sigma Chemical Co. USA
Vacuna comercial DPT	Secretaría de Salud, Mexico, clave 3805
Vacuna comercial Quadracel™	Pasteur Mérieux Connaught, Rhone-Poulenc Group, Canadá
Yoduro de potasio	Riedel de Haen. USA
Zeatina (E)-6-(4-hidroxy-3-methylbut-2-enylamino)purine)	Sigma. USA

5.4 Equipo

Equipo	Proveedor
Agitador magnético con placa de calentamiento	Corning, USA
Autoclave eléctrica Sterilmatic mod. STM-E tipo C	Market Forge, USA

Balanza analítica eléctrica mod. SA210D	Scientech, USA
Balanza granataria mod 1400	Ohaus, USA.
Baño María digital mod. Isotemp 1025	Fisher Scientific, USA.
Cámara bioclimática mod. Mac-510	Lumistell, México.
Cámara de electroforesis horizontal mod. Minisub-cell GT	Bio-Rad, USA
Campana de extracción de humos mod. CS línea 2000	Fisher-Aldher, USA
Campana de Flujo Laminar	VECO S.A de C.V., México.
Centrífuga mod. RC 5C Plus	Sorvall, USA
Cuarto de incubación de cultivos vegetales	Lumistell, México.
Electroporador Gene Pulser III mod. ECM 630	BTX, Division of Genetronics, Inc, Alemania.
Entrecruzador de UV	Spectronic Corporation. USA
Espectrofotómetro mod.DU 530	Beckman, USA
Fotodocumentador de geles mod. UVP Chemisystem	UVP, USA
Fuente de poder mod. Power PAC300	Bio-Rad, USA
Horno de hibridación	Techne, USA
Lector de microplacas Multiskan Ascent	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA
Lector de placas de ELISA	BioRad. USA
Microcentrífuga mod. mini Spin	Eppendorf, Alemania.
Microcentrífuga refrigerada mod. 5415	Eppendorf, Alemania.
Potenciómetro mod. 430	Corning, Inglaterra.
Termociclador mod. Touchene Gradient	Techne, Inglaterra.
Termociclador mod. PTC-100TM	MJ Research, USA.
Vortex mod. Genie – 2	Fischer Scientific, USA

VI. MÉTODOS

6.1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pB1DPT

6.1.1. Reacción de ligación

El gen DPT fue subclonado en el vector pGem-easy para facilitar su clonación en el vector binario, el plásmido pGem-DPT fue cortado con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I (Invitrogen), la digestión se llevó a cabo por 2 h a 37° C y se liberó un fragmento de 570 pb, este fragmento fue ligado con 5 unidades de T4 DNA ligasa (Invitrogen) por 2 h a 25° C en el vector binario pBI121 el cual previamente fue digerido con las mismas enzimas por 2 h a 37° C, la proporción que se utilizó para la ligación fue en el rango molar 3:1 inserto-vector, en un volumen total de 20 μ L de reacción.

6.1.2. Preparación de medios de cultivo para bacterias

a) Medio de cultivo LB: Para preparar un litro de medio LB se pesaron 10 g de peptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura, se disolvieron, se aforó con agua desionizada y se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos. Para medio sólido se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico. Se aforó con agua destilada y se esterilizó.

b) Medio de cultivo YM: Para preparar un litro de medio YM se pesaron 10 g de manitol, 0.2 g de MgSO₄, 0.5 g K₂HPO₄, 0.4 g de extracto de levadura y 0.1 g de NaCl se disolvieron, se aforó con agua desionizada y se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N. Se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos

6.1.3. Preparación de *E. coli* calcio competentes

Se preparó un preinóculo crecido en medio LB a 37 °C toda la noche a partir de una colonia de un cultivo de *E. coli* Top 10. A partir de este, se tomaron 250 μ L y se añadieron a 25 mL de caldo LB, se incubó por 90-100 minutos a 37°C.

El cultivo se enfrió en baño de hielo y se centrifugó 1 min a 12,000 rpm. La pastilla se lavó con 4 mL de cloruro de calcio 0.1M y glicerol al 15%, previamente esterilizado y se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 1 min. Finalmente las células se resuspendieron en 700 μ L de cloruro de calcio 0.1 M y glicerol al 15% y se almacenaron a -80 °C en alícuotas de 30 μ L.

6.1.4. Transformación de *E. coli* mediante choque térmico

Células de *E. coli* TOP 10 calcio competentes fueron transformadas con la ligación por el método de choque térmico; se colocaron 3 μ L de la ligación sobre la superficie de 30 μ L de células TOP 10 congeladas y se incubaron en hielo por 15 minutos, posteriormente los tubos se llevaron a un baño a 43° C por 1 minuto y se regresaron de inmediato al baño de hielo por otros 10 minutos. Después de esto, se añadió 1 mL de medio LB y se incubaron las células por 45 min a 37° C para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos. El producto de la transformación (50 μ l) fue sembrado en placas con LB conteniendo 100 mg/L de kanamicina e incubadas a 37° C toda la noche. Colonias positivas para la construcción pBI-DPT fueron identificadas por análisis de restricción después de extraer los plásmidos por el método de lisis alcalina de Birboin y Dolly (1979).

6.1.5. Extracción de ADN plasmídico: Método de lisis alcalina

Se tomó 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 14-16 horas. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante. Se añadió 150 μ L de la solución I de BD (EDTA 10mM pH 8.0, Tris-HCl 25mM pH 8.0 y Glucosa 50mM), se resuspendió la pastilla con vórtex. Se agregaron 300 μ L de la solución II de BD recién preparada (NaOH 0.2N, SDS 1%), se agitó por inversión 5-10 veces. Se añadieron 225 μ L de la solución III de BD (Acetato de Potasio 3M), se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y 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 la fase acuosa a la cual se le 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. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 300 µL de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por un periodo de aproximadamente 10 minutos. La pastilla se resuspendió en 50 µL de agua Milli “Q”. Se agregó RNAsa (20µg/mL), y se incubó a 37° C por 30 minutos, nuevamente se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN con acetato de sodio 3M pH 7.0 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 20 µL de agua milli “Q” (Sambrook y col., 1989).

6.1.6. Digestión para caracterización de clonas positivas

Para la caracterización de clonas, mediante digestión con enzimas de restricción, se utilizó aproximadamente 1µg de ADN plasmídico, el buffer de reacción 10X sugerido por el fabricante, en un volumen de reacción de 10µL, con 0.5 U de enzima de restricción. La mezcla de reacción se dejó incubando durante 2h a 37° C ó a la temperatura sugerida por el fabricante.

6.2. TRANSFORMACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens*

6.2.1. Preparación de células electrocompetentes

La cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* se inoculó en medio de cultivo YM por dos días a 28° C, de este preinóculo (DO. 0.04-0.08 a 600nm), se tomaron 5 mL y se añadió a 100 mL de medio YM y se incubó a 28° C hasta obtener una densidad óptica de 0.5, 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, previamente esterilizado. Se centrifugó y se resuspendió la bacteria en 2 mL de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol, después de este lavado, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4° C, se resuspendió la pastilla en 400 µL de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50µL y se almacenaron a -80°C (Sambrook y col., 1989).

6.2.2. Electroporación de *Agrobacterium tumefaciens*

El plasmido pBI-DPT fué introducido a la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación, se colocó 1 µg del plásmido de interés sobre la superficie de una alícuota de 50 µL de células competentes congeladas de *Agrobacterium* y se incubaron en hielo por 2 minutos, la mezcla células competentes/plásmidos fueron transferidas a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad) colocada sobre hielo. Los parámetros de la electroporación fueron 25 µF, 400 Ω y un pulso de 2.5 KV en un equipo Gene Pulser II, inmediatamente después, se añadió 1 mL de medio YM a la solución electroporada, se transfirió la solución a un tubo estéril y se incubó a 28° C con agitación por 2 h para permitir la recuperación y expresión de los genes de selección, posteriormente se centrifugó la bacteria y se resuspendió la pastilla en 200 µL de medio YM, se sembraron 50 µL del cultivo en placas con medio YM conteniendo 100 mg/L de kanamicina e incubadas a 28° C por dos días (Sambrook y col., 1989). Las clonas obtenidas fueron verificadas por PCR y una de ellas fue usada para la transformación de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. AC).

6.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PLANTAS DE TOMATE

El medio base que se utilizó fue el MS (Murashigue y Skoog, 1962). Los componentes del medio se enlistan en la Tabla 2, se preparó una mezcla de sales MS 2X concentrada y se almacenó a 4° C.

Tabla 2. 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

Para preparar un 1 L de medio MS, se midieron 500 mL de la mezcla de sales MS 2X concentrada, se agregaron 350 ml de agua, 30 gramos de sacarosa, los reguladores de crecimiento y vitaminas MS, el pH se ajustó a 5.7 con hidróxido de sodio 0.1N y se ajustó el volumen a 1L, finalmente se añadieron 8 g de agar. Los medios se esterizaron a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos.

En la Tabla 3 se describe la composición de los medios utilizados para el cultivo y regeneración tomate (*Lycopersicon esculentum*):

Tabla 3: Medios para cultivo *in vitro* de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Componentes	PM	RM	RTM
Sales MS 2X	500mL	500mL	500mL
Vitaminas MS (1000X)	1mL	1mL	1mL
BA	1mg/L	--	--
ANA	1mg/L	--	--
IAA	--	0.5 mg/L	--
Zeatina	--	1 mg/L	--
Tiamina		0.1 mg/L	--
Sacarosa (g/L)	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7
Agar (g/L)	8	8	8
Cefotaxima	--	400 mg/L	400 mg/L
Kanamicina	--	100 mg/L	100 mg/L

Aforar a 1 L con agua desionizada estéril. PM: Medio de precultivo; RM: Medio de selección; RTM: Medio de enraizamiento

6.3.1. Preparación de vitaminas MS

La composición de las vitaminas MS se muestra en la Tabla 4, los compuestos se disolvieron en agua desionizada estéril y se almacenaron en alícuotas de 20 mL a -20 °C.

Tabla 4. Composición de las 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

6.3.2. Preparación de antibióticos y reguladores de crecimiento

Antibióticos:

a) Kanamicina: Para 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 μ m) y se almacenó a -20°C.

c) Cefotaxima: Se utilizó un antibiótico de marca genérica. Para un stock de 250 mg/mL, se agregó 1 gramo de Cefotaxima a 4 mL de agua desionizada estéril.

Reguladores de crecimiento:

a) Ácido naftalenacético (ANA): Para un stock de 1.5 mg/mL, se disolvieron 150 mg de ANA en 1.0 mL de hidróxido de sodio 1N. Se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20 °C.

b) 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 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C.

c) Ácido Indol Acético (IAA): Para un stock de 1.0 mg/mL, se pesaron 100 mg de IAA y se disolvieron en 1.0 mL de hidróxido de sodio 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20 °C.

d) Zeatina: Para un stock de 2.0 mg/mL, se pesaron 25 mg de Zeatina y se disolvieron en 1.0 ml de hidróxido de sodio 1N, se aforó a 50 mL con agua desionizada estéril. Se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m) y se almacenó a -20°C.

Los reguladores ANA, BA e IAA se añadieron al medio antes de esterilizar, sólo la zeatina y los antibióticos se añadieron después de esterilizar, cuando el medio alcanzó una temperatura aproximada de 45-50° C.

6.4. TRANSFORMACIÓN NUCLEAR MEDIANTE *Agrobacterium tumefaciens*

6.4.1. Esterilización y germinación de semillas

Semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. AC) fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 50% por 10 minutos, después fueron enjuagadas con 100 mL de agua destilada estéril por 4 ó 5 veces. Las semillas fueron germinadas en agar al 0.8%. Los cultivos fueron mantenidos a 25° C con un foto período de 16 h luz, 8 h oscuridad (Intensidad de iluminación 180,000 lux máxima y 40,000 lux mínima).

6.4.2. Transformación nuclear de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Para la transformación de plantas de tomate se siguió el protocolo descrito por Cortina y Culiañez-Macías (2003). Se utilizó el sistema de co-cultivo de explantes vegetales con *A. tumefaciens* como se describe a continuación. Cotiledones de 8 días de germinación fueron cortados y seccionados en dos fragmentos con un bisturí estéril. Se colocaron los explantes en cajas de Petri conteniendo el medio de precultivo PM e incubadas por 2 días a 25° C. Posteriormente, los explantes fueron removidos de las placas de pre-incubación y colocados en la suspensión

bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el plásmido pBI-DPT por 15 minutos para la infección. La OD a 620 nm del cultivo celular fue alrededor de 0.2. Los explantes fueron removidos de la suspensión bacteriana y colocados sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de bacteria y colocados nuevamente en las placas de preincubación con la cara abaxial hacia abajo, en contacto con el medio PM, para cocultivar durante 2 días a un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y a una temperatura de 25 +/- 2°C. Después de este tiempo los explantes fueron transferidos a placas con medio RM adicionado de antibióticos. La cefotaxima mata a la agrobacteria y la kanamicina selecciona los tejidos transformados. Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente y resebradas a medio fresco cada 15 días. Cuando las plántulas regeneradas alcanzaron una altura de 2-3 cm se colocaron en medio RTM para inducir la formación de raíces. Un mes después las plantas fueron pasadas a tierra estéril y posteriormente crecidas en un invernadero hasta estado adulto.

6.5. EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS

Para la extracción de ADN genómico para análisis por PCR se siguió el protocolo descrito por Dellaporta (1983). En un tubo de 1.5 mL se congelaron 50 mg de tejido vegetal y se trituraron con pistilo, se añadieron 480 µL de buffer de extracción (Tris-HCl 100 M pH 8, EDTA 50 mM y NaCl 500 mM) y 37.5 µL de SDS al 20%, después de incubar por 10 min a 65° C se añadieron 94 µL de acetato de potasio 5 M. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se dió un lavado con fenol-cloroformo (1:1), la parte acuosa se precipitó con isopropanol frío. La pastilla se resuspendió en 40 µL de agua milli "Q".

Para la extracción de ADN genómico para utilizarse en los análisis por Southern blot, aproximadamente 5 g de tejido vegetal se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron hasta obtener un polvo fino, se homogeneizó con el buffer de extracción (Sorbitol 0.35 M, Tris-HCl 0.1 M pH 8, EDTA 5 mM y bisulfito de sodio 3.8 g/L) antes que se descongelara el material. Las muestras fueron centrifugadas

a 10 000 rpm/20 min, el sobrenadante fue descartado y la pastilla se resuspendió en 6.25 mL buffer de extracción frío más 8.75 mL de buffer de lisis nuclear (tris-HCl pH 8 0.2 M, EDTA pH 8 50 mM, NaCl 2N, CTAB 20g) y 3 mL de SLS (lauril sarcosina de sodio) al 5%, las muestras fueron mezcladas por inversión de los tubos 5 a 10 veces e incubadas a 65° C por al menos 20 minutos. En seguida 20 ml de la mezcla fenol/cloroformo (1:1) se añadió a las muestras y después de mezclar se centrifugó a 10,000 rpm/ 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol. Las muestras fueron centrifugadas a 15 000 rpm por 5 min. La pastilla fue lavada con 2 mL de etanol 80% y resuspendido en 500 µL de agua Milli "Q". El ARN fue eliminado por adición de 2 µL de RNasa (500 µg/mL) libre de DNasa. Las muestras fueron incubadas por 1 h a 37° C. La RNasa fue eliminada por adición de SDS 0.5% y proteinasa K fresca (50 µg/mL) e incubadas a 37° C por 2 h. Las muestras se centrifugaron por 5 min a 12,000 rpm. El sobrenadante fue extraído dos veces con un volumen de fenol/cloroformo (1:1). El sobrenadante transparente se precipitó por adición de 0.1 volúmenes de acetato de sodio y 0.7 volúmenes de isopropanol. Después de centrifugar por 2 min a 6000 rpm la pastilla fue resuspendida en 700 µL de agua Milli "Q". El ADN fue separado del RNA degradado por precipitación en hielo por 1 h con polietilenglicol 8000 al 10% y NaCl 0.5 M. Las muestras fueron centrifugadas 2-3 min a baja velocidad. La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 80% y luego resuspendido en 800 µL de agua Milli "Q". Las muestras fueron almacenadas a -20° C. La concentración de ADN fue determinada usando el espectrofotometro DU 530 (Beckman).

6.6. REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN EN CADENA (PCR)

Los oligos DPT-F (5' ATG CAC CAT CAC CAC CAT C 3') y DPT-R (5' GCA ACT CAT CTT TTT CAC TCT CG 3') fueron sintetizados por la compañía Invitrogen y se utilizaron para detectar la presencia del gen *sDPT* en las plantas transformadas, la mezcla de reacción fue de 50 µL y fue preparada como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la mezcla maestra usada para la amplificación del gen sDPT mediante PCR.

Componente	Concentración de la solución madre (stock)	Concentración final requerida	Volumen de stock necesario para una reacción
Agua milli "Q"	-	-	37 μ L
Buffer de PCR	10X	1X	5 μ L
dNTPs	10 mM	5 μ M	1 μ L
Oligo sentido	10 μ M	0.1 μ M	0.5 μ L
Oligo antisentido	10 μ M	0.1 μ M	0.5 μ L
MgCl ₂	25 mM	1.5 μ M	3 μ L
Taq ADN polimerasa	5 U/ μ L	0.01 U	0.1 μ L
ADN problema	---	200 ng/ μ L	1 μ L
Vol. Final			50 μ L

Se utilizó el equipo TouchGene (Techne), el protocolo de amplificación empleado se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Protocolo de amplificación por PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Evento	
94	2	Desnaturalización inicial	
94	0.5	Desnaturalización	35 ciclos
60.5	1	Alineamiento de oligos	
72	1.5	Extensión	
72	5	Extensión final	

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (1 µg/mL), observados y digitalizados en el equipo UVP chemisystem (UVP, Inc.)

6.7. SOUTHERN BLOT

Las plantas de tomate positivas por PCR para *sDPT* además de una planta no transformada (control negativo) fueron analizadas por Southern blot.

6.7.1. Tratamiento del ADN

70 µg de ADN genómico extraído como previamente se describió, fue digerido con 100 U de la enzima *EcoRI* (Invitrogen). La digestión se llevó a cabo a 37° C toda la noche. La digestión fue verificada cargando 10 µg de la muestra en un gel de agarosa al 1% corrido en TAE 1X a 80 volts. Las muestras digeridas fueron extraídas con un volumen de fenol/cloroformo y precipitadas con un décimo de volumen de acetato de sodio 3M y 0.7 volúmenes de isopropanol, luego centrifugadas a baja velocidad por 5 minutos y lavadas con etanol al 80%. Las muestras fueron resuspendidas en 20 µL de agua Milli "Q" e incubadas por 20-30 minutos a 65° C para ayudar a la resuspensión. Las muestras fueron separadas en un gel de agarosa al 1% corrido en TAE 1X a 40 volts toda la noche. El gel fue teñido con bromuro de etidio (1 µg/mL), observado y digitalizado en el equipo UVP chemisystem (UVP, Inc.).

6.7.2. Tratamiento del gel

El gel fue enjuagado en una solución de HCl 0.5 M por 15 min, después enjuagado con agua destilada y sumergido en una solución de NaCl 0.6M / NaOH 0.5 M por 45 minutos y posteriormente neutralizado por 30 min en una solución de Tris 0.5 M pH 7.5 / NaCl 1.5 M.

6.7.3. Tratamiento de la membrana de nylon

Antes de transferir el gel, primero se enjuagó la membrana de nylon (Hybond-N+ Amersham Pharmacia Biotech) con agua destilada y posteriormente se equilibró por 5 min en el buffer de transferencia SSC 6X (NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3 M pH 7).

Después de esto, el gel fue transferido a la membrana, para la transferencia el sistema “down blot” fue usado, el cual se basa en las propiedades de la gravedad y capilaridad para transferir los ácidos nucleicos a la membrana de nylon.

6.7.4. Transferencia a la membrana

Una hilera de papel absorbente de 20x20 cm (de aproximadamente 10 cm de altura) fue colocada y encima de esta, 3 capas de papel Whatman 3MM, las orillas fueron cubiertas con parafilm antes de colocar la membrana de nylon encima, el gel fue colocado sobre la membrana y sobre este, 3 capas de papel whatman humedecido con la solución de SSC 10X. Encima del papel Whatman fue colocado un cristal de 15 x 15 cm y sobre ésta, en el centro un peso de 500 g. El DNA fue transferido toda la noche (Sambrook y col., 1989).

6.7.5. Tratamiento de la membrana después de la transferencia

Al siguiente día la membrana fue enjuagada con SSC 6X y el exceso de fluido fue removido por colocar la membrana sobre un papel Whatman 3 M, el ADN fue fijado usando luz UV (120, 000 μ J) (Spectrolinker XL-1500 UV Crosslinker). La membrana fue sellada en una bolsa de plástico y almacenada a 4° C.

6.7.6. Marcaje de la sonda

Para la reacción de marcaje e hibridación se utilizó el kit “Dig High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II” de Roche, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Como sonda utilizamos un producto de amplificación por PCR del gen DPT y fue purificado con kit (Qiagen), después de

cuantificar, se tomó 1 μg de ADN y se añadió agua hasta un volumen final de 16 μL , se desnaturalizó el ADN por ebullición en baño de agua por 10 min, y después de colocó rápidamente en hielo, se añadió 4 μL de Dig-High Prime (vial 1) al ADN desnaturalizado y se incubó a 37° C toda la noche, la reacción se detuvo por adición de 2 μL de EDTA 0.2 M pH 8 (siguiendo este procedimiento la sonda quedó marcada a una concentración de 125 ng/ μL).

6.7.7. Hibridación

Posteriormente se hibridó la membrana usando al producto de PCR del gen *sDPT* como sonda marcado con digoxigenina, como previamente se describió, utilizando 500 ng de sonda marcada para una membrana de aproximadamente 100 cm^2 . La membrana fue hibridada toda la noche a 42° C en el buffer de hibridación Dig Easy Hyb. Al día siguiente, la membrana fue lavada a temperatura ambiente por 10 min con 10-20 mL del buffer de lavado primario (SSC 2X, SDS 0.1%) con agitación constante, seguido de dos lavados a 68° C por 15 min con 10-20 mL del buffer de lavado secundario (SSC 0.5 X, SDS 0.1%) precalentado a la temperatura adecuada, con agitación.

6.7.8. Detección inmunológica

Después de los lavados, se agitó la membrana por 10 min en el buffer de lavado (Ácido maléico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 y Tween 20 0.3%), y se incubó por 30 min en 50 mL de la solución de bloqueo (Diluir 1:10 el vial 6 en buffer de ácido maléico, el cual contiene ácido maléico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5), transcurrido este tiempo se realizó otra incubación de la membrana, por 30 min en 10 mL de la solución con el anticuerpo (dil 1:10 000 en la solución de bloqueo). Se dieron dos lavados a temperatura ambiente por 20 min c/u con 10-15 mL del buffer de lavado con agitación constante, se equilibró por 5 min en 10 mL de buffer de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M pH 9.5) y se colocó la membrana en una bolsa de plástico. Se añadió el reactivo CSPD ready to use (1 mL por cada 100 cm^2 de membrana) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, finalmente

se expuso la membrana en el fotodocumentador UVP chemisystem (UVP, Inc) por 1 h en oscuridad utilizando el filtro claro y la luz UV apagada.

6.8. EXTRACCIÓN DE ARN

RNA total fue extraído utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. 50 mg de tejido 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 Milli "Q". La concentración de ARN fue determinada usando el espectofotometro DU 530 (Beckman). Las muestras fueron almacenadas a -70° C.

6.9. ANÁLISIS POR RT-PCR

6.9.1. Síntesis de ADNc

El cDNA se sintetizó a partir de 250 ng 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)	Concentración final requerida	Volumen de stock necesario para una reacción
Agua milli "Q"	-	-	2.48 μ L
Buffer RT	10X	1X	1 μ L
dNTPs	10 mM	2 mM	2 μ L
Oligos hexámeros	50 μ M	2.5 μ M	0.5 μ L
Inhibidor ARNasa	20 U/ μ L	0.4 U/ μ L	0.2 μ L
MgCl ₂	25 mM	5.5 mM	2.2 μ L
MultiScribe	50 U/ μ L	3.1 U	0.625 μ L

(Transcriptasa reversa)			
ARN problema	---	250 ng/μL	1 μL
Vol. Final			10 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 (°C)	Tiempo (minutos)
25° C	10
37° C	60
95° C	5

6.9.2. 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 maíz (donados por el Dr. Jiménez-Bremont) F'- AACTGGGATGACATGGAGAA y R'- ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA, la mezcla de reacción fue de 50 μl 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)	Concentración final requerida	Volumen de stock necesario para una reacción
Agua milli "Q"	-	-	38 μL
Buffer de PCR	10X	1X	5 μL

dNTPs	10 mM	5 μ M	1 μ L
Oligo sentido	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Oligo antisentido	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
MgCl ₂	25 mM	1.5 μ M	3 μ L
Taq ADN polimerasa	5 U/ μ L	0.01 U	0.1 μ L
ADN problema	---	200 ng/ μ L	1 μ L
Vol. final			50 μ L

Se utilizó el equipo TouchGene (Techne), el protocolo de amplificación es el que se describe en la tabla 10. Se utilizaron 30 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 ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Evento	
94	5 min	Desnaturalización inicial	
94	45 s	Desnaturalización	30 ciclos
58	45 s	Alineamiento de oligos	
72	1 min	Extensión	
72	8 min	Extensión final	

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/mL), observados y digitalizados en el equipo UVP chemisystem (UVP, Inc.)

6.10. ANÁLISIS INMUNOLÓGICO *IN VITRO*

6.10.1. Extracción de proteína total soluble de tejidos vegetales

Se congelaron 100 mg de tejido vegetal y se homogenizaron en 400µL de buffer de extracción (PBS pH 8, NaCl 100 mM, Triton X-100 0.5% y leupeptina 10 µg/µL). El homogenado se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford. Se colocaron 10 µL de la solución problema en tubos de ensayo, se añadió 1.0 mL del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm. Se empleó albumina de suero de bovino para realizar la curva estándar (5-20ng/µL) (Bradford, 1979).

6.10.2. ELISA

En los ensayos de ELISA para detectar los epítopes diftéricos, tetánicos y pertúsicos, las placas fueron cubiertas con 50 ng de proteína total soluble disueltas en buffer de carbonatos e incubadas toda la noche a 4° C. Al día siguiente, los pozos se lavaron tres veces con 200 µL de PBST (PBS+Tween20, 0.05%). Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de PBS más leche descremada al 5%. Como anticuerpo primario utilizamos un antisuero policlonal de cabra anti-toxina tetánica diluido 1:20000 en PBS (USBIOLOGICAL T2962-07 Swampscott, MA, US), antisuero policlonal de cabra anti-toxina pertúsica diluido 1:400 en PBS (donado por el Dr. Song Lee, 2002) y un antisuero policlonal de cabra anti-toxina diftérica diluido 1:5000 en PBS (USBIOLOGICAL D-8065-51 USBiological, Swampscott, MA, US) para la detección de los epitopes de *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis* y *Corynebacterium diphtheriae* respectivamente. Después de incubar 1 h a 37° C y lavar, las placas fueron incubadas con el anti-anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1:20,000 en PBS). Por último, se agregó p-nitrofenilfosfato como sustrato disuelto en el buffer de fosfatasa alcalina (1 mg/mL) y se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas BIO-RAD modelo 550.

En cada ensayo se incluyó un blanco de reactivos, un extracto de una planta no transformada y una curva estándar utilizando la vacuna comercial DPT (Secretaría de Salud, Mexico, clave 3805) para la cuantificación de los toxoides diftérico y tetánico y la vacuna comercial QuadraceTM (Pasteur Mérieux Connaught, Rhone-Poulenc Group) para la cuantificación del toxoide pertúsico.

6.11. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS *IN VIVO*

6.11.1. Esquema de inmunización

En todos los experimentos se usaron ratones Balb/c de 12-14 semanas. Cada grupo constó de 5 ratones, a los cuales se les aplicaron tres dosis de antígeno a los 0, 7 y 14 días. Los ratones fueron inmunizados por vía oral, el primer grupo recibió 270 mg de tejido vegetal (tomate liofilizado) de la línea 17, esta cantidad de tejido contiene 3 µg (5.5 Lf), 14.3 µg (23.8 Lf) y 0.073 µg de toxoides diftérico, tetánico y pertúsico respectivamente, para establecer si la presencia de un adyuvante potencia la respuesta, se incluyeron otros 2 grupos, uno de ellos recibió 270 mg de tejido vegetal coadministrado con 5 µg de toxina de cólera (CT) (Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, MO) mientras que otro grupo recibió además de los 270 mg de tejido vegetal 5 µg de toxina termolábil de *E. coli* (LTB) expresada en zanahoria (Rosales-Mendoza, tesis de doctorado Ene/2007). Como control negativo se incluyó un grupo que fue alimentado con 270 mg de tejido sin transformar. Los animales fueron sacrificados siete días después de la última inmunización, para obtener muestras de suero, lavados intestinales y traqueopulmonares. Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, bajo la supervisión de la Dra. Leticia Moreno Fierros.

6.11.2. Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de suero, lavados intestinales y traqueopulmonares de ratones inmunizados por las vía oral de los 4 grupos a) Tomate-DPT; b) Tomate-

DPT/CT c) Tomate-DPT/LTB y d) Control Negativo (Tomate sin transformar) los cuales fueron sacrificados siete días después de la última inmunización

a) Suero

Se obtuvo a partir de la sangre colectada por punción cardiaca. El suero se recuperó por centrifugación a 10, 000 rpm aproximadamente 1-2 ml y se almacenó a -80° C hasta su uso.

b) Lavados intestinales

El contenido del intestino grueso y delgado se obtuvo con 3 ml de RPMI 1X (Hepes 25 mM, Bicarbonato de sodio 1000 mg/l y Cloruro de sodio 6400 mg/l) frío introduciendo una cánula (de 10 cm de largo por 3 mm de grosor). Para evitar la hidrólisis por proteasas, se añadió p-hidroximercurobenzoato (pHMB) a una concentración final de 5 mM. En ambos casos los restos sólidos fueron macerados para solubilizar los anticuerpos que pudieran estar incorporados. Todas las muestras fueron centrifugadas a 8,000 rpm a 4° C por 20 min para separar la fracción soluble de los paquetes celulares o restos alimenticios, según fuera el caso. Los sobrenadantes fueron almacenados a -80° C hasta que fueron analizados.

c) Lavados traqueopulmonares

Para obtener el lavado traqueopulmonar, se disectó el árbol respiratorio desde la traquea, donde se introdujo una cánula (de 3 cm. de largo por 2 mm de grosor), la cual contenía 1 mL de medio RPMI 1X frío con pHMB a una concentración final de 5 mM. Las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm a 4° C por 15 min para separar la fracción soluble de los paquetes celulares. Los sobrenadantes fueron almacenados a -80° C hasta que fueron analizados.

6.11.3. Evaluación de anticuerpos IgA, IgG e Isotipos

Los niveles de anticuerpos en las muestras de suero y de mucosas (lavados intestinales y traqueopulmonares) se evaluaron por medio de la técnica de ELISA. Placas de 96 pozos se recubrieron con 50 μ L de cada uno de los antígenos (concentración final: 0.23 UI/mL toxoide pertúsico, 0.5 Lf/mL (0.27 ng/mL) toxoide tetánico y 0.5 Lf/mL (0.27 ng/mL) toxoide diftérico) disueltos en buffer de carbonatos (0.1 M Na₂CO₃, pH 9.6) incubándose toda la noche a 4° C, después se lavaron con PBS-T, se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-T y se incubaron 2 h a 37° C; al finalizar este tiempo, las placas se lavaron con PBS-T y se colocaron las muestras de suero y mucosas a diferentes diluciones (suero: dilución 1:10, mucosas: dilución 1:2) incubándose toda la noche a 4° C. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS-T y se agregaron anticuerpos peroxidados de cabra anti-IgG (Pierce Laboratories) dilución 1:1,000, anti-IgA dilución 1:1,000 (Zymed Laboratories) de ratón o biotinilados anti-IgG1 e IgG2a (Zymed Laboratories) de ratón, los anticuerpos se incubaron 1 hora a 37° C. Para el uso de anticuerpos biotinilados se agregó streptoavidina peroxidada (dilución 1:1,000) y se incubó toda la noche a 4° C. Después las placas se lavaron con PBS-T y se adicionó la solución reveladora (o-fenilendiamina 10 mg/mL, H₂O₂ 30% en buffer de fosfato-citrato 50 mM pH 5.2), después la reacción se detuvo con 25 μ L de ácido sulfúrico 2N. Por último, la absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA).

6.11.4. Análisis Estadístico

El análisis de significancia estadística entre los niveles de anticuerpos en los grupos experimentales se determinó con un Análisis de Varianza ($P < 0.05$). Los datos son la media geométrica de $n=5$ animales por grupo y representativo de experimentos duplicados. Las barras de error representan la desviación estándar.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La vacunación es uno de los mejores medios para protegerse contra muchas enfermedades contagiosas. Es posible prevenir hoy enfermedades que en el pasado causaron grandes epidemias como la brucelosis, el cólera, la tos ferina, la difteria, la fiebre amarilla, la influenza, la hepatitis A, la hepatitis B, la leptospirosis, el meningococo, las paperas, el neumococo, la poliomielitis, la rabia, la rubeola, el sarampión, el tétanos, la tuberculosis, el tifo, la varicela y la viruela.

Sin lugar a dudas el desarrollo de vacunas ha sido una de las mayores contribuciones a la medicina, el uso de la vacuna triple contra la difteria, tos ferina y tétanos, desde 1940, disminuyó en forma espectacular la incidencia de estas tres enfermedades, sin embargo, las bajas coberturas de vacunación, han permitido la reaparición de epidemias en ciertos países, así mismo existen otro tipo de problemas que presentan este tipo de vacunas. Por una parte implican en cualquier caso la propagación en el laboratorio de microorganismos patógenos, cuya inactivación o atenuación pueda resultar incompleta y por otro lado pueden inducir efectos secundarios de consideración.

Con el mejoramiento de las técnicas de biología molecular en los 80's, se han desarrollado nuevas estrategias para la producción de vacunas por sub unidades en plantas. Los antígenos expresados en plantas transgénicas han inducido respuestas inmunes cuando han sido administrados a animales de laboratorio. También se han obtenido buenos resultados en las pruebas clínicas realizadas en voluntarios humanos en las cuales los antígenos consumidos por vía oral a partir de tejido vegetal fueron capaces de inducir una importante respuesta inmune. Por esta razón se considera que las vacunas preparadas en plantas tienen un gran potencial. Esta nueva forma vacunación empleando plantas transgénicas comestibles es una estrategia socio-sanitaria prometedora, especialmente en países pobres que son los que mayores problemas presentan en cuanto a enfermedades de fácil control mediante la vacunación, como difteria, tos ferina y tétanos.

En este trabajo planteamos la posibilidad de generar plantas transgénicas de tomate expresando un gen sintético optimizado para plantas, el cual es codificado por un polipéptido que contiene los principales epítopes inmunoprotectores de las exotoxinas diftérica, pertúsica y tetánica (sDPT) como fase inicial en el desarrollo de una vacuna comestible.

7.1. DISEÑO DEL GEN SINTÉTICO DPT

La toxina tetánica está compuesta por dos subunidades, la cadena pesada (H) y la cadena ligera (L), con tres dominios funcionales. El dominio Hc o fragmento C (TetC) de la toxina tetánica es un buen candidato para generar vacunas por subunidades porque se ha demostrado que este dominio no es tóxico, es altamente inmunogénico e induce respuesta protectora (Ribas y col., 2000; Tregoning y col, 2005). La toxina pertúsica (PT) es uno de los factores de virulencia más importantes de *B. pertussis* y ha sido empleada en las vacunas acelulares contra tos ferina. La PT está compuesta de cinco subunidades, entre las que la subunidad S1 es inmunodominante, se ha demostrado que anticuerpos contra S1 son capaces de neutralizar la toxina *in vitro* y proteger ratones ante el desafío con *B. pertussis* (Boucher y col., 1994; Lee y col., 2002;). La toxina diftérica comprende una subunidad A con el dominio catalítico C, y una subunidad B que incluye el dominio transmembranal y el dominio de unión a receptor. El dominio C participa en las interacciones de membrana y traslocación, haciéndolo buen candidato para la producción de vacunas por subunidades (Tortorella y col., 1995; Lobeck y col., 1998).

Basados en el conocimiento de los epítomos candidatos a vacunas por subunidades para difteria, tos ferina y tétanos, se escogieron los dos epítomos inmunoprotectores más antigénicos de cada exotoxina (con el apoyo del M.C. Crisóforo Mercado) y se diseñó un polipéptido inmunoprotector usando el programa “Antheprot” (disponible en <http://antheprot-pbil.ibcp.fr>), se incluyeron además secuencias “linker” ó “conectores” que ayudan a mantener la estructura de los epítomos expuestos. Las siguientes secuencias peptídicas antigénicas

fueron seleccionadas: 26 aminoácidos (posición 312-337) y 32 aminoácidos (posición 975-826) de la cadena pesada de la toxina tetánica; los primeros 17 aminoácidos y otros 17 aminoácidos adicionales (posición 99-115) de la sub unidad 1 de la toxina pertúsica, 16 aminoácidos (posición 186-201) y 27 aminoácidos adicionales (posición 221-247) de la sub unidad A de la toxina diftérica. Dos secuencias de la toxina tetánica que codifican para adyuvantes fueron incluidas en el extremo C- terminal antes de añadir una señal de retención en el retículo endoplásmico (SEKDEL) (Tabla 11).

Tabla 11: Epítomos seleccionados para diseñar el gen DPT.

Toxina tetánica (cadena pesada)	EQIADEINNLLKNKLEEKANKAMININ
Toxina tetánica(cadena pesada)	SVQLKLYDDKNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDI
Toxina pertúsica (subunidad 1)	DDPPATVYRYDSRPPED
Toxina pertúsica (subunidad 1)	GAASSYFEYVDYGDNA
Toxina diftérica (cadena A)	CAGNRVRRSVGSSLSC
Toxina diftérica (cadena A)	KEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYL
Adyuvante (Toxina tetánica)	QYIKANSKFIGITE
Adyuvante (Toxina tetánica)	FNNFTVSFWLRVLPKVSASHLE
Señal de retención RE	SEKDEL

El gen DPT se optimizó para su expresión en tomate en base al uso de codones en plantas, según la base de datos www.kasuzo.or.jp, y al análisis de las secuencias desestabilizantes del mRNA. El gen fue sintetizado por la compañía Entelechon (Regensburg, Germany) y mantiene la secuencia de aminoácidos de las exotoxinas nativas (Fig. 8).

```
Secuencia optimizada para núcleo cca tgg gat ccc atg cac cat cac cac cat cat gaa cag atc
Secuencia bacteriana gaa caa att
M H H H H H H E Q I
gct gat gaa ata aat aac ttg aag aac aag ttg gag gag aag gcc aac aag gct atg att aat
gcc gac gaa att aat aat ctg aaa aac aaa ctt gaa gaa aag gct aat aaa gca atg ata aac
A D E I N N L K N K L E E K A N K A M I N
att aat tca gta caa ctt aag ttg tat gac gac aag aat gct tct ctt gga ctt gtt gga aca
ata aat tct gta caa ctt aaa tta tat gat gat aaa aat gca tct tta gga cta gta ggt acc
I N S V Q L K L Y D D K N A S L G L V G T
cat aat ggt caa att ggt aac gac cca aat aga gat atc gat gat cca cct gcc act gtg tat
cat aat ggt caa ata ggc aac gat cca aat agg gat ata gac gat cct ccc gcc acc gta tac
H N G Q I G N D P N R D I D D P P A T V Y
agg tac gat tca cga cct cct gaa gat gga gca gca tct agt tat ttt gaa tac gtg gat aca
cgc tat gac tcc cgc ccg cgg gag gac ggc gcc gcc tct agc tac ttc gaa tac gtc gac act
R Y D S R P P E D G A A S S Y F E Y V D T
tac ggt gat aac gct tgc gca gga aac cgt gtt aga agg tct gtt ggc tca agt tta tca tgt
tat ggc gac aat gcc tgt gca gga aat cgt gtc agg cga tca gta ggt agc tca ttg tca tgc
Y G D N A C A G N R V R S V G S S L S C
aaa gaa cat ggt cct att aaa aac aaa atg tca gag tca cca aat aag act gtt tct gaa gag
aaa gag cat ggc cct atc aaa aat aaa atg agc gaa agt ccc aat aaa aca gta tct gag gaa
K E H G P I K N K M S E S P N K T V E E K
aaa gca aaa caa tac ttg cag tat att aag gct aat agt aag ttc atc ggg ata acc gag ttt
aaa gct aaa caa tac cta cag tat ata aaa gca aat tct aaa ttt ata ggt ata act gaa ttt
A K Q Y L Q Y I K A N S K F I G I T E F N
aat aat ttc act gtt tct ttt tgg ctt aga gtg cca aaa gtc agt gct tct cat ctc gag agt
aat aat ttt acc gtt agc ttt tgg ttg agg gtt cct aaa gta tct gct agt cat tta gaa
N N F T V S F W L R V P K V S A S H L E S
gaa aaa gat gag ttg tag taa
E K D E L
```

Fig 8: Secuencia del gen sintético DPT optimizado para su expresión en tomate. Codones en negro corresponden a la secuencia bacteriana original, los nucléotidos en azul corresponden a los cambios realizados para optimizar su expresión en plantas. Se resaltan en rosa los péptidos conectores.

El objetivo de diseñar un gen sintético fue crear un gen modificado que pueda ser traducido en la planta de un modo más eficiente que el gen bacteriano original, para obtener así niveles de expresión más altos de la proteína en las plantas de tomate transformadas. Existen varios reportes en los cuales se ha demostrado que los niveles de proteínas aumentan significativamente después de modificar la secuencia del gen (Perlak y col., 1991; Horvanth y col., 2000; Huang y col., 2002).

7.2. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pBI-DPT

El gen DPT fue inicialmente clonado en el vector pCR4-TOPO, se subclonó en el vector pGem-easy (Promega) para facilitar su clonación en el vector pBI-121. El vector pGem-DPT contiene los sitios de restricción *Bam*HI y *Sac*I flanqueantes al gen en los sitios 5' y 3', respectivamente. Al digerir con estas enzimas se libera un fragmento de 570 pb. El fragmento liberado (*gen sDPT*) fue ligado al vector binario pBI121 como se describió en la sección de metodología. El vector binario pBI121 contiene el gen de selección *npt* II (que confiere resistencia a kanamicina a las células vegetales transformadas) el cual está bajo el control del promotor 35S del virus del Mosaico de la Coliflor (35SCaMV). El plásmido resultante fue nombrado pBI-DPT (Fig. 9).

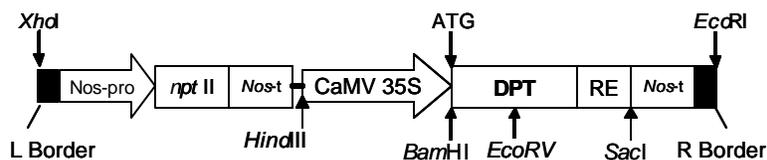


Figura 9. Vector binario pBI-DPT usado para la transformación de tomate. RE: Retículo endoplásmico. Se indican los bordes izquierdo (L Border) y derecho (R Border) del TDNA así como los sitios de restricción.

Colonias positivas para la construcción pBI-DPT en *E. coli* TOP 10 fueron identificadas por análisis de restricción. En la Figura 10 se muestra la digestión de 2 clonas positivas con: A) *Bam*HI/ *Sac*I (fragmento esperado: 570 pb); B) *Hind*III/ *Sac*I (fragmento esperado: 1447 pb); C) *Bam*HI/ *Eco*RI (fragmento esperado: 843 pb); D) *Hind*III/ *Eco*RI (fragmento esperado: 1714 pb) y E) *Hind*III/ *Xho*I (fragmento esperado: 1409 pb).

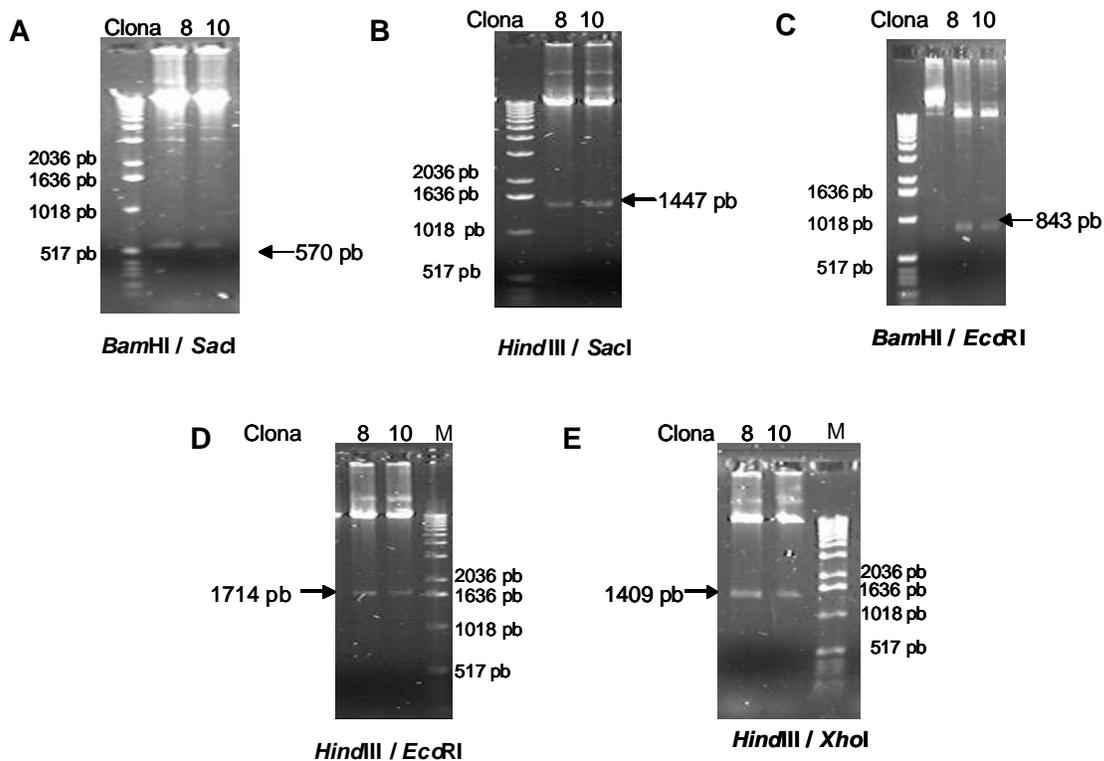


Figura 10: Análisis de restricción de clonas positivas para la construcción pBI-DPT en células de *E. coli* TOP10. M= Marcador de peso molecular de 1 Kb. A) Digestión con BamHI/ SacI; B) Digestión con HindIII/ SacI; C) Digestión con BamHI/ EcoRI; D) Digestión con HindIII/ EcoRI y E) Digestión con HindIII/ XhoI.

Como se observa en la Figura 10, en todos los casos se obtuvo la banda del tamaño esperado, confirmando así la clonación de sDPT en el vector binario pBI-121. Se utilizó la clona 8 para transferirla por electroporación a *A. tumefaciens*.

7.3. ELECTROPORACIÓN DEL PLÁSMIDO pBI-sDPT EN *A. tumefaciens*

El plásmido pBI-DPT fue introducido a la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación, las clonas obtenidas fueron verificadas por PCR, como se describe en la sección de metodología, la clona 2 de *Agrobacterium* (Figura 11) fue usada para la transformación de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. AC) (Cortina y Culiañez-Macia, 2003).

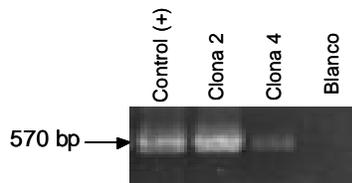


Figura 11: Productos de amplificación por PCR de clonas positivas de la construcción pBI-sDPT en *Agrobacterium tumefaciens*. Control (+): pCR4 Topo-sDPT

7.4. TRANSFORMACIÓN DEL TOMATE

La transformación de plantas de tomate de la variedad isogénica AC fue realizada mediante la infección de cotiledones con la cepa de *A. tumefaciens* que porta la construcción pBI-sDPT y se llevó a cabo como se describió en la Metodología.

Las plantas transgénicas fueron seleccionadas en medio RM, el cual contiene 100 mg/L de kanamicina, después de 3 meses, los brotes (de aproximadamente 2-3 cm) se colocaron en medio RTM para inducir la formación de raíces. En estas condiciones se logró obtener brotes resistentes a kanamicina. Un mes después, las plántulas fueron transferidas a tierra estéril y mantenidas en condiciones de esterilidad por 1 mes más. Posteriormente fueron pasadas al invernadero para permitir su crecimiento hasta estado adulto y recuperar frutos (Figura 12).

El tiempo aproximado desde la infección de cotiledones hasta la obtención de frutos fue de aproximadamente 1 año, aunque se obtuvieron aproximadamente 20 brotes resistentes al antibiótico, solo 16 lograron formar raíz y al transferirlos a suelo solamente 11 se desarrollaron hasta estado adulto.

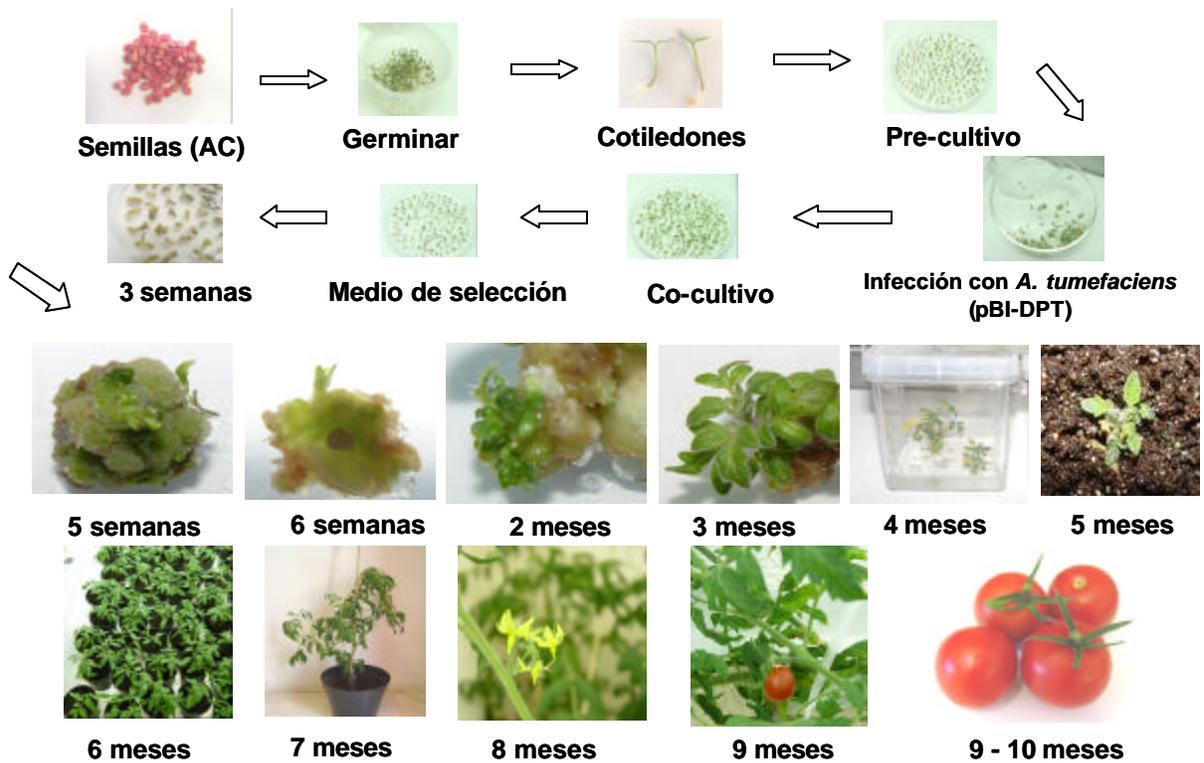


Figura 12. Representación esquemática de la transformación de plantas vía *Agrobacterium* y regeneración de plantas de tomate.

7.5. ANÁLISIS POR PCR

Para comprobar la presencia del transgén sDPT, se realizó un análisis por PCR de las líneas resistentes a kanamicina, como se describió anteriormente. Se utilizó como control positivo el vector pBI-121 y como controles negativos ADN de plantas de tomate no transformadas. Estos análisis demostraron la presencia del gen sintético DPT en 11 plantas, lo cual representa un 13.4% del total de explantes transformados. No se observó producto de PCR en plantas sin transformar (Figura 13).

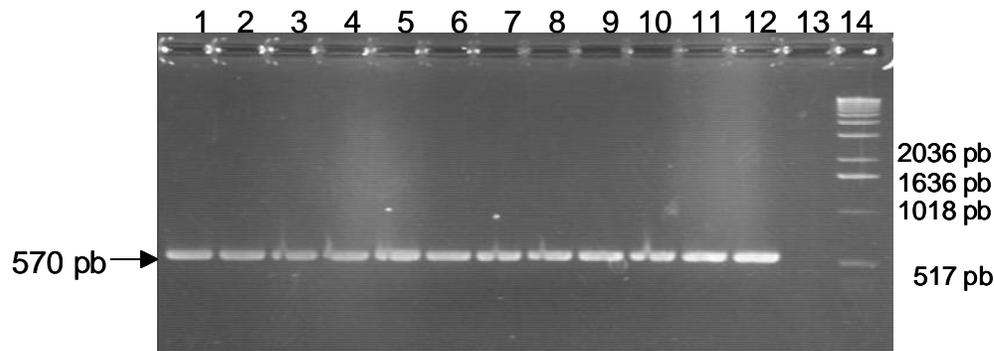


Figura 13. Análisis de los productos de amplificación por PCR de plantas de tomate transformadas con la construcción pBI-DPT vía *Agrobacterium*. Carril 1-11 Plantas transformadas; Carril 12: Control positivo (plásmido pBI-DPT); Carril 13: Planta sin transformar (Control negativo); Carril 14: Marcador de Peso Molecular 1 Kb. Análisis de productos en un gel de agarosa al 1% corrido en TAE 1X a 70V.

En la Figura 13 se observa la banda esperada de 570 pb en las 11 plantas regeneradas a partir de medio RM con antibiótico, en la planta sin transformar no se observa producto de amplificación.

7.6. ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT

Para confirmar la integración del transgén DPT al genoma de la planta, se analizaron las plantas positivas por PCR y una planta no transformada (control negativo) mediante Southern blot.

Para la transferencia el sistema “down blot” fue usado, el cual se basa en las propiedades de la gravedad y capilaridad para transferir los ácidos nucleicos a la membrana de nylon. En la mayoría de los casos se observó más de una copia insertada, no se detectó señal de hibridación en el tejido de la planta no transformada (Figura 14).

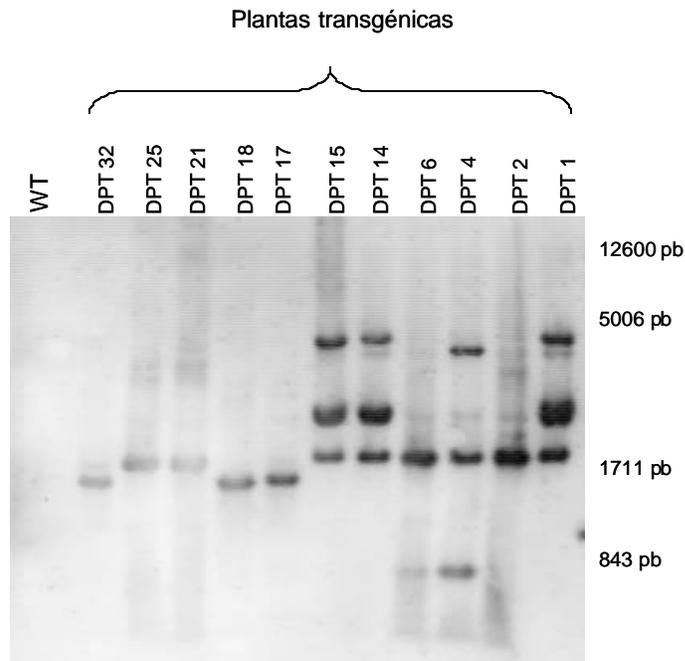


Figura 14. Análisis por Southern blot para determinar la integración del gen DPT en plantas de tomate. 70 μ g de ADN genómico de una planta sin transformar (WT) y plantas transformadas fue digerido con *Eco* RI, usando como sonda al producto de PCR del gen sDPT marcado con digoxigenina.

También se puede observar un mismo patrón de bandeo en plantas regeneradas a partir de un mismo callo, como en las plantas 17 y 18 ó 14 y 15, este evento ha sido reportado previamente (Mlynárová y col., 1994). La línea 17 fue seleccionada por tener una sola copia lo cual facilita el análisis en las siguientes generaciones.

7.7. ANÁLISIS POR RT-PCR

Se llevaron a cabo análisis por RT-PCR para determinar la presencia de un transcrito específico para el gen sintético. Para ello se seleccionaron las plantas positivas por PCR para el gen sDPT. Un transcrito de 570 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 β -actina con oligos diseñados para maíz donados por el Dr. Jiménez-Bremont (Figura 15).

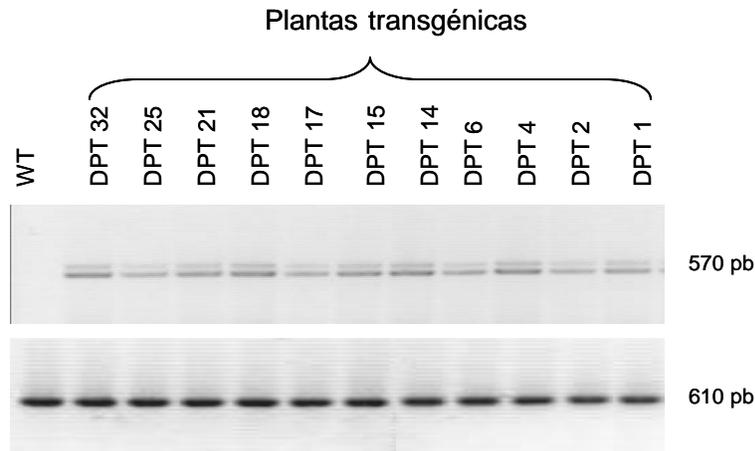


Figura 15. Análisis por RT-PCR de plantas de tomate transformadas con el gen DPT (transcrito específico de 570 pb). Se amplificó una región de β -actina como control de carga (610 pb). Análisis de productos en un gel de agarosa al 1% corrido en TAE 1X a 70 V.

Este resultado nos indica que el gen sDPT insertado está siendo transcrito adecuadamente por la planta, y es específico al no detectarse banda en el tejido no transformado.

7.8. ANÁLISIS POR ELISA

Las 11 líneas transformantes para DPT que crecieron en el agente de selección (kanamicina) se analizaron por ELISA, en este ensayo se incluyó una curva estándar en la que se interpolaron las lecturas obtenidas de las plantas transformadas, se utilizó como estándar la vacuna triple DPT distribuida por la Secretaría de Salud (Clave 3805), para la cuantificación del toxoide diftérico (Figura 16A), y del toxoide tetánico (Figura 16B). La vacuna comercial QuadraceITM (Pasteur Mérieux Connaught, Rhone-Poulenc Group) se utilizó para la cuantificación del toxoide pertúsico (Figura 16C).

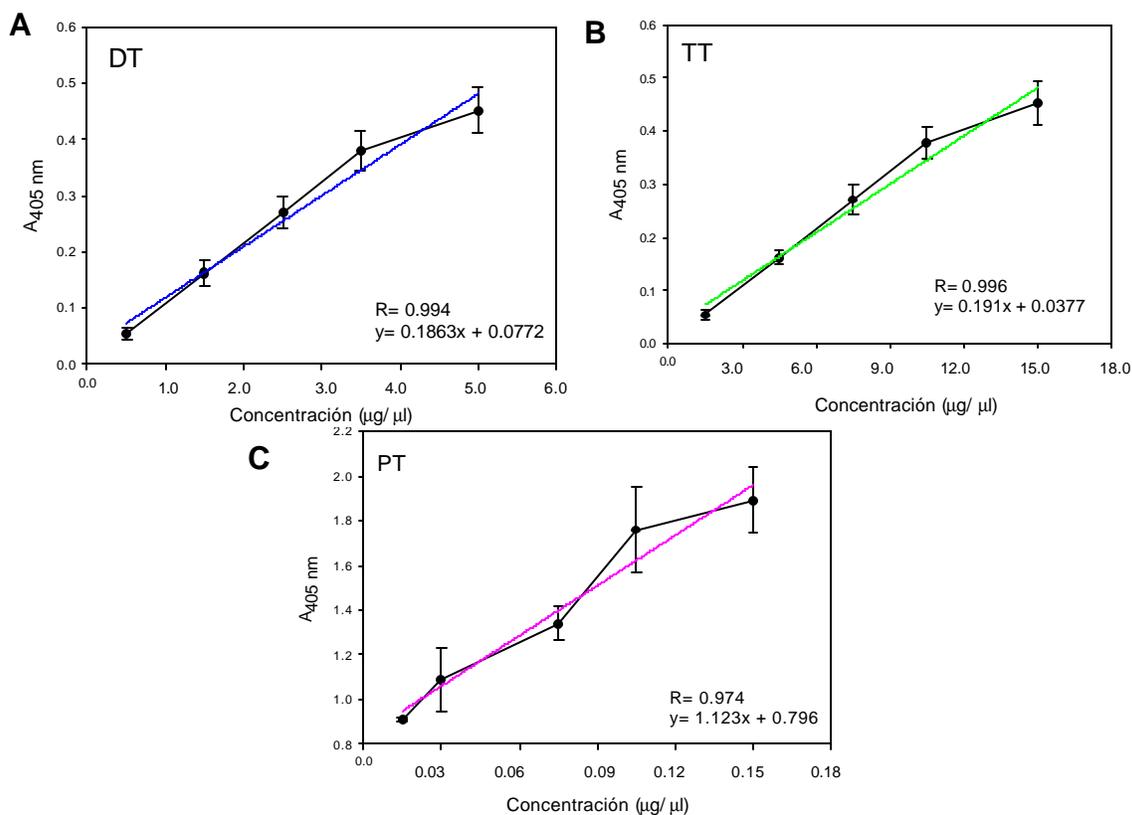


Figura 16. Curva estándar para la cuantificación del toxoide diftérico, tetánico y pertúsico. Para el diftérico (16A), para el tetánico (16B) empleando como estándar la vacuna triple DPT distribuida por la Secretaria de Salud (Clave 3805), mientras que para el toxoide pertúsico (16C) se utilizó como estándar la vacuna comercial Quadracel™ (Pasteur Mérieux Connaught). DT: Toxoide diftérico. TT: Toxoide tetánico. PT: Toxoide pertúsico.

La Figura 17 muestra los resultados obtenidos en las diferentes líneas transgénicas para los epítopes diftéricos, tetánicos y pertúsicos en hojas. El rango de expresión de los epítopes en las hojas de las plantas transgénicas obtenidas va desde 1.9 hasta 5.8 $\mu\text{g/g}$ (3.5-12 Lf /g) de tejido para los epítopes diftéricos (17A), desde 4.5 hasta 16.8 $\mu\text{g/g}$ (8.31- 31.05 Lf /g) de tejido para los epítopes tetánicos (17A) y desde 0.0003 hasta 0.15 $\mu\text{g/g}$ (0.66-117 ng/g) para los epítopes pertúsicos (17B).

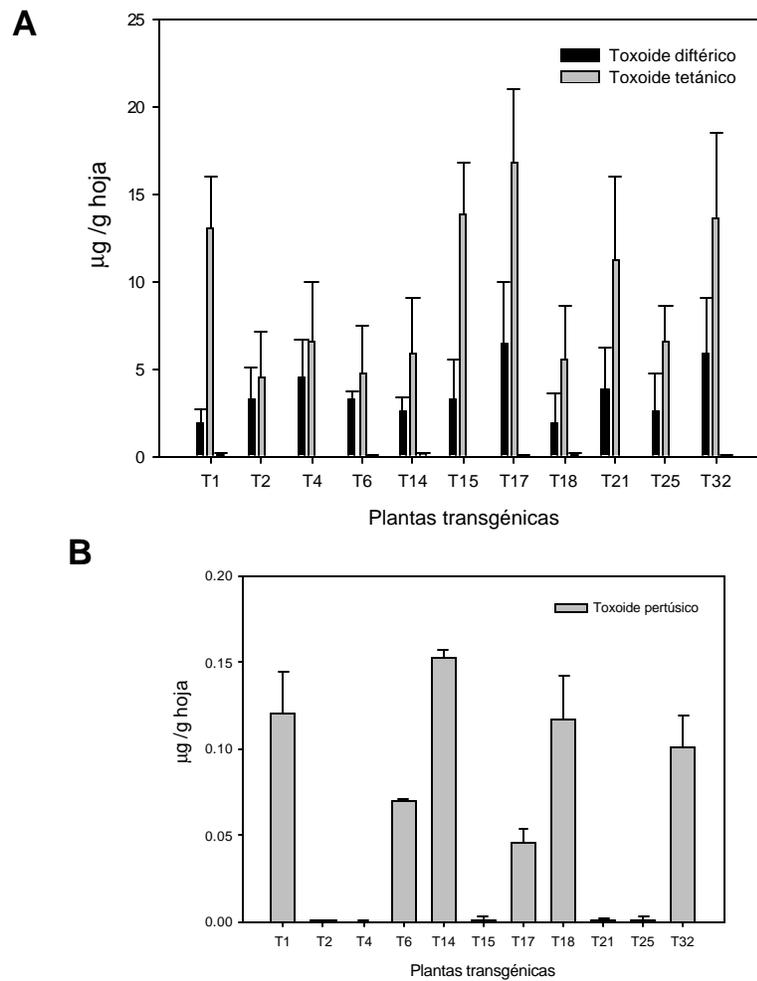


Figura 17. Análisis por ELISA para la detección de epítopes DPT en hojas de tomate. A) Niveles de expresión de epítopes diftéricos y tetánicos. B) Niveles de expresión de epítopes pertúsicos. Los resultados se expresan como ng/ g de hoja.

Así mismo se analizaron los frutos de las líneas transgénicas; debe mencionarse que, de las 11 plantas regeneradas, sólo se obtuvo fruto de 5 plantas. La Figura 18 muestra los resultados obtenidos. El rango de expresión de los epítopes en bs frutos varía desde 0.9 hasta 2 µg/g (1.8- 3.59 Lf /g) de tejido para los epítopes diftéricos (18A), desde 2-6.6 µg/g (4.53-12.59 Lf /g) de tejido para los epítopes tetánicos (18A) y desde 0.0003-0.03 µg/g para los epítopes pertúsicos (18B).

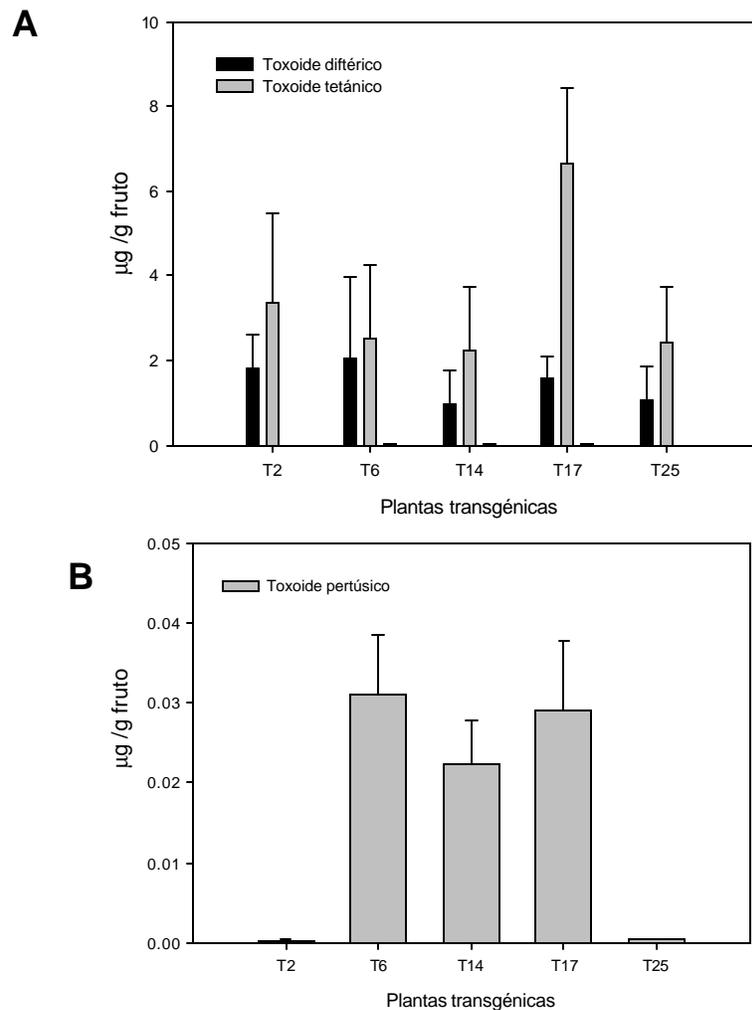


Figura 18. Análisis por ELISA para la detección de epítopes DPT en frutos de tomate. A) Niveles de expresión de epítopes diftéricos y tetánicos. B) Niveles de expresión de epítopes pertúsicos. Los resultados se expresan como $\mu\text{g/g}$ de hoja.

La variabilidad observada en la expresión de antígenos de planta a planta y frecuentemente también de fruto en fruto, ha sido reportada previamente. Esta variación puede deberse a los diferentes sitios de integración del transgén, los cambios en la actividad del promotor y el número de copias insertadas (Mlynárová y col., 1994; Leeuwen y col., 2001). En el 2002, Jani y col., expresaron CTB en plantas de tomate, la construcción utilizada incluía al gen CTB nativo, una secuencia de retención en el retículo endoplásmico (Sekdel), el gen reportero *gusA* y el gen de selección *nptII* dirigidos por el promotor CaMV35S. Lograron

regenerar 4 plantas las cuales fueron positivas por PCR para el transgen. Análisis por Southern confirmó la integración del transgén al genoma del tomate, de las 4 plantas regeneradas, 2 mostraron al menos dos copias del gen mientras que las otras 2 plantas presentaron solo una copia integrada. En la progenie de estas plantas se demostró la presencia también de una sola copia de CTB. En los análisis tipo Northern realizados para determinar la presencia de un transcrito específico para CTB encontraron que la señal fue variable entre las diferentes plantas transgénicas indicando posibles efectos de posición debido a inserciones al azar del transgen en el genoma de la planta hospedera. Se observó además, que el nivel de transcrito fue mayor en las plantas que contenían una sola copia del transgén. En los análisis por inmunoblot se encontró que las plantas que contenían dos copias del transgen no mostraron expresión de la proteína CTB, lo cual puede atribuirse a silenciamiento de genes, ya que no se observó una acumulación significativa de mRNA ni proteína acumulada en las plantas maduras. La proteína CTB fue cuantitativamente estimada en hojas y frutos de las plantas transgénicas. El máximo nivel de expresión en hojas fue de 0.02% del total de proteína soluble y en el fruto la máxima cantidad alcanzada fue de 0.04%. En un reporte anterior, Arakawa y col., (1998) expresaron CTB fusionada a la señal de retención en el retículo endoplásmico (Sekdel) en papas y alcanzaron hasta 0.3% de PTS, lo cual puede ser debido al uso de un promotor más fuerte (P2). En el 2002, se reportó la generación y caracterización de plantas de maíz productoras de LTB utilizando un gen sintético optimizado para plantas y analizaron el papel de dos promotores y la secuencia Sekdel en la acumulación de LTB en callos y mazorcas. El promotor constitutivo CaMV35S y el promotor de la gamma zeína, el cual dirige la expresión del gen al endospermo en maíz, regularon la expresión de LTB. Análisis por Southern blot confirmaron la integración del cassette de expresión en el genoma del maíz. Las plantas de maíz generadas a partir de un mismo evento de transformación mostraron un mismo diseño de inserción del transgen, así mismo en los resultados por Northern blot se observaron diferentes niveles en la expresión de RNA. En los análisis pro ELISA se demostró que

usando el promotor constitutivo, el nivel máximo detectado de la proteína LTB fue de 0.04% de TPS en callos y 0.01% en mazorcas. Usando el promotor de la gama zeína, el nivel de acumulación de LTB alcanzó el 0.07% en mazorca. Al incluir la secuencia Sekdel se observó un incremento en los niveles de LTB cuando se combinó con el promotor de la gama zeína. También se encontró variabilidad significativa en la expresión del gen entre eventos transgénicos y entre plantas generadas a partir del mismo evento de transformación (Chikwamba y col., 2002).

7.9. ANÁLISIS DE LA ANTIGENICIDAD DE LA PROTEÍNA DPT

Se distinguen cinco clases de inmunoglobulinas o anticuerpos, de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La clase de inmunoglobulina presente en mayor cantidad en la sangre es IgG la cual representa el 80 % de las inmunoglobulinas del suero y protege al torrente sanguíneo, tejidos corporales y órganos internos de infecciones contra bacterias, virus, toxinas, etc. El nivel de anticuerpos en la sangre es, por lo tanto, un reflejo de la exposición previa del organismo a un antígeno o sustancia que el cuerpo no reconoce como suyo. El cuerpo utiliza estos anticuerpos para atacar y eliminar elementos extraños (Abbas y Lichtman, 2004).

También es muy importante que el cuerpo sea protegido en las superficies que entran en contacto directo con el medio ambiente. Estos puntos son las superficies mucosas: la boca y la nariz, la garganta, las vías respiratorias del pulmón, el tracto gastrointestinal y los genitales. Los anticuerpos IgG, IgM e IgE se encuentran también en secreciones de las superficies mucosas, pero no en la misma cantidad que el anticuerpo IgA. Es, por esto que el IgA es conocido como el anticuerpo secretorio. La IgA representa la clase de inmunoglobulina predominante en las secreciones externas y juega un papel importante en la protección de las superficies mucosas contra infecciones, bloqueando a nivel de las mucosas la penetración de agentes patógenos al organismo (Corado y Mora, 2003).

Para comprobar la funcionalidad *in vivo* de las proteínas expresadas en tomate se realizaron estudios inmunológicos en donde se evaluó la producción de anticuerpos IgG, IgA, IgG2a e IgG1 en muestras de suero, lavados intestinales y traqueopulmonares obtenidos de ratones alimentados con las plantas transgénicas obtenidas.

Estos análisis se han realizado en casos similares para plantas que producen proteínas antigénicas. Curtiss y Cardineau, en 1990, realizaron y patentaron el primer trabajo de expresión de un antígeno en plantas, en el que expresaron la proteína antigénica de superficie de *Streptococcus mutans*, SpaA, en tabaco (especie utilizada como modelo por su fácil transformación y cultivo *in vitro*). Las plantas se incluyeron en la dieta de un grupo de ratones y estos desarrollaron una respuesta inmune de mucosas contra SpaA. Kapusta y col., (1999) expresaron el antígeno de superficie de la hepatitis B en lechuga y después de inmunizar ratones por vía oral se indujo una respuesta serica tipo IgG.

Otro estudio en ratones usando plantas que expresen los antígenos virales contra la diarrea, ha sido usando la proteína de la cápside del virus Norwalk (NVCP), el cual se ha producido en plantas de tabaco, y con ellas se ha alimentado a ratones, produciéndose una respuesta específica en el suero, principalmente IgG y IgA. También se ha expresado el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) en tabaco dando una respuesta similar que la que se obtienen cuando los ratones son inmunizados con levaduras recombinantes con el HBsAg (Tacket y Mason, 1999). De igual modo, ratones inmunizados por vía oral con maíz transgénico que expresa la sub unidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) indujo niveles elevados de anticuerpos IgG e IgA contra LTB (Chikwamba y col., 2002). En el 2004 se expresó la proteína VP4 de rotavirus en alfalfa, y se demostró que las plantas fueron efectivas para inducir anticuerpos protectores anti-rotavirus en ratones (Wigdorovitz y col., 2004). Resultados similares fueron reportados por Tregoning y col., (2005) cuando inmunizaron ratones por vía oral con el fragmento C de la toxina tetánica expresado en tabaco observaron niveles elevados de IgG e IgA.

En este trabajo se usaron ratones Balb/c de 12-14 semanas. El material vegetal (derivado de la línea 17) después de ser liofilizado y molido, fue administrado por vía oral (270 mg); con esta cantidad de tejido vegetal liofilizado se alcanzan dosis similares a las cantidades de toxoides diftérico y tetánico presentes en las vacunas comerciales. Cada grupo constó de 5 ratones a los cuales se les aplicaron tres dosis a los 0, 7 y 14 días, como se describió en la sección de metodología. Este diseño experimental ha sido utilizado en diversos estudios de inmunización utilizando ratones (Rojas-Hernández y col., 2004; Esquivel-Pérez y Moreno-Fierros, 2005).

Se ha comprobado que los adyuvantes inmunológicos desempeñan una función muy importante en los procesos de inducción y activación de la respuesta inmune, al producir el reclutamiento y activación de células accesorias, y la inducción de coestimuladores de la respuesta inmune. El desarrollo de vacunas de mucosas ha exigido la búsqueda de adyuvantes que logren elevar la respuesta humoral de anticuerpos IgA secretores. Esta reportado en la literatura que tanto CT como LTB actúan como adyuvantes fuertes de mucosas por tal motivo se incluyeron en el diseño experimental dos grupos los cuales recibieron además del tomate transgénico, el adyuvante CT y otro grupo LTB. (Pierre y Scheerlinck, 2001)

7.9.1. Evaluación de anticuerpos anti-DPT en suero

Después de extraer el suero de los animales inmunizados, se realizó un análisis por ELISA para evaluar la producción de anticuerpos del tipo IgG contra difteria, tos ferina y tétanos. Como se observa en la Figura 19, la absorbancia registrada a 492 nm, es significativamente mayor en los grupos problema comparada con la lectura registrada en el grupo control (WT), indicando con ello la producción de anticuerpos específicos para cada toxoide. En este experimento, se observa, además que el efecto adyuvante de CT como LTB no producen una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta sérica a IgG respecto a T-DPT ($P < 0.05$).

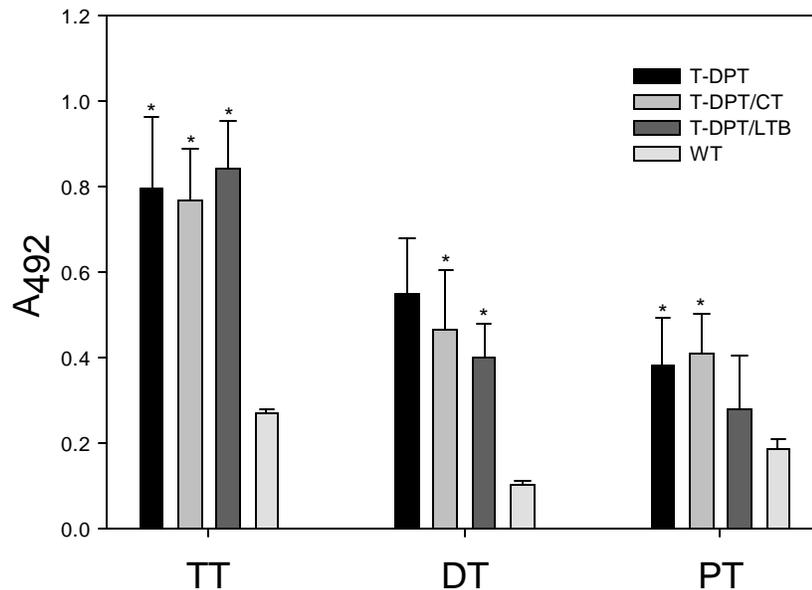


Figura 19. Respuesta anti-DPT en suero (IgG). Ratones BALB/c fueron alimentados con tres dosis de 270 mg de tomate transgénico solo (T-DPT) o co-administrado con 5 μ g de toxina de cólera (T-DPT/CT) o 5 μ g de sub unidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) producida en zanahoria (T-DPT/LTB) por vía oral. Las muestras analizadas por ELISA fueron diluidas 1:10. Se registra el valor medio A_{492} , de cada grupo experimental (n=5). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre grupos. TT: Toxoide tetánico, DT: Toxoide diftérico, PT: Toxoide pertúsico.

7.9.2. Evaluación de anticuerpos traqueo-pulmonares anti-DPT

Como control positivo se administró por vía intramuscular la vacuna comercial Quadracel, los valores de absorbancia registrados corresponden al doble comparado con los valores registrados por la vía de administración oral, estos datos no se incluyen en las graficas, pues se incluyó a este grupo como referencia solo para estandarizar la técnica de ELISA.

En el líquido traqueo-pulmonar, se observó una mayor respuesta del tipo IgA que IgG, aún así en todos los grupos la respuesta del tipo IgG fue significativamente diferente al grupo alimentado con tomate sin transformar. Para la respuesta tipo IgA se observa, al adicionar los adyuvantes CT y LTB, una mayor

respuesta hacia los epítopes diftérico y tetánico, mientras que para el caso de IgG se registró mayor respuesta (estadísticamente significativa) al adicionar CT en los tres casos. Después de la inmunización oral con las plantas de tomate, los ratones respondieron mayormente hacia el epítipo tetánico y diftérico y muestran una menor respuesta hacia el epítipo pertúsico (Fig. 20).

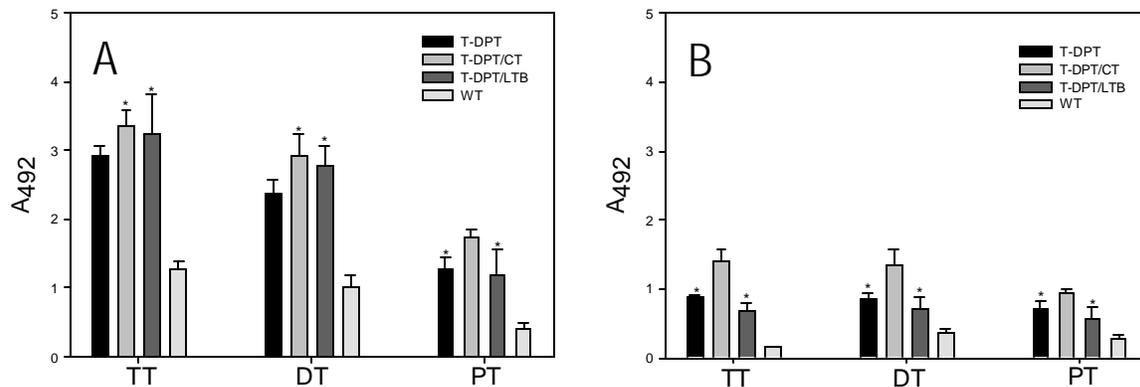


Figura 20: Respuesta anti-DPT en líquidos traqueopulmonares. Ratones BALB/c fueron alimentados con tres dosis de 270 mg de tomate transgénico solo (T-DPT) o co-administrado con 5 μ g de toxina de cólera (T-DPT/CT) o 5 μ g de sub unidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) producida en zanahoria (T-DPT/LTB) por vía oral. Niveles de anticuepos hacia (A) IgA y (B) IgG fueron analizados por ELISA en muestras diluidas 1:2. Se registra el valor medio A_{492} , de cada grupo experimental (n=5). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre grupos. TT: Toxoide tetánico, DT: Toxoide diftérico, PT: Toxoide pertúsico.

7.9.3. Evaluación de anticuerpos intestinales anti-DPT

En los fluidos intestinales, todos los grupos inmunizados con DPT con o sin adyuvante adicional presentaron valores de IgA superiores a los de IgG ($P < 0.05$). En general se observó una respuesta baja de IgA y de IgG hacia el epítipo pertúsico. CT tiene efecto adyuvante sobre la respuesta hacia IgG para el caso del epítipo tetánico ($P < 0.05$); en contraste, la co-administración de LTB no mostró efecto adyuvante adicional en ninguna de las dos respuestas (IgA e IgG). Niveles similares de IgA fueron inducidas en los ratones inmunizados con las plantas transgénicas con o sin adyuvante adicional, pero fueron diferentes

estadísticamente respecto al grupo alimentado con la planta no transformada. CT tiene un ligero efecto adyuvante sobre la respuesta a IgA hacia el epítipo tetánico. Para los epitopos diftéricos y pertúsicos CT o LTB no tienen efecto adyuvante (Fig. 21)

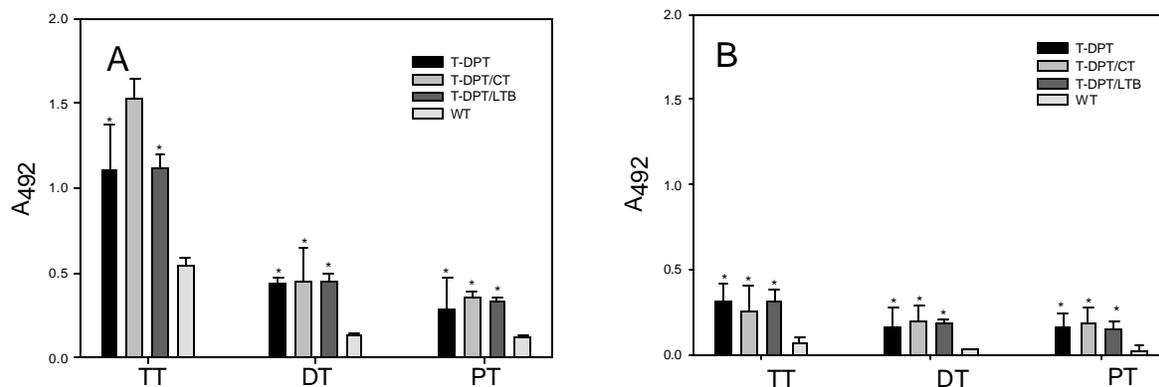


Figura 21: Respuesta anti-DPT en fluidos intestinales. Ratones BALB/c fueron alimentados con tres dosis de 270 mg de tomate transgénico solo (T-DPT) o co-administrado con 5 µg de toxina de cólera (T-DPT/CT) o 5 µg de sub unidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) producida en zanahoria (T-DPT/LTB) por vía oral. Niveles de anticuepos hacia (A) IgA e (B) IgG fueron analizados por ELISA en muestras diluidas 1:2. Se registra el valor medio A₄₉₂, de cada grupo experimental (n=5). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05) entre grupos. TT: Toxoide tetánico, DT: Toxoide diftérico, PT: Toxoide pertúsico

7.9.4. Evaluación de seroanticuerpos anti-DPT (IgG1, IgG2a)

Es posible que las vacunas, además de ocasionar una respuesta específica, ejerzan una intervención global sobre el sistema inmunitario; concretamente, se piensa que puedan modificar el equilibrio funcional de los linfocitos CD4 o Th. El estímulo de los linfocitos CD4 por algunos antígenos da lugar a una respuesta TH1 caracterizada por la secreción de gamma interferón, interleucina 2, e interleucina 12. Esta respuesta origina una población de linfocitos citotóxicos, que es fundamental en la defensa y aclaramiento de infecciones producidas por microorganismos intracelulares, como bacterias, protozoos y virus. Los linfocitos CD8 citotóxicos así generados, reconocen a los microorganismos intracelulares.

Esta respuesta citotóxica está dirigida contra un gran número de péptidos del agente infeccioso, lo que impide el escape de éste por variación antigénica (Azuma, 1992).

Otros antígenos desencadenan una respuesta TH2 al ser reconocidos por los linfocitos CD4. En este caso se produce una secreción de interleucina 4, interleucina 5, interleucina 6 e interleucina 10. Esta respuesta favorece la producción de anticuerpos que median la destrucción de organismos extracelulares. Los anticuerpos neutralizantes previenen, además, las infecciones por algunos virus y otros microorganismos al neutralizarlos antes de que alcancen el receptor celular y puedan entrar en la célula. Los anticuerpos, sin embargo, pueden contribuir a la destrucción de células infectadas por virus que expresan el antígeno en su superficie, por dos mecanismos: citotoxicidad dependiente de anticuerpos, y lisis de las células por anticuerpos más complemento. Es característico que los anticuerpos estén dirigidos contra algunos epítomos del antígeno, a diferencia de la respuesta celular. Por lo tanto, es importante seleccionar los antígenos de la vacuna para generar las respuestas deseadas. Las vacunas dirigidas a prevenir infecciones intracelulares, como la malaria, infección por VIH, u otros virus, deben ser capaces de generar respuestas citotóxicas. Por el contrario, una respuesta humoral vigorosa puede neutralizar las toxinas de algunos gérmenes (difteria y tétanos) o neutralizar virus circulantes, como los enterovirus (Azuma, 1992; Aucouturier y col., 2000).

Parece comprobado que los toxoides, tetánico o diftérico, la vacuna antipertussis acelular y especialmente los adyuvantes de aluminio, exacerban las respuestas de tipo Th2. Por el contrario algunas otras vacunas, como la de BCG, sarampión, pertussis de célula entera, y coadyuvantes derivados de productos bacterianos, son estimulantes de una respuesta de tipo Th1 que promueve inmunidad celular retardada y citotoxicidad (Gerard y col., 2001).

A fin de caracterizar el tipo de la respuesta inmune inducida (Th1 o Th2), se cuantificaron por ELISA las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG2a en los sueros de los ratones inmunizados con las plantas transgénicas, se observó una mayor

respuesta sérica del tipo IgG1 comparada con IgG2a. CT presenta un efecto adyuvante sobre la respuesta a IgG1 pero no sobre IgG2a para los toxoides diftérico y pertúsico ($P < 0.05$). La respuesta más alta registrada hacia IgG1 fue alcanzada en el grupo donde se administró el tomate transgénico con el adyuvante CT (Fig. 22). En general, se observó mayor respuesta de anticuerpos del tipo IgG1, lo cual es producto de una respuesta Th2 o humoral, lo cual concuerda con lo reportado por Tregoning y col., (2005) quienes observaron que la respuesta sistémica del tipo IgG1 domina sobre la respuesta IgG2a en ratones vacunados con el fragmento C de la toxina tetánica expresado en cloroplastos de tabaco, al igual que en nuestro trabajo, en este reporte, al adicionar como adyuvante a CT, incrementan los niveles de IgG1. Estos autores demostraron también que el incremento en los niveles de anticuerpos debido a la adición de CT no son necesarios para conferir protección ante el desafío por la toxina tetánica.

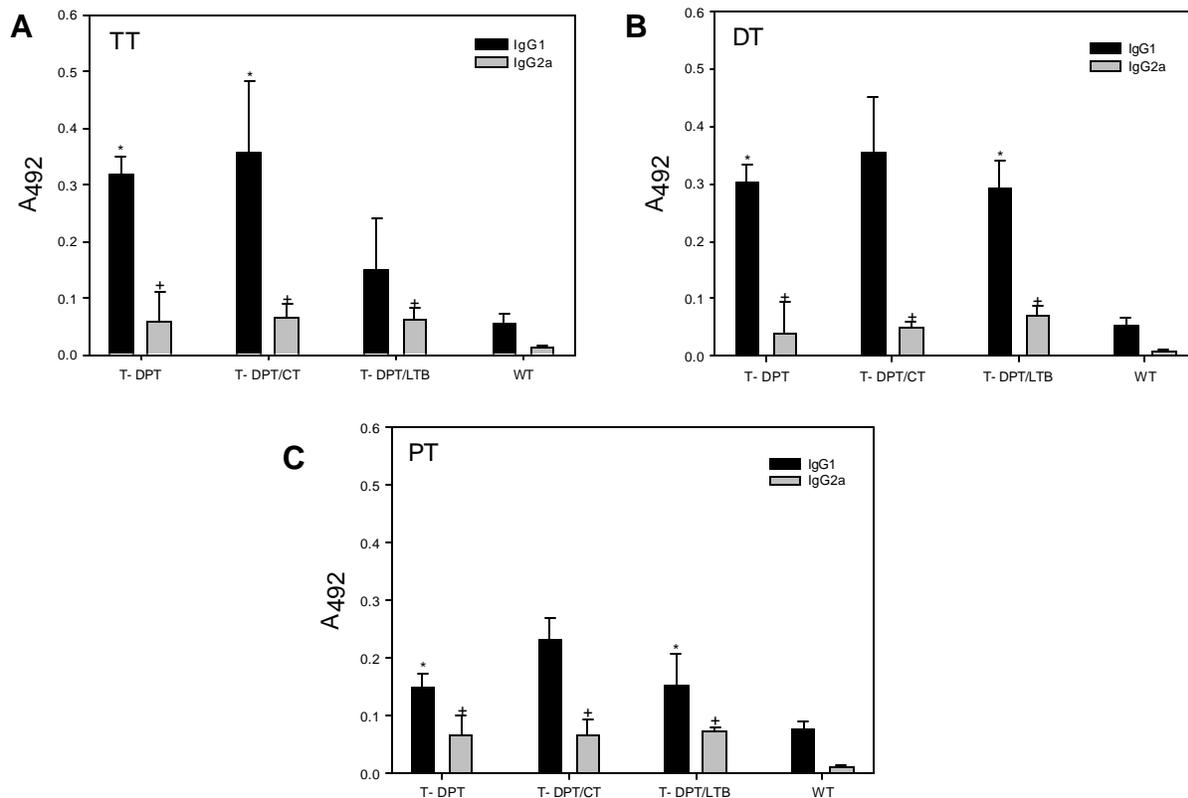


Figura 22: Respuesta anti-DPT en suero, IgG1/ IgG2a. Ratones BALB/c fueron alimentados con tres dosis de 270 mg de tomate transgénico solo (T-DPT) o co-administrado con 5 μ g de toxina de

cólera (T-DPT/CT) o 5 µg de sub unidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) producida en zanahoria (T-DPT/LTB) por vía oral Las muestras analizadas por ELISA fueron diluidas 1:10. Se registra el valor medio A_{492} , de cada grupo experimental (n=5). (A) Subclases de IgG para el toxoide tetánico (TT), (B) Subclases de IgG para el toxoide diftérico (DT), (C) Subclases de IgG para el toxoide pertúsico (PT). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre grupos.

La posibilidad de producir antígenos en plantas permite suponer que en un futuro habrá una nueva generación de vacunas en las que los antígenos serán producidos y transportados por alimentos. Más allá del obvio alivio de evitar jeringas y agujas, la verdadera ventaja de esto consiste en facilitar el acceso masivo de la población a las campañas de vacunación.

El objetivo de este proyecto fue expresar epítomos inmunoprotectores de enfermedades relevantes en salud pública, tales como difteria, tos ferina y tétanos mediante el diseño y construcción de un polipéptido sintético no existente en la naturaleza, que supone no producirá efectos secundarios, con el fin de desarrollar modelos de vacunas comestibles. Los resultados obtenidos demuestran que la inmunización de ratones con plantas de tomate conteniendo el gen sintético sDPT inducen respuesta inmune sistémica y de mucosas sin la presencia de un adyuvante adicional exogeno, lo cual revela que las proteínas antigénicas son funcionales *in vivo* y podrán ser utilizadas en fases posteriores del desarrollo de vacunas, como ensayos clínicos en humanos.

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 mejorar significativamente la vacuna DPT como lo demanda la organización Mundial de la Salud y ser de interés a las compañías farmacéuticas productoras de vacunas.



El presente trabajo fue finalista en la convocatoria Premios a la Innovación en Salud y Alimentación y despertó interés en el congreso de Plant Biology por investigadores que han comercializado productos farmacéuticos.

VIII. CONCLUSIONES:

Los resultados del presente trabajo demuestran que :

- 1) La transformación nuclear de tomate mediante co-cultivo de *Agrobacterium* con el vector binario pBI121 portador del gen sintético DPT (sDPT) permite la obtención de tomates transgénicos (variedad AC) con características fisiológicas similares a su contraparte no transformada.
- 2) La proteína recombinante codificada por el gen *sDPT* (con codones optimizados para su expresión en tomate) y expresados bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, tiene la antigenicidad esperada en los tomates T₀, los cuales demostraron ser funcionales *in vitro* al detectarse los epítopes de las exotoxinas por ELISA.
- 3) La línea 17 de tomate T₀ induce inmunidad anti-DPT de mucosas y sistémica en ratones inmunizados por vía oral con el fruto transgénico.
- 4) La inmunidad anti-DPT es predominantemente humoral.
- 5) Los genes sintéticos permiten expresar polipéptidos multiepítopo inmunogénicos en plantas comestibles.

IX. PERSPECTIVAS

1. Probar

- a. Si los tomates DPT T₁ son antigénicos e inmunogénicos en ratones
- b. Si la inmunización parenteral de ratones con la vacuna DPT refuerza la inmunización oral con tomates DPT
- c. Si la inmunización oral de ratones con tomates DPT con o sin refuerzo parenteral protege del reto letal de las toxinas diftérica y tetánica

2. Incrementar los niveles de expresión transformando cloroplastos

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A, Lichtman A (2004) En: Propiedades generales de las respuestas inmunitarias, Células y tejidos del Sistema Inmunitario, Apéndice I 5ed. Goldsby R, Kindt T (eds) Madrid: Elsevier, 478- 492.
- Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WHR (1998) A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnology* 16: 934–938.
- Arntzen C, Mason H, Mahoney R, Kirk D (2004) Oral vaccines derived from transgenic plants. En: Vaccines: Preventing Disease and Protecting Health, Scientific Publication, No. 596. De Quadros C (ed) Washington, DC: Pan American Health Organization, 256-262.
- Arntzen C, Plotkin S, Dodet B (2005) Plant-derived vaccines and antibodies: potential and limitations. *Vaccine* 23: 1753–1756.
- 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.
- Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V (2000) Adjuvants designed for human vaccines. *Vaccine* 19:2666-2672.
- Audibert F, Jolivet M, Chedid L, Alouf J, Boquet P, Rivaille P, Siffert O (1981) Active antitoxic immunization by a diphtheria toxin synthetic oligopeptide. *Nature* 289:593–594.
- Azuma I (1992) Synthetic immunoadjuvant applications to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine* 10:1000-1006.
- Backstrom M, Holmgren J, Schodel F, Lebens M (1999) Characterization of an internal permissive site in the cholera toxin B-subunit and insertion of epitopes from human immunodeficiency virus-1, hepatitis B virus and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gene* 165:163–171.

- Bagdasarian MM, Nagai M, Frey J, Bagdasarian M (1999) Immunogenicity of *Actinobacillus* ApxIA toxin epitopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. *Vaccine* 17: 441–447.
- Barbieri JT, Armellini D, Molkenin 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.
- Belanger H, Fleysh N, Cox S, Bartman G, Deka D, Trudel M, Koprowski H, Yusivob V (2000) Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB Journal* 14: 2323-2328.
- Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willrnitzer L, Muller M (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* 77(17):9211-9220.
- Bigio M, Rossi R, Nucci D, Antoni G, Rappuoli R, Ratti G (1987) Conformational changes in diphtheria toxoids: Analysis with monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 218:271–276.
- Birboin HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bogorad L (2000) Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol* 18: 257–263.
- Boucher P, Sato H, Sato Y, Locht 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.
- Bradford MM (1979) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Campins M, Moraga F (2002) (Eds) *Vacunas. Prous Science* 1999-2001. Barcelona.
- Carter III JE, Langridge WHR (2002) Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. *Crit Rev Plant Sci* 21: 93–109.

- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res* 11(5):479-493.
- Choi NW, Estes MK, Langridge WH (2005) Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in transgenic potato. *Mol Biotechnol* 31(3):193-202.
- Christensen AH, Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* 5:213-218.
- Corado A, Mora S. (2003) En: Sistema Inmunitario de Piel y Mucosas 1ed. Moncayo JI, Santacruz (eds) Valencia: Alfa Impresores; 317-319.
- Corthesy B, Spertin F (1999) Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 380(11):1251-62.
- Cortina C, Culiañez-Macia FA (2004) Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76(3):269-275.
- Curtis RI, Cardineau CA (1990) Oral immunization by transgenic plants. World Patent Application, WO 90/02484
- Dalla-Pozza T, Yan H, Meek D, Guzman CA, Walker MJ (1998) Construction and characterization of *Salmonella typhimurium aroA* simultaneously expressing the five pertussis toxin subunits. *Vaccine* 16:522-529.
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci* 7:84-91.
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Sci* 6:219-226.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21.
- Dixon B (1995) The third vaccine revolution. A look at the development of vaccines in today's laboratories. *Bio/Technology* 13:420.

- Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T (2005) Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 339(2):153-163.
- Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol* 11:199-204.
- Esquivel-Pérez R, Moreno-Fierros L (2005) Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. *Viral Immunol* 18: 695-708.
- Figueiredo D, Turcotte D, Frankel G, Li Y, Dolly O, Wilkin G, Marriott D, Fairweather N, Dougan G (1995) Characterization of Recombinant Tetanus Toxin Derivatives Suitable for Vaccine Development. *Infect. Immun* 63: 3218-3221
- Frankel AE, Ramage J, Latimer A, Feely T, Delatte S, Hall P, Tagge E, Kreitman R, Willingham M (1999) High level synthesis and maximal purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DTGM for phase I clinical trials. *Protein Express Purif* 16:190–201.
- Gardner P, Peteter G (2001) (eds). Vaccine Recommendations. Challenges and controversies. *Infect Dis Clin of North Am* 15:1.
- Gerard G, Baudson N, Kraemer K, Bruck C, Garcon N, Paterson Y (2001) Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations. *Vaccine* 19:2583-2586.
- Gerathy KC (1984) DPT Immunization and SIDS. *J Pediatr* 105:169-170.
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Biotechnol* 12:450-454.
- Goldschmidt-Clermont M (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of chlamydomonas. *Nucl Acid Res* 19:4083-4089.
- Gomord V, Faye L (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 7:171-181.



- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral Immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.
- Harcus AW, Ward AE, Roberts JC, Bryerr KA (1989) An evaluation of Diphtheria-tetanus (adult) vaccine in unselected human volunteers. *J Int med Res* 17:262-267.
- Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP (2000) The role of M cells in mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 57(2):323-32.
- Hayakawa S, Uchida T, Mekada E, Moynihan MR, Okada Y (1983) Monoclonal antibody against diphtheria toxin. Effect on toxin binding and entry into cells. *J. Biol. Chem* 258:4311–4317
- Hinman AR, Koplan J (1984) Pertussis and pertussis vaccine: Reanalysis of benefits, risks, and costs. *JAMA* 251:3109-3113.
- Horn ME, Pappu KM, Bailey MR, Clough RC, Barker M, Jika JM, Howard JA, Streatfield SJ (2003) Advantageous features of plant-based systems for the development of HIV vaccines. *J Drug Target* 11: 539-545.
- Horvath H, Huang J, Wong O, Kohl E, Okita T, Kannangara CG (2000) The production of recombinant protein in transgenic barley grains. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1914-1919.
- <http://www.infoagro.com>
- Huang J, Wu L, Yalda D, Adkins Y, Seller SL, Crane M, Lonnerdal B, Rodriguez RL, Huang N (2002) Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture. *Transgenic Res* 11:229-239.
- Ivanoff B, Robertson SE (1997) Pertussis: a worldwide problem. En: Pertussis vaccine trials. Developmental Biological Standards. Brown F, Greco D, Mastrantonio P, Salmaso S, Wassilak S. (Eds) Basel: Karger Vol. 89. pp.3–13.
- Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haq QM, Singh Y, Sharma AK, Tyagi AK (2002) Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 11(5):447-454.

- Jani D, Singh NK, Bhattacharya S, Meena LS, Singh Y, Upadhyay SN, Sharma AK, Tyagi AK (2004) Studies on the immunogenic potential of plant-expressed cholera toxin B subunit. *Plant Cell Rep* 22:471-477.
- Kang TJ, Lee WS, Choi EG, Kim JW, Kim BG, Yang MS (2006) Mass production of somatic embryos expressing *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in *Siberian ginseng*. *J Biotechnol* 121(2):124-133.
- Kapusta J, Moldeska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Korpowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999) A plant-derived vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13:1796-1799.
- Karasev AV, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I, Hone D, Koprowski H, Reitz M (2005) Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* 23(15):1875-1880.
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo JM, Bazin R, Darveau A, Castanguay Y, Allard G, Lemieux R, Vezma LP (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol Bioeng* 64:135-143.
- Kirk DD, Webb S (2005) The next 15 years: Taking plant-made vaccines beyond proof of concept. *Immunol Cell Biol* 83:248-256.
- Kjeldsen K, Simonsen O, Heron Y (1985) Immunity against diphtheria 25-30 years after primary vaccination in childhood. *The Lancet* 1:900-902.
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1539-11544.
- Koo M, Bendahmane M, Lettieri GA, Paoletti AD, Lane TE, Fitchen JH, Buchmeier MJ, Beachy RN (1999) Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by nasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7774-7779.
- Koprowski H, Yusibov V (2001) The green revolution: Plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19: 2735-2741.

- 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(12):8266-8274.
- Koziel MG, Carozzi NB, Desai N (1996) Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol Biol* 32:393-405.
- Kusnadi AR, Hood EE, Witcher DR, Howard JA, Nkolov ZL (1998) Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol Prog* 14(1):149-155.
- Lamm ME (1997) Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *An Rev Microb* 51:311-340.
- Langridge WHR (2000) Edible vaccines. *Scientific American* 283(3): 48-53.
- Laurterslager TGM, Florack DEA, van der Wal TJ, Molthoff JW, Langeveld JPM, Bosch D, Boersma WJA, Hilgers LT (2001) Oral immunization of naïve and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine* 19: 2749-2755.
- Lee SF, Halperin SA, Knight JB, Tait A (2002) Purification and immunogenicity of a recombinant *Bordetella pertussis* S1S3FHA fusion protein expressed by *Streptococcus gordonii*. *Appl Env Microbiol* 68:4253-4258.
- 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.
- Liljeqvist S, Stahl S, Andreoni C, Binz H, Uhlen M, Murby M (1997) Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding. *J Immunol Meth* 210: 125–135.
- Liu HL, Li WS, Lei T, Zheng J, Zhang Z, Yan XF, Wang ZZ, Wang YL, Si LS (2005) Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochem Biophys Sin (Shanghai)* 37(3):153-158.
- Lobeck K, Drevet P, Leonetti M, Fromen-Romano C, Ducancel F, Lajeunesse C, Lemaire C, Menez A (1998) Towards a recombinant vaccine against diphtheria toxin. *Infect Immun* 66:418-423.

- Ma S, Huang Y, Yin Z, Menassa R, Brandle JE and Jevnikar AM (2004) Induction of oral tolerance to prevent diabetes with transgenic plants requires glutamic acid decarboxylase (GAD) and IL-4. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5680–5685.
- Makoff AJ, Ballantine SP, Smallwood AE, Fairweather NF (1989) Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli*: its purification and potential use as a vaccine. *Biotechnology* 7:1043-1046.
- Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP (2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol* 51(4):459-469.
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and protein and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5335-5340.
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16(13):1336-1343.
- Mason HS, Man-Kit D, Arntzen CJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11745-11749.
- Mayer L (2000) Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30:54-12.
- McCormick AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, Hakim I, Grill LK, Tuse D, Levi S, Levi R (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:703-708.
- McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowsk H, Michaels FH (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* 13(13):1484-1487.
- Miler E, Rush M (1994) Immunity to diphtheria in adults in England. *Brit Med J* 308:598-560.

- 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.
- Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu FZ, Steplewski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V (1998) Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2481-2485.
- Moffat AS (1995) Exploring transgenic plants as a new vaccine source. *Science* 268:658-660.
- Molina A, Veramendi J, Hervas-Stubbs S (2005) Induction of neutralizing antibodies by tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology* 342:266-275.
- Mortimer J, Melville-Smith M, Sheffield F (1986) Diphtheria vaccine for adults. *The Lancet* 2:1182-1183.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-479.
- Napier JA, Richard G, Shewry R (2005) Trafficking and stability of heterologous proteins in transgenic plants. In *Methods in Biotechnology: Vol 3: Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds*. Cunningham LC and Porter AJR (Eds) Totowa, NJ: Human Press, pp. 189-202.
- Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN, Gamberini M, Quintilio W, Gebara VC, Cardoso DF, Ho PL, Raw I, Winter N, Gicquel A, Rappuoli B, Leite LC (2000) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. *Infect Immun* 68:4877-4883.
- O'Dowd AM, Botting CH, Precious B, Shawcross R, Randall RE (1999) Novel modifications to the C-terminus of LTB that facilitate site-directed chemical coupling of antigens and the development of LTB as a carrier for mucosal vaccines. *Vaccine* 17:1442-1453.
- Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, Hallander HO, Heijbel H (1997) Randomized controlled trial of two-component, three-component and five-component

- acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccines. *Lancet* 350:1569–1577.
- Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McOherson, S.L. y Fischhoff, D.A. (1991) Modification of the coding sequence enhances plants expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3324-3328.
- Pierre J, Scheerlinck S (2001) Genetic adjuvant for DNA vaccines. *Vaccine* 19:2647-2656.
- Rappuolli R, Podda A, Giovannoni F, Neucioni L, Peragallo M, Francolini P (1993) Absence of protective immunity against diphtheria in a large porportion of young adults. *Vaccine* 11:576-577.
- Ribas AV, Ho PL, Tanizaki MM, Raw I, Nascimento AL (2000) High-level expression of tetanus toxin fragment C-thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 31:91-94.
- Rice J, Ainley WM, Shewen P (2005) Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. *Animal Health Research Reviews* 6:199-209.
- Rigano MM, Alvarez ML, Pinkhasov J, Jin Y, Sala F, Arntzen CJ, Walmsley AM (2004) Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 22(7):502-508.
- Rigano MM, Walmsley AM (2005) Expression system and developments in plant-made vaccine. *Immunol Cell Biol* 83:271-277.
- Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy M, López-Revilla R, Reséndiz-Albor A, Moreno-Fierros L (2004) Intranasal coadministration of the cry1ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infec Immun* 72: 4368-4375.
- Rolf JM, Eidels L (1993). Structure-function analyses of diphtheria toxin by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun* 61:994–1003
- Romanos MA, Makoff AJ, Fairweather NF, Beesley KM, Slater DE, Rayment FB, Payne MM, Clare JJ (1991) Expression of tetanus toxin fragment C in yeast:

- gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Res* 19:1461-1467.
- Runeberg-Nyman K, Engstrom O, Lofdahl S, Ylostalo S, Sarvas M (1987) Expression and secretion of pertussis toxin S1 in *Bacillus subtilis*. *Microb Pathog* 3:461-468.
- Sala F, Rigano MM, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione S (2005) Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* 21:803-808.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Press, New York, USA.
- Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier L, Korban SS, Osadjan MD, Buetow DE (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Research* 9:127-135.
- Shin EA, Lee JY, Kim TG, Park YK, Langridge WH (2006) Synthesis and assembly of an adjuvanted *Porphyromonas gingivalis* fimbrial antigen fusion protein in plants. *Protein Expr Purif* 47(1):99-109.
- Simonsen O, Kjeldsen K, Vendborg HA, Heron Y (1986) Revaccination of adults against diphtheria 1: Responses and reactions to different doses of diphtheria toxoid in 30-70 years-old persons with low serum antitoxin levels. *Acta Path Microbiol Scand* 94:213-218.
- Snowden SL, Langridge WHR (2003). Plant-based mucosal immunization. *Biotech Gen Eng Rev* 20: 165–182.
- Streatfield SJ, Howard JA (2003) Plant-based vaccine. *International Journal for Parasitology* 33:479-493.
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodars SL, Beifuss K, Horn ME, Delaney DE, Tizard LR, Howard JA (2001) Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 19: 2742-2748.
- Sutter RW, Cochi SL, Brink EW, Sirotkin BI (1990) Assessment of vital statistics and surveillance data for monitoring tetanus mortality. *Am J Epidemiol* 131:132-142.

- Tacket, CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Wasserman SS, Levine MM, Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial-antigen delivered in transgenic potato. *Nat Med* 4: 607-609.
- Tacket CO, Mason HS (1999) A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect* 1:777-783.
- Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA, Streatfield S (2004) Immunogenicity of recombinant LT6 delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine* 22:4385-4389.
- Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N, Goodwin P, Arntzen C (2005) Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3378-3382.
- Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3358-3361.
- Tortorella D, Sesardic D, Dawes CS, London E (1995) Immunochemical analysis of the structure of diphtheria toxin shows all three domains undergo structural changes at low pH. *J Biol Chem* 17:27439-27445.
- Tregoning JS, Nixon O, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 31(4):1174-11.
- Tregoning J, Clare S, Bowe F, Edwards L, Fairweather N, Qazi O, Nixon P, Maliga P, Dougan G, Hussell T (2005) Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine. *Eur. J. Immunol.* 35: 1320–1326.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotech* 12:570-578.
- Tyagi AK (2001) Plant genes and their expression. *Curr Sci* 80:161-169.
- Urieto JO, Liu T, Black JH, Cohen KA, Hall PD, Willingham MC, Pennell LK, Hogge DE, Kreitman RJ, Frankel AE (2004) Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DT388IL3 for phase I clinical trials. *Protein Expr Purif* 33:123-133.



- Van Ginkel FW, Nguyen HH, McGhee JR (2000) Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Em Infect Dis* 6(2):123-132.
- Verch T, Yusibov V, Koprowski H (1998) Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J Immunol Methods* 220: 69-75
- Vermij P (2004) Edible vaccines not ready or main course. *Nat Med* 10:881.
- VRD (1998) Global Programme for Vaccines and Immunization Vaccine Research and Development. Report of the Technical Review Group Meeting, Geneva, World Health Organization.
- Walker MJ, Rohde M, Timmis KN, Guzman CA (1992) Specific lung mucosal and systemic immune responses after oral immunization of mice with *Salmonella typhimurium aroA*, *Salmonella typhi* Ty21a, and invasive *Escherichia coli* expressing recombinant pertussis toxin S1 subunit. *Infect Immun* 60:4260-4268.
- Walmsley AM, Arntzen CJ (2000) Plants for delivery of edible vaccines, *Curr Opinion Biotech* 11: 126-129.
- Walmsley AM, Arntzen CJ (2003) Plant cell factories and mucosal vaccines. *Curr Opinion Biotech* 14:145-150.
- Wassilak SGF, Orentein WA (1988) Tetanus. En: Vaccines, Plotkin SA, Mortimer EA (eds). WB Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc Philadelphia, EEUU, 45-73.
- WHO (1986) Report Annual Incidence of Diphtheria, measles, pertusis, poliomyelitis, tetanus and tuberculosis, 1974-1984 Geneva.
- WHO (1993) Global Situation. Immunization coverage. Expanded Programme on Immunization.
- WHO (1999) Informal consultation on the control of pertussis with whole cell and acellular vaccines. Geneva (www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF99/www9911.pdf)
- WHO (2002) World Health Statistics Annual. 222-357.
- WHO (2004) (<http://www.who.int/>)

- Wigdorovitz A, Mozgovej M, Dus Santos M, Parreño M, Gómez C, Pérez-Filgueira D, Trono K, Ryos R, Franzone P, Fernández F, Carrillo C, Babiuk L, Escribano J, Borca M (2004) Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *J Gen Virol* 85: 1825–1832.
- Yoshimori T, Yamada M, Sugawa H, Mekada E, Uchida T, Okada Y (1984) Monoclonal antibodies against diphtheria toxin fragment A. Characterization and introduction into living cells. *Exp. Cell Res* 151:344–353
- Yu J, Langridge WH (2000) Novel approaches to oral vaccines: delivery of antigens by edible plants. *Curr Infect Dis Rep* 2: 73-77.
- Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper DC, Koprowski H (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5784-5788.
- Zhang H, Zhang X, Liu M, Zhang J, Li Y, Zheng CC (2006) Expression and characterization of *Helicobacter pylori* heat-shock protein A (HspA) protein in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Biotechnol Appl Biochem* 43:33-38.
- Zhang T, Li E, Stanley SLJ (1995) Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SREHP antibody response. *Infect Immun* 63:1349–1355.
- Zucker D, Murphy J (1984) Monoclonal antibody analysis of diphtheria toxin. I. Localization of epitopes and neutralization of cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 21:785–793

XI. APÉNDICE

En esta sección se mencionan los trabajos publicados o en preparación generados durante mis estudios de doctorado.

11.1 Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene

Ruth Elena Soria-Guerra, Sergio Rosales-Mendoza, Crisóforo Márquez-Mercado, Rubén López-Revilla, Rosalba Castillo-Collazo y Ángel G. Alpuche-Solís

RESUMEN

Una prioridad actual en el área de vacunas es el desarrollo de subunidades y multicomponentes que protejan contra varios patógenos. La vacuna triple DPT (difteria, tos ferina y tétanos) previene los síntomas de estas tres enfermedades serias y frecuentemente fatales debido a las exotoxinas producidas por *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* y *Clostridium tetani*. Intentamos desarrollar una vacuna comestible multicomponente DPT en plantas, basada en la fusión de epítomos protectivos de las exotoxinas codificadas por un gen sintético. Por medio de transformación mediada por *Agrobacterium* generamos tomates transgénicos con un gen sintético optimizado para plantas codificado por un polipéptido novedoso conteniendo dos adyuvantes y seis epítomos inmunoprotectores de las exotoxinas DPT unidos por péptidos conectores. En las plantas de tomate transformadas, la integración del gen sintético DPT (sDPT) detectada por PCR fue confirmada por Southern blot y transcritos específicos del peso molecular esperado fue detectado por RT-PCR. La expresión del polipéptido esperado codificado por el gen sDPT fue detectado por inmunoensayos con anticuerpos específicos para las exotoxinas diftérica, pertúsica y tetánica. El gen sDPT, está por lo tanto, integrado, transcrito y traducido como el polipéptido



multiepítopo sDPT recombinante esperado en los tomates transgénicos lo cual constituye como una vacuna comestible potencial.

Artículo aceptado en *Plant Cell Report* (2007)

11.2 Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in carrot (*Daucus carota* L.)

Rosales-Mendoza S, **Soria-Guerra RE**, Olivera-Flores MTJ, López-Revilla R, Arguello-Astorga G, García-de La Cruz RF, Loyola-Rodríguez JP y Alpuche-Solís AG.

RESUMEN

Expresamos en zanahoria la subunidad B de la toxina termolábil de *Escherichia coli* codificada por gene sintético con codones optimizados. Se empleó un método de transformación genética mediado por *Agrobacterium*. Después de seis meses de cultivo *in vitro*, se regeneraron treinta líneas transgénicas vía embriogénesis somática, las cuales fueron transferidas a suelo y crecidas en invernadero. Se empleó el método GM1-ELISA para determinar el contenido de LTB en raíces de plantas adultas. Algunas líneas transgénicas expresaron hasta un 0.3% de la proteína total soluble (PTS), lo cual es diez veces mas alto que los niveles de expresión reportados previamente usando el gen bacteriano nativo. Así, este ensayo inmunológico confirmó el correcto ensamblaje del complejo pentamérico y la actividad *in vitro* de la proteína LTB recombinante, sugiriendo que puede resultar funcional para la prevención de la diarrea (Aceptado en *Plan Cell Report*, 2007)

11.3 Immunogenicity of a polypeptide encoded by a synthetic gene containing *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* and *Clostridium tetani* exotoxin antigen sequences expressed in tomato plants

Ruth E. Soria-Guerra, Sergio Rosales-Mendoza, Rubén López-Revilla, Leticia Moreno-Fierros y Ángel Alpuche-Solís

RESUMEN

La vacuna DPT fue diseñada para inmunizar contra la difteria, pertusis y tétanos, y ha demostrado ser muy efectiva para proteger humanos. Sin embargo hay descontento con la formulación que contiene células completas debido a la reactogenicidad que presenta, lo cual ha impulsado desarrollo de nuevas formulaciones. Estudios recientes en este laboratorio, han establecido que es posible generar plantas transgénicas de tomate expresando un gen sintético optimizado para plantas, el cual codifica para un polipéptido recombinante conteniendo los principales epítomos inmunoprotectores de las exotoxinas diftérica, pertúsica y tetánica y dos adyuvantes. En este estudio, examinamos si la proteína recombinante expresada en las plantas de tomate puede inducir anticuerpos específicos en animales. Ratones BALB/c fueron inmunizados por vía oral con el material vegetal en tres dosis semanales. En el día 21, los ratones fueron sacrificados y se colectaron muestras de suero, lavados intestinales y traqueopulmonares. El suero analizado para respuesta del tipo IgG hacia las toxinas pertúsica, tetánica y diftérica mostró respuesta serológica a los antígenos foráneos estadísticamente significativa respecto al tomate sin transformar. En el lavado traqueopulmonar se observó mayormente una respuesta del tipo IgA. Encontramos una respuesta más alta del sub-tipo IgG1 que IgG2a en suero, lo cual es producto de una respuesta Th2 o humoral. Los niveles de respuesta en estos grupos fueron mayores que en el grupo de animales que recibieron tomate sin transformar. Para analizar la inmunidad protectora es necesario evaluar por



desafío letal utilizando las toxinas diftérica, pertúsica y tetánica (Artículo enviado a *Plant Sci*).

11.4 Expresión del gen sintético DPT en cloroplastos de tabaco y lechuga

Este trabajo se elaboró en una estancia en la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign en colaboración con el Profesor Schuyler Korban.

RESUMEN

Uno de los principales inconvenientes de la producción de proteínas recombinantes en plantas transgénicas por transformación nuclear es el bajo nivel de expresión (generalmente inferior al 1% de la proteína soluble total) lo que hace difícil la aplicación a gran escala y su explotación empresarial.

En los últimos años la transformación del genoma de los plástidos se ha convertido en un blanco atractivo para la ingeniería genética. Cada célula vegetal puede tener aproximadamente 100 cloroplastos y cada cloroplasto contiene 100 copias de la estructura genética de la planta, con lo cual se pueden obtener altos niveles de expresión del transgén, otras ventajas sobre la transformación del genoma nuclear son: (a) es posible expresar el transgen como un “operón”, o sea con varias secuencias codificantes bajo el control de un mismo promotor, (b) no se observa efecto de posición debido a que la integración del transgen está dirigida a un sitio particular del plastoma, lo cual hace posible que no sea necesario obtener una gran población de transformantes, a diferencia de lo que actualmente ocurre con las plantas transgénicas nucleares, (c) no se observa silenciamiento de transgenes y (d) se minimiza la dispersión de los transgenes debido a que los plástidos se transmiten de forma materna.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue generar plantas transplastómicas que expresen el gen sintético *sDPT* optimizado para cloroplastos de tabaco y lechuga. La estrategia consistió en el re-diseño el gen sintético *sDPT* optimizado para expresión en cloroplastos de tabaco y lechuga además de un sitio para unión a ribosomas. También usamos vectores con secuencias homólogas al genoma del cloroplasto para su integración por doble recombinación homóloga. Por otro lado el protocolo de transformación usado fue biobalística, método comúnmente empleado para la obtención de plantas transplastómicas.

La estrategia para generar un vector para transformación de cloroplastos se basó en el empleo del vector pKCZ-P'UTR, generado por Herrera-Díaz (2006). El primer paso consistió en deletar el fragmento delimitado por los sitios *SpeI* y *NheI*, que contiene el cassette de expresión para *aadA*, para después religar el vector y obtener la construcción pKCZ-P5'UTRdel. En el siguiente paso, a partir del vector pKCZ-P5'UTR original, se liberó el fragmento *SmaI-EcoRV*, que contiene el cassette de expresión para *aadA* y fue clonado en los sitios *AfeI* y *PmlI* del vector pKCZ-P5'UTRdel, a fin de obtener el vector pBic. Finalmente el gen *sDPT* fue clonado en los sitios *XbaI* y *XhoI* del vector pBic, para dar lugar al vector pBic-DPT, que contienen un cassette bicistronico para los genes *aadA* y *sDPT*, en donde su expresión está regulada por el promotor *Prrn* de origen cloroplástico y la region 5'UTR del fago ϕ que potencia la traducción (Kuroda y Maliga, 2001). El cassette de expresión se encuentra flanqueado por regiones del plastoma de tabaco, las cuales median la recombinación homóloga que hace posible la integración sitio específica de la construcción.

Se realizaron ensayos de biobalística con la construcción pBic-DPT utilizando hojas de plantas de tabaco cultivado *in vitro*. Se logró obtener un explante a las 6 semanas, con la capacidad de crecer en medio selectivo (500 mg/l de espectinomicina). Este brote resultó positivo por PCR para el gen DPT lo cual sugiere que contamos con un explante transplastómico. La reacción de PCR incluyó oligonucleótidos específicos para el gen sDPT. En el caso de la lechuga, hasta el momento se tiene algunos callos verdes creciendo en medio de selección (50 mg/l de espectinomicina). El trabajo futuro para este proyecto consistirá en completar dos rondas de selección más en el agente de selección para la obtención de plantas homoplastómicas para estos cultivos y posteriormente cuantificar y caracterizar la proteína de fusión producida por ensayos *in vitro* (ELISA) e *in vivo* (en ratones Balb/c). Este sería el primer trabajo de la expresión de un gen sintético que codifica para una proteína multiepitope para antígenos relevantes de difteria, tos ferina y tétanos en cloroplastos (Artículo en preparación).



Referencias:

Herrera-Díaz A. (2006) Tesis de maestría.

Kuroda H y Maliga P (2001) Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 29:970-975.



11.5 Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics

Daniel E. Noyola. Angel G. Alpuche-Solis, Areli Herrera-Díaz, **Ruth E. Soria-Guerra**, Josefina Sánchez-Alvarado y Rubén López-Revilla.

Este proyecto se elaboró en colaboración con la UASLP, Facultad de Medicina en colaboración con el Dr. Daniel Loyola Cherpitel.

RESUMEN

El metapneumovirus humano (hMPV) es un virus respiratorio de RNA recientemente descrito que afecta principalmente a los niños. Hasta la fecha no ha habido reportes que describan la detección de este virus en México. Este estudio fue realizado para detectar hMPV en niños mexicanos hospitalizados con infecciones respiratorias, y describe sus características epidemiológicas y clínicas. Muestras de lavados nasales de 558 niños menores de 3 años de edad con el diagnóstico de admisión de infección en el tracto respiratorio fueron evaluados. Virus respiratorios fueron detectados en 221 niños (Virus Sincitial respiratorio (VSR), 193 (34.6%); Virus influenza, 13 (2.3%); Virus parainfluenza, 15 (2.7%). Secreciones respiratorias de 323 niños en los cuales la presencia de estos virus fue excluida (131 admitidos durante el periodo de 2002-2003 y 192 durante el periodo 2003-2004) fueron evaluados para infección por hMPV. El genoma de hMPV fue detectado en 34 muestras por amplificación usando RT-PCR en tiempo real. Las secuencias de los amplicones correspondientes al genN de la nucleocápside y el análisis filogenético indican la predominancia del genotipo A de hMPV. Los meses con el número más alto de detecciones de hMPV fueron Febrero y Marzo. Durante el periodo del 2003-2004 epidemias de hMPV y VSR ocurrieron simultáneamente. La presentación clínica de infección por hMPV fue indistinguible de las otras infecciones respiratorias. A excepción de una muerte, el pronóstico de infecciones por hMPV fue bueno. En este estudio, entre los virus

rutinariamente evaluados, el hMPV fue el segundo agente más común, después de VSR, en niños menores de 3 años hospitalizados con infecciones del tracto respiratorio.

Artículo publicado: *Journal of Medical Microbiology* (2005), 54: 969-974

11.6 Detección de sepsis neonatal por PCR

Este proyecto se elaboró en colaboración con el Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" en colaboración con la Dra. Victoria Lima Rogel.

RESUMEN

La sepsis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en neonatos. Actualmente el método más utilizado para establecer el diagnóstico de sepsis es el hemocultivo. El 98% de los cultivos que serán positivos se identifican a las 72 horas de incubación, sin embargo, la positividad de los hemocultivos en sepsis neonatal no supera el 80 - 85%, por lo que un resultado negativo en presencia de factores de riesgo y clínica compatible no descarta la infección. El objetivo de este trabajo fue comparar la técnica de reacción en polimerización en cadena (PCR) con el diagnóstico establecido por hemocultivo. Se obtuvo sangre de neonatos con sospecha de sepsis (Diciembre 2004-Junio 2005) y se aisló el ADN utilizando el kit "UltraClean DNA BloodSpin". Se analizaron las muestras por PCR utilizando oligonucleótidos universales para el ARNr 16S (U1: 5'- CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG y U2 5' ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC), las muestras positivas para ARNr 16S fueron analizadas utilizando oligonucleótidos específicos para las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae* las cuales son las más comúnmente encontradas por hemocultivos positivos para sepsis neonatal. En 93 muestras de sangre en las que se sospechaba episodio de sepsis, 17 casos fueron positivos por PCR para ARNr 16S, mientras que por hemocultivo solo fueron 8 casos positivos, 7 de estas 8 muestras fueron positivas por PCR y por hemocultivo. Los microorganismos encontrados por hemocultivo por PCR fueron *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus sp.*, *E. cloacae*, *Streptococcus grupo D* y *Enterococcus sp.* De las

17 muestras positivas por PCR para ARNr 16S, 9 fueron positivas utilizando oligos específicos para patógenos, Las muestras restantes fueron identificadas por secuenciación del producto obtenido del PCR para ARNr 16S y fueron: *Klebsiella sp* (3), *P. aeruginosa* (1) y cromosomas humanos (4). El diagnóstico de sepsis neonatal e identificación de bacterias por PCR ofrece alta especificidad y sensibilidad a un menor tiempo, lo que haría posible prevenir las complicaciones de la enfermedad y por ende ofrecer un nivel de atención óptimo, individualizando cada caso según el riesgo presentado (Artículo en preparación).

11.7 Aislamiento de un cDNA que codifica para una expansina de guayaba

Este proyecto se elaboró en colaboración con el Dr. Francisco Morales de la UAA.

RESUMEN

Las expansinas son proteínas que se encuentran en la pared celular vegetal y tienen un peso molecular entre 25 y 28 kDa. Inducen relajación de la pared celular no hidrolíticamente permitiendo su extensibilidad y una expansión celular. Se han identificado y aislados expansinas de diferentes plantas y su expresión es dependiente de tejido y órgano específico así como, de la etapa de desarrollo y estímulos hormonales o de luz. Se han clasificado en dos familias, las α y las β -expansinas, y presentan un 25% de homología. Se ha sugerido que ambos grupos de proteínas trabajan de manera similar, pero en diferentes polímeros de la pared celular. Las expansinas pueden tener aplicaciones biotecnológicas. En este trabajo se aisló un ADNc que codifica para una expansina de guayaba. Se aislaron muestras de RNA de fruto de guayaba (*Psidium guajava*) y luego se sintetizó cDNA de doble cadena utilizando el kit Super Script First-Strand Syntesis System for RT-PCR. Se aisló la expansina mediante PCR utilizando los oligos: F: 5'-GCACATGCTACATTTTACGGC y R: 5' TTGCCAATTTTGTCCCAATT, donados por el Dr. Francisco Morales. El fragmento fue aislado y purificado utilizando el kit QIAquick PCR purification kit de Qiagen, clonado mediante el sistema pGem-T (Promega) y finalmente secuenciado. Como resultado se la secuenciación obtuvimos un fragmento de 900 bp. Análisis por Blast revela homología con una alta identidad entre las secuencias de expansina presentes en otras especies. Se pueden identificar algunos residuos críticos para la función biológica propuesta. Por otro lado se analizó si la expresión era tejido y etapa de maduración específicos. Por RT-PCR se observó que solo se expresa en fruto y no en tallo, hoja ni raíz. También se observó que a los 10 días de maduración es en el que se expresa mayoritariamente. La clona de ADNc fue usada por el grupo del Dr.



Francisco Morales para expresarla en vectores de expresión bacterianos. La caracterización enzimática está en proceso (Artículo en preparación).