



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

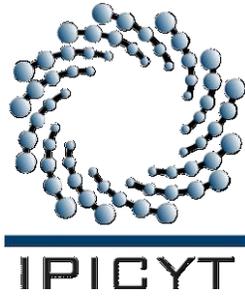
**Gen sintético que codifica péptidos antigénicos del  
virus sincicial respiratorio: diseño y expresión en  
sistemas vegetales**

Tesis que presenta  
**Benita Ortega Berlanga**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Director de Tesis:  
**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

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



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Gen sintético que codifica péptidos antigénicos del virus sincicial respiratorio: diseño y expresión en sistemas vegetales**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Benita Ortega Berlanga** y aprobada el **16 de Julio de 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel G. Alpuche Solís  
(Director de la tesis)

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

Dr. Rubén López Revilla  
(Asesor de la tesis)

Dr. Sergio Rosales Mendoza  
(Asesor de la tesis)



## **Créditos institucionales**

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 233531) y apoyo del proyecto de Investigación de Ciencias Básicas SEP-CONACYT (No. 56980).



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

En la ciudad de San Luis Potosí a los 16 días del mes de julio del año 2009, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Benita Ortega Berlanga**

sobre la Tesis intitulada:

*Gen sintético que codifica péptidos antigénicos del virus sincicial respiratorio: diseño y expresión en sistemas vegetales*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 14:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 16 días del mes de julio de 2009.

**Mtra. Ivonne Lizétes Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## Dedicatorias

A DIOS.

A mis padres y hermano, por todo el apoyo y cariño brindado.

A TODA mi familia.

A mi abuelito Lupe y Marco.

A mis tías: Guadalupe y Lilia. A mis tíos: Juan y Feluel. A mi abuelita Benita, porque desde allá arriba siguen guiando mis pasos a donde quiera que voy.

“La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces”

**Aristóteles**

## Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Dr. Ángel Alpuche Solís por sus enseñanzas y apoyo para la realización de este trabajo, por permitirme ser parte de su grupo de investigación.

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

Al Dr. Sergio Rosales por todas las enseñanzas, consejos y apoyo dado para el presente trabajo. Por brindarme su amistad.

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

A mis padres Rosalba Berlanga y Nicolás Ortega por tener siempre la palabra correcta que me alentó a seguir adelante, por ser mi guía y mis primeros maestros.

A mi hermano Nicolás Ortega por su apoyo y cariño.

A Emmanuel Orta por su apoyo.

A Marcela y Gael por la amistad brindada.

A los compañeros y amigos del laboratorio 1 de “Biología Molecular de Plantas” Especialmente a Pablo, Mayra, Luzmila, Karla, Aurora, Ruth, Rosy, Vero, Hugo y Omar, por sus consejos y ayuda.

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

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

## ÍNDICE

	Página
Carátula	i
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen de grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Infecciones respiratorias	2
2.2. Virus sincicial respiratorio	3
2.2.1. Epidemiología	3
2.2.2. Biología y estructura	4
2.2.3. Replicación y transcripción	5
2.2.4. Proteínas del virus	6
2.2.5. Inmunología	7
2.2.6. Medidas profilácticas y terapéuticas	8
2.2.6.1. Inmunoprofilaxis pasiva	8
2.2.6.2. Vacunas contra VSR	8
2.3. Vacunación	11
2.3.1. Principales tipos de vacunas	11
2.3.2. Vacunas recombinantes	12
2.3.3. Plantas usadas como bioreactores	12
2.3.4. Vacunas comestibles	13
2.3.5. Vacunas en plantas contra VSR	14
2.4. Estrategias utilizadas para mejorar la producción de proteínas recombinantes en plantas	15
2.5. Transformación genética de plantas	16
2.5.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
2.5.2. Biobalísitica	19

---

2.5.2.1.	Transformación de cloroplastos	19
2.5.2.2.	Vectores virales	20
2.6.	Plantas utilizadas y sus características	23
2.6.1.	Tabaco	23
2.6.2.	Lechuga	24
2.6.3.	Soya	24
3.	OBJETIVOS	25
3.1.	Objetivo general	25
3.2.	Objetivos específicos	25
4.	MATERIAL Y EQUIPO	26
4.1.	Material biológico	26
4.2.	Vectores	27
4.3.	Reactivos	28
4.4.	Equipo	31
5.	METODOLOGÍA	33
5.1.	Diseño de genes sintéticos para los epítomos de las proteínas F y G del VSR	33
5.1.2	Diseño de un gen sintético con actividad antiviral	35
5.2.	Construcciones genéticas	36
5.2.1.	Construcciones para transformación nuclear	36
5.2.1.1.	Estrategia general	36
5.2.1.2.	Clonación del gen sintético VSRn en el vector pBI121	37
5.2.2.	Construcciones para transformación de cloroplastos	38
5.2.2.1.	Clonación del gen VSRsc en el vector pBIC	38
5.2.3.	Construcciones para transformación transitoria	38
5.2.3.1	Vectores Magnifection	38
5.2.3.2	Clonación del gen VSRn en el vector pICH11599	39
5.2.3.3	Clonación del gen VSRpa en el vector pICH11599	40
5.3.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción pBI-VSRn	40
5.4.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción pICH11599-VSRn	41
5.5.	Protocolos de regeneración	42
5.5.1.	Lechuga	42
5.5.2.	Tabaco	43

---

5.5.3. Soya	43
5.6. Obtención de explantes	44
5.6.1. Lechuga	44
5.6.1.1. Obtención de hojas cotiledonarias.	44
5.6.2. Tabaco	45
5.6.2.1. Obtención de hojas jóvenes.	45
5.7. Ensayo de transformación nuclear vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
5.7.1. Lechuga	45
5.7.2. Tabaco	45
5.8. Ensayos de transformación genética de cloroplastos por el método de biobalística.	46
5.8.1. Obtención del explante	46
5.8.2. Preparación de la suspensión de micropartículas de oro	46
5.8.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco	47
5.8.3.1. Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés	47
5.8.3.2. Bombardeo de hojas de tabaco (Pistola Bio-Rad)	47
5.9. Transformación genética transitoria de plantas de tabaco	48
5.9.1. Obtención de plantas de tabaco	48
5.9.2. Agroinfiltración de plantas de tabaco	48
5.10. Análisis de transformantes	48
5.10.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	49
5.10.1.1. Extracción de ADN genómico	49
5.10.1.2. Protocolos de PCR	50
5.10.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	51
5.10.2.1. Extracción de la proteína total soluble	51
6. RESULTADOS	52
6.1. Diseño de genes sintéticos para los epítomos de las proteínas F y G del VSR	52
6.1.1. Diseño de un gen sintético con actividad antiviral	57
6.2. Construcciones genéticas	58
6.2.1. Construcción nuclear (VSRn)	59
6.2.2. Obtención del 5'UTR	60
6.2.3. Digestión del vector binario	61
6.2.4. Digestión del gen VSRn	61
6.2.5. Clonación del 5'UTR y del gen VSRn en el vector pBI-121	62

---

6.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
6.4. Proceso general para obtención de plantas transgénicas de lechuga y tabaco vía <i>A. tumefaciens</i>	64
6.5. Transformación genética nuclear vía <i>A. tumefaciens</i> conteniendo el plásmido pBI-VSRn	65
6.5.1. Lechuga	65
6.5.2. Análisis de transformantes	65
6.5.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa	65
6.5.3. Tabaco	67
6.6. Construcción para la transformación de cloroplastos de tabaco	67
6.6.1. Clonación del gen VSRc en el vector pBIC	67
6.6.2. Transformación genética de cloroplastos de tabaco por el método de biobalística	69
6.7. Transformación transitoria de tabaco	70
6.7.1. Vectores magniffection	70
6.7.2. Clonación del gen VSRn en el vector pICH11599	71
6.7.3. Clonación del gen VSRpa en el vector pICH11599	72
6.7.4. Transformación genética transitoria de plantas de tabaco con el plásmido pICH-VSRn	72
6.7.5. Análisis de las transformantes de tabaco obtenidas mediante transformación transitoria	73
6.7.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	73
6.8. Protocolo para la regeneración de soya	74
7. DISCUSIÓN	75
8. CONCLUSIONES	79
9. PERSPECTIVAS	80
10. REFERENCIAS	81
11. APÉNDICE	90

**Lista de tablas**

<b>Número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Principales causas de hospitalización por enfermedades de las vías respiratorias	4
2	Principales tipos de vacunas experimentales contra el VSR	9
3	Enzimas utilizadas para comprobar la identidad de los vectores magnifecton, así como el tamaño de banda esperado en cada caso.	39
4	Descripción del protocolo usado para la transformación genética de lechuga en este trabajo.	43
5	Secuencia de aminoácidos de los epítopos incluidos en el diseño de los genes sintéticos que codifican la proteína antigénica del VSR.	52

**Lista de figuras**

<b>Número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Principales agentes etiológicos en los diferentes padecimientos respiratorios	2
2	Estructura del virus sincicial respiratorio	5
3	Comparación de costos en diferentes sistemas de expresión de proteínas heterólogas	13
4	Esquematzación a grandes rasgos de la producción de una vacuna comestible.	14
5	Transferencia de genes por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a células vegetales	17
6	Diagrama de la transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> usando vectores binarios.	18
7	Los diferentes módulos que conforman los vectores de magniffection	21
8	Gen sintético para transformación nuclear	34
9	Gen sintético para transformación de cloroplastos	35
10	Gen sintético que expresa un péptido con actividad antiviral	36
11	Análisis de las secuencias de los genes sintéticos por medio del programa <i>Antheprot</i> .	53
12	Primera construcción, gen para transformación nuclear (VSRn)	55
13	Segunda construcción, gen para transformación de cloroplastos (VSRc)	56
14	Tercera construcción, gen para transformación de cloroplastos (VSRc)	56
15	Cuarta construcción, gen que codifica para un péptido con actividad antiviral	57
16	Gen uno (VSRn)	58
17	Digestión de las cuatro construcciones	59
18	PCR de la construcción 5'UTR-LTB-ST	60
19	Obtención del 5'UTR	60
20	Digestión del vector pBI-121 con las enzimas <i>Sma</i> I y <i>Sac</i> I	61
21	Digestión del gen VSRn con las enzimas <i>Nco</i> I y <i>Sac</i> I	61

Número	Título	Página
22	Digestión con <i>Hind</i> III y <i>Nco</i> I de las dos clonas resistentes a la selección	62
23	Digestión con <i>Xba</i> I y <i>Sac</i> I	63
24	Plásmido pBI-VSRn usado para la transformación nuclear de tabaco y lechuga	63
25	Representación esquemática de la transformación de plantas vía <i>Agrobacterium</i>	64
26	Formación de callos y brotes de lechuga regenerados a partir de cotiledones infectados con el plásmido binario pBI-VSRn	65
27	Productos de PCR mostrando el gen de selección <i>nptII</i> en callos de lechuga	66
28	Productos de PCR para amplificar específicamente un segmento del gen VSRn correspondiente a 347pb.	66
29	Formación de brotes de tabaco regenerados a partir de hojas infectadas con el plásmido binario pBI-VSRn	67
30	Digestión con las enzimas <i>Xba</i> I y <i>Xho</i> I,	68
31	Vector bicistrónico pBIC-VSRc para transformación de cloroplastos de tabaco.	69
32	Proceso de transformación de hojas de tabaco por el método de biobalística.	69
33	Ensayo de restricción para comprobar la identidad de cada uno de los siete vectores magniffection.	70
34	Digestión de la clonación del gen VSRn en el vector pBI-121	71
35	Expresión de la proteína verde fluorescente en hojas de tabaco utilizando los vectores magniffection	73
36	PCR para amplificar específicamente un segmento del gen VSRn correspondiente a 347pb	73
37	Esquematización del protocolo de regeneración de soya establecido en el presente trabajo	74

## RESUMEN

El virus sincicial respiratorio (VSR) es el principal patógeno del tracto respiratorio bajo en niños de todo el mundo. La infección por VSR causa cerca de 100,000 hospitalizaciones en Estados Unidos, con costos que ascienden a \$300 millones de dólares anuales. A pesar de la importancia del VSR como un patógeno respiratorio, no existe actualmente una vacuna disponible en el mercado.

Este trabajo se enfocó al desarrollo de construcciones que codifiquen epítopos antigénicos de las proteínas F, G y M, del VSR optimizados para su expresión estable en citoplasma y los cloroplastos de plantas, así como para su expresión transitoria mediante vectores virales para su producción con altos niveles .

Se diseñó una construcción genética pBI-VSRn que consta de cuatro epítopos del VSR (dos de la proteína F, uno de la proteína G y uno de la proteína M), optimizada para el uso de codones en plantas y cuenta además con espaciadores ricos en prolina y con una región del virus del sarampión; esto último con la finalidad que influya en el balance de respuesta Th1/Th2; que ha sido una limitante en trabajos previos en el desarrollo de vacunas contra VSR. Con esta construcción se realizó la transformación genética de plantas de tabaco y lechuga vía *Agrobacterium tumefaciens*, lográndose obtener callos y brotes resistentes al agente de selección; de los cuales se pudieron analizar por PCR los callos de lechuga demostrándose la presencia del transgén en 6 de 15 muestras analizadas.

Se inició además la transformación de cloroplastos de tabaco mediante el método de biobalística y estamos en el proceso de obtención de brotes.

Por otra parte se usó por primera vez en nuestro grupo de trabajo la técnica de transformación transitoria mediada por vectores virales denominada "Magnifection", la cual tiene ventajas de transfección por *Agrobacterium* y la alta tasa de replicación viral y por ende de producción de proteína recombinante en 4 semanas. Mediante esta técnica se logró la transformación genética de plantas de tabaco con la construcción pICH-VSRn, obteniéndose resultados positivos para la presencia del transgén mediante PCR.

Aunado a lo anterior, se llevó a cabo el diseño de un gen sintético que codifica un péptido con actividad antiviral (Rho A) contra el VSR, con el objetivo de buscar alternativas adicionales al control de la replicación del virus.

Finalmente se logró la regeneración *in vitro* de plantas de soya, con el fin de utilizar este sistema vegetal para futuras transformaciones genéticas, en las cuales se pueda obtener de manera estable una mayor proporción de proteína total soluble con mayor vida de anaquel.

Los materiales obtenidos por transformación transitoria serán analizados *in vitro* e *in vivo* para ver su antigenicidad e inmunogenicidad y el balance de respuesta inducida Th1/Th2, así como los materiales resultantes de la transformación nuclear y de cloroplastos.

## ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of lower respiratory tract infections in children worldwide. VSR infections cause around 100,000 hospitalizations in the USA, with costs of more than \$300 million dollars per year. However, in spite of RSV importance as a respiratory pathogen, still, there is no a successful vaccine in the market.

In this work, we developed a set of constructions encoding plant-optimized sequences of epitopes derived from the antigenic F, G and M proteins of RSV. These vectors were optimized for stable plant transformation in order to obtain the transgene expression into nuclear and chloroplast genome and also for viral-based transient expression.

The pBI-VSRn vector carries four RSV epitopes (two from the F protein, one from the G protein and one from the M protein), which were optimized for codon usage in plants. This construct also has proline-rich linkers and a measles virus region that is though may balance the Th1/Th2 immune response, which has been a limiting factor in previous works on the development of vaccines against RSV. With this plasmid, the genetic transformation of tobacco and lettuce plants via *Agrobacterium tumefaciens* was performed. We obtained callus and shoots for both plants resistant to the selection marker, and the presence of the transgene in six of the fifteen lettuce shoots was demonstrated by PCR assay.

As for tobacco chloroplast transformation, the pBIC-VSRc plasmid was bombarded and calli are under development.

In the other hand, the “Magninfection” technique, a viral-based transient expression system, was used for the first time by our research group. Here we exploit the advantages of *Agrobacterium*-mediated delivery of viral vectors, which have high replication rate resulting in a systemic transfection of a plant and therefore in high yields of recombinant proteins in short time. Using this technique, tobacco plants were transformed with the construct pICH-VSRn and the transgene presence was confirmed by PCR analysis.

In addition, we designed a synthetic gene that encodes a peptide (Rho A) with antiviral activity against RSV, as an approach to search new alternatives for the RSV virus replication control.

Finally, *in vitro* plant regeneration of soybean was achieved. This method will be used as an alternative for future plant genetic transformation, because seeds offer higher protein yield production total soluble protein with longer shelf life than other plant systems.

The tobacco and lettuce obtained in this work, will be analyzed *in vitro* and *in vivo* assays for their antigenicity and immunogenicity respectively, focusing in the Th1/Th2 balance of the immune response induced in the *in vivo* assays.

## **1 .Introducción**

La Organización Mundial de la Salud estima que 18.3 millones de personas mueren a causa de enfermedades infecciosas alrededor del mundo, de las cuales 3.96 millones son causadas por infecciones respiratorias (Openshaw y col., 2005). A pesar de que la vacunación ha logrado erradicar algunas enfermedades infecciosas tales como la viruela, aun existen padecimientos que impactan la salud de la población mundial y para los cuales no se cuenta con una vacuna accesible; un ejemplo de ello son las infecciones respiratorias, las cuales afectan principalmente a niños, ancianos y personas inmunosuprimidas.

En la actualidad gracias a la biotecnología, se han podido desarrollar nuevas estrategias para el diseño de vacunas; un ejemplo de esto son las técnicas de manipulación de ADN que permiten tomar un gen foráneo e introducirlo a otro organismo.

Durante las dos últimas décadas las plantas han sido usadas intensamente como modelo de investigación para la producción de proteínas de interés terapéutico, así como para la producción de vacunas. Se ha visto que este sistema alternativo para la producción de proteínas recombinantes ofrece varias ventajas sobre los sistemas de expresión tradicionales, tales como: disminución de los costos, producción a gran escala, se evita la transmisión de enfermedades presentes en otros sistemas, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas recombinantes permiten la producción de proteínas biológicamente activas lo cual no se da en otros sistemas, además de que el producto de interés se puede producir en tejidos comestibles lo que lleva a la entrega del fármaco sin procesamiento adicional (Lico y col., 2008).

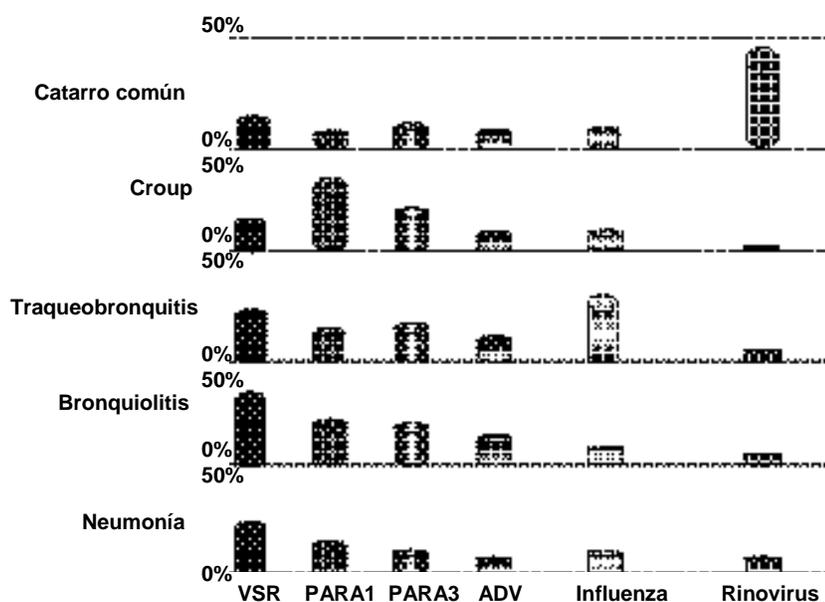
Dado los resultados positivos y los beneficios de producir proteínas biológicamente activas en plantas, el presente trabajo explora la posibilidad de expresar péptidos antigénicos en sistemas vegetales que produzcan una respuesta inmune adecuada contra el virus sincicial respiratorio (VSR), uno de los principales patógenos de las vías respiratorias bajas y para el cual no existe actualmente una vacuna eficaz disponible en el mercado.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Infecciones respiratorias

Para el año 2002 la Organización Mundial de la Salud estimó que 18.3 millones de personas mueren a causa de enfermedades infecciosas alrededor del mundo, de las cuales 3.96 millones son causadas por infecciones respiratorias; el 95% de las defunciones por infecciones respiratorias se deben a afección del tracto respiratorio bajo (Openshaw y col., 2005.)

Las infecciones respiratorias se presentan principalmente en niños menores de 5 años y en ancianos mayores de 65 años. Los principales agentes etiológicos de las enfermedades respiratorias son los virus, entre los cuales destacan los virus de la influenza, parainfluenza, rinovirus y virus sincicial respiratorio, siendo éste último el principal agente causal de bronquiolitis y neumonía (Rosete y col., 2002) (Fig. 1).



**Figura 1.** Principales agentes etiológicos en los diferentes padecimientos respiratorios. VSR: Virus sincicial respiratorio; PARA1: parainfluenza 1; PARA3: parainfluenza 3; ADV: adenovirus. Tomado de Rosete y col., 2002

## **2.2 Virus sincicial respiratorio**

En 1956 Morris y col. aislaron un nuevo virus a partir de un grupo de chimpancés que estaban resfriados; a este virus lo llamaron agente de la coriza del chimpancé. Posteriormente Chanock y col. (1957) lograron aislar este virus en dos niños con enfermedades de las vías respiratorias bajas; a partir de entonces el agente fue llamado virus sincicial respiratorio (VSR) haciendo alusión a su principal manifestación histopatológica que es la formación de sincicios (fusión de membranas celulares).

### **2.2.1 Epidemiología**

El VSR es el principal patógeno de las vías respiratorias bajas en niños en todo el mundo. Para la edad de 2 años >90% de los niños se ha infectado con este virus (Tabla 1)(Noyola y col., 2007; van Drunen y col., 2007). La Organización Mundial de la Salud estima una infección anual y mortalidad de 64 millones y 160,000 respectivamente. Las manifestaciones clínicas de la infección por VSR incluyen rinitis, otitis media, bronquiolitis y neumonía (Ruuskanen y col., 1989).

Las lesiones patológicas causadas por el VSR incluyen bronquitis, necrosis epitelial bronquiolar, oclusión bronquiolar, inflamación del parénquima pulmonar y exudación alveolar (Stott y col., 1985). A pesar que el VSR afecta a todos los grupos etarios los lactantes (< 18 meses) y ancianos son los grupos que sufren la forma más severa de la infección (Simoes y col., 1999). La tasa de mortalidad en niños es de 0.1-2.5% y en ancianos de hasta un 10% (Falsey y col., 2000; Kneyber y col., 2000).

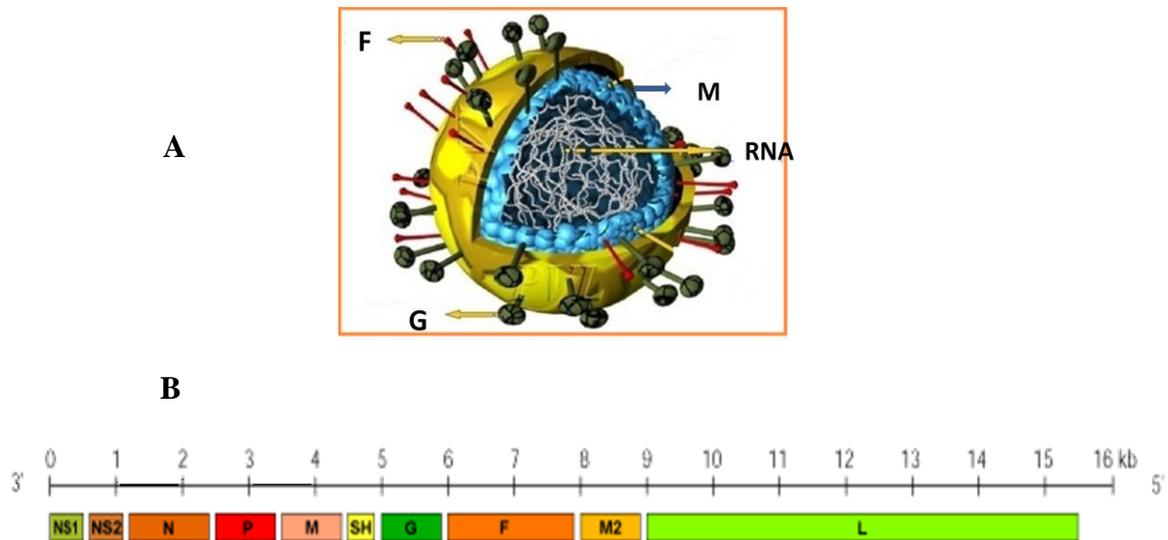
**Tabla 1.** Principales causas de hospitalización por enfermedades de las vías respiratorias (Noyola y col., 2005).

Virus detectados en niños hospitalizados con infección respiratoria aguda (Hospital Central, SLP, 2002-2004).	
Virus	Porcentaje
VSR	34.6%
Metapneumovirus humano	10.5%
Parainfluenza	2.7%
Influenza	2.3%

### 2.2.2 Biología y estructura

El VSR se encuentra clasificado como un virus que pertenece al género *Pneumovirus*, familia *Paramyxoviridae*. El virión del VSR consiste de una nucleocápside contenida dentro de una envoltura lipídica, su tamaño varía entre 150-300nm. Hay tres proteínas transmembranales que se organizan formando espículas (F, G y SH) y la proteína de matriz (M) que conecta la nucleocápside con la envoltura lipídica (Vergara y col., 2006) (Figura 2A).

Es un virus de ARN de cadena sencilla, no segmentada y de sentido negativo. Su genoma está compuesto por 15,222 nucleótidos y codifica 10 ARN mensajeros. Los 10 genes virales se ordenan con sentido 3' al 5' de la siguiente manera: NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L (Figura 2B). El ARN mensajero para M2 contiene dos marcos de lectura que codifican dos diferentes proteínas: M2-1 y M2-2 (Vergara y col., 2006).



**Figura 2.** Estructura del virus sincicial respiratorio. A) Estructura del virus mostrando la distribución espacial de las proteínas. B) Organización del genoma. Tomado de Vergara y col., 2002.

### 2.2.3 Replicación y transcripción

Los eventos de replicación y transcripción suceden en el citoplasma. Para evento la transcripción el genoma del virus contiene secuencias que actúan en cis y que marcan el inicio (GS) y el final de cada gen (GE). La transcripción inicia cuando la ARN polimerasa dependiente de ARN entra en contacto con el promotor ubicado en el extremo 3'; la transcripción de los diferentes genes ocurre de manera secuencial con la asistencia de la proteína M2-1 que ayuda al complejo polimerasa a pasar a través de las regiones intergénicas; los productos proteínicos se acumulan y cuando el factor regulador M2-2 alcanza cierto nivel, el complejo polimerasa cambia del modo transcripcional al modo de replicación. En esta condición el complejo de la polimerasa ignora las señales GE y se sintetiza una copia antigenómica con orientación positiva, la cual sirve como plantilla para generar el genoma del virión (Fearnly y col., 2002).

#### **2.2.4 Proteínas del virus**

La proteína G es una glicoproteína tipo II con abundantes glicosilaciones N y O. Debido a sus propiedades de mucina, media la mayor parte de la adsorción del virus a la célula huésped. Además contribuye en el sesgo de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 (Bourgeois y col., 1998).

La glicoproteína F media la penetración del virus porque facilita la fusión entre la envoltura del virión y la membrana de la célula huésped (Vergara y col., 2006).

La proteína SH es una pequeña proteína hidrofóbica cuya función se desconoce.

La proteína de la matriz viral (M) forma una capa que recubre la cara interna de la envoltura viral, además de contribuir al proceso de ensamblaje (Marty y col., 2004).

Las proteínas N, P, M2-1 y L se encuentran asociadas a la nucleocápside y cumplen papeles esenciales en diferentes estadios de los eventos de transcripción y replicación viral (Vergara y col., 2006).

La proteína M2-2 es un factor regulador responsable de cambiar el modo operacional del complejo polimerasa del modo transcripcional al de replicación (Bermingham y col., 1999).

Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 parecen servir de antagonistas al sistema del interferón IFN tipo I (Spann y col., 2004).

### 2.2.5 Inmunología

Las reinfecciones con el VSR son comunes, ya que el virus produce una inmunidad naturalmente adquirida incompleta.

Cuando un organismo es infectado por algún patógeno, el tipo de respuesta inmune depende de los siguientes factores: vía de entrada del patógeno, la naturaleza de éste y el mecanismo de presentación del antígeno.

Hay tres tipos de respuesta inmune de los linfocitos T cooperadores: la respuesta inmune Th1, la Th2 y recientemente descrita Th 17. En condiciones normales una infección por VSR es resuelta mediante la respuesta inmune Th1 que se caracteriza por la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral beta (TNF-B), interleucina-12 (IL-12), inmunoglobulina G2a (IgG2a) y linfocitos T CD8+; en conjunto todos estos factores llevan a la producción de una respuesta citotóxica contra las células infectadas resolviendo así la enfermedad.

Por otro lado la respuesta inmune Th2 se caracteriza por la producción de interleucinas 4, 5, 6 (IL-4, IL-5, IL-6), inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina G1 (IgG1) y linfocitos T CD4+. Este tipo de respuesta se ve exacerbada en pacientes de alto riesgo (inmunosuprimidos, menores de 6 meses y ancianos) que presentan la infección por VSR, lo cual conlleva a una enfermedad más severa en la que se presenta eosinofilia y la producción de gran cantidad de moco que taponan las vías respiratorias (Openshaw y Tregoning, 2005).

Estudios en animales han demostrado que la proteína F del VSR genera predominantemente una respuesta inmune Th1 mientras que la proteína G del VSR genera preferencialmente una respuesta Th2 (Openshaw y Tregoning, 2005).

## **2.2.6 Medidas profilácticas y terapéuticas**

### **2.2.6.1 Inmunoprofilaxis pasiva**

La única medida profiláctica disponible actualmente es la administración de una versión humanizada de un anticuerpo monoclonal contra la proteína F del VSR (Palivizumab) que protege a los individuos en alto riesgo de desarrollar la infección. Desafortunadamente su utilización es costosa y su eficacia podría disminuir si hay aparición de nuevas cepas virales resistentes debido a la naturaleza de los virus ARN (Kimpen, 2002).

### **2.2.6.2 Vacunas contra VSR**

Debido a la importancia del VSR como uno de los patógenos principales de las vías respiratorias bajas, desde su descubrimiento se han realizado varios intentos por desarrollar una vacuna segura y eficaz. La Tabla 2 resume las ventajas y desventajas de los principales tipos de vacunas experimentales que se han desarrollado desde el inicio de los 60's hasta la actualidad.

Tabla 2. Principales de vacunas experimentales contra VSR

Tipo de Vacuna	Ventajas	Desventajas	Referencias
<b>Virus inactivado</b> F1-RSV	Bajo costo	Inactivación incompleta Predisposición de agravar la enfermedad	Chanock y col., (1957)
<b>Vacunas de subunidades y péptidos</b> F (PFP 1,2,3) G (BBG2Na) FG	Alto nivel de pureza Seguras Estables	Potencial predisposición a agravar la enfermedad (Th2, adyuvante que promueve Th1) Eficacia limitada en presencia de anticuerpos maternos	Prince y col., 2001 Rui-hong y col., 2005
<b>Vacunas atenuadas</b> cp, ts, cpts RSV	Bajo costo Inducción de respuesta inmune balanceada	Posible reversión a Wt Sobre/baja atenuación	Juhasz y col., 1997
<b>Vectores virales</b>	Anticuerpos neutralizantes	Inmunidad contra el propio vector	Tree y col., 2004
<b>Vacunas en plantas</b>	Bajo costo, bajo riesgo de contaminación	No se ha probado inmunoprotección frente al reto	Shandu y col., 1999

La primera vacuna contra el VSR fue generada a partir de virus inactivados con formaldehído. Esta vacuna fue administrada en dosis intramusculares a niños de 2 meses y 7 años; sin embargo, no solo falló en proteger sino que se presentó una respuesta exacerbada Th2 que llevó a la muerte de dos niños. Se sugirió que el formaldehído había alterado selectivamente epítomos protectores localizados dentro de las proteínas F o G.

Por lo anterior la estrategia de construir vacunas inactivas de VSR se ha abandonado y en la actualidad se prefiere experimentar con vacunas construidas a partir de virus vivos atenuados. Sin embargo su utilidad clínica está en entredicho, la formulación cpts248/404 produjo abundantes secreciones que obstruyeron la nariz de los lactantes de 1-2 meses de edad (los cuales son los más necesitados de protección). Además, las vacunas de VSR atenuados han mostrado replicación en los niños en presencia de anticuerpos maternos adquiridos.

Se han realizado también experimentos con vectores virales tales como los adenovirus, en los cuales se aprovecha su capacidad de replicación y la ventaja de que pueden superar la relativa inmadurez del sistema inmune de neonatos aún con anticuerpos maternos. Se demostró que estos vectores que expresan la proteína F o G indujeron una inmunidad protectora y anticuerpos neutralizantes en ratones y ratas algodón; sin embargo cuando se probaron en chimpancés no resultó en protección. Una de las desventajas de estos vectores es que no son muy seguros ya que pueden inducir inmunidad contra el vector en sí.

Por otro lado se ha experimentado con vacunas de subunidades, las cuales tienen la ventaja de ser seguras, pero es necesario una formulación y vía de administración adecuada. Las glicoproteínas F y G son los principales blancos para la respuesta inmune contra VSR. Las vacunas PFP-1 y PFP-2 formuladas con hidróxido de aluminio están en fase I, han demostrado ser inmunogénicas y seguras en adultos saludables y en niños mayores de 12 meses; sin embargo en algunos casos se ha observado un incremento del daño histológico. La vacuna BBG2Na esta en fase III y consiste en un dominio central conservado de la proteína G (130-230 a.a.G2Na) fusionado al dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptococcica (BB). Esta vacuna mostró que induce protección contra el reto en ratón y ratas algodón sin inducción de patología en el pulmón; sin embargo la duración de la inmunidad no fue considerada suficiente para prevenir un infección en un estación endémica de VSR.

## 2.3 Vacunación

La vacunación consiste en la administración de un microorganismo o sus antígenos, con el objeto de producir una respuesta inmunológica similar a la de la infección natural, pero sin peligro para el vacunado. La vacunación ha permitido prevenir ciertas enfermedades e incluso erradicarlas. La primera vacuna fue creada en 1796 por Edward Jenner y permitió la erradicación de la viruela (Stern y Makel, 2005).

Las dos grandes propiedades que deben reunir las vacunas son la eficacia y la inocuidad, esto es que tenga la capacidad para prevenir la enfermedad sin que desencadene reacciones adversas (López y col., 2004).

### 2.3.1 Principales tipos de vacunas

Hay cuatro tipos tradicionales de vacunas:

*Inactivadas:* Los microorganismos han sido tratados con productos químicos o calor y han perdido su patogenicidad. La mayoría de estas vacunas suelen inducir inmunidad incompleta o de duración limitada, por lo que es necesaria más de una toma.

*Vivas atenuadas:* Los microorganismos han sido cultivados expresamente bajo condiciones en las cuales pierden sus propiedades nocivas. Suelen provocar una respuesta inmunológica más duradera y son utilizadas frecuentemente.

*Toxoides:* Son componentes tóxicos inactivados procedentes de microorganismos, en casos donde esos componentes son los responsables de provocar la enfermedad, en lugar del propio microorganismo.

*Subunitarias:* Están compuestas por fragmentos del microorganismo los cuales pueden crear una respuesta inmunitaria.

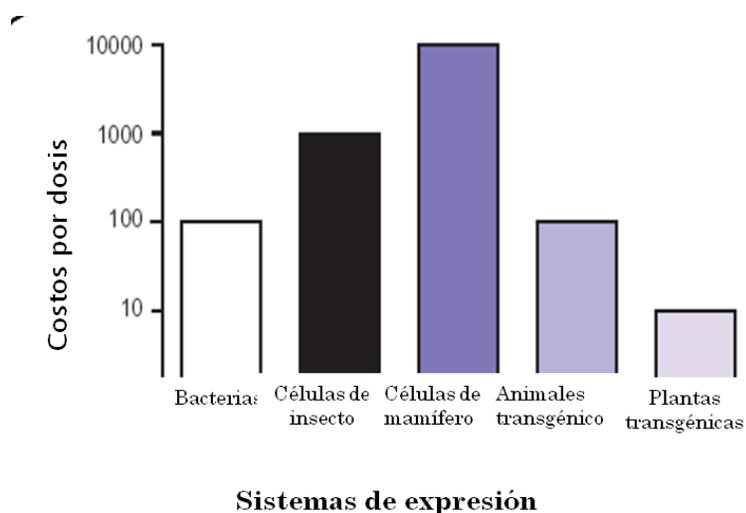
### **2.3.2 Vacunas recombinantes**

En la actualidad gracias a la biotecnología, se han podido desarrollar nuevas estrategias para el diseño de vacunas. Ejemplo de esto son las técnicas de manipulación de ADN que nos permiten tomar un gen foráneo e introducirlo a otro organismo.

Las vacunas de péptidos recombinantes consisten en tomar del microorganismo patógeno, un gen o fragmentos de ellos que codifican para proteínas antigénicas, o epítomos de éstas e introducirlos en sistemas biológicos tales como bacterias, levaduras o plantas que son usados como biorreactores. Estas vacunas nos ofrecen grandes ventajas, ya que al poder seleccionar los epítomos se abarca un mayor rango de protección y se disminuyen los efectos secundarios.

### **2.3.3 Plantas usadas como biorreactores**

La tecnología del ADN recombinante fue inicialmente utilizada para expresar proteínas que fueran difíciles de producir o aislar en sus organismos nativos en grandes cantidades. La mayoría de las proteínas recombinantes han sido producidas por “fábricas” biológicas tradicionales como lo son predominantemente cultivos celulares microbiológicos (bacterias o levaduras) o células de mamífero. Sin embargo durante las dos últimas décadas las plantas se han usado como modelo de estudio para la producción de proteínas de interés terapéutico así como para la producción de vacunas. Se ha visto que este sistema alternativo para la producción de proteínas recombinantes ofrece varias ventajas sobre los sistemas de expresión tradicionales, como lo son: disminución de los costos, producción a gran escala, se evita la transmisión de enfermedades presentes en otros sistemas, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas recombinantes permiten la producción de proteínas biológicamente activas lo cual no se da en otros sistemas, además de que el producto de interés se puede producir en tejidos comestibles lo que lleva a la entrega del fármaco sin procesamiento adicional como el caso de las vacunas comestibles (Lico y col., 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** Comparación de costos en diferentes sistemas de expresión de proteínas heterólogas (Streatfiel y col., 2001).

### 2.3.4 Vacunas comestibles

La producción de vacunas comestibles involucra la introducción de los genes deseados dentro de las plantas. A grandes rasgos se selecciona el gen de interés a partir del patógeno humano y con la ayuda de bacterias o virus que naturalmente infectan a la planta las proteínas son expresadas (Figura 4).

Este tipo de vacunas ofrece múltiples ventajas como reducir el costo por producción, purificación, almacenamiento y transporte; además permiten evitar el uso de jeringas estériles (Daniell y col., 2001).

Las vacunas comestibles tienen la capacidad de activar la inmunidad sistémica como la de mucosas al entrar en contacto directo con el tracto digestivo, lo cual provee la primera línea de defensa contra patógenos que invaden las mucosas (Lal y col., 2007).

Idealmente estas vacunas deben producirse en vegetales que se coman crudos, ya que el antígeno expresado en tejidos que requieran cocción podría degradarse, además debe tenerse en cuenta que el sistema vegetal a elegir no produzca compuestos tóxicos naturalmente.



**Figura 4.** Esquemización a grandes rasgos de la producción de una vacuna comestible. Tomado de Lal y col., 2007.

### 2.3.5 Vacunas en plantas contra VSR

Dadas las ventajas que ofrecen las plantas como sistema de expresión, se han realizado varios intentos de producción de vacunas contra el VSR, en la mayoría de ellos han sido expresadas las proteínas F o G del virus sin optimizar; los vegetales utilizados para este fin incluyen tabaco, tomate y protoplastos de manzana.

Shandu y col., (1990; 2000) lograron expresar el gen de la proteína F en protoplastos de hoja de manzana y en jitomate, comprobando la generación de anticuerpos protectores. Por otro lado Belanger y col. (2000) expresan el gen de la proteína G en tabaco, la cual demuestra ser inmunogénica e inmunoprotectora en ratones; sin embargo no reportan datos sobre el balance de la respuesta inmunológica Th1/Th2 lo cual es importante conocer dados los antecedentes de la vacuna inactivada.

Considerando los resultados obtenidos en los diferentes intentos de desarrollo de vacunas contra el VSR y las recomendaciones por comunicación personal del Dr. Piedra de tomar en cuenta diferentes epítomos tanto de la proteína F como de la G, consideramos desarrollar una vacuna de subunidades que contenga dichos epítomos para obtener una vacuna comestible inmunogénica e inmunoprotectora, además de que promueva un adecuado balance entre las respuestas inmunológicas Th1/Th2.

#### **2.4 Estrategias utilizadas para mejorar la producción de proteínas recombinantes en plantas**

A pesar de las ventajas que ofrecen las plantas sobre otros sistemas de expresión, una de sus principales limitaciones es la baja cantidad de proteína que se obtiene (0.01%-2% de la proteína total soluble-PTS) (Lal y col., 2007).

Para superar esta dificultad algunas de las técnicas que se han utilizado son: la optimización de la secuencia codificante de los genes foráneos (ya sean de bacterias o virus) para al adecuar el uso de codones de plantas, puedan ser expresados mas eficientemente (Lal y col., 2007); la utilización de promotores constitutivos como el 35S del virus del mosaico de la coliflor (Tyagi, 2001); el añadir en el extremo 5' del gen una secuencia UTR con la finalidad de proteger al ARN mensajero de su degradación; y la utilización de una señal de retención para el retículo endoplásmico (SEKDEL) en el extremo 3' que incrementa la acumulación de las proteínas antigénicas en las células vegetales (Rigano y Walmsley, 2005).

Además de lo anterior se han realizado técnicas de expresión de la proteína heteróloga en cloroplastos y la expresión de genes foráneos mediante vectores virales; ambas técnicas han mostrado una mayor producción de PTS (Lal y col., 2007).

## 2.5 Transformación genética de plantas

### 2.5.1 *Agrobacterium tumefaciens*

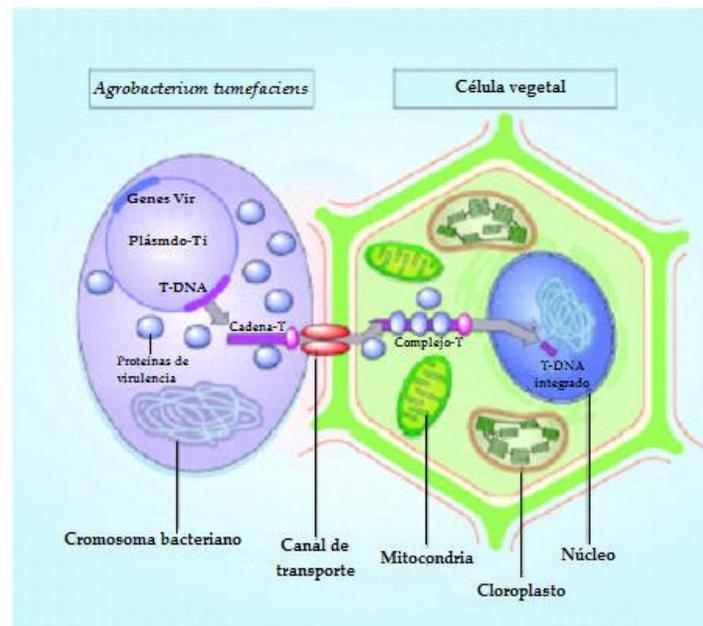
*Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria natural del suelo, Gram negativa, que tiene la capacidad de infectar principalmente plantas dicotiledóneas y causar un tumores en ellas. Ésto es debido a la habilidad de la bacteria para introducir información genética dentro del genoma de la planta; dicha información codifica para la síntesis de auxinas y citocininas necesarias para el crecimiento tumoral (formado por la bacteria) y para la supervivencia de la bacteria. La información transferida (T-DNA) se encuentra dentro de un plásmido denominado Ti (plásmido inductor de tumor) el cual está flanqueado por dos regiones de 25pb, llamados bordes derecho e izquierdo, que son indispensables para su transferencia. Además el plásmido Ti contiene genes de virulencia (genes *vir*) localizados en una región de 35 Kb, los cuales son necesarios para el procesamiento y la transferencia del T-DNA, ya que codifican para funciones de corte, extensión, transferencia e integración del T-DNA en el genoma de la célula receptora (Arguello-Astorga y Herrera-Estrella; 1994).

Naturalmente el proceso de infección ocurre de la siguiente manera: cuando la planta sufre una herida se generan compuestos fenólicos, principalmente acetosiringona, la cual es sensada por la proteína VirA que se encuentra en la membrana de la bacteria; cuando la acetosiringona se una a VirA se dispara una cascada de señalización que activa a los demás genes *vir* y que da como resultado la transferencia e integración del T-DNA en el genoma de la planta (Zupan y col., 1995) (Figura 5).

Para aprovechar la capacidad natural de *Agrobacterium* de introducir material genético dentro del genoma de la planta, se han construido vectores binarios, donde por una lado se tiene un vector pequeño el cual contiene un sitio

múltiple de clonación en el cual se puede introducir el ADN de interés, mientras que por otra parte este vector mantiene los bordes derecho e izquierdo necesarios para su transferencia y un marcador de resistencia que permite realizar la selección en *E. coli*. Por otra parte el plásmido Ti de *Agrobacterium* se modificó, deletándole el T-DNA y se dejaron los genes *vir* necesarios para la transferencia e integración del ADN foráneo (Figura 6).

Estos vectores binarios ofrecen varias ventajas: están desarmados y por lo tanto no pueden causar tumores en las plantas, son pequeños y fáciles de manejar en el laboratorio y además pueden propagarse fácilmente en *E. coli* (Mary-Dell Chilton., 2001) .



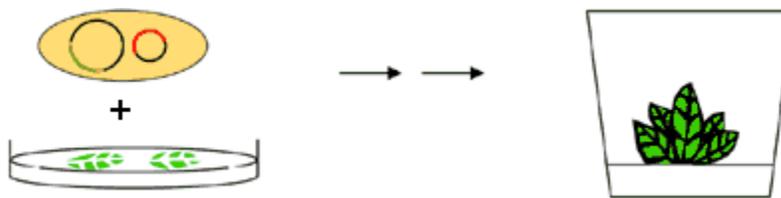
**Figura 5.** Transferencia de genes por *Agrobacterium tumefaciens* a células vegetales. Tomado de Zupan y col., 1995.



Primer Paso. El ADN de interés (verde) es clonado dentro del primer vector y propagado en *E. coli*.



Segundo Paso. El plásmido con el ADN de interés es introducido dentro de una cepa de *Agrobacterium* la cual contiene el plásmido Ti con los genes *vir*.



Tercer Paso. Con la cepa de *Agrobacterium* se infectan piezas pequeñas de la hoja de la planta en un medio con reguladores de crecimiento y finalmente mediante distintas rondas de selección en un medio con antibiótico, o algún otro compuesto selectivo, se regenera una planta completa con el transgén de interés.

**Figura 6.** Diagrama de la transformación mediada por *Agrobacterium* usando vectores binarios.

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

### **2.5.2 Biobalística**

A pesar de que el método de transformación con *Agrobacterium* es eficiente y la transformación es estable, la cantidad de proteína heteróloga expresada es baja. Un método de transformación que mejora considerablemente este punto, es la transformación de cloroplastos, la cual se lleva a cabo mediante la técnica de biobalística, que consiste en introducir el ADN específico mediante el bombardeo con microproyectiles que no causan daño letal al tejido.

Los microproyectiles utilizados son partículas de oro o tungsteno, de 0.4 a 2.0 micrómetros de diámetro y recubiertas con el ADN foráneo. Estos microproyectiles se colocan en un acarreador y son después impulsados por un choque de gas a presión. La trayectoria del acarreador es detenida a cierta distancia antes de llegar al tejido; de esta manera solo los microproyectiles alcanzan los organelos y el ADN de interés es integrado en el genoma de éstos (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1994).

#### **2.5.2.1 Transformación de cloroplastos**

La transformación de cloroplastos ofrece varias ventajas respecto a la transformación nuclear mediada por *Agrobacterium*, entre ellas destacan las siguientes:

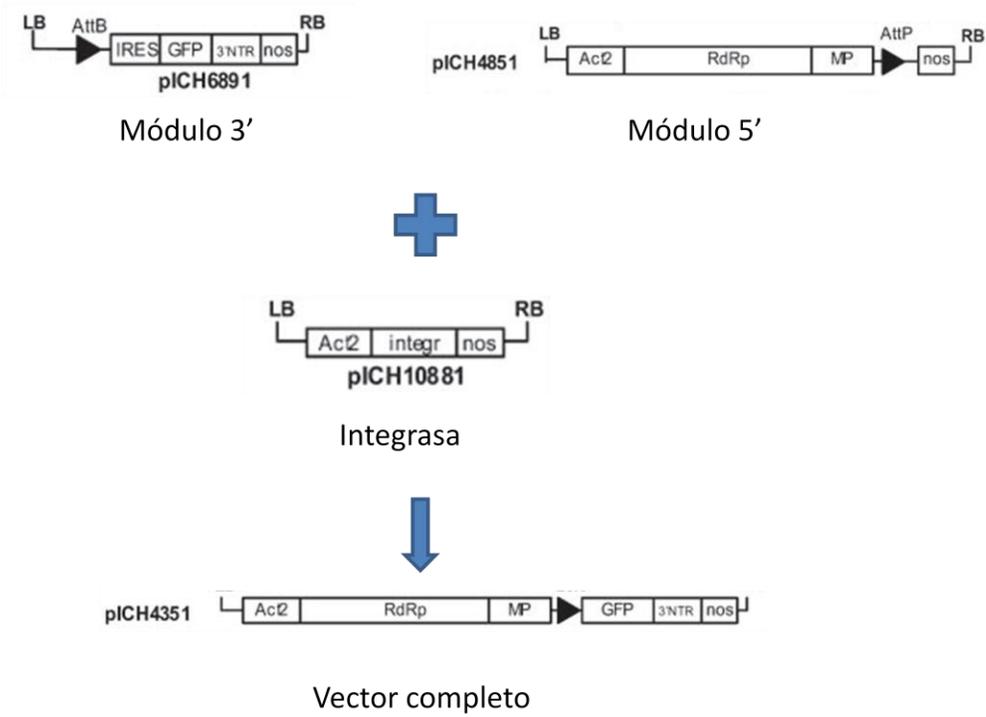
- La célula vegetal contiene en promedio 100 cloroplastos y hay de 10-100 copias del genoma por plástido, lo cual resulta en niveles altos de proteína recombinante (>15% PTS) (Maliga, 2003; Streatfield y Howard, 2003).
- Es posible expresar genes en forma de operón (Streatfield y Howard, 2003).
- No se ha reportado silenciamiento de genes introducidos (Streatfield y Howard, 2003).
- Dado que el cloroplasto es herencia materna se reduce el riesgo potencial de escape del transgén (Bock, 2007).

- Dado que el genoma del cloroplasto permite eventos de recombinación homóloga, el transgén puede ser dirigido con precisión a un locus específico (Bock, 2007).

A pesar de las ventajas que ofrece la transformación de cloroplastos, una de sus principales limitaciones es que no lleva a cabo la glicosilación de las proteínas ahí expresadas; por lo tanto proteínas cuyas modificaciones post-traduccionales son esenciales para su función biológica no pueden ser expresadas en este sistema, además que el sistema de regeneración no es tan eficiente como en la técnica de transformación nuclear (Lico y col., 2007).

### 2.5.3 Vectores virales

Los virus que infectan a las plantas han sido utilizados desde 1980 para introducir genes foráneos en ellas, esto es debido que los virus son pequeños, fácilmente manipulables y su infección es relativamente simple (Lico y col., 2007). Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido mejorar este sistema de expresión creando una nueva tecnología llamada “Magnifection” la cual permite la amplificación transitoria de genes a partir de vectores virales que son introducidos a múltiples partes de la planta vía *Agrobacterium*. Estos vectores virales están comúnmente divididos en varios módulos: el módulo 3' que es donde se inserta el ADN a expresarse, el módulo 5' que contiene a la replicasa viral así como señales que pueden dirigir a la proteína hacia algún sitio específico dentro de la célula vegetal y por último un vector que contiene una integrasa cuya función es unir los dos módulos anteriores mediante el proceso de recombinación. (Gelvin, 2005) (Fig. 7).



**Figura 7.** Los diferentes módulos que conforman los vectores de Magnifection. Tomado de Gelvin 2005.

La técnica consiste en infectar a la planta con una suspensión diluida de *Agrobacterium* (la cual contiene cada uno de los tres módulos descritos anteriormente) ya sea aplicando una presión en vacío o inoculándola directamente con la ayuda de una jeringa sobre el tejido foliar de la planta; después de 2-3 semanas la biomasa se recolecta y se realiza la extracción de la proteína recombinante, que puede llegar a alcanzar niveles de expresión de hasta un 40% de la PTS (Marillonet y col., 2004).

Así esta nueva tecnología combina las ventajas de tres sistemas biológicos: la rapidez y los niveles de expresión del virus, la eficiencia de transfección de *Agrobacterium* y las capacidades pos-traduccionales y bajos costos de producción de las plantas.

Hasta la fecha las más de 50 proteínas expresadas por esta técnica, han mostrado altos niveles de expresión y han sido biológicamente activas (Marillonet y col., 2004).

## 2.6 Plantas utilizadas y sus características

### 2.6.1 Tabaco

*Nicotiana tabacum* es una planta dicotiledónea, pertenece a la familia de las solanáceas las cuales se caracterizan por tener un alto contenido de alcaloides, entre los que destacan la nicotina (Claridades Agropecuarias, 2001).

Las hojas de tabaco son atractivas para expresar proteínas heterólogas, ya que éstas pueden recolectarse antes de la floración lo cual reduce el riesgo potencial de liberar el transgén al medio ambiente a través del polen; además, a diferencia de las semillas o tubérculos; las hojas de tabaco no persisten en el ambiente (Jignasha Patel y col., 2006)

El tabaco es un buen modelo para la evaluación de proteínas recombinantes, ya que su transformación genética es relativamente fácil y tiene una rápida regeneración *in vitro*; sin embargo no puede utilizarse como una planta para producir vacunas comestibles, ya que produce algunos compuestos tóxicos como alcaloides (Lal y col., 2007).

Este modelo sirve como prueba de concepto para evaluar la funcionalidad de las proteínas ahí expresadas, antes de realizar las transformaciones estables en las plantas apropiadas que por lo general llevan un proceso lento de regeneración.

### 2.6.2 Lechuga

*Lactuca sativa* es una planta dicotiledónea, pertenece a la familia de las compuestas y hay cerca de 100 especies distribuidas alrededor del mundo (Davey y col., 2002). El cultivo de lechuga es comercialmente importante a nivel mundial, en Estados Unidos se le considera el cuarto vegetal más consumido después del tomate, la naranja y la papa (Claridades Agropecuarias, 1999).

Las hojas de la lechuga son consumidas crudas por los humanos, lo cual la hace un excelente modelo para la producción de vacunas comestibles; además es de rápido desarrollo, produce gran biomasa y su transformación genética es relativamente fácil (Lal y col., 2007)

### 2.6.3 Soya

*Glicina max*, planta dicotiledónea que pertenece a la familia de las leguminosas, tiene un alto valor nutricional y a nivel mundial es una fuente importante de proteínas y aceites.

La semilla madura de soya contiene alrededor de 35-40% de proteínas lo cual ofrece un amplio potencial para la producción de proteínas recombinantes, además su bajo contenido de humedad le confiere una mayor estabilidad y vida de anaquel a las proteínas ahí expresadas (Tomas Moravec y col., 2007).

A diferencia de otros sistemas, el utilizar semillas de leguminosas tiene la ventaja de que se obtiene una mayor cantidad de proteína heteróloga, alrededor de 2.5-3-5 % de la PTS. Por otro lado el procesamiento de la semilla de soya es muy amplio pudiéndose obtener leche de soya, salsa de soya o tofu lo cual da como ventaja que las proteínas heterólogas pueden entregarse mediante diferentes vehículos comestibles (Tomas Moravec y col., 2007).

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Diseñar y expresar genes sintéticos que codifiquen epítopos antigénicos de proteínas relevantes del VSR en plantas de lechuga, tabaco y soya, para posteriormente analizar el tipo de respuesta inmune producida por éstos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analizar *in silico* regiones de antigenicidad y seleccionar epítopos de las proteínas F y G del virus sincicial respiratorio, para diseñar genes sintéticos.
- Clonar los genes sintéticos en los vectores adecuados para transformación nuclear, de cloroplastos y transformación transitoria de plantas.
- Transformar genéticamente plantas de lechuga, tabaco y soya con las construcciones generadas.
- Establecer el sistema de regeneración de soya.
- Analizar las transformantes de lechuga y tabaco por PCR.

## 4. MATERIAL Y EQUIPO

### 4.1. Material biológico

Material biológico	Proveedor
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa LBA4404	Cepario del Dr. Cress
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GV3101	Donadas por el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, USA.
<i>Escherichia coli</i> Top 10 F'	Donada por el Dr. Argüello-Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
Semillas de tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) SR1 variedad Petite Havana	Donadas por el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, USA.
Semillas de tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) sin nicotina	Donadas por la Dra. Menassa de Ontario, Canadá.
Semillas de lechuga de la variedad Green Wave	Donadas por el Dr. Nakano de la Universidad de Niigata, Japón
Semillas de soya ( <i>Glycine max</i> ) variedad Jack	Donadas por el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, U.S.A.

## 4.2. Vectores

Plásmido	Características	Proveedor
pGEM-T Easy	Vector de clonación	Promega, USA
pGA4	Vector de clonación	Cepario Laboratorio Dr. Alpuche
pMK	Vector de clonación	Cepario Laboratorio Dr. Alpuche
pBI-121	Vector binario que incluye un cassette de expresión con el promotor 35S completo del virus del mosaico de la coliflor, fusionado al gen <i>gusA</i> y al terminador NOS	Cepario del Dr. Cress
pKCZ	Vector para la transformación de cloroplastos de tabaco. Contiene sitios para recombinación entre los genes <i>trnR-ACG</i> y <i>trnN-GUU</i> , en la región de repetidos invertidos (IR), incluye un cassette de expresión del gen <i>aadA</i> bajo el promotor <i>Prrn</i> y el terminador <i>rbcl3'</i> .	Donado por el Dr Koop del Instituto de Botánica de la Universidad de Munich, Alemania, mediante el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana Champaign, U.S.A.
Magniffection pICH11599 pICH10990 pICH7410 pICH14011 pICH17388 pICH17610 pICH17620	Vectores para la transformación transitoria de plantas de tabaco. Agrupados en tres módulos, el módulo 3' (pICH11599, pICH10990, pICH7410) utilizados para clonar el gen de interés; el módulo 5' (pICH7388, pICH17610, pICH17620) contienen la replicasa viral y señales de dirección de la proteína; y el módulo de la integrasa (pICH7410) contiene a la enzima integrasa.	Donados por el Dr. Gleba de la compañía ICON GENETICS

### 4.3. Reactivos

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

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

Leupeptina	Sigma Chemical Co., USA
Manitol	Sigma Chemical Co., USA
Marcador de ADN de 1 kb	New England Biolabs, USA
Marcador de ADN de 100 pb	New England Biolabs, USA
Microdín	Laboratorio Lacami S.A. de C.V., México
Myoinositol	Phyto Technology Lab., USA
Nitrato de amonio	Sigma Chemical Co., USA
Nitrato de potasio	Riedel de Haen, USA
Oligonucleótidos	Invitrogen, USA
Piridoxina	Sigma Chemical Co., USA
PMSF	Sigma Chemical Co., USA
p-Nitro fenil fosfato	Sigma Chemical Co., USA
RNAsa	Roche, USA
Rifampicina	Mavi Farmacéutica Lab
Sacarosa	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato de cobre	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato de magnesio	Sigma Chemical Co., USA
Sulfato de manganeso	Sigma Chemical Co., USA
Sulfato de zinc	Phyto Technology Lab., USA
Sulfato ferroso	Sigma Chemical Co., USA
T4 ADN Ligasa	New England Biolabs, USA
Taq ADN Polimerasa casera	Sintetizada en el laboratorio a partir de una cepa de <i>E. coli</i>
Taq ADN Polimerasa ( <i>pfx</i> )	Invitrogen, USA
Terrazole	Uniroyal Chemical Co., USA
Tiamina	Phyto Technology Lab., USA
Sustrato Cosmopeat	COSMOCEL, México
Tris base	Promega, USA
Tween 20	Sigma Chemical Co., USA
Yoduro de potasio	Riedel de Haen, USA

#### 4.4. Equipo

- Agitador orbital de mesa con plataforma Daigger modelo MX2139E
- Autoclave eléctrica Sterilmatic modelo STM-E tipo C
- Balanza analítica eléctrica Scientech modelo SA210D
- Balanza granataria Ohaus modelo 1400
- Baño María digital Fisher Scientific modelo Isotemp 1025
- Bomba de vacío Felisa modelo FE 1402
- Cámara bioclimática Lumistell modelo Mac-510
- Cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD modelo minisub-cell GT
- Cámara fotográfica Sony Cyber Shot modelo DSCF717
- Campana de extracción de humos Fisher Alder modelo CS línea 2000
- Campana de flujo laminar Fisher Alder
- Campana de flujo laminar Lumistell modelo L-120
- Campana de flujo laminar Lumistell modelo LP-09
- Centrífuga refrigerada Kendro modelo Hareus Biofuge fresco
- Centrífuga Sorvall modelo RC 5C Plus
- Congelador Nieto modelo CVC15
- Cuarto de incubación de cultivos vegetales Lumistell
- Electroporador BTX modelo ECM 630
- Espectrofotómetro Beckman modelo DU 530
- Fluorómetro TECAN modelo Genios
- Fotodocumentador de geles UVP modelo EpiChemi3 Darkroom
- Fuente de poder Thermo EC modelo EC105
- Homogenizador de tejidos Wheaton modelo 903475
- Horno de microondas LG modelo MS-217XQE
- Incubadora shaker New Brunswick Scientific modelo 12400
- Lector de microplacas BIO-RAD modelo 550
- Microcentrífuga Eppendorf modelo mini Spin
- Micropipetas Gilson
- Pistola de biobalística Bio-Rad PDS-1000/He biolistic
- Placa de calentamiento Corning modelo PC420

- Potenciómetro Orion 3 Star Termo Electro Corporation
- Refrigerador Torrey modelo R-14
- Tanque de Helio comprimido Praxair
- Termociclador Techne modelo Touchene Gradient
- Termociclador DNA Engine Bio Rad
- Termomezclador R Eppendorf modelo 22331
- Ultracongelador Nuaire modelo UN-6613A35
- Vortex Fischer Scientific modelo Genie – 2

## 5. Metodología

### 5.1 Diseño de genes sintéticos para los epítomos de las proteínas F y G del VSR.

Se diseñaron en total cuatro genes sintéticos, todos optimizados para el uso de codones en plantas, dos de ellos comprenden una fusión de epítomos de las proteínas F, G y M del VSR, uno es para transformación nuclear (VSRn) y el otro para transformación de cloroplastos (VSRc). El tercer gen comprende básicamente las mismas regiones del gen para transformación de cloroplastos con la única diferencia de los espaciadores ya que se seleccionaron aminoácidos diferentes. El cuarto gen (VSRpa) comprende una región de la GTPasa RhoA que se ha visto codifica para un péptido con actividad antiviral (Graham y col., 2004).

Con base a una extensa revisión bibliográfica se seleccionaron las siguientes regiones: de la proteína F del VSR se eligieron las secuencias de aminoácidos 205-223 y 255-278 ya que se tiene reportado que son epítomos de las células T además de ser inmunogénicas (Bourgeois y col., 1998; Hyung y col., 2007). Por otra parte se eligió la proteína de fusión (G1F/M2). Esta proteína consta de un fragmento de la proteína G del VSR (G:125-225 aminoácidos) fusionado a la proteína quimera (F/M2), que a su vez se conforma por un fragmento de la proteína F del virus de sarampión (F:113-131 aminoácidos) unida a un segmento de la proteína M del VSR (M:81-95 aminoácidos). La fusión G1F/M2 ha demostrado inducir producción de anticuerpos neutralizantes, proliferación de células T y un balance adecuado entre la respuesta inmune Th1/Th2 (Zeng y col., 2006).

Cada uno de los epítomos seleccionados, fueron además analizados con el programa *Antheprot* (disponible en <http://antheprot-pbil.ibcp.fr>), que determina las regiones inmunogénicas con base a la hidrofobicidad de los aminoácidos (Parker y col., 1986).

Los espaciadores utilizados son los reportados en el artículo de Livingston y col. (2002), que son ricos en prolina (GPGPG) y han demostrado dar flexibilidad a la construcción para exponer a diversos epítomos, además para la construcción de cloroplastos se probaron también los espaciadores reportados por Liu y col. (2004), los cuales son ricos en glicina (GSGGGGS) y han demostrado ser útiles en la construcción de vacunas de epítomos recombinantes.

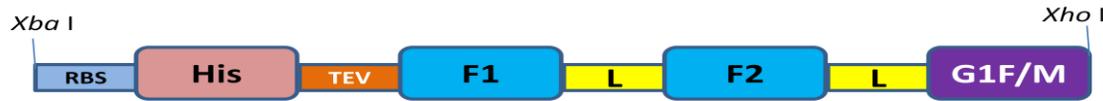
A todas las construcciones se le añadieron en el extremo 5' seis codones que codifican histidina con la finalidad de permitir la purificación de la proteína recombinante y también se añadió un sitio de proteasa (TEV) que permite eliminar las histidinas una vez que se ha sido purificada la proteína.

A la construcción para transformación nuclear se le añadió una señal de retención al retículo endoplásmico (SEKDEL) y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI121 (Figura 8).



**Figura 8.** Gen sintético para transformación nuclear. His, histidinas; TEV, sitio de proteasa; F1 y F2 epítomos del gen F; G1F/M, proteína de fusión; L, espaciador; SEKDEL señal de retención en el retículo endoplásmico. Se muestran sitios de restricción.

A la construcción para transformación en cloroplastos se le añadió un sitio de unión a ribosoma y sitios de restricción para ser clonado en el vector pBIC (Figura 9).



**Figura 9.** Gen sintético para transformación de cloroplastos. RBS, sitio de unión a ribosoma; His, histidinas; TEV, sitio de proteasa; F1 y F2 epítomos del gen F; G1F/M proteína de fusión; L, espaciadores. Se muestran sitios de restricción.

### 5.1.2 Diseño de un gen sintético con actividad antiviral

La cuarta construcción fue diseñada en base al artículo de Graham y col., (2004), donde se reporta que un segmento (aminoácidos 80-94) de una proteína transmembranal con actividad de GTPasa denominada RhoA posee actividad antiviral contra el VSR, al parecer debido a una inhibición competitiva de la interacción de las proteínas F-RhoA.

Esta construcción fue diseñada para realizar transformación nuclear de tal manera que se colocaron los sitios de restricción apropiados para ser clonada en el vector binario pBI121 además se añadieron los codones que codifican las seis histidinas, el sitio de proteasa y la señal de retención al retículo endoplásmico (Figura 10).



**Figura 10.** Gen sintético que expresa un péptido con actividad antiviral. His, histidinas; TEV, sitio de proteasa; PA, péptido antiviral que comprende los aminoácidos 80-94 de la proteína RhoA; SEKDEL, señal de retención de retículo endoplásmico. Se muestran sitios de restricción.

## 5.2. Construcciones genéticas

Los genes diseñados fueron sintetizados por la compañía GenScript en EUA. Los genes llegaron clonados en vectores pUC los cuales fueron resuspendidos en 20µl de agua destilada estéril, de este volumen se tomaron 3µl para transformar células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (ver Apéndice 10.1). Los genes cuentan con un gen de resistencia a carbanicilina, por lo cual se seleccionaron tres clonas de cada gen resistentes a este antibiótico, se extrajo ADN de cada una de ellas y mediante digestión se comprobó la identidad de cada construcción. Las enzimas de restricción utilizadas para las digestiones fueron *Xba* I y *Bam*HI; ya que todos los genes están flanqueados por estos sitios.

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

### 5.2.1. Construcciones para transformación nuclear

#### 5.2.1.1. Estrategia general

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

El vector binario pBI-121 contiene el cassette del gen reportero GUS bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV), además de un gen de selección que le confiere resistencia a kanamicina a las células

vegetales que han sido transformadas. Las construcciones para transformación nuclear fueron subclonadas en este vector mediante la sustitución del gen GUS por nuestro gen de interés.

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

En el laboratorio se cuenta con una construcción que contiene un 5' UTR de 120 pares de bases del "tobacco etch virus", el cual se ha visto que protege al ARN mensajero de su degradación y es un potenciador de la traducción (Carrington y Freed, 1989). Para añadir este 5'UTR a nuestras construcciones se realizó un PCR partiendo de la construcción 5'UTR-LTB-ST, construcción desarrollada en nuestro laboratorio por el Dr. Rosales-Mendoza para una vacuna contra la diarrea del viajero (Rosales y col., 2008). Para realizar lo anterior se utilizó el oligonucleótido sentido del 5'UTR y el oligonucleótido antisentido de LTB-ST. Posteriormente el producto obtenido fue digerido con la enzima de restricción *Nco* I y el fragmento de 120 pares de bases liberado fue purificado a partir del gel de agarosa.

Para obtener las construcciones nucleares se realizaron ligaciones triples en los sitios *Sma* I, *Nco* I y *Sac* I. Con estas construcciones se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (ver Apéndice 10.1). Las clonas resistentes a kanamicina se seleccionaron y propagaron para aislar ADN plasmídico de acuerdo a Sambrook y col. (1989). El ADN de las clonas obtenidas fue analizado mediante el perfil de restricción obtenido con las enzimas *Nco* I, *Hind* III, *Xba* I y *Sac* I.

#### **5.2.1.2. Clonación del gen sintético VSRn en el vector pBI121**

El gen sintético VSRn sintetizado por la compañía GenScript fue liberado del vector de clonación pUC mediante digestión con las enzimas de restricción *Nco* I y *Sac* I ; los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de 656pb correspondiente al gen VSRn fue purificado empleando el kit QIAquick gel extraction de Qiagen. Al mismo tiempo se digirió el vector pBI-121 para eliminar al gen GUS y se obtuvo el 5'UTR mediante el procedimiento descrito

anteriormente, finalmente se realizó una ligación triple (Vector pBI121-5'UTR-VSRn) que dio lugar al plásmido pBI-VSRn.

## **5.2.2. Construcciones para transformación de cloroplastos**

### **5.2.2.1. Clonación del gen VSRsc en el vector pBIC**

El vector pBIC es una modificación del vector pKCZ, es especial para transformación de cloroplastos de tabaco ya que tiene sitios de recombinación homóloga para integrarse al genoma del cloroplasto. Este vector fue digerido con las enzimas *Xba* I y *Xho* I, a la par el gen VSRc fue digerido con las mismas enzimas y ligado en el vector pBIC, se tomaron 5 $\mu$ l de esta ligación y se transformaron células competentes de *E. coli* top 10 F' para finalmente analizar las clonas por perfil de restricción.

## **5.2.3 Construcciones para transformación transitoria**

### **5.2.3.1 Vectores magniffection**

Los siete vectores de magniffection agrupados en tres módulos (módulo 3': pICH11599, pICH10990, pICH7410; módulo 5': pICH17388, pICH17610, pICH17620; módulo de la integrasa: pICH7410) fueron resuspendidos en 35 $\mu$ l de agua destilada estéril, de este volumen se tomaron 5 $\mu$ l de cada uno de ellos y se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (ver Apéndice 10.1). Los vectores de magniffection poseen un gen de resistencia a carbanicilina, por lo cual se seleccionaron dos clonas de cada vector resistentes a este antibiótico, se extrajo el ADN (Apéndice 10.4) de cada una de ellas y mediante digestión se comprobó la identidad de cada vector. Las enzimas de restricción utilizadas para realizar las digestiones de los vectores se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Enzimas utilizadas para comprobar la identidad de los vectores magniffection, así como el tamaño de banda esperado en cada caso.

Vector	Enzimas	Bandas Esperadas
pICH11599	<i>BamHI/NdeI</i>	5483/1017
pICH10990	<i>EcoRI/NdeI</i>	5467,1033
pICH7410	<i>EcoRI/BamHI</i>	6017,1183
pICH17388	<i>NcoI/HindIII</i>	11431,2569
pICH17610	<i>EcoRI/SacI</i>	12713,1287
pICH17620	<i>EcoRI/SacI</i>	12713,1287
pICH14011	<i>NcoI/NdeI</i>	7248,1552

### 5.2.3.2 Clonación del gen VSRn en el vector pICH11599

Como se mencionó en el apartado 2.5.3 de Introducción, los vectores magniffection constan de tres módulos, el 5' que contiene a la replicasa viral y señales que dirigen a la proteína hacia ciertos compartimentos dentro de la célula vegetal; el módulo 3' que tiene sitios de clonación para introducir el gen de interés, el módulo de la integrasa que contiene a la enzima integrasa que va a ensamblar a los dos módulos anteriores.

El gen VSRn está flanqueado por los sitios de restricción *Nco I* y *Sac I*; estos sitios también se encuentran en el vector pICH11599 (correspondiente al modulo 3') lo cual fue útil para realizar le clonación de este gen en dicho vector.

El gen sintético VSRn sintetizado por la compañía GenScript fue liberado del vector de clonación pUC mediante digestión con las enzimas de restricción *Nco I* y *Sac I*; los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de 656pb correspondiente al gen fue purificado empleando el kit QIAquick gel extraction de Qiagen. Al mismo tiempo se digirió con las mismas enzimas el vector pICH11599, finalmente se realizó la ligación empleando T4 ADN ligasa para dar lugar el plásmido pICH11599-VSRn.

### 5.2.3.3 Clonación del gen VSRpa en el vector pICH11599

El gen sintético VSRpa sintetizado por la compañía GenScript fue liberado del vector de clonación pUC mediante digestión con las enzimas de restricción *Nco* I y *Sac* I; los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% y el fragmento de 122pb correspondiente al gen VSRpa fue purificado empleando el kit QIAquick gel extraction de Qiagen. Al mismo tiempo se digirió con las mismas enzimas el vector pICH11599, finalmente se realizó la ligación empleando T4 ADN ligasa para dar lugar al plásmido pICH11599-VSRpa.

### 5.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción pBI-VSRn

Para transferir la construcción pBI-VSRn a *Agrobacterium tumefaciens*, se empleó la técnica de electroporación. Se prepararon células competentes de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col. (1991) (ver Apéndice 10.2). Se agregaron 3.0  $\mu$ l de ADN a 50  $\mu$ l de células competentes y después de incubar en hielo por 5 minutos se transfirieron a una cubeta de electroporación Bio-Rad para aplicar corriente bajo los parámetros establecidos por el proveedor Bio-Rad (25  $\mu$ F, 400  $\Omega$ , 2.5kV por 8-9 milisegundos) en un equipo BTX Mod. 630. Inmediatamente se añadió 1.0 mL de medio de cultivo YM (Apéndice 9.5.13), se transfirió la solución a un tubo Eppendorff de 1.5 mL y las células se recuperaron a 28°C por dos horas. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, la pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ l de medio de cultivo LB (Apéndice 9.5.14) y se inoculó en medio de selección (LB con 50 mg/L de kanamicina) para su cultivo por 2 días a 28°C y 150 rpm. Sólo las bacterias transformadas se desarrollan en el medio de selección, debido a que el plásmido transferido confiere resistencia a kanamicina.

#### 5.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción pICH11599-VSRn

Para transferir la construcción pICH11599-VSRn del módulo 3' a *Agrobacterium tumefaciens*, se empleó la técnica de electroporación; a la par también se llevó a cabo mediante la misma técnica la transferencia de los vectores pICH17388 (módulo 5'), pICH7410 (módulo de la integrasa) y pICH7410 (módulo 3' que contiene el gen GFP). Esta última construcción se usará como control para verificar que el sistema funciona, de tal forma que al observar fluorescencia se demostrará la integración del módulo 5' con el 3' y asumiremos se puede integrar nuestro gen de interés (pICH11599-VSRn). Se prepararon células competentes de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col. (1991) (ver Apéndice 10.2). Se agregaron 3.0  $\mu$ l de ADN a 50 $\mu$ l de células competentes y después de incubar en hielo por 5 minutos se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2mm Bio-Rad para aplicar corriente bajo los parámetros establecidos por el proveedor Bio-Rad (25 $\mu$ F, 400 $\Omega$ , 2.5kV por 8-9 milisegundos) en un equipo BTX Mod. 630.

Inmediatamente se añadió 1.0 mL de medio de cultivo YM (Apéndice 10.5.15), se transfirió la solución a un tubo Eppendorff de 1.5 mL y las células se recuperaron a 28°C por dos horas. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, la pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ l de medio de cultivo LB (Apéndice 10.5.16) y se inocularon en medio de selección (LB con 50 mg/L de carbenicilina +50 mg/L de rifampicina) para su cultivo por 2 días a 28°C y 150 rpm. Sólo las bacterias transformadas se desarrollan en el medio de selección, debido a que los plásmidos transferidos tienen resistencia a carbenicilina.

## **5.5. Protocolos de regeneración**

### **5.5.1. Lechuga**

Debido a los múltiples factores que influyen en la eficiencia tanto de regeneración como de la transformación genética de plantas, es frecuente encontrar poca reproducibilidad en los protocolos reportados. En nuestro grupo en 2005, Martínez-González probó tres protocolos para la transformación de lechuga, a fin de ensayar su eficiencia: Curtis y col., (1994); Nakano y col., (2003) y Pileggi y col., (2001), y se concluyó que una combinación de los tres métodos era la mejor opción, por lo cual en este trabajo la metodología usada para la regeneración y transformación de plantas de lechuga es un compendio de los tres (Tabla 4). Se empleó el medio descrito por Murashige y Skoog (1962) (ver Apéndice 10.5.3) y los cultivos se incubaron a 25 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ) y 8 horas de oscuridad en el cuarto de cultivo de tejidos.

**Tabla 4.** Descripción del protocolo usado para la transformación genética de lechuga en este trabajo.

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

### 5.5.2 Tabaco

El protocolo de regeneración para tabaco está bien establecido en nuestro laboratorio y es el descrito por Daniell y col., 2001, en el cual se utiliza como explante inicial hojas jóvenes y como medio de regeneración RMOP (Apéndice 10.5.14).

### 5.5.3 Soya

En este trabajo se intentó establecer el protocolo de regeneración para soya, ya que en el laboratorio aun no se trabajaba con este vegetal; el protocolo seguido fue el reportado por Korban y col., 2003; donde los explantes iniciales fueron cotiledones inmaduros y como medios de regeneración se utilizaron los siguientes: SEIM I, SEIM III, MM y RM (Apéndice 10.5.14). Las vainas jóvenes conteniendo

los embriones inmaduros (5-8mm de largo) se recolectaron a partir de plantas de soya crecidas en invernadero de 6-7 semanas, la superficie de las vainas fue esterilizada mediante un lavado de 30s con isopropanol y un lavado con 25% de cloro (v/v) por 20min. Las semillas inmaduras fueron asépticamente removidas a partir de las vainas esterilizadas para lo cual se cortó con cuidado a través del eje embrionario para remover la testa de la semilla y se separaron los dos cotiledones.

Posteriormente se colocaron 25 explantes por placa con la cara abaxial hacia arriba sobre medio SEIM I (Apéndice 10.5.14). Las placas se incubaron por 14 días a 25°C bajo un periodo de 23h luz/1h oscuridad. Posterior al día 14 los explantes fueron cambiados a medio SEIM III donde permanecieron hasta el día 28 bajo un periodo de 23h luz/1h oscuridad. Después del día 28 los explantes fueron evaluados para embriogénesis somática bajo un microscopio de disección.

Posteriormente los embriones somáticos fueron cuidadosamente cortados y puestos directamente sobre el medio MM (Apéndice 10.5.14).

Se incubaron a 25°C por 8 semanas con intervalos de subcultivos cada 15d para maduración. Finalmente los embriones maduros fueron colocados en medio RM (Apéndice 10.5.14) para su regeneración.

## **5.6 Obtención de los explantes**

### **5.6.1 Lechuga**

#### **5.6.1.1. Obtención de hojas cotiledonarias**

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

## **5.6.2 Tabaco**

### **5.6.2.1 Obtención de hojas jóvenes**

Se esterilizaron semillas de tabaco siguiendo el mismo protocolo descrito para las semillas de lechuga. Se colocaron de dos a tres semillas en frascos con medio de cultivo RMOP (Apéndice 10.5.14)., después de 4 semanas se obtuvieron plántulas con suficientes hojas jóvenes las cuales fueron utilizadas para los ensayos de regeneración y transformación genética.

## **5.7. Ensayos de transformación genética nuclear vía *A. tumefaciens***

### **5.7.1. Lechuga**

Se utilizaron 300 cotiledones por experimento que fueron heridos con un bisturí, éstos fueron colocados en medio MSO (ver Apéndice 10.5.14) para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una solución de *A. tumefaciens* que portaba el plásmido pBI-VSRn, durante 10 minutos. Después de eliminar el exceso de bacterias con papel absorbente estéril, se colocaron en el medio de cocultivo correspondiente. Pasado el periodo de cocultivo (dos días), los explantes se transfirieron al medio de selección (con 100 mg/L de kanamicina) adicionado con 500 mg/L de cefotaxima para eliminar a la agrobacteria. Los tejidos fueron subcultivados cada dos semanas, seleccionando solo los explantes resistentes a la selección.

### **5.7.2. Tabaco**

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

## **5.8. Ensayos de transformación genética de cloroplastos por el método de biobalística**

### **5.8.1. Obtención del explante**

Se obtuvieron en condiciones de esterilidad hojas de tabaco de cuatro semanas de edad, tal como se describió en el apartado 5.6.2.1, éstas se colocaron en medio RMOP con la cara abaxial hacia arriba.

### **5.8.2. Preparación de la suspensión de micropartículas de oro**

Las micropartículas de oro para el bombardeo fueron preparadas según el protocolo descrito por Daniell y col. 2001.

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

### **5.8.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco**

#### **5.8.3.1. Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés**

La suspensión de partículas de oro previamente preparadas se mezcló en vórtex hasta estar completamente resuspendidas. Se tomaron 50µl de estas partículas y en estricto orden se agregaron: 10 µl de ADN plasmídico de concentración 1 µg/µl, 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5M recién preparado, 20µl de espermidina 0.1M; después de añadir cada solución se agitó con vórtex durante 5 segundos, posteriormente mezcló con vórtex durante 20 min a 4°C; se agregaron 200 µl de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezcló en vórtex, durante 5 segundos, la mezcla fue centrifugada durante 30 segundos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se repitieron los lavados con etanol durante al menos 5 veces, hasta que las partículas de oro eran fácilmente resuspendidas. El paso final fue resuspender las partículas en 35µl de etanol al 100% y se dejan en hielo hasta su uso.

#### **5.8.3.2. Bombardeo de las hojas de tabaco (Pistola Bio-Rad)**

Se utilizaron discos de ruptura de 1,100 psi. La presión del manómetro de salida se ajustó a 1,400 psi, ya que la presión de salida debe ser mayor a la resistencia del disco de ruptura. Se encendió la bomba de vacío y la cámara de vacío para realizar los disparos. Se colocaron 6µl de la suspensión de micropartículas con ADN en los macroacarreadores previamente esterilizados con etanol, se colocó la caja petri con la hoja, a 9 cm de distancia y se cerró la cámara de vacío. Se generó vacío hasta que el indicador marcó 15 Hg (mm de mercurio). Se mantuvo el vacío y se realizó el disparo de las micropartículas con el ADN de interés. Las hojas bombardeadas se incubaron en medio MS durante 48h a 25°C en la oscuridad. Después de este periodo, cada hoja se cortó en fragmentos de alrededor de 5mm<sup>2</sup> y se colocaron en medio RMOP con espectinomicina 500mg/L para inducir la selección de las plantas transplásticas.

Los explantes resistentes a la selección se cambiaron a medio nuevo cada dos semanas.

## **5.9. Transformación genética transitoria de plantas de tabaco**

### **5.9.1 Obtención de plantas de tabaco**

Se esterilizaron semillas de tabaco con y sin nicotina siguiendo el mismo protocolo descrito para las semillas de lechuga. Se colocaron de dos a tres semillas en frascos con medio de cultivo RMOP, después de 4 semanas se obtuvieron plántulas las cuales fueron cuidadosamente transferidas a tierra. Después de tres semanas las plantas fueron utilizadas para realizar la agroinfiltración.

### **5.9.2. Agroinfiltración de plantas de tabaco**

Cada cepa de *Agrobacterium* con la construcción adecuada se puso a crecer en medio de selección (5mL de medio LB + carbanicilina 50mg/L + rifampicina 50mg/mL) durante 24 horas a 28°C. Posteriormente se mezcló 200µl de cada una (ej. 3'-pICH11599-VSRn +5'- pICH17388 + integrasa pICH7410) en un tubo Eppendorf de 1.5mL y se centrifugo a 8,000 rpm durante tres minutos. El pellet fue resuspendido en 2mL del buffer de infiltración. Finalmente las hojas de las plantas de tabaco fueron inoculadas con esta suspensión, para lo cual con ayuda de un bisturí se le realizaron pequeños cortes a la parte abaxial de la hoja y con una jeringa fue introducida la suspensión que contenía la mezcla de las tres construcciones.

## **5.10. Análisis de transformantes**

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

### **5.10.1. Reacción en cde la polimerasa (PCR)**

#### **5.10.1.1 Extracción de ADN genómico**

El ADN genómico se aisló de tejido vegetal siguiendo el protocolo de Michiels y col. (2002). Se congelaron 50 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido, se trituraron en un tubo Eppendorff con un pistilo de plástico y se adicionaron 750  $\mu$ L de buffer de extracción a 60°C [Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.2%, (PVP 2%, CTAB 2% inmediatamente antes de usarse)]. Se incubó a 65°C por 60 minutos con mezclado ocasional para evitar agregaciones en el homogenizado, se añadió 750  $\mu$ l de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) sobre el extracto, se agitó con vórtex, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se transfirió la fase superior a otro tubo y se repitió la extracción hasta limpiar la fase acuosa; ésta se mezcló con 500  $\mu$ l de isopropanol y se incubó a 25°C por toda la noche, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en 750  $\mu$ L de solución de lavado (acetato de amonio 10mM, etanol 70%) y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, se centrifugó por 5 minutos y se repitió el lavado, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire, se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua milli "Q" con RNasa en una concentración final de 10 g/mL, se incubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se añadió un volumen de fenol- cloroformo -alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó para formar una emulsión, se centrifugó por 5 minutos, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo alcohol isoamílico (24:1). Se añadió NH<sub>4</sub>Ac 7.5 M, pH 7.7 en una concentración final de 2.5 M y dos volúmenes de etanol frio, se mezcló e incubó a -20°C por 30 minutos, se precipitó por centrifugación a 13,000 rpm por 10 minutos. Se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%, se secó a 37 °C y se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua milli Q; el ADN se almacenó a -20°C.

Para la cuantificación de ADN se empleó un fluorómetro Tecan modelo Genios, empleando el kit Pico Green. Se preparó una dilución de Pico Green 1:400 en TE 1X y se colocaron 198  $\mu$ l de esta solución en placas de 96 pozos. Se añadieron 2  $\mu$ L de la solución problema y se realizó la medición de fluorescencia (a 485nm excitación/535nm emisión). Para la curva de calibración se emplearon

estándares de 1, 10 y 50 ng/ $\mu$ L y los datos fueron analizados en el software Magellan 4. El rendimiento promedio de ADN fue de 0.5  $\mu$ g/LI.

#### 5.10.1.2. Protocolos de PCR

Se analizó mediante PCR el ADN extraído de 15 callos de lechuga transformada nuclearmente con la construcción pBI-VSRn, los oligonucleótidos que se utilizaron fueron para amplificar el gen de resistencia a kanamicina (NPT II), el cual tiene un tamaño de banda esperado de 600pb aproximadamente. A continuación se muestra el programa utilizado para dicho caso:

Desnaturalización inicial----5min a 94°C

30 ciclos {  
Desnaturalización----30s a 94°C  
Alineamiento-----30s a 57°C  
Extensión-----1min a 72°C

Extensión final----7min a 72°C

Por otro lado a las 15 muestras de ADN anteriores y a la muestra de ADN obtenida a partir de la transformación transitoria de tabaco se les realizó un PCR que amplificaba específicamente 347 pb correspondientes al gen VSRn. El programa utilizado para este caso fue igual al descrito anteriormente con la única diferencia de la temperatura de alineamiento que en este caso fue de 52°C.

En todos los casos la mezcla maestra de reacción (25  $\mu$ l) contenía ADN genómico (20 ng), buffer de Taq polimerasa (1X), MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), dNTPs (0.2mM), oligonucleótidos (10  $\mu$ M) y Taq polimerasa (1U). La secuencia de los oligos utilizados tanto para NPT II y VSRn se muestra en la sección de apéndice.

La amplificación se llevó a cabo en un equipo de Techne, después de la amplificación, las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1%, corridos en TAE 1X a 70 V, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados

bajo luz UV en un fotodocumentador Chemisystem (UVP) empleando el software Labworks 4.0.0.8.

## **5.10.2 Inmunoensayo enzimático (ELISA)**

### **5.10.2.1. Extracción de proteína total soluble**

Se homogenizaron 100 mg de tejido vegetal en 500 $\mu$ L de buffer de extracción (PBS, PMSF 0.1% y leupeptina 10  $\mu$ g/mL). El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford (1968). Se colocó 1  $\mu$ l de la solución problema y se añadió 1.0 mL del reactivo de Bradford, se midió la absorbancia a 595 nm. Se empleó albúmina de suero bovino como estándar (5-20 ng/ $\mu$ l).

## 6. Resultados

### 6.1 Diseño de genes sintéticos para los epítomos de las proteínas F y G del (VSR)

Con base en una extensa revisión de literatura se seleccionaron los epítomos de las proteínas F y G del VSR que se incluyeron en el diseño de los genes sintéticos. De la proteína F del VSR se eligieron las secuencias de aminoácidos 205-223 y 255-278 ya que se ha reportado que son epítomos de las células T además de ser inmunogénicas (Bourgeois y col., 1998; Hyoung y col., 2006). Como se mencionó con anterioridad, se ha demostrado que la proteína G induce un sesgo hacia la respuesta inmune Th2, sin embargo Fan y col. (2005), demostraron que la secuencia de aminoácidos 125-225 de la proteína G del VSR unida a la proteína quimera (F/M) que a su vez está compuesta por un fragmento de la proteína F del virus de sarampión (F:113-131 aminoácidos) y un segmento de la proteína M del VSR (M:81-95 aminoácidos), es capaz de inducir producción de anticuerpos neutralizantes y un adecuado balance entre la respuesta inmune Th1/Th2, por lo cual esta construcción decidió tomarse en cuenta en el diseño de nuestro gen sintético. La secuencia de aminoácidos de cada epítomo seleccionado para el diseño de los genes sintéticos se muestra en la Tabla 5.

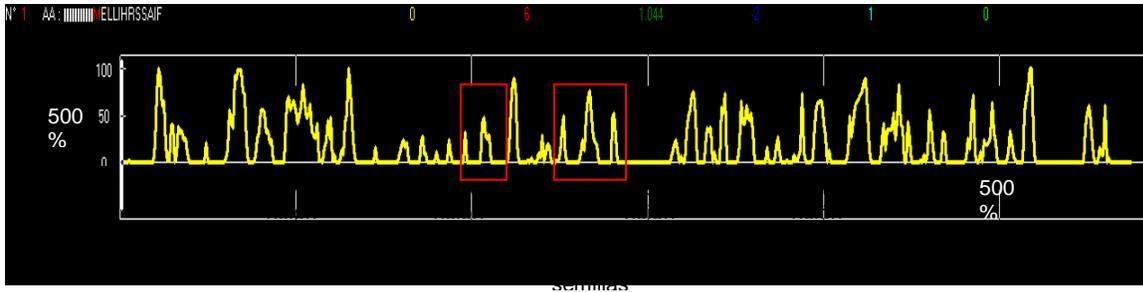
**Tabla 5.** Secuencia de aminoácidos de los epítomos incluidos en el diseño de los genes sintéticos que codifican la proteína antigénica del VSR.

Descripción	Aminoácidos	Secuencia
Epítomo 1F	205-223	PIVNKQSCSISNIETVIEF
Epítomo 2F	255-278	SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV
Epítomo 1G	125-225	TLQSTTVKTKNTTTTKIQPSKPTTKQRQNKPPNKPNNDFH FEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKTTTKPTKK PTIKTTKKDLKPQTTKPKEV
Epítomo 4F*	113-131	FAGVVLAGAALGVAAAAQI
Epítomo 1M	81-95	ESYIGSINNITKQSA
Señal de retención en ER	-----	SEKDEL

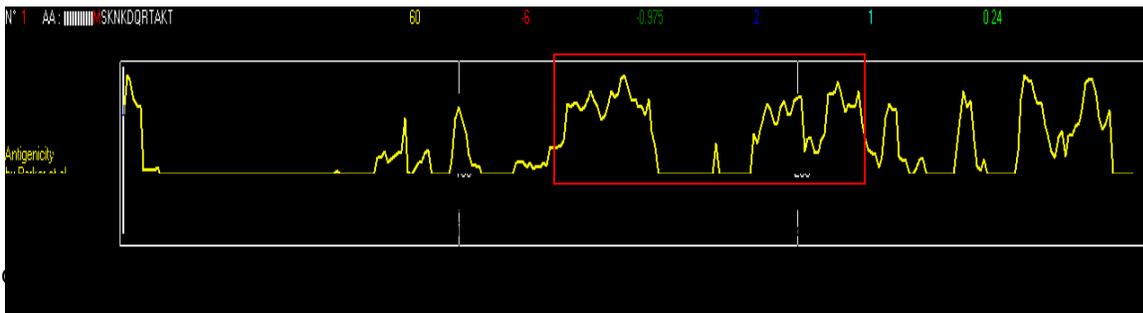
\*Fragmento de la proteína de fusión del virus del sarampión.

Los epítomos seleccionados para el diseño de genes sintéticos fueron además analizados mediante el programa *AntheProt* el cual ayuda a predecir las regiones antigénicas de una proteína en base a su hidrofobicidad (Figura 11).

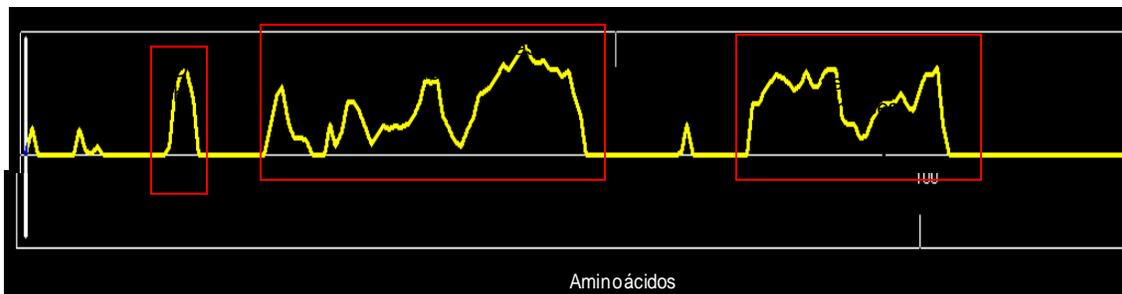
**A**



**B**



**C**



**Figura 11.** Análisis de las secuencias de los genes sintéticos por medio del programa *Antheprot*. A) Secuencia de la proteína F del VSR, en los recuadros se muestran los picos de antigenicidad que corresponden a los epítomos seleccionados. B) Secuencia de proteína G del VSR, en el recuadro se muestra el pico de antigenicidad del epítomo seleccionado. C) Secuencia del péptido sintético, en los recuadros se muestran los picos de antigenicidad de los epítomos (rojo), como se puede ver la secuencia que se intercala correspondiente a los espaciadores (Figuras 8 y 9), no muestra pico de antigenicidad.

Se diseñaron en total tres genes que incluyen los epítomos descritos anteriormente, un gen para transformación nuclear (VSRn), el segundo y tercer gen fueron diseñados para transformación de cloroplastos, pero uno contenía espaciadores ricos en prolina (GP GPG) y otro espaciadores ricos en glicina (GS GGGGS).

Al gen VSRn para transformación nuclear se le añadió una secuencia SEKDEL para la retención en el retículo endoplásmico y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI-121. A los genes para transformación en cloroplastos se les añadió un sitio de unión a ribosoma y sitios de restricción para ser clonados en un vector de transformación de cloroplastos, pBIC.

Para diseñar el gen de transformación de cloroplastos con los espaciadores ricos en glicina (tercera construcción), se procedió a realizar una construcción que incluía los dos primeros epítomos de la proteína F del VSR con los respectivos espaciadores ricos en glicina y finalizaba con un sitio de restricción *Kpn* I. El gen de transformación de cloroplastos con los espaciadores ricos en prolina también cuenta con un sitio de restricción *Kpn* I, que nos permite seleccionar al epítomo GF/My subclonarlo al digerir con la enzima y ligarlo al fragmento anterior. Las Figuras 12, 13 y 14 muestran el diseño de cada uno de los tres genes descritos anteriormente.

A todas las construcciones se le añadieron en el extremo 5' seis codones que codifican histidina con la finalidad de permitir la purificación de la proteína recombinante y también se añadió un sitio de proteasa (TEV) que permite eliminar las histidinas una vez que ha sido purificada la proteína.

**A***Nco* I

**CCATGGGA**CATCATCATCATCATCATGAAAATCTTTACTTCCAAGGACCAATCGTTAACAAGCA  
 TCTTGTTCTATCTCTAACATTGAAACAGTTATTGAATTTGGACCAGGACCAGGATCTGAACTTCT  
 TTCTCTTATTAATGATATGCCAATCACAAACGATCAAAAGAACTTATGTCTAATAACGTTGGAC  
 CAGGACCAGGAACACTTCAATCTACAACAGTTAAAACAAGAACACAACAACAACAAGATCCA  
 ACCATCTAAGCCAACAACAAGCAAAGACAAAACAAGCCACCAACAAGCCAAATAACGATTTCT  
 CATTTCGAAGTTTTTAATTTTCGTTCCATGTTCTATCTGTTCTAATAACCCAACATGTTGGGCAATT  
 GTAAGAGAATTCCAACAAGAAACCAGGAAAGAAAACAACACTACAAAGCCAACAAGAAACCAAA  
 ATTAACAACAACAAGAAAGATCTTAAGCCACAAACAACAAGCCAAAGGAAGTTTTTGCAGGAG  
 TGTCTTGCAGGAGCAGCACTTGGAGTTGCAGCAGCAGCACAATTGAATCTTATATTGGATCT  
 ATCAATAACATTACAAAACAATCTGCAGGTCCTGGACCAGGATCTGAAAAGATGAACTTTGAT  
**AGAGCTC.**

*Sac* I**B**

LDREGH **Met** HHHHHHENLYFQGPIVNKQSCSISNIETVIEFGPGPGSELLSLIN  
 D **Met** PITNDQKKL **Met** SNNVGP GPGTLQSTTVKTKNTTTTKIQPSKPTTKQRQN  
 KPPNKPNNDFHFEVFNFPVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKTTTKPTKKP  
 TIKTTKDLKPQTTPKEVFAGVVLGAAALGVAAAAQIESYIGSINNITKQSA  
**Stop Stop** LE

**Figura 12.** Primera construcción, gen para transformación nuclear (VSRn). A) Secuencia nucleotídica del gen VSRn optimizada para su expresión en plantas por la compañía GeneScript. B) Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen VSRn. Longitud del gen: 656pb. En verde se muestran los sitios de restricción (*Nco* I y *Sac* I).

**A***Xba I*

**TCTAGATA**GGGAGGGACATATGCATCATCATCATCATGAAAATCTTTACTTCCAAGGACCA  
 ATCGTTAACAAGCAATCTTGTTCTATCTCTAACATTGAAACAGTTATTGAATTTGGACCAGGACC  
 AGGATCTGAACTTCTTTCTCTTATTAATGATATGCCAATCACAAACGATCAAAAAGAACTTATGT  
 CTAATAACGTTGGACCAGGACCA**GGTACC**CTTCAATCTACAACAGTTAAAAACAAGAACAACAAC  
 AACAAACAAGATCCAACCATCTAAGCCAACAACAAGCAAAGACAAAACAAGCCACCAAAACAA  
 GCCAAATAACGATTTCCATTTTCGAAGTTTTTAATTTTCGTTCCATGTTCTATTTGTTCTAATAACCC  
 AACATGTTGGGCAATCTGTAAGAGAATTCCAAACAAGAAACCAGGAAAGAAAACAACACTACAAAG  
 CCAACAAGAAACCAACAATTAACAACAAGAAAGATCTTAAGCCACAAACAACAAGCCAA  
 AGGAAGTTTTTGCAGGAGTTGTTCTTGCAGGAGCAGCACTTGGAGTTGCAGCAGCAGCACAAA  
 TTGAATCTTATATTGGATCTATCAATAACATTACAAAACAATCTGCATGATAA**CTCGAG**

*Xho I***B**

LDREGH **Met** HHHHHHENLYFQGPIVNKQSCSISNIETVIEFGPGPGSELLSLIN  
 D **Met** PITNDQKKL **Met** SNNVGGPGTLQSTTVKTKNTTTTKIQPSKPTTKQRQ  
 NKPPNKPNNDFHFEVFNFPVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKTTTKPTKK  
 PTIKTTKKDLKPQTTPKEVFAGVVLAGAALGVAAAQIESYIGSINNITKQSA  
**Stop Stop** LE

**Figura 13.** Segunda construcción, gen para transformación de cloroplastos (VSRc). A) Secuencia nucleotídica del gen VSRc optimizada para su expresión en plantas B) Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen VSRc. Longitud del gen: 637pb. En verde se muestran los sitios de restricción (*Xba I*, *Kpn I* y *Xho I*, respectivamente).

**A***Xba I*

**TCTAGATA**GGGAGGGACATATGCATCATCATCATCATGAAAATCTTTACTTCCAAGGACCA  
 ATCGTTAACAAGCAATCTTGTTCTATCTCTAACATTGAAACAGTTATTGAATTTGGATCTGGAGG  
 AGGAGGATCTTCTGAACTTCTTTCTCTTATTAATGATATGCCAATCACAAACGATCAAAAAGAAAC  
 TTATGTCTAATAACGTTGGAGGAGGT**GGTACC**

*Kpn I***B**

LDREGH **Met** HHHHHHENLYFQGPIVNKQSCSISNIETVIEFGSGGGGSSELLSL  
 IND **Met** PITNDQKKL **Met** SNNVGGGGT

**Figura 14.** Tercera construcción, gen para transformación de cloroplastos (VSRc) A) Secuencia nucleotídica del gen VSRc optimizada para su expresión en plantas . B) Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen VSRc. Longitud del gen: 226pb. En verde se muestran sitios de restricción (*Xba I* y *Kpn I*).

### 6.1.1 Diseño de un gen sintético con actividad antiviral

Como una alternativa al diseño de genes sintéticos que codifican proteínas antigénicas del VSR, se decidió realizar una cuarta construcción con base en los reportes de Graham y col., 2004, donde demuestran que un segmento (aminoácidos 80-94) de una proteína transmembranal con actividad de GTPasa denominada RhoA posee actividad antiviral contra el VSR.

Esta construcción puede ser una alternativa a la producción del anticuerpo monoclonal usado actualmente en la profilaxis (palimizumav), dirigido a la proteína F, ya que al producirlo en plantas se reducirían sus costos. En caso de que controle eficazmente la replicación se podría producir masivamente en plantas y ofertarse a un menor precio.

La cuarta construcción fue denominada VSRpa y se colocaron los sitios de restricción apropiados para ser clonada en el vector binario pBI121 además se añadieron los codones que codifican para las seis histidinas, el sitio de proteasa y la señal de retención (Figura 15). También se pretende expresarla en el sistema de vectores virales Magniffection.

#### A

*Nco I*

CCATGGGACATCATCATCATCATGAAAATCTTTACTTCCAAGGAATCCTTATGTGTTTCTCT  
ATCGATTCTCCAGATTCTCTTAAAATTCTGAAAAGATGAACTTTGATGAGAGCTC

*Sac I*

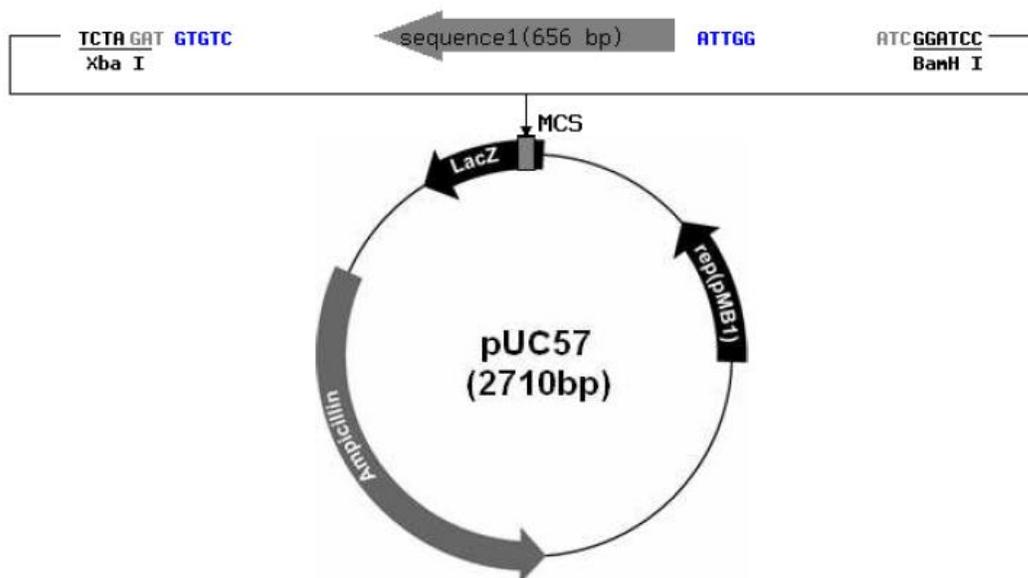
#### B

..MGHHHHHENLYFQGILMCFSIDSPDLENSEKDEL..EL

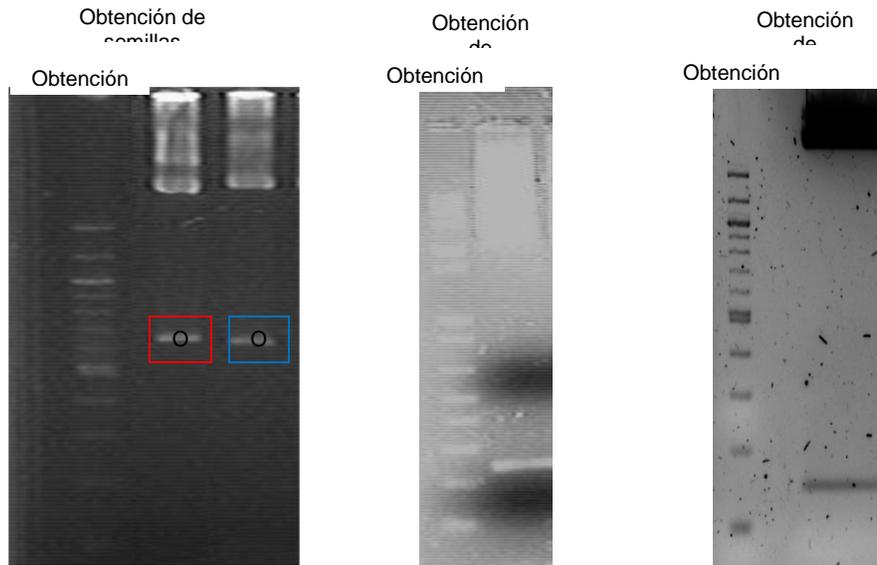
**Figura 15.** Cuarta construcción, gen que codifica un péptido con actividad antiviral. A) Secuencia nucleotídica del gen VSRpa optimizada para su expresión en plantas B) Secuencia de aminoácidos correspondiente al gen VSRpa, en subrayado se muestran los aminoácidos que componen al péptido antiviral. Longitud del gen: 122pb. En verde se muestran sitios de restricción (*Nco I* y *Sac I*).

## 6.2 Construcciones genéticas

Las construcciones genéticas fueron clonadas originalmente en el vector pUC por la compañía GeneScript, una vez que en el laboratorio se contaba con dichas construcciones se procedió a confirmar mediante restricción la identidad de cada gen, para lo cual las enzimas que se utilizaron fueron *Xba* I y *Bam*H I, ya que en todos los casos los genes estaban flanqueados por estos sitios de restricción (Figura 16). La Figura 17 muestra el patrón de restricción esperado para cada uno de los genes.



**Figura 16.** Se muestra el gen uno (VSRn) que consta de 656pb y está flanqueado por los sitios de restricción *Xba* I y *Bam*H I. Todos los genes sintéticos fueron clonados de la misma manera por la compañía GeneScript.



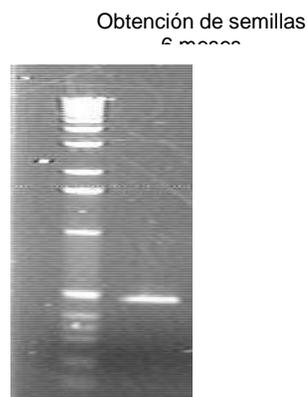
**Figura 17.** Se muestra la liberación de cada una de las cuatro construcciones mediante la digestión con las enzimas *Xba* I y *Bam*H I. A) Gen 1 de 656 pb (recuadro rojo), gen 2 de 637 pb (recuadro azul); M: marcador de 1Kb. B) Gen 3 de 226 pb; M: marcador de 100 pb. C) Gen 4 de 122 pb; M: marcador de 100 pb.

### 6.2.1 Construcción nuclear (VSRn)

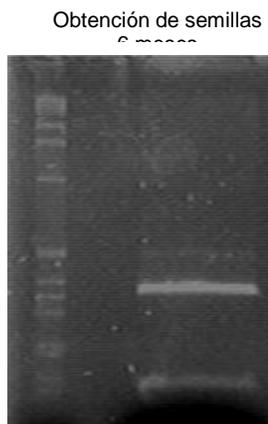
Para realizar la primera construcción nuclear se obtuvo un fragmento 5'-UTR de una construcción existente en el laboratorio desarrollada por el Dr. Rosales-Mendoza, 2008 en un proyecto para generar una vacuna contra la diarrea del viajero, el cual se ligó al gen VSRn en el vector binario pBI-121.

### 6.2.2 Obtención del 5'UTR

Se realizó una PCR de la construcción 5'UTR-LTB-ST, con la enzima Pfu (Figura 18). Posteriormente el producto de esta PCR fue digerido con *Nco* I para liberar el fragmento de 120pb correspondiente al 5'UTR (Figura 19).



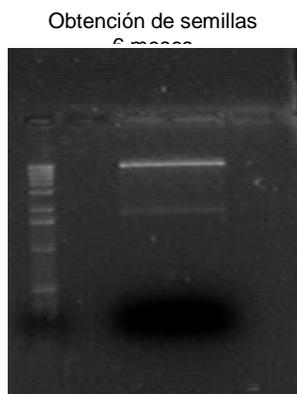
**Figura 18.** PCR de la construcción 5'UTR-LTB-ST. Los oligonucleótidos utilizados fueron F-TEV y R-LTBST, 1: Producto del PCR correspondiente a 490 pb; M: Marcador de peso molecular 1Kb.



**Figura 19.** Obtención de la secuencia 5'UTR. 1: Digestión con *Nco* I del producto del PCR anterior, se muestra el fragmento esperado de 120 pb correspondiente a la secuencia 5'UTR. M: Marcador de peso molecular 1Kb.

### 6.2.3 Digestión del vector binario pBI-121

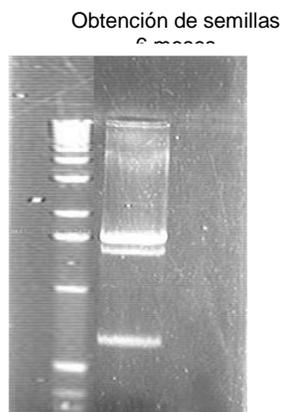
El vector pBI-121 fue digerido con las enzimas de restricción *Sma* I y *Sac* I, con la finalidad de liberar el cassette del gen GUS (Figura 20). Después el vector digerido fue purificado con el kit QIAquick gel extracción de Qiagen, y de esta manera el vector quedó listo para poder realizar la clonación de nuestro gen de interés.



**Figura 20.** Digestión del vector pBI-121 con las enzimas *Sma* I y *Sac* I. 1: Vector digerido; M: Marcador de peso molecular 1Kb. Se muestra la liberación del fragmento de 1,800pb correspondiente al gen GUS.

### 6.2.4 Digestión del gen VSRn

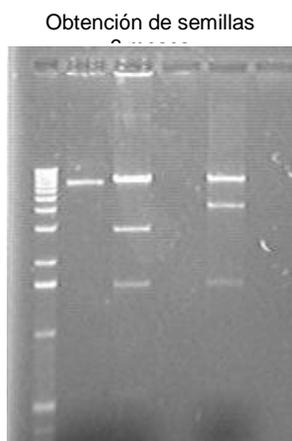
El gen para transformación nuclear (VSRn) fue liberado a partir del plásmido pUC con las enzimas de restricción *Nco* I y *Sac* I (Figura 21). La banda de 656 pb correspondiente al gen fue purificada con el kit QIAquick gel extraction de Qiagen.



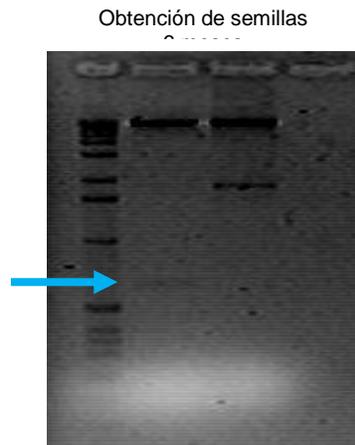
**Figura 21.** Digestión del gen VSRn con las enzimas *Nco* I y *Sac* I. 1: Gen VSRn digerido; M: Marcador de peso molecular 1Kb. Se muestra la banda de 656 pb correspondiente al gen.

### 6.2.5 Clonación del 5'UTR y del gen VSRn en el vector pBI-121

Se realizó una triple ligación del 5'UTR, el gen VSRn y el vector pBI-121, con dicha ligación se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F'), se inoculó en medio de selección (LB + 50mg/L kanamicina) y se obtuvieron dos clones, a los cuales se les realizaron ensayos de restricción para comprobar si el 5'UTR y el gen VSRn habían sido correctamente clonados. La primera digestión se realizó con las enzimas de restricción *Hind* III y *Nco* I, si la clona era positiva se esperaban las siguientes bandas: 8,211pb, 2,909pb, 1,552pb, 528pb y 327 pb. Como control también se realizó la digestión del vector pBI-121; en este caso las bandas esperadas fueron: 8,211pb, 4,140pb, 1,552pb, 528pb y 327pb (Figura 22). Una de las dos clones mostró el patrón de restricción esperado, a esta clona se le realizó una segunda digestión con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sac* I para comprobar la liberación de la construcción clonada en el vector pBI-121 (Figura 23).



**Figura 22.** Digestión con *Hind* III y *Nco* I de las dos clones resistentes a la selección. 1: Clona uno; 2: Clona 2; 3: Control (vector completo pBI-121); M: Marcador de peso molecular 1Kb.



**Figura 23.** Digestión con *Xba* I y *Sac* I. 1: Clona 2; 2: Control (vector completo pBI-121). Se muestra la liberación del fragmento de 776pb correspondiente a la construcción clonada (120 pb del 5'UTR + 656 pb del Gen VSRn)

Finalmente el resultado de esta clonación dio lugar al plásmido pBI-VSRn el cual fue utilizado para la transformación nuclear de lechuga y tabaco (Figura 24).



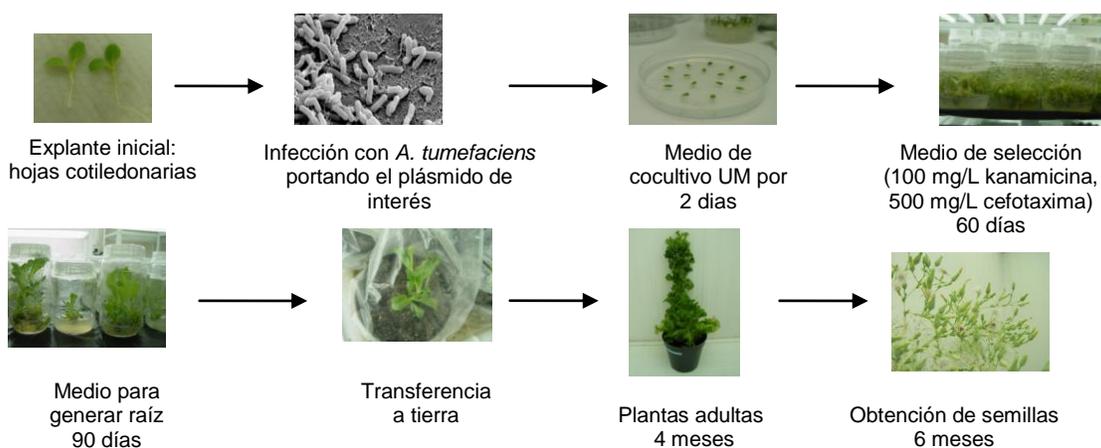
**Figura 24.** Plásmido pBI-VSRn usado para la transformación nuclear de tabaco y lechuga. En amarillo se indican los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-DNA, el gen VSRn (en azul) flanqueado por sitios de restricción. En rosa se muestra el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S-Pro) y en rojo el gen de selección (*nptII*).

### 6.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

El vector binario fue transferido a *A. tumefaciens* mediante electroporación. Después de dos días de cultivo en medio selectivo se presentó desarrollo bacteriano, lo cual indicó que la transformación fue exitosa. La presencia del plásmido fue confirmada realizando su extracción y análisis en un gel de agarosa, en el que se visualizó el plásmido en todos los casos (resultados no mostrados).

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

La estandarización de la regeneración de plantas de tabaco y lechuga fue realizada en el laboratorio con anterioridad por Martínez-González (2005), en el caso de lechuga este proceso toma aproximadamente 6 meses (Figura 25); para el caso del tabaco el proceso es de 4 meses.

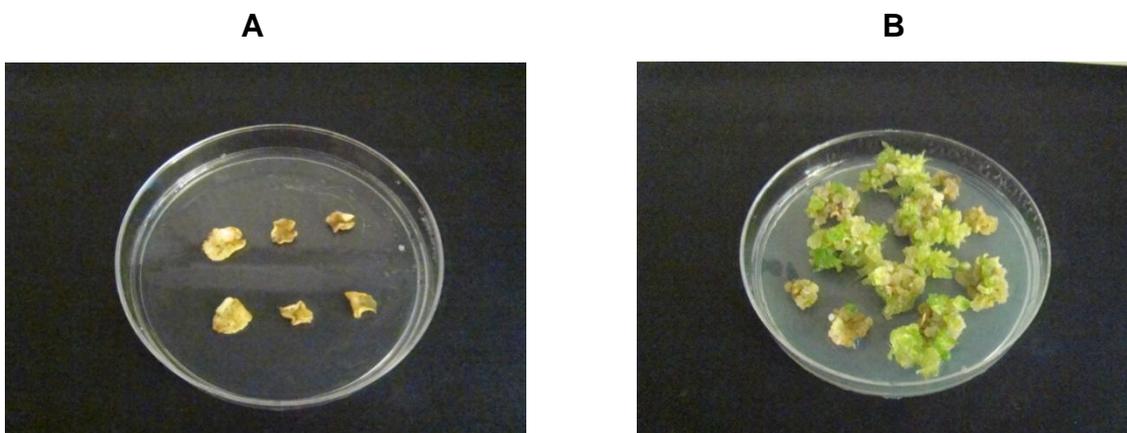


**Figura 25.** Representación esquemática de la transformación de plantas vía *Agrobacterium* y regeneración de plantas de lechuga. Se muestra el tiempo acumulado para llegar a cada una de las etapas.

## 6.5. Transformación genética nuclear vía *A. tumefaciens* con el plásmido pBI-VSRn

### 6.5.1. Lechuga

La transformación de plantas de lechuga fue realizada mediante la infección de cotiledones con la cepa de *A. tumefaciens* que portaba la construcción pBI-VSRn y se llevó a cabo como se describió en la sección de metodología; los cotiledones infectados se colocaron en medio de selección (MS104 +100mg/L kanamicina + 500 mg/L cefotaxima), se cambiaron de medio cada dos semanas hasta la formación de callos y brotes mostrados en la Figura 26.

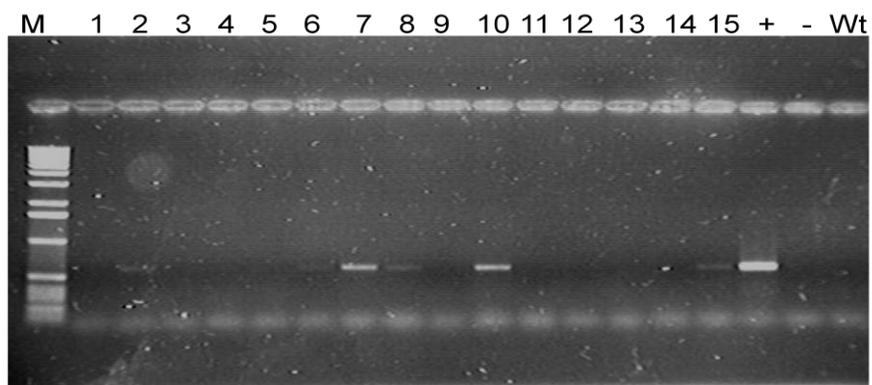


**Figura 26.** Formación de callos y brotes de lechuga regenerados a partir de cotiledones infectados con el plásmido binario pBI-VSRn. A) Control negativo (cotiledones sin infectar) B) Cotiledones de lechuga infectados con el plásmido pBI-VSRn. Fotos tomadas a las 5 semanas.

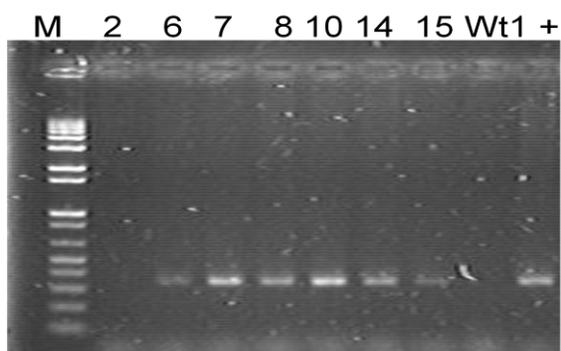
### 6.5.2 Análisis de transformantes

#### 6.5.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para comprobar la presencia del transgén VSRsn, se realizó un análisis por PCR de 15 callos resistentes a kanamicina obtenidos a partir de la transformación nuclear de lechuga. Como primer paso se realizó una PCR para la amplificación del gen de selección *nptII*. Las muestras que dieron positivas (Figura 27), fueron sometidas a una segunda PCR para amplificar específicamente un fragmento interno del gen VSRn de 347 pb (Figura 28).



**Figura 27.** Productos de PCR mostrando el gen de selección *nptII* en callos de lechuga resistentes a la selección después de haber sido transformados nuclearmente con la construcción pBI-VSRn. 1-15: muestras; +: control positivo (plásmido pBI-121); -: control negativo de PCR; Wt: ADN de callo de lechuga sin transformar; M: marcador de peso molecular 1Kb.

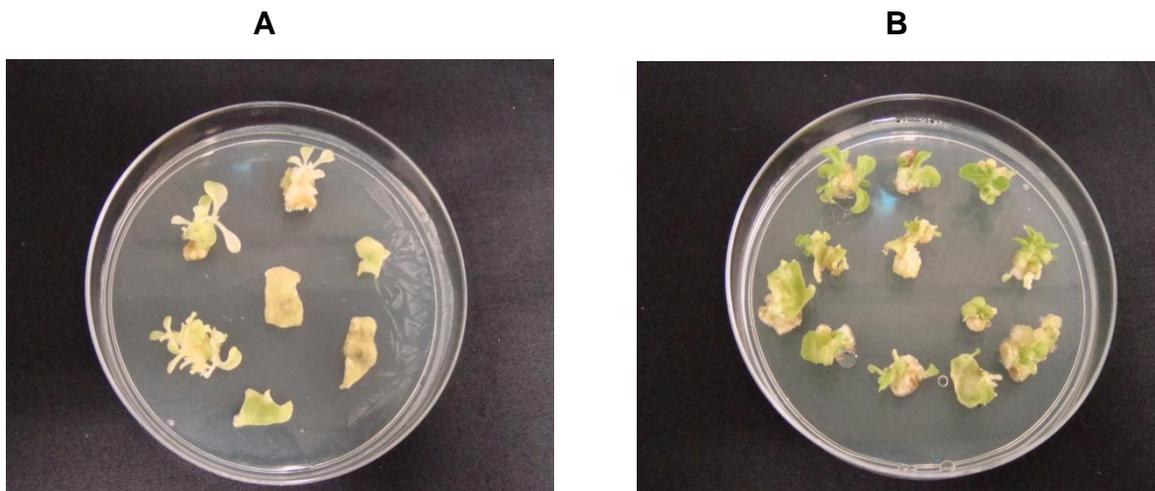


**Figura 28.** Productos de PCR para amplificar específicamente un segmento del gen VSRn correspondiente a 347pb. 2,6,7,8,10,14,15: muestras de callo de lechuga; Wt1: muestra de callo de lechuga sin transformar, M: marcador de peso molecular 100pb.

De un total de 16 muestras analizadas para detectar la presencia del gen VSRn en las plantas transformadas, 6 fueron positivas.

### 6.5.3. Tabaco

La infección de hojas de tabaco con el plásmido binario pBI-VSRn se realizó como se describe en la sección de metodología. Las hojas de tabaco infectadas con el plásmido pBI-VSRn se colocaron en medio de selección (RMOP + 200mg/L kanamicina + 500 mg/L) hasta la formación de callo y brotes organogénicos (Figura 29).



**Figura 29.** Formación de brotes de tabaco regenerados a partir de hojas infectadas con el plásmido binario pBI-VSRn. A) Control negativo (hojas sin infectar) B) Hojas de tabaco infectadas con el plásmido pBI-VSRn. Fotos tomadas a las 6 semanas.

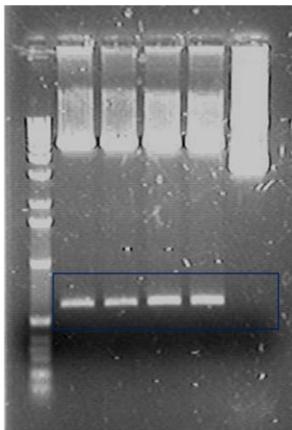
## 6.6. Construcción para la transformación de cloroplastos de tabaco

### 6.6.1. Clonación del gen VSRc en el vector pBIC

El gen VSRc para transformación de cloroplastos fue liberado a partir del vector pUC mediante digestión con las enzimas de restricción *Xba* I y *Xho* I, la banda liberada de 626pb correspondiente al gen VSRc fue clonada en el vector pBIC previamente digerido con las mismas enzimas. La ligación del gen VSRc en dicho vector se realizó empleando T4 ADN ligasa y 5 $\mu$ L de esta ligación fueron utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F'),

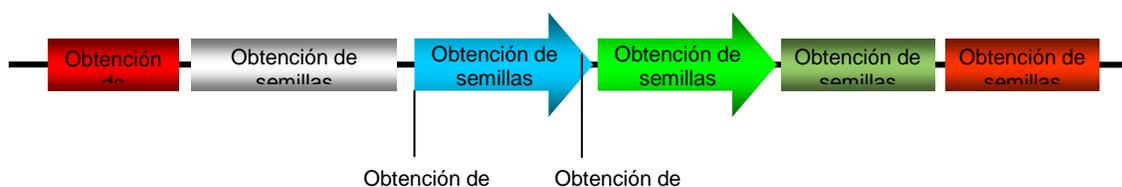
se inoculó en medio de selección (LB + 50mg/L carbenicilina). De las colonias resistentes a la selección se eligieron cinco, las cuales fueron sometidas a un ensayo de restricción con las enzimas *Xba* I y *Xho* I para confirmar la presencia del gen de interés, cuatro de cinco de las clonas fueron positivas (Figura 30).

M 1 2 3 4 5



**Figura 30.** Digestión con las enzimas *Xba*I y *Xho*I, de cinco clonas resistentes a la selección después de haber sido transformadas con la construcción para transformación de cloroplastos. Se muestra el fragmento liberado de 626pb (recuadro azul) que corresponde al gen VSRc. 1-5: Diferentes clonas; M: Marcador de peso molecular 1Kb.

La clonación del gen VSRc en el vector pBIC dio lugar al plásmido pBIC-VSRc, el cual se ejemplifica en la Figura 31; el gen VSRc quedó bajo el control del promotor de origen plastídico *Prn*, se muestra además el gen de selección (*aadA*) que le confiere resistencia a espectinomicina a las células vegetales transformadas.



**Figura 31.** Vector bicistrónico pBIC-VSRc para transformación de cloroplastos de tabaco. En azul el gen VSRc flanqueado por los sitios de restricción.

### 6.6.2 Transformación genética de cloroplastos de tabaco por el método de biobalística

La transformación y regeneración de hojas de tabaco ha sido estandarizada con anterioridad en el laboratorio (Herrera-Díaz, 2005; Patiño-Rodríguez, 2006), el proceso de regeneración se lleva a cabo en aproximadamente cuatro meses (Figura 32).



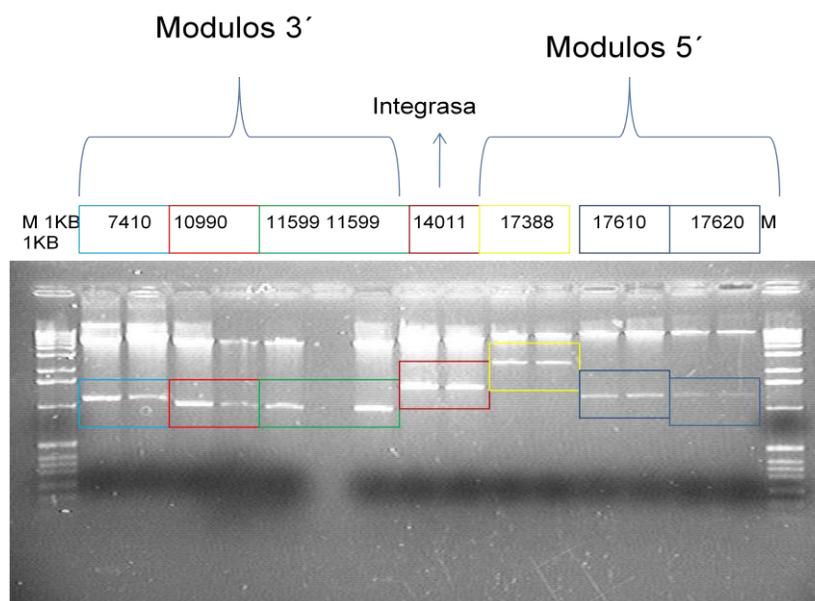
**Figura 32.** Proceso de transformación de hojas de tabaco por el método de biobalística.

El bombardeo de hojas de tabaco se llevó a cabo como se describe en la metodología, las hojas se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5x3 mm y se colocaron en medio de selección, los explantes resistentes a la selección se cambiaron de medio cada dos semanas.

## 6.7. Transformación transitoria de tabaco

### 6.7.1. Vectores Magnifection

Una vez que se contaba en el laboratorio con los 7 vectores magnifection (donados gentilmente por el doctor Gleba de ICON Genetics) se procedió a realizar aislamiento plasmídico por miniprep y a comprobar mediante análisis de restricción cada uno de los plásmidos. El ensayo de restricción mostró el patrón esperado para cada vector (Figura 33).



Vector	Enzimas	Bandas Esperada
pICH11599	<i>Bam</i> HI/ <i>Nde</i> I	5,483 y1,017
pICH10990	<i>Eco</i> RI/ <i>Nde</i> I	5,467 y1,033
pICH7410	<i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	6,017 y1,183
pICH17388	<i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III	1,1431 y2,569
pICH17610	<i>Eco</i> RI/ <i>Sac</i> I	12,713 y1,287
pICH17620	<i>Eco</i> RI/ <i>Sac</i> I	12,713 y1,287
pICH7410	<i>Nco</i> I/ <i>Nde</i> I	7,248 y1,552

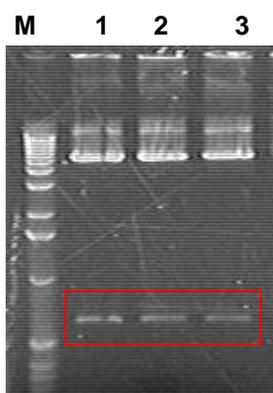
**Figura 33.** Ensayo de restricción para comprobar la identidad de cada uno de los siete vectores magnifection. En todos los casos el tamaño de las bandas fue la esperada.

Finalmente se obtuvo un stock en glicerol de cada uno de los vectores y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 6.7.2 Clonación del gen VSRn en el vector pICH11599

Como se mencionó con anterioridad, los vectores magniflection constan de tres módulos, el 5' que contiene a la replicasa viral y señales que dirigen a la proteína hacia ciertos compartimentos dentro de la célula vegetal; el módulo 3' que tiene sitios de clonación para introducir el gen de interés y el módulo de la integrasa que contiene a la integrasa que va a ensamblar a los dos módulos anteriores.

El gen para transformación nuclear (VSRn) fue clonado en el vector pICH1599, para lo cual tanto el vector como el gen fueron digeridos con las enzimas de restricción *Nco* I y *Sac* I, el fragmento de 656 pb correspondiente al gen y el vector digerido fueron purificados a partir del gel de agarosa mediante el kit QIAquick gel extraction de Qiagen. La ligación del gen VSRn en el vector pICH11599 se realizó empleando T4 ADN ligasa y  $5\mu\text{L}$  de esta ligación fueron utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F'), se plaqueó en medio de selección (LB + 50mg/L carbenicilina). Posteriormente se realizó la digestión del ADN de tres clonas resistentes a la selección y en todos los casos se observó la liberación de un fragmento de 656 pb correspondiente al gen VSRn, lo cual indicó que dicho gen había sido correctamente clonado en el vector pICH11599 (Figura 34). Esta clonación dio lugar al plásmido pICH-VSRn.



**Figura 34.** Digestión de la clonación del gen VSRn en el vector pBI-121, con las enzimas *Nco*I y *Sac*I. Se muestra la liberación del fragmento de 656 pb correspondiente al gen VSRn (recuadro rojo). 1, 2, 3: Clonas 1, 2 y 3 respectivamente; M: Marcador de peso molecular 1Kb.

### 6.7.3 Clonación del gen VSRpa en el vector pICH11599

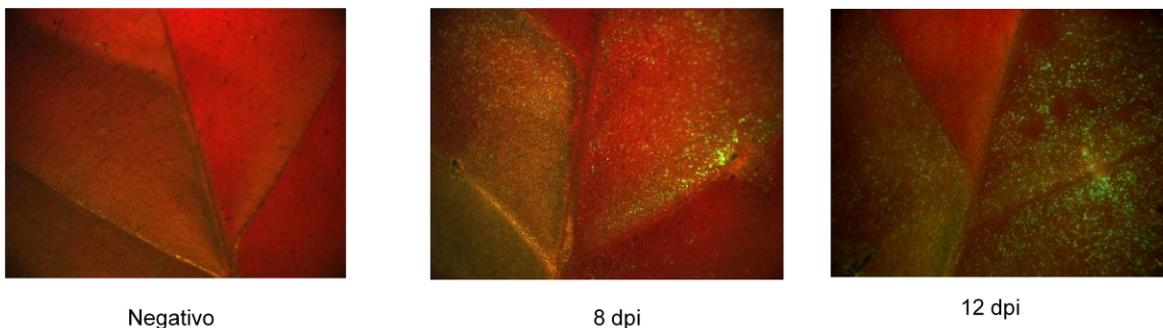
El gen VSRpa, el cual codifica para un péptido con actividad antiviral, también fue clonado en este sistema de expresión, ya que cuenta con los sitios de restricción necesarios para realizar su clonación en el vector pICH11599.

El gen VSRpa fue clonado en el vector pICH11599 siguiendo la estrategia mencionada en el apartado anterior. El ensayo de restricción de las clonas resistentes a la selección mostró la liberación de un fragmento de 122pb correspondiente al gen VSRpa. Esta clonación dio lugar al plásmido pICH-VSRpa (datos no mostrados).

### 6.7.4 Transformación genética transitoria de plantas de tabaco con el plásmido pICH-VSRn

La transformación fue llevada a cabo como se explica en la sección de metodología, se utilizaron plantas de tabaco de 4 semanas de edad y se inocularon con una suspensión de agrobacterias que contenía una mezcla de cada de las siguientes construcciones: pICH-VSRn (módulo 3'), pICH17388 (módulo 5') y pICH-14011 (integrada), como control se utilizó el vector pICH- 7410 (modulo 3') que contiene al gen de la proteína verde fluorescente (GFP).

La expresión de GFP se evaluó a los 8 y 12 días después de la infección mediante el microscopio, para lo cual se utilizó el filtro de luz UV. Se observó la presencia de la proteína verde fluorescente en la mayoría de las hojas infiltradas como lo muestra la Figura 35.

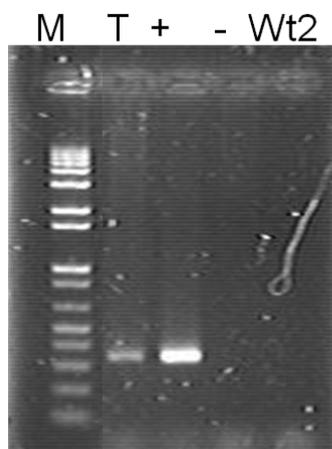


**Figura 35.** Expresión de la proteína verde fluorescente en hojas de tabaco utilizando los vectores magniflection. Dpi: días post infección.

### 6.7.5 Análisis de las transformantes de tabaco obtenidas mediante transformación transitoria

#### 6.7.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para comprobar la presencia del transgén VSRn, se realizó una PCR del ADN extraído del tabaco que fue transformado transitoriamente, el resultado se muestra en la figura 36.

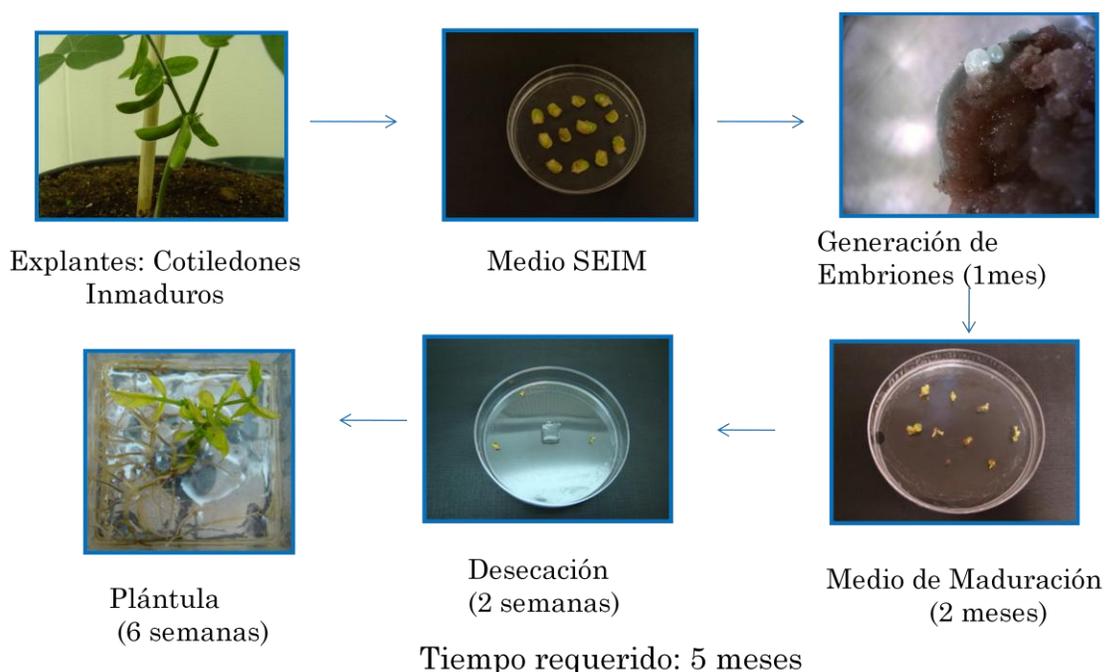


**Figura 36.** PCR para amplificar específicamente un segmento del gen VSRn correspondiente a 347pb. T: muestra tabaco; Wt2: muestra tabaco sin transformar, M: marcador de peso molecular 100pb.

### 6.9 Protocolo de regeneración de soya

Uno de los pasos importantes para poder realizar la transformación genética de cualquier planta es contar con un protocolo de regeneración *in vitro* eficiente, en este trabajo se estableció el protocolo de regeneración de soya, ya que como trabajo futuro en el laboratorio se piensa realizar la transformación genética de este vegetal.

El protocolo de regeneración se describe en la sección de metodología y la Figura 37 muestra imágenes de las primeras plántulas de soya obtenidas mediante embriogénesis somática.



**Figura 37.** Esquematización del protocolo de regeneración de soya establecido en el presente trabajo.

## 7. Discusión

El VSR es uno de los principales agentes etiológicos en padecimientos que afectan al tracto respiratorio bajo; para la edad de 2 años el 90% de los niños ha sufrido una infección por este virus (van Drunen y col., 2007). Con una alta tasa de morbilidad y costos que ascienden a millones de dólares en países desarrollados, la infección por este virus se ha convertido en un problema de salud serio, por lo cual desde 1960 se han realizado diversos esfuerzos para producir una vacuna segura y eficaz contra el VSR; sin embargo el tipo de respuesta inmunológica desencadenada por el virus ha hecho complicada esta tarea. Actualmente se sabe que las proteínas de superficie F y G del VSR son inmunogénicas y que F por si sola causa una respuesta inmunológica predominantemente Th1 mientras que G produce una respuesta inmunológica predominantemente tipo Th2.

En la actualidad se ha experimentado con vacunas de epítomos recombinantes ya que tienen las ventajas de que al poder seleccionar los epítomos se disminuyen los efectos secundarios y se pueden seleccionar de diferentes proteínas cubriendo un mayor rango de protección al generar diferentes anticuerpos en los seres inmunizados con estos antígenos, por lo que en este trabajo se decidió diseñar un gen sintético que abarca tanto epítomos de la proteína F como de la proteína G y M con el fin de obtener una mayor protección y un balance adecuado entre la respuesta inmune Th1/Th2. Las regiones candidatas resultados de la búsqueda bibliográfica para seleccionar los epítomos se analizaron mediante el programa *Anteproph* y predicen serán antigénicas como lo muestran la Figura 11. Trabajos previos en nuestro grupo han demostrado que esta predicción *in silico* ha reflejado resultados positivos *in vitro* e *in vivo* (Rosales-Mendoza y col., 2007; Soria-Guerra y col., 2007).

El presente trabajo incluye regiones adicionales al primer trabajo de proteínas antigénicas de VSR realizado en nuestro grupo por Martínez-González (2009) que son los aminoácidos 205-223 de la proteína F del VSR, y una región que pretendemos genere un balance de respuesta Th1/Th2 que son los aminoácidos 125-225 de la proteína G del VSR unida a la proteína quimera (F/M2) que está compuesta por un fragmento de la proteína F del virus de sarampión (F:113-131 aminoácidos) y un segmento de la proteína M del VSR (M:81-95 aminoácidos).

La mayoría de las proteínas recombinantes han sido producidas por “fábricas” biológicas tradicionales como lo son predominantemente cultivos celulares microbiológicos (bacterias o levaduras) o células de mamífero. Sin embargo durante las dos últimas décadas las plantas han sido objeto de estudio para la producción de proteínas de interés terapéutico así como para la producción de vacunas por sus ventajas citadas anteriormente, destacando la reducción en el costo de producción y que el producto o fármaco no requiere de extracciones adicionales si se usa como vacuna comestible (Lico y col., 2008).

Dado las ventajas que ofrecen las plantas como sistemas de expresión, en este trabajo las construcciones diseñadas fueron optimizadas para su expresión en plantas por la compañía GenScript.

Se diseñaron un total de cuatro construcciones genéticas, tres de ellas incluyen los epítomos mencionados anteriormente. La cuarta construcción codifica para un péptido con actividad antiviral y consta de un fragmento (aminoácidos 80-94) de la proteína Rho A. Todas las construcciones pudieron subclonarse en los vectores adecuados y no se observó problemas de crecimiento de *E. coli* ni de *Agrobacterium*, lo cual es importante ya que previamente en nuestro grupo ciertos genes sintéticos han causado problemas al crecimiento de *Agrobacterium*.

Estas construcciones nos permitirán comparar con previas elaboradas en nuestro laboratorio para ver la efectividad de los espaciadores, y el tipo de balance Th1/Th2.

Además, se planea probar en un trabajo futuro la efectividad de péptido antiviral Rho A. El presente trabajo logró el diseño y su clonación en vectores de transformación nuclear y vectores virales Magniffection.

Se logró transformar nuclearmente tabaco y lechuga con la construcción pBI-VSRn, obteniéndose hasta el día de hoy callos y brotes de lechuga y tabaco resistentes a la selección. Los análisis de PCR para detectar la presencia del transgén solo se llevaron a cabo en callos de lechuga ya que el material vegetal de tabaco obtenido hasta la fecha del ensayo era insuficiente, este ensayo mostró la presencia del transgén en 6 de 15 muestras de ADN obtenidas de los callos de lechuga resistentes a la selección, lo cual indica la posibilidad de que brotes generados a partir de estos callos también contengan el transgén.

La transformación nuclear ofrece como principal ventaja que es una transformación estable, lo cual significa que la nueva información introducida a la planta se hereda en las siguientes generaciones (Kaprowski y Yusibov, 2001). Sin embargo la cantidad de proteína que se obtiene es baja (0.01%-2% de la proteína total soluble-PTS) incluso después de haberse optimizado el gen para su óptima expresión en plantas.

Una de las técnicas de transformación genética que permite obtener una mayor cantidad de proteína (>15% PTS) es la transformación de cloroplastos (Streatfield y Howard, 2003.), por lo cual en este trabajo se realizó la transformación de cloroplastos de tabaco con la construcción pBIC-VSRc. Cabe mencionar que la regeneración de callos obtenidas de hojas bombardeadas con genes a expresarse en cloroplastos, no es tan eficiente como la transformación nuclear, al menos en sistemas como lechuga.

A pesar de las diversas ventajas que ofrecen los sistemas de transformación nuclear y de cloroplastos, una desventaja en común es el tiempo que se requiere en obtener una planta transformada genéticamente, el cual puede ir desde 4 meses hasta 1 año según el sistema vegetal que se esté utilizando. Un novedoso sistema de expresión denominado "Magniffection" permite obtener una alta cantidad de proteína recombinante (>40% PTS) en tan solo 2-4 semanas (Marillonet y col., 2006).

Esta técnica se basa en la amplificación transitoria de genes a partir de vectores virales que son entregados a múltiples partes de la planta vía *Agrobacterium*.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica Magniffection en plantas de tabaco, los resultados preliminares mostraron una adecuada expresión de la proteína verde fluorescente dos semanas después de haber realizado la infección con los vectores indicados. Además el gen VSRn fue introducido mediante la misma técnica a plantas de tabaco; los análisis de PCR mostraron la presencia del transgén dos semanas después de la infección. Se está estandarizando la técnica de ELISA para comparar el porcentaje de PTS de lechuga transformada nuclearmente con los niveles producidos por los vectores virales. Esta técnica dará la posibilidad en un futuro de probar diferentes construcciones genéticas de una manera rápida y sencilla y en poco tiempo saber cuál es la construcción que da mejores resultados *in vitro* e *in vivo* antes de realizar las transformaciones estables en las plantas apropiadas que produzcan tejidos comestibles crudos, que por lo general llevan un proceso lento de regeneración.

Finalmente en este trabajo se estandarizó el método de regeneración de soya, esto con el fin de poder producir nuestra proteína recombinante en este sistema, ya que el utilizar semillas de leguminosas tiene la ventaja de que se obtiene una mayor cantidad de proteína heteróloga, alrededor de 2.5-3.5 % de la PTS, en un tejido con larga vida de anaquel por su bajo contenido de agua y que aunque requiere de procesamientos térmicos, existen reportes de vacunas producidas en semillas que han dado buenos resultados. Por otro lado el procesamiento de la semilla de soya es muy amplio pudiéndose obtener leche de soya, salsa de soya o tofu lo cual da como ventaja que las proteínas heterólogas pueden administrarse mediante diferentes vehículos comestibles.

## 8. Conclusiones

Los resultados del presente trabajo demuestran que:

1. La transformación nuclear de plantas de lechuga mediante co-cultivo con la construcción pBI-VSRn, permite la obtención de callos y brotes resistentes al agente de selección y es posible detectar el transgén por PCR.
2. Es posible obtener brotes de tabaco resistentes al agente de selección al realizar la transformación nuclear de plantas con la construcción pBI-VSRn.
3. Al realizar la transformación de cloroplastos de tabaco con el plásmido bicistrónico pBIC-VSR, se obtienen callos resistentes al agente de selección presumiblemente trasplastómicos.
4. La construcción pICH-VSRn usada para transformación transitoria mediante vectores virales a través de la técnica "Magniffection", se puede expresar en tabaco mediante agroinfiltración y es detectada por PCR.

## 9. PERSPECTIVAS

1.- Purificar la proteína recombinante producida en tabaco por vectores virales mediante el sitio de proteasa y la cola de histidinas, la cual servirá como control para la curva estándar en ensayos de ELISA.

2.- Transformar mediante biobalística cloroplastos de lechuga con la construcción con espaciadores ricos en glicina y con la que contiene el péptido Rho A usando el vector específico pADCT6 con sitios de recombinación homóloga de lechuga.

3.-Transformar transitoriamente con vectores virales plantas de tabacos sin nicotina con el gen VSRpa, el cual codifica para un péptido con actividad antiviral.

4.-Transformar nuclearmente soya con el gen VSRn utilizando el vector específico pCAMBIA.

5.- Caracterizar las plantas transgénicas y transplastómicas, obtenidas a partir del total de transformaciones realizadas, mediante PCR, RT-PCR, Southern blot y ELISA.

6.- Una vez comprobada la presencia de los transgenes y la antigenicidad de las proteínas heterólogas, analizar la inmunogenicidad en ratones Balb/c.

7.-Comprobar la inmunoprotección de las proteínas heterólogas en ratas de la raza algodón mediante el reto en mucosas nasales.

7.-Finalmente para el caso del gen VSRpa analizar la actividad antiviral mediante el ensayo de inhibición de la replicación en placas líticas.

## 11. REFERENCIAS

- Argüello-Astorga GR y Herrera-Estrella LR (1994). Métodos de transformación y vectores de expresión en plantas, En: Avances en Ingeniería Genética, 2ª edición, M Vicente (Ed.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Pp. 41-70.
- Bel AJE, Hibberd J, Prüfer D, y Knoblauch M (2001). Novel approach in plastid transformation. *Curr Opin Biotech.* 12:144–149.
- Belanger H, Fleysh N, Cox S, Bartman G, Deka D, Trudel M, Koprowski H y Yusivob V (2000). Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB J*, 14: 2323.
- Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, Hosakote YM, Atmar RL, Macias CG y Piedra P. (2007). Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 195: 1532-1540.
- Bermingham, A., and P. L. Collins. (1999) The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11259.
- Bock y Ruf (2007) Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation , Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 6998-7002
- Bogorad L (2000). Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol* 18: 257–263.
- Bourgeois C, Bour JB, Lindholt K, Gauthay C y Pothier P (1998). Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in infectivity *in vitro*. *J. Virol.* 72: 7221.
- Bradford MM (1968). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G y Nestei EW (1991). Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Meth Enzymol.* 204: 384-397.

- Cárdenas L y Clements JD (1993). Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect Immun.* 61: 4629-4636.
- Carrington JC y Freed DD (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol.* 64(4): 1590-1597.
- Chanock R y Finberg L (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 66:291-300.
- Chanock R, Roizman B y Myers R (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.* 66:281-290.
- Claridades Agropecuarias (1999). Lechuga y trigo. ASERCA.
- Claridades Agropecuarias (2001). Tabaco y soya. ASERCA.
- Clements CJ, Larsen G y Jodar L (2004). Technologies that make administration of vaccines safer. *Vaccine.* 22: 2054-2058.
- K Juhasz, S S Whitehead, P T Bui, J M Biggs, J E Crowe, C A Boulanger, P L Collins, and B R Murphy (1997) The temperature-sensitive (ts) phenotype of a cold-passaged (cp) live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate, designated cpts530, results from a single amino acid substitution in the L protein. *J Virol.* 71(8): 5814–5819.
- Curtis IS, Power JB, Blackhall NW, Laats AMM y Davey MR (1994). Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Exp Bot.* 45: 1441-1449.
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7:84-91.
- Daniell H, Ruiz ON y Dhingra A (2005). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol Transgenic Plants.* 286:111-138.
- Daniell H, Streatfield SJ y Wycoff K (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 6: 219-226.

- Daniell H, Vivekananda J, Nielsen BL, Ye GN y Tewari KK (1990). Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 88-92.
- Davey MR, McCabe MS, Mohapatra U y Power JB (2002). Genetic manipulation of lettuce. En: *Transgenic Plants*. YH Hui, G Khachatourians, D Lydiate, A McHughen, WK Nip y R Scorza (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, 613-635.
- Dellaporta SL, Wood J y Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21.
- Dixon B (1995). The third vaccine revolution. A look at the development of vaccines in today's laboratories. *Bio/Technology* 13:420.
- Dudas RA y Karron R (1998). Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin. Microbiol Rev.* 11: 430-439.
- Falsey AR y Walsh EE (2000). Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev.* 13:371-384.
- Feans R, Peeples ME y Collins PL (2002). Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 76:1663.
- Gelvin (2005). Viral mediated plant transformation gets a boost. *Nat Biotechnol.* 23:684-685
- 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.
- Graham y Budge (2004) Inhibition of respiratory syncytial virus by RhoA-derived peptides: implications for the development of improved antiviral agents targeting heparin-binding viruses. *JAC Antiviral* 54:299-302
- Haq TA, Mason HS, Clements JD y Arntzen CJ (1995). Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science.* 268: 714-715.
- Herrera-Díaz A (2005). Transformación nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos. Tesis de maestría. IPICYT.

- Hyoung JK, Jung-Kwon K, Sang BS, Hoan JL y Hong-Jin K (2006). Intranasal vaccination with peptides and cholera toxin subunit B as adjuvant to enhance mucosal and systemic immunity to respiratory syncytial virus. *Arch Pharm Res* 30: 366-371.
- Kaprowski H y Yusibov V (2001). The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19 (17-19): 2735-2741.
- Kneyber MCJ, Moll HA y Groot R (2000). Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur J Pediatr*. 159: 399-411.
- Koziel MG, Carozzi NB y Desai N (1996). Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol Biol*. 32:393-405.
- Kimpen, J. L (2002). Prevention and treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and postbronchiolitic wheezing. *Respir Res* 3:S40.
- Lal P, Ramachandran VG, Goyal R (2007). Edible vaccines: current status and future. *Indian J. Of medical microbiology*.25 (2): 93-102
- Korban, Ko, Lee y Krasnyanski (2003). Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: Agrobacterium strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theor Appl Genet* 107:439–447
- Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrensse AWM, Plas LHW y Krol AR (2001). Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Exp Bot*. 52 (358): 949-959.
- Lopez JA, Bustos R, Orvell C, Berois M, Arbiza J, García-Barreno B y Melero JA. (1998). Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Virol*. 72: 6922-6928.
- López M, Mallorquín P, Pardo R y Vega M (2004). Vacunas humanas de nueva generación. GENOMA España CIBT/FGUAM.
- Lico, Chen y Santi (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J. Cell Physiol*.216: 366-377
- Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Appella E, Sidney J y Sette A (2002). A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J.of Immunology* 168: 5499–5506.

- Pastey MK, Gower TL, Spearman PW, Crowe JE Jr. y Graham BS (2000). A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *J Virol* 74: 35-40.
- Maliga P (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotech.* 21:20-28.
- Martínez-González L (2005). Transformación genética de lechuga (*Lactuca sativa* L) con un gen sintético de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura UASLP.
- Marty, A., J. Meanger, J. Mills, B. Shields, and R. Ghildyal (2004). Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Arch Virol* 149:199.
- Mason H, Warzecha H, Mor T, y Arntzen C (2002). Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends in Mol Med.* 8: 324-329.
- Michiels A, Van den Ende W, Tucker M, Riet LV y Laere AV (2003). Extraction of high quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal Biochem.* 1(315):85-89.
- Mlynárová L, Loonen A, Heldens J, Jansen RC, Keizer P, Stiekema WJ y Nap JP (1994). Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *Plant Cell.* 6: 417-426.
- Moravec, Schmidt, Herman,(2006) Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* 25 : 1647–1657
- Morris JA, Blount RE y Savage RE (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 92:544-549.
- Murashige T y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Nakano M, Makino M y Sueyoshi K (2003). *Agrobacterium*–mediated transformation of lettuce widely cultivated in Japan. *Jap Crop Sci.* 56 (2): 59-66.

- Napier JA, Richard G y Shewry R (2005). Trafficking and stability of heterologous proteins in transgenic plants. En: *Methods in Biotechnology: Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds*. LC Cunningham y AJR Porter (Eds.) Totowa, NJ: Human Press. 3:189-202.
- Noyola DE, Zuviri-González A, Castro-García J y Ochoa-Zavala JR (2007). Impact of respiratory syncytial virus on hospital admissions in children younger than 3 years of age. *J Infect* 54:180-184.
- Noyola DE, Alpuche-Solís AG, Herrera-Díaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J y López-Revilla R (2005). Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol* 54: 969-974.
- Openshaw PJM y Tregoning JS (2005). Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 18:541-545.
- Patel, Zhu, Menassa, Gyenis, Richman y Brandle (2007). Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins. *Transgenic Res* 16:239-249
- Parker JMR, Guo D y Hodges RS (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry.* 25:5425-5432.
- Patiño-Rodríguez O (2007). Transformación de cloroplastos de lechuga con tres genes sintéticos de protegrinas con actividad antimicrobiana. Tesis de maestría. IPICYT.
- Pileggi M, Mielniczki AA, Silva JS, Veiga SA, y Verma DP (2001). An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. *Braz Arch Biol Tech* 44: 191-196.
- Prince, G. A., Capiou, C., Deschamps, M., Fabry, L., Garçon, N., Gheysen, D., Priels, J.-P., Thiry, G., Van Opstal, O., Porter, D. D. (2000). Efficacy and Safety Studies of a Recombinant Chimeric Respiratory Syncytial Virus FG Glycoprotein Vaccine in Cotton Rats. *J. Virol.* 74: 10287-10292

- Rigano MM y Walmsley AM (2005). Expression system and developments in plant-made vaccine. *Immunol Cell Biol.* 83:271-277.
- Rosales, Solis, Guerra, Fierros, Gonzales, Diaz y Korban (2008). Expression of an Escherichia coli antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants *Plant Journal*
- Rosete DP, Archundia FJ, Cabello C, Mankares ME (2002). Paogenia de las infecciones respiratorias por virus. *Rev Inst Nal Enf Resp México.* 15:239-254
- Zeng R-H, Gong W, Fan C-F, Wang Y-F, Mei X-G (2006). Induction of balanced immunity in BALB/c mice by vaccination with a recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment and a CTL epitope. *Vaccine.* 24: 941-947.
- Romagnani S (1991). Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol today.* 12:256-7.
- Rui-Hong; Gong Wei; Fang Xue-Ping; Zhang Zhen-Ya; Mei Xing-Guo (2005) [Plasmid construction, expression, immunogenicity and protective efficacy of recombinant protein candidate vaccine of respiratory syncytial virus] *Chinese journal of biotechnology* 21(4):534-9.
- Ruuskanen, (1989) Acute otitis media and respiratory virus infections. *Pediatr Infect Dis* 1. 8, 94-99.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier L, Korban SS, Osadjan MD y Buetow DE (2000). Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Trans Res.* 9: 127-135.
- Sandhu JS, Osadjan MD, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS y Buetow DE (1999). Enhanced expression of the human respiratory syncytial virus-F gene in apple leaf protoplasts. *Plant Cell Rep.* 18: 394-397.
- Simoes, E. A. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* 1999; 354:847.

- Singh SR, Dennis VA, Carter CL, Pillai SR, y Moore EG (2007). Respiratory syncytial virus recombinant F protein (residues 255-278) induces a helper T cell type 1 immune response in mice. *Viral immunology*. 20:265-275
- Spann, K. M., K. C. Tran, B. Chi, R. L. Rabin, and P. L. Collins (2004) Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human Respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol* 78:4363.
- Stott, E. J. y Taylor, G. (1985). Respiratory syncytial virus: brief review. *Archives of Virology* 84: 1-52
- Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V, y Gleba Y (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *PNAS*. 101:6852-6857
- Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Márquez-Mercado C, López-Revilla R, Castillo-Collazo R y Alpuche-Solís AG (2007). Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene. *Plant Cell Rep*. 26:961–968.
- Stern y Makel (2005). The history of vaccines and immunization: Familiar patterns, New challenges. *HEALTH AFFAIRS ~ Volume 24, Number 3: 611-621*
- Streatfield SJ y Howard JA (2003). Plant production systems for vaccines. *Expert Rev Vacc*. 2 (6): 763-775.
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodars SL, Beifuss K, Horn ME, Delaney DE, Tizard LR y Howard JA (2001). Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*, 19: 2742-2748.
- Sugiura M (2003). History of chloroplast genomics. *Photosynth Res*. 76:371–377.
- Svab Z, Hajdukiewicz P y Maliga P (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 8526-8530.
- Trigiano RN y Gray DJ (2000). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, CRC Press, 2<sup>da</sup> Edición.

- Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L y Nagy E (2000). Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*. 18: 2023-2028.
- Tyagi AK (2001). Plant genes and their expression. *Curr Sci*. 80:161-169.
- Van Drunen Littel-van den Hurk S, Mapletoft JW, Arsic N, Kovacs-Nolan J. (2007) Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication. *Rev Med Virol*.17(1):5-34.
- Van Ginkel FW, Nguyen HH y McGhee JR (2000). Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 6(2):123-132.
- Vergara HSJ, Gutierrez MA y Mohapatra SS (2006). Biología molecular del virus sincicial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. *Revisiones básicas*. 22: 135-153.
- Walmsley AM y Arntzen CJ (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opinion Biotech*. 11: 126-129.
- Yu J y Landrige WH (2001). A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biothechnol*. 19: 548-552.
- Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper D C y Koprowski H (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 5784-5788.
- Zambrysky PC (1992). Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Plant Mol Biol*. 43: 465-490.
- Zupan y Zambryski (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiol*. 107: 1041-1 047

## 11. Apéndice

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

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

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

### 11.2. Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*

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

resuspendió la pastilla en 400  $\mu$ l de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50 $\mu$ l y se almacenaron a -80°C. La misma metodología fue utilizada para preparar células electrocompetentes de la cepa de *Agrobacterium* GV3101 utilizada en los ensayos de transformación transitoria de tabaco.

### 11.3. Extracción de ADN plasmídico

Se basó en el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Se tomó 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, se eliminó parte del sobrenadante, se resuspendió la pastilla con vórtex y se añadió 150  $\mu$ l de la solución I de Birnboim (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 10 mM), se mezcló en vórtex y se agregaron 300  $\mu$ L de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién preparada, se agitó por inversión 5 veces, se añadieron 225  $\mu$ l de la solución III de BD (Acetato de sodio 3M, pH 4.8), se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se adicionó un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7 y un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se precipitó a -20°C por 30 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 300  $\mu$ l de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se agregó RNAsa y se incubó a 37°C por una hora, nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN con acetato de sodio e isopropanol frío, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm y se secó la pastilla a 50-60 °C, se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua milli Q y se almacenó a -20 °C.

## 11.4. Preparación de soluciones y medios de cultivo

### 10.4.1 TAE 50X

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

### 11.4.2. Agarosa 1%

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

### 11.4.3. Mezcla basal de sales MS

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

Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 250 mL a 4°C.

### 11.4.4. Vitaminas MS

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0

Ácido nicotínico	1.0	1.0
Piridoxina	1.0	1.0

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

#### 11.4.5. Vitaminas B5

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

Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -70 °C.

#### 11.4.6. Kanamicina

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

#### 11.4.7 Cefatoxima

Para preparar un stock de 500 mg/mL, se disolvieron 2 gramos de cefatoxima en agua desionizada. Se aforó a 4 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2  $\mu$ m) y se almacenó a -20 °C.

#### 11.4.8 Rifampicina

Para preparar un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 gramos de rifampicina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2  $\mu$ m) y se almacenó a -20 °C.

#### **11.4.9. Ácido naftalenacético (ANA)**

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

#### **11.4.10. Benciladenina (BA)**

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

#### **11.4.11. Cinetina (Cin)**

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

#### **11.4.12. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)**

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

#### **11.4.13. Procedimiento general para la preparación de medios de cultivo**

Para preparar un litro de medio de cultivo, se añadieron 10 mL de cada solución MS (MS I – MS V) a 700 mL de agua desionizada. Se adicionaron 30 gramos de sacarosa y, después de añadir reguladores de crecimiento y vitaminas apropiados, el pH fue ajustado a 5.7 con hidróxido de sodio 1 N / ácido clorhídrico 1 N y se aforó con agua destilada estéril. Para los medios semisólidos se añadieron 7 gramos de agar. Los medios se esterizaron a 15 lb/pulgada<sup>2</sup> por 15 minutos.

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

#### 11.4.14. Composición de medios de cultivo

Medio	Vitaminas	ANA (mg/L)	BA (mg/L)	Cinetina (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Caseína (g/L)	pH
MS	MS						5.7
MSO	B5	-	-	-	-	-	5.7
MS104	B5	0.05	0.02	-	-	-	5.7
MSJ	MS	1.0	0.5	-	-	-	5.7
UM	MS	-	-	0.25	2.0	2.0	
RMOP	B5	1.0	0.1	-	-	-	5.8
SEIM I	B5	-	-	-	40	-	7.0
SEIM III	B5	-	-	-	20	-	7.0
MM*	B5	-	-	-	-	-	5.8
RM	B5	-	-	-	-	-	5.6

\* Este medio va adicionado con 6% de maltosa.

#### 11.4.15. Medio de cultivo YM

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

#### 11.4.16. Medio de cultivo LB

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

#### 11.4.17. Soluciones Bradford

##### 11.4.17.1. Solución A

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

**11.4.17.2. Solución B**

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

**11.4.18. Buffer salino de fosfatos (PBS)**

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

**11.4.19. Buffer de carbonatos**

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

**11.4.18. Buffer de fosfatasa alcalina**

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