



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Evaluación *in vitro* de un péptido antiviral
(HRA2pl) e *in vivo* de una proteína antigénica
(hMPVpl) producidas en plantas contra el
metapneumovirus humano”**

Tesis que presenta

M.C. Verónica Araceli Márquez Escobar

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2015



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Evaluación in vitro de un péptido antiviral (HRA2pl) e in vivo de una proteína antigénica (hMPVpl) producidas en plantas contra el metapneumovirus humano**" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Verónica Araceli Márquez Escobar** y aprobada el **6 de Julio de 2015** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

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

Dra. Irene Castaño Navarro
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel
(Miembro del Comité Tutorial)

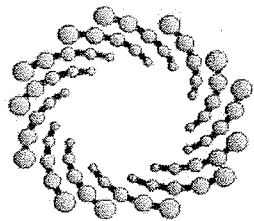
Dr. Abel Gutiérrez Ortega
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 332439) y se contó con el apoyo del proyecto de Ciencia Básica CONACYT154790.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 079 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 17:25 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|--|------------------------|---------------|
| Dr. Daniel Ernesto Noyola Cherpitel | Presidente | UASLP |
| Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro | Secretaria | IPICYT |
| Dr. Abel Gutiérrez Ortega | Sinodal externo | CIATEJ |
| Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís | Sinodal | IPICYT |

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Verónica Araceli Márquez Escobar

sobre la Tesis intitulada:

Evaluación in vitro de un péptido antiviral (HRA2pl) e in vivo de una proteína antigénica (HMPVpl) producidas en plantas contra el metapneumovirus humano

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

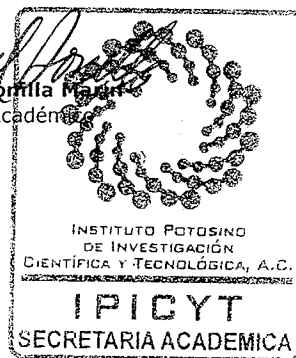
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes de julio de 2015.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Martín
Secretario Académico



Dedicatorias

Una vez más a mí mami que siempre estuvo y está escuchándome y orientándome para seguir adelante, gracias a sus consejos pude realizar mi doctorado y alcanzar mis objetivos.

A mi papi quien incondicionalmente me brinda su cariño, felicidad y apoyo.

A mi hermano que me echa la mano cada vez que puede, que me brinda alegría y me da su confianza.

A Héctor que me ha acompañado estos últimos 3 años con paciencia y amor.

A Dios por quererme tanto.

¡Los quiero mucho!

Agradecimientos

Al Dr. Ángel que me dio un espacio en su grupo de investigación, me tuvo paciencia y me corrigió el trabajo para obtener mejores resultados. También por haberme compartido sus experiencias académicas y orientarme para seguir superándome.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Daniel, Dra. Irene y Dr. Abel que revisaron mi trabajo y me dieron sus comentarios y sugerencias.

A la Dra. Rocío Tirado Mendoza que me recibió en su laboratorio y me enseñó a trabajar con cultivo celular. No solo en lo laboral sino también en lo personal me brindó el apoyo que necesitaba para terminar mi trabajo.

Al Dr. Daniel Noyola que me prestó su laboratorio para experimentar.

A la Técnico Rosy por su disponibilidad para trabajar y conseguir el material necesario quien también se convirtió en una buena amiga.

A mis compañeros del laboratorio con los que pasé momentos agradables y que sin ellos el recorrido se habría hecho más difícil y los congresos muy aburridos.

Al CONACYT por la beca otorgada y al IPICYT por su infraestructura para el desarrollo de mis proyectos.

Contenido

| Título | Página |
|---|-----------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos Institucionales..... | iii |
| Acta de examen | iv |
| Dedicatorias..... | v |
| Agradecimientos | vi |
| Contenido..... | vii |
| Lista de tablas | xi |
| Lista de figuras..... | xii |
| Resumen | xiv |
| Abstract..... | xv |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Importancia de las enfermedades agudas respiratorias..... | 3 |
| 2.2 Generalidades del Metapneumovirus humano, (hMPV)..... | 3 |
| 2.2.1 Descubrimiento..... | 3 |
| 2.2.2 Epidemiología | 4 |
| 2.2.3 Estructura genómica..... | 5 |
| 2.2.4 Genotipos de hMPV | 5 |
| 2.2.5 Características virológicas | 6 |
| 2.2.6 Proteínas codificadas | 7 |
| 2.2.7 Patogénesis..... | 9 |
| 2.2.8 Síntomas y diagnóstico molecular..... | 9 |
| 2.2.9 Tratamiento actual y vacunas candidatas..... | 9 |
| 2.3 Importancia del desarrollo de una vacuna contra el hMPV | 11 |
| 2.3.1 Vacuna ideal..... | 11 |
| 2.3.2 Vacunas orales..... | 11 |
| 2.4 Vacunas basadas en plantas | 12 |
| 2.4.1 Plantas como modelo para producción de proteínas antigénicas | 13 |
| 2.4.1.1 Las plantas comparten ventajas de otros sistemas de producción | 13 |
| 2.4.1.2 Ventajas de las plantas sobre otros sistemas..... | 13 |
| 2.4.1.3 Desventajas y estrategias para resolver las desventajas | 14 |
| 2.4.1.4 El cloroplasto como estrategia para aumentar el nivel de expresión..... | 15 |
| 2.5 Transformación genética de plantas..... | 16 |
| 2.5.1 Método directo | 17 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.5.2 | Método indirecto | 17 |
| 2.5.3 | Expresión transitoria: Magniffection (MagnICON)..... | 18 |
| 2.6 | Lechuga y tabaco como bioreactores..... | 20 |
| 2.6.1 | Lechuga..... | 20 |
| 2.6.2 | Tabaco..... | 20 |
| III. | OBJETIVOS..... | 21 |
| 3.1 | Objetivo general..... | 21 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 21 |
| IV. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| 4.1 | Péptido HRA2pl | 22 |
| 4.1.1 | Construcción del vector de expresión para plantas | 22 |
| 4.1.2 | Transformación transitoria de plantas (protocolo Magniffection) | 22 |
| 4.1.3 | Análisis de transcripción por RT-PCR para el transcrito HRA2pl | 22 |
| 4.1.4 | Extracción de proteínas y cuantificación por Bradford..... | 23 |
| 4.1.5 | SDS-PAGE y Western blot..... | 23 |
| 4.1.6 | Líneas celulares y los virus | 23 |
| 4.1.7 | Protocolos para el manejo de la línea celular HEp-2 | 24 |
| 4.1.8 | Ensayo de unidades formadoras de placa..... | 28 |
| 4.1.9 | Análisis estadístico | 29 |
| 4.2 | Proteína antigénica hMPVpl..... | 29 |
| 4.2.1 | Diseño y síntesis de genes | 29 |
| 4.2.2 | Construcciones genéticas | 30 |
| 4.2.3 | Transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> sin nicotina y <i>N. benthamiana</i> | 31 |
| 4.2.4 | Extracción de proteína soluble total y determinación de cantidad de proteína soluble total por el método de Bradford..... | 32 |
| 4.2.5 | Transformación nuclear vía <i>A. tumefaciens</i> | 33 |
| 4.2.6 | Transformación de cloroplastos de <i>N. tabacum</i> sin nicotina con pBIC-hMPVc por biobalística..... | 33 |
| 4.2.7 | Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés | 34 |
| 4.2.8 | Detección de la proteína recombinante por Dot blot y Western blot..... | 35 |
| 4.2.9 | ELISA para determinación de la cantidad de proteína recombinante en el extracto infiltrado..... | 35 |
| 4.2.10 | Administración de la proteína antigénica de lechuga hMPVn a ratones Balb/c..... | 36 |
| 4.2.11 | Preparación del material vegetal..... | 36 |
| 4.2.12 | Inmunización | 36 |
| 4.2.13 | Colección de muestras | 36 |
| 4.2.14 | Determinación de nivel de anticuerpos por ELISA..... | 36 |
| 4.2.15 | Análisis estadístico | 37 |
| V. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 38 |
| 5.1 | Péptido HRA2pl | 38 |
| 5.1.1 | Diseño de HRA2pl péptido | 38 |
| 5.1.2 | Modelado de la estructura del péptido <i>in silico</i> | 39 |
| 5.1.3 | Construcción módulo 3'-HRA2pl..... | 39 |
| 5.1.4 | Transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> sin nicotina | 40 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 5.1.5 | Análisis de transcripción por RT-PCR para el transcrito HRA2pl | 40 |
| 5.1.6 | Identificación del péptido HRA2pl por SDS-PAGE, Dot blot y Western blot..... | 41 |
| 5.1.7 | Ensayos <i>in vitro</i> en la línea celular HEp-2..... | 42 |
| 5.2 | Proteína antigénica contra el hMPV (hMPVpl)..... | 51 |
| 5.2.1 | Diseño de genes sintéticos para los epítomos relevantes de las proteínas del metapneumovirus humano..... | 51 |
| 5.3 | Construcción módulo 3'-hMPVn y transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> y <i>N. benthamiana</i> | 57 |
| 5.4 | Construcción pBI121-hMPVn para la transformación nuclear | 59 |
| 5.4.1 | Transformación nuclear de lechuga | 61 |
| 5.4.2 | Transformación nuclear de tabaco sin nicotina..... | 67 |
| 5.5 | Construcción pBIC-hMPVc | 70 |
| 5.5.1 | Transformación de cloroplastos de <i>N. tabacum</i> sin nicotina..... | 71 |
| VI. | CONCLUSIONES..... | 72 |
| VII. | PERSPECTIVAS..... | 73 |
| VIII. | ANEXOS I: PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES | 74 |
| 8.1 | Preparación de células calcio competentes de <i>E.coli</i>..... | 74 |
| 8.2 | Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico | 74 |
| 8.3 | Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.. | 74 |
| 8.4 | Extracción de ADN plasmídico (método de lisis alcalina) | 75 |
| 8.5 | Manipulación enzimática del ADN | 75 |
| 8.5.1 | Digestión de clonas positivas con enzimas de restricción | 75 |
| 8.5.2 | Purificación de fragmentos de ADN | 76 |
| 8.5.3 | Extremos romos | 76 |
| 8.5.4 | Reacciones de ligación..... | 76 |
| 8.6 | Preparación de soluciones | 77 |
| 8.6.1 | TAE 50X | 77 |
| 8.6.2 | Agarosa 1% | 77 |
| 8.6.3 | Antibióticos | 77 |
| 8.6.4 | Reguladores del crecimiento | 77 |
| 8.6.5 | Buffers | 78 |
| 8.7 | Preparación de medios de cultivo | 78 |
| 8.7.1 | Medios de cultivo para bacterias | 78 |
| 8.7.2 | Medios de cultivo para plantas | 79 |
| 8.8 | Proteínas | 81 |
| 8.8.1 | Extracción de proteínas de plantas..... | 81 |
| 8.8.2 | Buffer de extracción de proteínas de plantas..... | 81 |
| 8.8.3 | Cuantificación de proteína soluble total (PST)..... | 82 |
| IX. | ANEXOS II: ARTÍCULO PUBLICADO | 85 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| X. REFERENCIAS..... | 86 |
|----------------------------|-----------|

Lista de tablas

| | Título | Página |
|-----|---|---------------|
| 1. | Proteínas codificadas por el hMPV | 8 |
| 2. | Vacunas experimentales desarrolladas contra el hMPV | 10 |
| 3. | Antígenos expresados en cloroplastos de plantas | 16 |
| 4. | Intensidad de fluorescencia determinada en el ensayo con Alamar blue® | 43 |
| 5. | Número de sincicios observados en el ensayo de inhibición de sincicios | 44 |
| 6. | Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de unión del virus-célula | 47 |
| 7. | Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de replicación del virus | 48 |
| 8. | Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de infección <i>de novo</i> | 50 |
| 9. | Epítomos utilizados en la construcción utilizados para el diseño de los genes sintéticos | 52 |
| 10. | Predicción de epítomos de las proteínas del hMPV por SYFPEITHI para el alelo HLA-A*0201 | 55 |
| 11. | Predicción de epítomos de las proteínas del hMPV por SYFPEITHI para el alelo H2D ^b | 56 |

Lista de figuras

| | Título | Página |
|-----|---|---------------|
| 1. | Patógenos virales humanos de la familia Paramyxoviridae | 4 |
| 2. | Causas de hospitalización por infecciones agudas respiratorias, Hospital Central S.L.P | 5 |
| 3. | Mapa genómico del hMPV comparado con el de VSR | 5 |
| 4. | Diagrama esquemático de las características virológicas hMPV | 6 |
| 5. | Transformación genética de plantas | 18 |
| 6. | Representación esquemática del ensamblaje de los tres módulos de la tecnología de MagnICON | 19 |
| 7. | Estructura del gen sintético HRA2pl con actividad profiláctica contra el hMPV | 38 |
| 8. | Modelo del péptido HRA2pl por predicción <i>in silico</i> | 39 |
| 9. | Análisis de restricción de las clonas módulo 3'-HRA2pl con las enzimas <i>Nco</i> I y <i>Sac</i> I. | 40 |
| 10. | Representación esquemática de la construcción módulo 3'-HRA2pl para la transformación transitoria | 40 |
| 11. | Expresión del transcrito del gen HRA2pl medido por RT-PCR | 41 |
| 12. | Dot blot de la proteína recombinante obtenida por Magniffection | 41 |
| 13. | Expresión del péptido HRA2pl a diferentes días post-infiltración | 42 |
| 14. | Ensayo de inhibición de la formación de sincicios | 45 |
| 15. | Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de unión del virus-célula | 47 |
| 16. | Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de replicación del virus. | 49 |
| 17. | Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de infección <i>de novo</i> . | 50 |
| 18. | Análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas del hMPV en el software Antheprot | 54 |
| 19. | Estructura de los genes sintéticos usados para transformación de tabaco y lechuga | 56 |
| 20. | Representación esquemática del vector módulo 3'-hMPVn para la transformación transitoria | 57 |
| 21. | Perfil de restricción de las clonas positivas para la construcción del módulo 3'-hMPVn | 58 |
| 22. | PCR de las clonas 7 y 8 con oligonucleótidos específicos para la transformación del gen nuclear | 58 |
| 23. | Dot blot de la proteína recombinante obtenida por Magniffection | 59 |

| | | |
|-----|--|----|
| 24. | Representación esquemática del vector pBI121 para la transformación nuclear | 60 |
| 25. | Análisis de restricción de las clonas pBI121-hMPVn con las enzimas <i>BamH</i> I y <i>EcoR</i> I | 61 |
| 26. | Análisis por PCR de las clonas pBI121-hMPVn | 61 |
| 27. | Análisis por PCR de las clonas 16 y 22 de la construcción pBI121-hMPVn | 61 |
| 28. | Análisis por PCR de las líneas de lechugas transgénicas generación T1 (pBI121-hMPVn). | 62 |
| 29. | Análisis por PCR multiplex de las líneas de lechugas transgénicas generación T2 (pBI121-hMPVn) | 62 |
| 30. | Southern blot de la línea 35 de lechuga transgénica (pBI121-hMPVn) | 63 |
| 31. | Detección de la proteína MPVpl | 63 |
| 32. | Esquema de inmunización de ratones Balb/c por vía oral | 65 |
| 33. | Cuantificación por ELISA de inmunoglobulinas producidas en ratón | 66 |
| 34. | Cuantificación por ELISA de IgA | 67 |
| 35. | Generación T0 de tabaco transgénico nuclear <i>in vitro</i> y posterior pase a tierra para obtener semilla transgénica | 68 |
| 36. | PCR de plantas transgénicas nucleares T0 con oligos para NPTII. | 68 |
| 37. | PCR de plantas transgénicas nucleares T0 con oligos para el promotor35S y el terminador NOS | 69 |
| 38. | PCR de plantas transgénicas nucleares T1 con oligos para el gen de resistencia y para el transgén | 69 |
| 39. | Representación esquemática del vector bicistrónico pBIC para la transformación de cloroplastos de tabaco | 70 |
| 40. | Análisis por PCR de las clonas pBIC-hMPVc. | 70 |
| 41. | Tabacos transplastómicos T0 <i>in vitro</i> que se pasaron a tierra para obtener semilla | 71 |
| 42. | Plántulas de tabaco transplastómicas generación T1, en medio de selección con 500mg/L de espectinomicina | 71 |

Resumen

Evaluación *in vitro* de un péptido antiviral (HRA2pl) e *in vivo* de una proteína antigénica (hMPVpl) producidas en plantas contra el metapneumovirus humano

Los agentes etiológicos que causan enfermedades respiratorias son principalmente bacterias y virus; estos últimos son los responsables de un 50-60% de las infecciones respiratorias agudas (IRA). El metapneumovirus humano (hMPV) es uno de los agentes etiológicos de las infecciones respiratorias agudas. En los niños menores de 3 años de edad, las infecciones de las vías respiratorias representan el 20% de las muertes en todo el mundo. Las manifestaciones clínicas de la infección por hMPV incluyen fiebre, tos y taquipnea y puede progresar a cuadros infecciosos severos como bronquiolitis, neumonía y laringotraqueobronquitis. También los pacientes ancianos e inmunodeprimidos se encuentran entre los grupos más afectados. Sin embargo, hoy en día no existe ningún tratamiento o vacuna disponible en el mercado para las infecciones por hMPV. Existen varios sistemas para la expresión de proteínas recombinantes, pero las plantas son un sistema de expresión ideal porque la producción es rentable y es más fácil de escalar hasta un nivel industrial que otras plataformas. Además, el tejido de la planta se puede utilizar como alimento crudo, seco o, alternativamente, las proteínas se pueden purificar parcial o totalmente y administrar en aerosol o cápsulas como polvo seco.

En este estudio, exploramos dos estrategias diferentes para obtener en plantas un tratamiento contra la infección por hMPV. 1) El péptido llamado HRA2pl fue producido por sistema de expresión viral transitoria (Magniffection) en plantas de tabaco; HRA2pl está diseñado con base en la proteína F de la hMPV y se demostró mediante ensayos *in vitro* en la línea celular HEp-2 que inhibe la fusión del virus a la célula huésped en una forma dependiente de la dosis. 2) La proteína antigénica (hMPVpl) fue diseñada como una proteína de subunidades de antígeno basada en regiones de aminoácidos hidrófilos y la predicción de epítopos de HLA-A*0201 (humano) y H2Db (ratón). La expresión de esta proteína antigénica se realizó en plantas de lechuga por transformación nuclear y se administró por vía oral a ratones Balb/c. En suero se detectaron mayor cantidad de anticuerpos IgG1 respecto a IgG2a, lo que sugiere una respuesta inmune Th2 que está relacionada con la diferenciación de las células B y la producción de anticuerpos.

Estas dos alternativas confirmaron el gran potencial de las plantas para la producción de biofarmacéuticos, por lo que HRA2pl y hMPVpl podrían ser una alternativa para la prevención y la reducción de la transmisión del hMPV.

Palabras clave: Metapneumovirus humano, HRA, plantas, transformación transitoria, transformación nuclear, biofarmacéuticos

Abstract

***In vitro* evaluation of an antiviral peptide (HRA2pl) and *in vivo* of an antigenic protein (hMPVpl) produced in plants against human metapneumovirus**

The etiologic agents that cause respiratory illnesses are mainly bacteria and viruses; the latter are responsible for 50-60% of acute respiratory infections (ARIs). Human metapneumovirus (hMPV) is an etiological agent of acute respiratory infections. In children under 3 years old, respiratory tract infections account for 20 % of deaths worldwide. Clinical manifestations of hMPV infection include fever, cough and tachypnea, and may progress to severe infections as well as severe signs like bronchiolitis, pneumonia and laryngotracheobronchitis. The elderly and immunocompromised patients are also among the most affected groups. However, today there is no commercially available treatment or vaccine for hMPV infections.

There are several systems for the expression of recombinant proteins, but plants are an ideal expression system because the production is cost effective and is easier to scale up to an industrial level than other platforms. In addition, the plant tissue may be used as raw food, dried or, alternatively, proteins may be partially or fully purified and administered in aerosol or capsules as dry powder.

In this study, we explore two different strategies to obtain a treatment against hMPV infection in plants. 1) The peptide called HRA2pl was produced by transient viral expression system (Magniffection) in tobacco plants; HRA2pl was designed based on the F protein of the hMPV and it was demonstrated by *in vitro* assays in Hep-2 cell line that it inhibits the fusion of the virus to the host cell in a dose-dependent manner. 2) The antigenic protein (hMPVpl) was designed as a subunit antigen protein based on hydrophilic amino acid regions and predicted HLA-A*0201 (human) and H2D^b (mouse) epitopes. The expression of this antigenic protein was performed in lettuce plants by nuclear transformation and administered orally to Balb/c mice. The antibody responses showed a higher concentration of serum IgG1 compared to IgG2a suggesting an induction of Th2 immune response, which is related to B cell differentiation and antibody production.

These two alternatives confirmed the great potential of plants for the production of biopharmaceuticals, therefore HRA2pl and hMPVpl could be an alternative for prevention and reduction of the transmission of hMPV.

Keywords: Human metapneumovirus, HRA, plants, transient transformation, nuclear transformation, biopharmaceuticals

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del tracto respiratorio son hoy en día un problema de salud a nivel mundial pues son causa importante de morbilidad y mortalidad. Para niños menores de 5 años de edad, las enfermedades del tracto respiratorio ocupan el segundo lugar como causa de muerte. Las infecciones agudas del tracto respiratorio son las más comunes de las enfermedades sin considerar edad y género (Kahn, 2006).

En los últimos años, los virus emergentes asociados a infecciones respiratorias agudas (IRA) incluyen la influenza aviar, el Metapneumovirus humano (hMPV), el coronavirus asociado al Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) y el coronavirus asociado al Síndrome Respiratorio del Oriente Medio (MERS)(Abara, 2006; Berry y col., 2015).

En un estudio realizado en San Luis Potosí, con muestras de niños hospitalizados por infecciones del tracto respiratorio del hospital Ignacio Morones Prieto fue posible determinar la incidencia de infección por hMPV, el cual resultó ser el segundo agente más común, después del Virus Sincicial Respiratorio (VSR) en niños menores (Noyola y col., 2005).

Los principales retos para la comunidad médica y científica son tanto el entendimiento de la patogénesis de la enfermedad por hMPV así como el desarrollo de una vacuna segura y efectiva para proteger contra la infección y enfermedad de este nuevo virus respiratorio.

La vacunación es considerada una de las mejores invenciones en el campo de la medicina, pues siempre será preferible que las personas no contraigan una enfermedad por sencilla que esta parezca a tener que tratarlas una vez que se han enfermado. Sin embargo, el costo elevado de las vacunas actuales se deben a su producción y métodos de entrega, el costo de purificación con tecnologías complejas y gastos adicionales asociados con el adyuvante, almacenamiento en frío, transporte y entrega estéril (Davoodi-Semiromi y col.,2009).



Una alternativa es el uso de plantas como biorreactores para la producción y entrega de los antígenos por vía oral. Los antígenos son protegidos de los ácidos y enzimas del estómago por la célula vegetal, pero son liberados para interactuar con el sistema inmune en el intestino cuando las paredes de células vegetales son digeridas por las bacterias que colonizan el intestino.

Es importante seguir explorando la capacidad de las plantas para incorporar nuevos transgenes, los cuales pueden resultar importantes desde el punto de vista farmacológico para el desarrollo de vacunas y antivirales.



II. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de las enfermedades agudas respiratorias

Las infecciones agudas del tracto respiratorio son causa de morbilidad y mortalidad en niños en todo el mundo; en estadísticas se habla de 30% de muertes en niños en países en vías de desarrollo. Los virus ocupan entre 50–90% de las IRAs en niños; los más comúnmente identificados son el VSR, virus parainfluenza (PIV), influenza virus A y B y el metapneumovirus humano (hMPV) (Bharaj y col., 2009).

Los virus respiratorios emergentes pueden llegar a producir alarma pública, se pueden presentar en brotes e implican un riesgo de pandemia. Es necesario conocerlos para que exista un reconocimiento oportuno e idealmente debería determinarse su comportamiento biológico y epidemiológico (Abara, 2006).

La etiología de la mayoría de las infecciones del tracto respiratorio bajo es viral; sin embargo, en solo 40% de los casos el agente etiológico es identificado, aun con el uso de métodos de amplificación genómica. En el 2001, van der Hoogen reportó el descubrimiento de un nuevo virus: el hMPV a partir de muestras de niños con enfermedades de tracto respiratorio en Holanda (Kahn, 2006). Además el hMPV ha sido detectado en secreciones respiratorias en 6.1% de los niños menores de 3 años de edad hospitalizados por infecciones respiratorias en un estudio realizado en San Luis Potosí (Noyola y col., 2005).

2.2 Generalidades del Metapneumovirus humano, (hMPV)

2.2.1 Descubrimiento

Ensayos inmunológicos utilizando anticuerpos y métodos basados en PCR con cebadores específicos fallaron en la identificación del hMPV, debido a que este virus resultó ser distinto de otros virus comunes de enfermedades respiratorias; su descubrimiento en Holanda, en el año 2001 por van der Hoogen, se llevó a cabo mediante la caracterización genética utilizando un PCR con cebadores aleatorios. Una vez secuenciado su genoma se pudo observar que está relacionado al pneumovirus aviar, del género *Metapneumovirus* y fue llamado metapneumovirus

humano (hMPV, por sus siglas en inglés) (Fig.1). Estudios serológicos y ensayos de neutralización viral revelaron que a la edad de 5 años todos los individuos han tenido infección por hMPV. Además, a través del estudio de un banco de suero humano, se reveló que este virus ha estado circulando por al menos 50 años en la población, sugiriendo que éste no ha llegado recientemente a la población humana a partir de un reservorio animal tal como los pájaros (Kahn, 2006).

Se ha sugerido que el retraso en su descubrimiento podría deberse a que el virus se replica pobremente en las líneas celulares de uso rutinario y genera efecto citopático inespecífico (Abara, 2006).

Order: Mononegavirales
Family: Paramyxoviridae
Sub-family: Paramyxovirinae
Genus: Respirovirus
Species: Human parainfluenza types 1 and 3
Genus: Rubulavirus
Species: Human parainfluenza types 2 and 4,
Mumps
Genus: Morbillivirus
Species: Measles virus
Genus: Henipavirus
Species: Hendra virus, Nipah virus

Sub-family: Pneumovirinae
Genus: Pneumovirus
Species: Respiratory syncytial virus
Subgroup: A and B
Genus: Metapneumovirus
Species: Human metapneumovirus
Subgroup (?serogroup): A and B

Figura 1. Patógenos virales humanos de la familia Paramyxoviridae (Kahn, 2006)

2.2.2 Epidemiología

El hMPV tiene distribución mundial y ha sido identificado en todos los continentes. En San Luis Potosí, en un estudio realizado en el Hospital Central durante el 2002 al 2004, el hMPV se encontró como la segunda causa de hospitalización por enfermedades de vías respiratorias (Noyola y col., 2005).

Con respecto al clima, el hMPV circula predominantemente al final del invierno y primavera. Sus picos de actividad parecen coincidir con infecciones por VSR, Fig.2 (Kahn, 2006).

La infección por hMPV tiene un período de incubación de 5-6 días, no presenta predilección por el sexo. Muy rara vez se demuestra presencia del virus en pacientes asintomáticos. La infección puede repetirse pues no deja inmunidad completa debido a la heterogeneidad del genoma y además existen por lo menos 2 linajes distintos del hMPV, A y B (Abara, 2006).

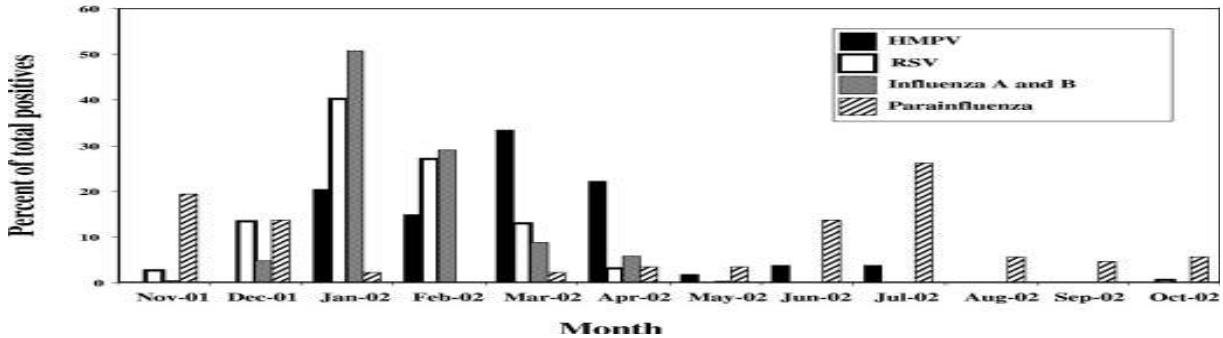


Figura 2. Distribución de hMPV y otros virus respiratorios en New Haven, Connecticut (Kahn, 2006)

2.2.3 Estructura genómica

La familia de *Paramyxoviridae* está compuesta por dos subfamilias, una de las cuales es la *Pneumovirinae* la cual incluye el género *Pneumovirus* y el género *Metapneumovirus*. El VSR, un pneumovirus, es el patógeno humano más cercano al hMPV, y además comparten características similares (Fig.3). Su genoma de ARN es de sentido negativo no segmentado (13kb) (Kahn, 2006).

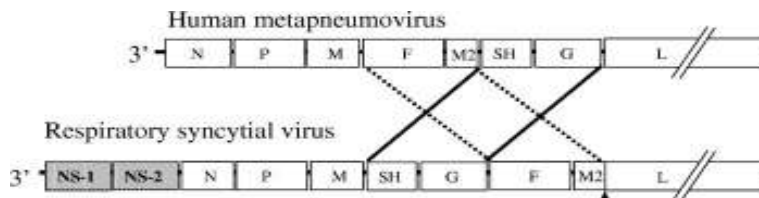


Figura 3. Mapa genómico del hMPV comparado contra el VSR (Kahn, 2006)

2.2.4 Genotipos de hMPV

Basado en la secuencia genómica y análisis filogenético, hay dos genotipos principales del hMPV, designados como A y B; cada uno de éstos se subdivide en subgrupos 1 y 2. Este análisis se basa en la secuenciación de los genes N, M, F, G y

L. La organización genómica de los dos subtipos es idéntica. La principal diferencia entre el genotipo A y B son polimorfismos de nucleótidos, y las proteínas G y SH son las que tienen la más alta concentración de estos polimorfismos. El resultado de esta variabilidad de nucleótidos es el cambio en aminoácidos, el cambio del marco de lectura y el uso de codones alternativos de terminación. La mayor parte de la variabilidad está localizada en las proteínas de la superficie del virión. Hay alrededor de un 34-37% de identidad en aminoácidos para la proteína G entre los genotipos A y B (Kahn, 2006).

2.2.5 Características virológicas

El hMPV posee un genoma ARN (-). La nucleocápside helicoidal está envuelta por un manto constituido por una bicapa lipídica procedente de la membrana plasmática de la célula huésped; en ésta se insertan 3 glicoproteínas: la glicoproteína de adhesión (G), la de fusión (F) y la hidrofóbica pequeña (SH) (Fig. 4). Las dos primeras constituyen las espículas en la superficie del virión y participan en la formación de sincicios. En la cara interna de la membrana las glicoproteínas interactúan con la proteína de la matriz (M), la cual coordina el ensamblaje viral de la nucleocápside viral con proteínas de la envoltura. La proteína L se considera ARN-polimerasa viral y requiere para funcionar de la presencia de las proteínas N y P (Abara, 2006).

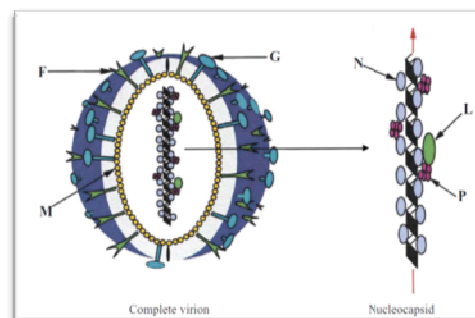


Figura 4. Diagrama esquemático de las características estructurales del hMPV (Broor y col., 2008)



2.2.6 Proteínas codificadas

El genoma del hMPV codifica para 9 proteínas (Tabla 1). El gen M2 codifica para 2 proteínas: M2-1 y M2-2 (proteínas regulatorias). Cabe mencionar que el hMPV carece de las dos proteínas no estructurales que tiene el VSR. Las proteínas codificadas por este virus se describen a continuación:

Proteína F: Es el mayor determinante antigénico que media la neutralización y protección (Skiadopoulos y col., 2004).

Proteína G: Presenta características de una proteína tipo mucina glicosilada tipo II, carece de un grupo de cisteínas conservadas en VSR. Media la adhesión entre la envoltura viral y la membrana celular del hospedero.

Proteína SH: Función desconocida.

Proteínas N, L, P: Son proteínas virales que se asocian al genoma de ARN para formar la nucleocápside viral.

Proteína M2-1: Potenciador transcripcional, factor regulatorio para la transcripción (Herd y col., 2005).

Proteína M2-2: Involucrada en la síntesis de ARN (Herd y col., 2005).



Tabla 1. Proteínas codificadas por el hMPV. Números de acceso corresponden al aislado clínico CAN97-83

| PROTEÍNA | INICIO | FIN | LONGITUD | NÚMERO DE ACCESO | GEN ID | LOCUS |
|-----------------------------------|--------|-------|----------|------------------|---------|-----------|
| Nucleoproteína | 55 | 1239 | 394 | YP_012605.1 | 2799936 | N |
| Fosfoproteína | 1263 | 2147 | 294 | YP_012606.1 | 2799937 | P |
| Proteína de matriz | 2180 | 2944 | 254 | YP_012607.1 | 2799938 | M |
| Glicoproteína de Fusión | 3067 | 4686 | 539 | YP_012608.1 | 2799939 | F |
| Proteína de matriz M2-1 | 4724 | 5287 | 187 | YP_012609.1 | 2799940 | M2 |
| Proteína de matriz M2-2 | 5235 | 5450 | 71 | YP_012610.1 | 2799940 | M2 |
| Proteína pequeña hidrofóbica | 5481 | 6020 | 179 | YP_012611.1 | 2799941 | SH |
| Glicoproteína de unión | 6232 | 6891 | 219 | YP_012612.1 | 2799942 | G |
| ARN polimerasa dependiente de ARN | 7133 | 13150 | 2005 | YP_012613.1 | 2799943 | L |



2.2.7 Patogénesis

Para que se lleve a cabo la infección debe ocurrir una interacción viral de la proteína G con una molécula o moléculas en la célula hospedera. Recientemente se ha descrito que la proteína G del hMPV interactúa con los glicosaminoglicanos celulares y la proteína F por su parte interactúa con las integrinas α y β , moléculas involucradas en la unión viral y entrada (Feuillet y col., 2012).

Seguido de la unión, la glicoproteína F promueve la fusión entre la membrana celular y la envoltura viral. Para que la proteína F llegue a ser funcional, ésta debe ser segmentada por proteasas celulares y la región hidrofóbica amino terminal del componente F1 promueve el proceso de fusión el cual introduce los componentes internos del virión dentro del citoplasma de la célula hospedera, donde se lleva a cabo el ciclo de infección.

Posteriormente, se produce un incremento en interleucinas IL-2, IL-8, IL-4, INF- γ , macrófagos, proteínas inflamatorias 1 α y proteínas quimiotácticas por los monocitos (Broor y col., 2008).

2.2.8 Síntomas y diagnóstico molecular

Las infecciones respiratorias por este virus son a menudo asociadas con estornudos y síntomas catarrales en niños y exacerbación del asma en pacientes mayores (Broor y col., 2008). Con menor frecuencia se presenta afección a las vías aéreas inferiores causando bronquiolitis y neumonía.

En cuanto al diagnóstico molecular, el blanco ideal de detección molecular y genotipificación es el gen P (una región conservada) usando RT-PCR, ELISA o ensayo de inmunofluorescencia directa (Broor y col., 2008), aunque también se ha utilizado el gen N porque su secuencia está conservada (Noyola y col., 2005).

2.2.9 Tratamiento actual y vacunas candidatas

2.2.9.1 Terapia antiviral

La terapia antiviral para virus respiratorios no ha mostrado resultados satisfactorios, sin embargo se ha utilizado la ribavirina, la cual posee actividad antiviral para inhibir



la replicación de hMPV que es equivalente a lo observado con VSR (Wyde y col., 2003). En cuanto a un tratamiento profiláctico el NMSO₃, un lípido sulfatado ha mostrado tener actividad antiviral contra el virus *in vitro* (Broor y col., 2008; Wyde y col., 2004). El desarrollo de una estrategia antiviral está limitado por la pobre información sobre la patogénesis del virus en el huésped.

2.2.9.2 Vacunas candidatas

Actualmente el desarrollo de una vacuna segura y eficaz contra el hMPV sigue siendo un reto importante. La Tabla 2 muestra las vacunas experimentales que se han desarrollado para combatir la infección por hMPV así como los resultados que se obtuvieron al probarlas en diferentes modelos animales.

Tabla 2. Vacunas experimentales desarrolladas contra el hMPV.

| Vacuna | Modelo Animal | Resultado | Referencia |
|--------------------------------------|---------------------------|---|---|
| FI-hMPV | Ratas de algodón | Produce un dramático incremento en la patología del pulmón. | Yim y col. 2007 |
| b/hPIV3 | Hámster, AGM | b/ hPIV3/ hMPV F2 fue atenuada en mono Rhesus. Inmunización de AGMs resultó en la completa protección de LRT y título viral en la URT >100-veces reducido. | Tang y col. 2003, 2005 |
| HMPV delección de mutantes | Hámster, AGM | Virus con delecciones ΔG y ΔM2-2 fueron atenuados en AGMs. Después del reto, el virus en LRT fue virtualmente indetectable. | Biacchesi y col. 2004, 2005; Buchholz y col. 2005 |
| Quimera hMPV/aMPV-C | Hámster, AGM | P-quimera fue atenuada 100 y 1000 veces URT y LRT de AGMs. La eficacia protectora es comparable con hMPV silvestre. | Pham y col. 2005 |
| Soluble F | Hámster, ratas de algodón | Inmunización con adyuvante F solubles induce completa protección de LRT contra el reto heterólogo de infección. | Herfst y col. 2008 |
| Proteína F soluble y vacuna de ADN F | Ratas de algodón | Replicación viral después del reto fue 10 veces reducido en LRT. Se observó una reducción no significativa en el URT comparado con animales no inmunizados. | Cseke y col., 2007 |

FI: inactivada con formalina, hMPV: metapneumovirus humano, b/hPIV3: bovina /humana parainfluenzavirus tipo 3, AGM: mono verde africano, F: proteína de fusión, LRT: tracto respiratorio bajo, UTR: tracto respiratorio superior, G: proteína de unión, M2-2: segundo ORF de M2, P: fosfoproteína



2.3 Importancia del desarrollo de una vacuna contra el hMPV

Es preferible que las personas no se enfermen a tener que tratarlas una vez que lo están; las vacunas ofrecen protección contra las enfermedades mediante la inducción de inmunidad, además reduce los contagios y se alivia la carga de los sistemas de salud. La inmunización es una herramienta de utilidad demostrada para controlar e incluso erradicar las enfermedades. Las vacunas son muy seguras y sus efectos secundarios son leves, especialmente cuando se comparan con las enfermedades que se pretende combatir con ellas.

2.3.1 Vacuna ideal

Una vacuna ideal debe poseer ciertas características tales como:

- Mimetizar una respuesta inmunológica similar a la de la infección natural
- Proporcionar más del 90% de protección
- Ser completamente segura y producir los mínimos efectos secundarios
- Inmunidad persistente a largo plazo
- Ser compatible con otras vacunas
- De administración no invasiva (vía oral preferentemente) y en los primeros años de vida
- Estable a temperatura ambiente
- De fácil producción y económicamente accesible

2.3.2 Vacunas orales

Los antígenos administrados por vía oral son capaces de estimular tanto la respuesta inmune sistémica como la de mucosas (Álvarez y col., 2010), lo cual es importante pues corresponde a la inmunidad requerida para prevenir la infección por el hMPV. Las vacunas derivadas de plantas para administración oral son un sistema alternativo muy prometedor y atractivo debido a la bioseguridad que ofrecen pues no se ha detectado que las plantas actúen como reservorio de patógenos para el humano (Álvarez y Cardineau, 2010).

2.3.2.1 Inmunización vía oral usando plantas

Las proteínas terapéuticas derivadas de las plantas se protegen de los ácidos y enzimas estomacales, debido a la bio-encapsulación del antígeno dentro de la célula vegetal y principalmente por la pared celular de las plantas. Cuando el antígeno protegido se libera en el intestino, se traslada de la luz intestinal al sistema circulatorio, a través de la unión al receptor GM1 de las células epiteliales (Davoodi-Semiromi y col., 2009).

El tejido linfático asociado a mucosas (MALT) ofrece una arquitectura única y la más grande superficie para la entrada de antígenos en el organismo. Para muchas enfermedades que afectan el tracto gastrointestinal, sistemas respiratorio y urogenital, la superficie de la mucosa es el sitio principal de entrada de gérmenes patógenos en el cuerpo. De hecho el número total de linfocitos en el MALT es igual al total de número de linfocitos en el resto del cuerpo, lo cual sugiere que tiene un papel importante en la salud y enfermedades.

Usando antígenos producidos en plantas y el transporte a través del MALT, es factible lograr inmunidad contra las enfermedades infecciosas como el cólera, la peste o tétanos y enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1. La generación de IgA locales contra el antígeno de la vacuna ingerida por vía oral es fundamental para conferir inmunidad (Davoodi-Semiromi y col., 2009). Los ratones inmunizados por vía oral con materiales derivados de plantas generan la producción de IgA tanto a nivel local como sistémico. En contraste, los ratones inmunizados por vía subcutánea genera poca o nada de IgA, lo que sugiere que la producción de IgA antígeno-específica contra el patógeno gastrointestinal es sobre todo generada en el MALT (Davoodi-Semiromi y col., 2009).

2.4 Vacunas basadas en plantas

Las vacunas basadas en plantas generan respuestas celulares y humorales del sistema inmune. La vacuna verde (a partir de plantas) genera diferentes respuestas inmunes Th1, tales como (IgG2, IFN γ , IL-2), Th2 (IL-4, IgG1, IL-10, IgA), Tr1 (IL-10), Th3 (TGF β 1). Una respuesta inmune Th2 frente al antígeno de la vacuna es la



formamás común de respuesta inmune así como la secreción de IL-10, IL-4 e IgA en el intestino (Davoodi-Semiromi y col., 2009; Karg y Kallio, 2009).

La secreción local de IgA soluble es una característica única de la vacunación oral y esto se debe a la presencia de un microambiente único en la mucosa intestinal para generar y secretar IgA. La IgA juega un papel incomparable en la inmunidad de la mucosa contra agentes infecciosos y se expresa poco o nada en absoluto por cualquier otro medio de la vacunación (Davoodi-Semiromi y col., 2009).

2.4.1 Plantas como modelo para producción de proteínas antigénicas

Las plantas ofrecen un sistema seguro y más económico para la producción de vacunas debido a la carencia de contaminación por toxinas microbianas y por la eliminación de los costosos biorreactores utilizados por otros sistemas para la producción de proteínas recombinantes como es el caso de las bacterias (Álvarez y Cardineau, 2010; Xu y col., 2011).

2.4.1.1 Las plantas comparten ventajas de otros sistemas de producción

En plantas es posible producir vacunas recombinantes formada de subunidades de epítopos relevantes, lo cual comparado a las vacunas tradicionales hechas con patógenos vivos, muertos o atenuados ofrece una gran ventaja pues aumenta la seguridad, disminuye la competencia antigénica y son blanco en sitios específicos (Álvarez y Cardineau, 2010; Kwon y col., 2013).

2.4.1.2 Ventajas de las plantas sobre otros sistemas

Producción de vacunas de subunidades por las plantas comparado con bacterias como *E.coli*, es mejor debido a que las plantas son eucariotes y pueden producir proteínas más complejas que se pliegan correctamente y sean capaces de someterse a modificaciones postraduccionales que no ocurren en bacterias (Álvarez y Cardineau, 2010).

Además las plantas no requieren la construcción y operación de costosos fermentadores y medios de cultivo requeridos por vacunas basadas en *E.coli* o



células de mamífero. Las plantas pueden crecerse localmente en invernaderos controlados donde se necesiten, evitándose el almacenamiento y transporte, reduciendo costos y se pueden cosechar por métodos tradicionales. Otra ventaja es que puede enviarse semillas a grandes distancias sin requerir de cadena fría y producir vacunas en países en desarrollo.

Los antígenos pueden ser producidos en partes comestibles de la planta y como vacunas orales pueden ser administradas directamente como producto alimenticio eliminando el costo de purificación. Comparado a las vacunas de ADN, las vacunas derivadas de plantas no pueden integrarse al genoma e inducir tumores. Por otro lado, a comparación de las vacunas acelulares producidas en sistemas convencionales, las vacunas en plantas no requieren la purificación del antígeno.

En contraste con las vacunas parenterales, las vacunas orales ofrecen inmunización local de mucosas además de humoral, la estabilidad del antígeno, y no requieren uso de jeringas lo cual elimina el riesgo de contaminación y de personal capacitado para la administración (Álvarez y col., 2010).

2.4.1.3 Desventajas y estrategias para resolver las desventajas

Las plantas son útiles para el desarrollo de vacunas comestibles; sin embargo, la vacunación oral requiere de dosis superiores que las utilizadas en la inmunización por otras vías de administración, por lo que es necesario una alta producción y acumulación de la proteína, lo cual se entiende como un balance entre la síntesis y degradación (Álvarez y col., 2010). Se ha demostrado que el aumento en la transcripción y traducción del transgén puede ser obtenido por el uso de elementos regulatorios que optimicen el proceso tales como promotores fuertes, potenciadores transcripcionales, señales alternativas de poliadenilación, así como el uso de genes sintéticos con codones optimizados para la expresión en plantas. Desafortunadamente la alta expresión del transgén no necesariamente garantiza la alta acumulación de la proteína en la planta. Existen diversos mecanismos para la degradación de la proteína en las plantas, uno de ellos son las proteasas citoplásmicas que contribuyen a la pérdida de la proteína dentro de la célula



vegetal; la degradación proteolítica puede disminuirse si se dirige la síntesis de la proteína al retículo endoplásmico (RE) que puede ser inducida por una señal de retención en el carboxi-terminal HDEL o KDEL que es reconocida por un receptor situado en el complejo de Golgi. La retención a través de RE es un mecanismo saturable ya que está mediada por el receptor KDEL. Esto podría ser la razón por la cual la adición de K/HDEL no siempre conduce a la acumulación de la proteína (Álvarez y col., 2010).

Cabe mencionar el uso de un sistema de localización de la proteína recombinante que consiste en organelos especializados llamados proteínas PB en donde se puede acumular en forma estable (Álvarez y col., 2010).

2.4.1.4 El cloroplasto como estrategia para aumentar el nivel de expresión

El expresar proteínas recombinantes en el cloroplasto tiene varias ventajas únicas sobre el genoma nuclear, incluida la hiperexpresión de proteínas terapéuticas de hasta 100-1000 veces mayor, la inserción en un sitio específico ya que se integran en el genoma del cloroplasto por recombinación homóloga, y se ha visto que se reduce la variación de expresión entre líneas transgénicas independientes. Además, el silenciamiento de genes no se ha reportado en los cloroplastos transgénicos (plantas transplastómicas). La expresión en el cloroplasto minimiza el riesgo de transferencia de genes a través del polen de los cultivos modificados genéticamente a otros cultivos o malezas relacionadas (Lössl y Waheed, 2011).

Tabla 3. Antígenos expresados en cloroplastos de plantas.

| Antígeno | Gen | Especie de planta | % PST | Evaluación funcional | Referencia |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------|---|---|
| *Bacteriano Toxina B del cólera | <i>CtxB</i> | Tabaco, Lechuga | 4.1, 2.3 | Ensayo de unión a gangliosidos GM1 | Daniell y col., 2001; Rosales-Mendoza y col., 2009 |
| * Viral Rotavirus | <i>VP6</i> | Tabaco | 3 | No reportado | Birch-Machin y col., 2004 |
| *Protozoarios Malaria | <i>CTB-AMA1 & CTB-MSP1</i> | Tabaco, Lechuga | 13.17, 10.11 | Suero de ratones inmunizados inhiben completamente la proliferación del parásito de la malaria. | Davoodi-Semiromi y col., 2010 |
| *Autoantígenos Diabetes tipo 1 | <i>CTB-PINS</i> | Tabaco, Lechuga | 16, 2.5 | Ratones tratados mostraron disminución significativa en inflamación | Ruhlman y col., 2007 |

La presencia de chaperonas o enzimas en el cloroplasto crea un nicho especial para las adecuadas modificaciones post-traduccionales (montaje de multímeros, enlaces disulfuro, la modificación de lípidos, etc.).

2.5 Transformación genética de plantas

La transformación genética de plantas consiste básicamente en la introducción de genes foráneos a una planta. Así el ADN transformante debe entrar a la célula vegetal atravesando la pared celular y la membrana plasmática para llegar posteriormente al núcleo e integrarse o no a los cromosomas residentes. Esto se lleva a cabo utilizando explantes competentes para obtener plantas fértiles completas (Martínez y col., 2004). Los métodos para la integración de ADN recombinante al genoma nuclear de la célula de la planta se pueden clasificar en directos o indirectos.

2.5.1 Método directo

2.5.1.1 Biobalística

Consiste en la introducción de proyectiles usualmente de tungsteno u oro cargados de ADN e impulsados al interior de la célula blanco por aceleración. La velocidad de las partículas puede ser generada por la explosión de una pistola convencional o una descarga por gases a alta presión, tales como helio o bióxido de carbono (Martínez y col., 2004). Algunas de las ventajas de este método son:

1. Pueden ser empleados diversos explantes para ser bombardeados y producir plantas fértiles
2. No hay necesidad de utilizar vectores de transformación especializados
3. Es el único método de transformación de cloroplastos confiable

2.5.2 Método indirecto

Este tipo de método consiste en transferir ADN a las células de la planta por *Agrobacterium tumefaciens* que transporta eficientemente ADN dentro de las células de la planta y causa la integración nuclear de ADN en sitios al azar; este método es útil para dicotiledóneas y pocas monocotiledóneas (Obembe y col., 2011).

En la Fig. 5 se representa de forma esquemática la transformación directa por biobalística y la indirecta o natural por *Agrobacterium tumefaciens* (Martínez y col., 2004).

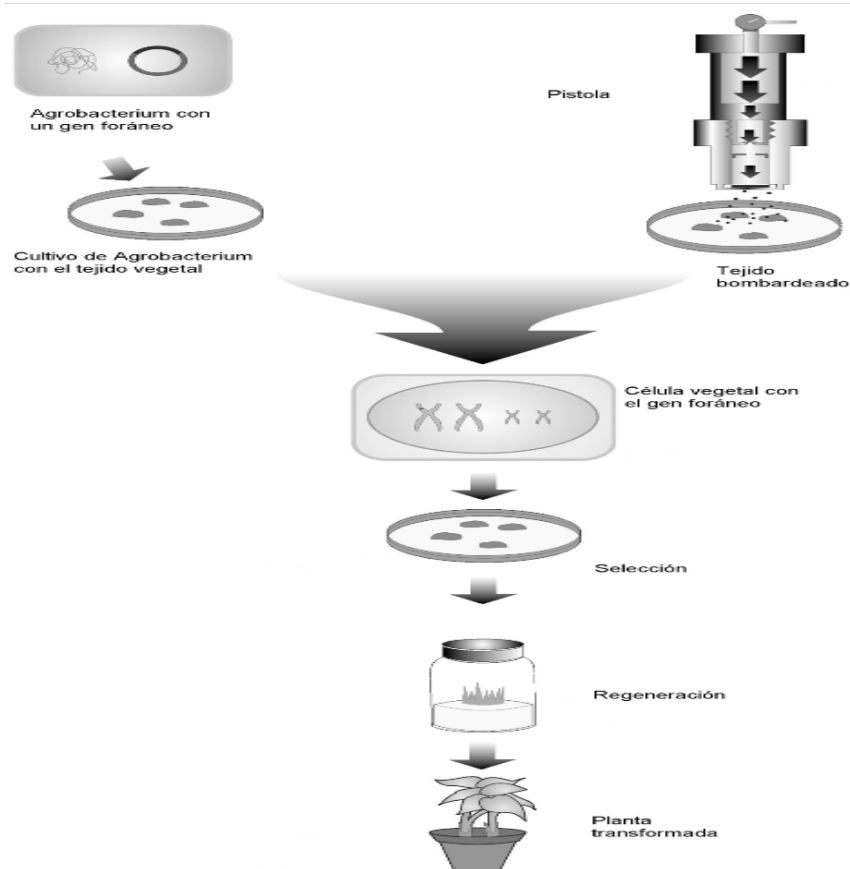


Figura 5. Transformación genética de plantas. Métodos directo (derecha) e indirecto (izquierda) (Martínez y col., 2004).

2.5.3 Expresión transitoria: Magniffection (MagnICON)

Se utiliza para conseguir rápidamente altos niveles de producción de proteínas en plantas. El sistema se basa en una construcción de TMV (Virus del Mosaico del Tabaco) con estrategia de replicación viral (Marillonnet y col., 2004; Marillonnet y col., 2005).

El sistema se divide en dos módulos principales, el módulo 5' contiene la ARN polimerasa viral dependiente de ARN y la proteína del movimiento, y el módulo 3' que lleva el gen de interés. Los módulos se integran en el núcleo celular de las plantas por la infección mediada por *Agrobacterium* y son ensamblados *in vivo* por la acción de una recombinasa sitio específico, transcrita a partir de un promotor constitutivo emitido por un tercer módulo (Santi y col., 2006). El módulo 5' lleva señales dirigidas a organelos, que se fusionan con el gen de interés después de la recombinación y la

transformación nuclear. Esta característica permite la acumulación en un compartimento celular (Fig. 6).

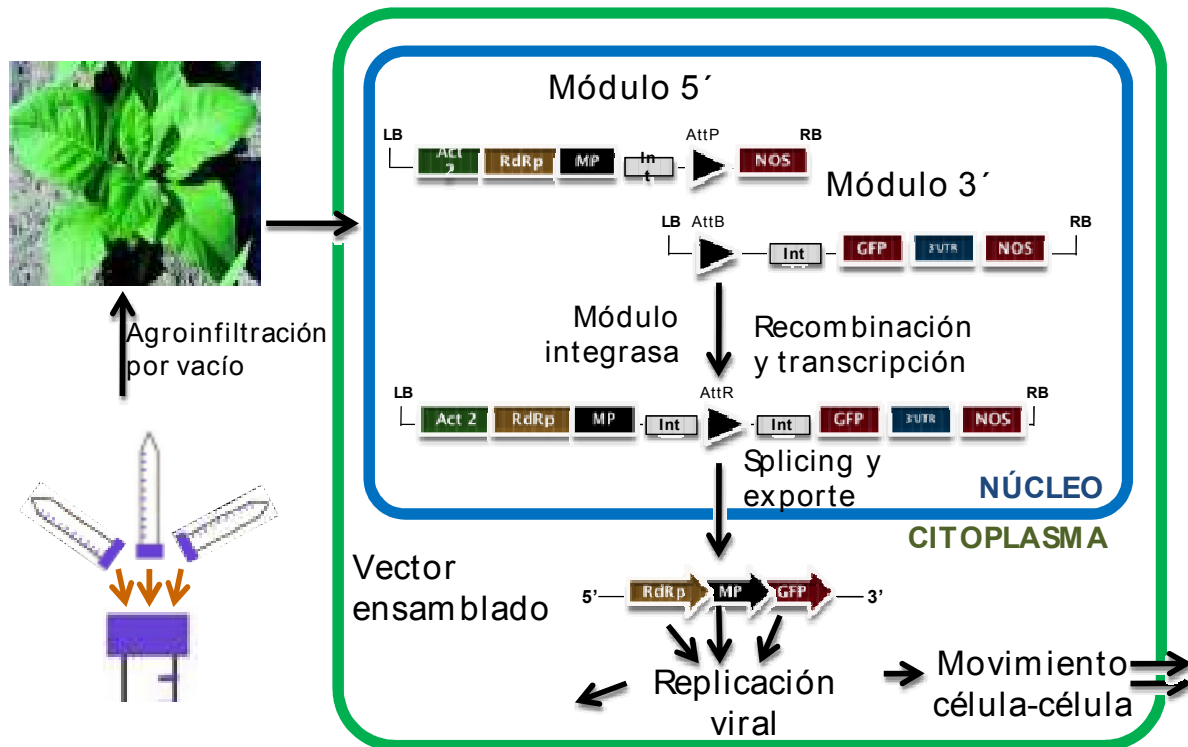


Figura 6. Representación esquemática del ensamblaje de los tres módulos de la tecnología de MagnICON (modificación de Marillonnet y col., 2004)

Marillonnet y col. (2005) mencionan que las ventajas que ofrece frente a otros sistemas de expresión existentes son:

- I. Los vectores son menos afectados por el tamaño del transgén ya que no tienen que moverse sistémicamente
- II. Infección simultánea de varias células en hojas múltiples da lugar a la expresión más sincrónica y rápida
- III. Una mayor proporción de la planta huésped es infectada por el virus que con los vectores tradicionales (que se mueven sistémicamente principalmente a los tejidos jóvenes)



- IV. Todos los recursos metabólicos de la célula se dirigen hacia la síntesis de la proteína y no se desperdicia para producir grandes cantidades de proteínas
- V. Los replicones de ARNs no están en partículas virales y por lo tanto no pueden ser transferidos a plantas no transformadas o generar virus de tipo silvestre

2.6 Lechuga y tabaco como bioreactores

2.6.1 Lechuga

La lechuga es una planta anual, perteneciente a la familia *Compositae* y cuyo nombre botánico es *Lactuca sativa* L. La lechuga es una hortaliza pobre en calorías, y las hojas exteriores son más ricas en vitamina C y hierro que las interiores. Normalmente se consume cruda, como ingrediente de ensaladas y otros platos; es decir no pasa por el proceso de cocción y por tanto se puede conservar las proteínas intactas. Recientemente la lechuga ha sido utilizada para la producción de diversas proteínas de interés farmacológico, tal es el caso de la expresión en lechuga de una proteína que podría ser utilizada como una vacuna candidato contra el VIH (Govea y col., 2013), la cual ha sido evaluada en ratones y ha demostrado inducir un aumento en la producción de anticuerpos que responden al reto contra el mismo antígeno.

2.6.2 Tabaco

Es una planta dicotiledónea, de la familia de las solanáceas. Su composición incluye un alcaloide, la nicotina, que se encuentra en las hojas en proporciones variables (desde menos del 1% hasta el 12%). Su uso en la producción de proteínas de interés farmacológico se debe en parte a que se considera una planta modelo pues su ciclo de vida es corto y no requiere la polinización para dar semilla (Tremblay y col., 2010). Un ejemplo de expresión de una proteína terapéutica en tabaco es la insulina como factor de crecimiento 1, cuya funcionalidad ha sido demostrada y su expresión cuantificada en valores de hasta 32.7% de proteína soluble total (PST) (Daniell y col., 2009).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Producir un péptido antiviral (HRA2pl) contra el hMPV en plantas de tabaco con actividad biológica y probarlo en la línea celular HEp-2.

Además a partir de plantas transgénicas de lechuga con una construcción que expresa epítomos relevantes del metapneumovirus humano (MPVpl), inmunizar ratones a fin de cuantificar su respuesta inmune.

3.2 Objetivos específicos

1. Construir vectores que permitan expresar un péptido antiviral contra el hMPV (HRA2pl) y otro para la proteína antigénica (MPVpl).
2. Obtener el péptido HRA2pl de plantas de tabaco transformado transitoriamente y caracterizarlo.
3. Probar la eficacia como péptido antiviral del HRA2pl en la línea celular HEp-2 contra el hMPV.
4. Obtener y caracterizar plantas transgénicas de lechuga que expresan la proteína antigénica contra el hMPV.
5. Probar la eficacia de la proteína antigénica contra el hMPV en ratones Balb/c.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Péptido HRA2pl

4.1.1 Construcción del vector de expresión para plantas

La secuencia del péptido HRA2pl fue una modificación del trabajo de Deffrasnes y col. 2008; también se añadió un fragmento de 52 aa del vector pET30a para estabilizar el péptido. La secuencia del gen se sintetizó por la compañía GenScript y su expresión se optimizó para la planta de *N. tabacum*. El gen sintético se clonó en el provector pICH11599 (donado por Icon Genetics, Halle, Alemania) para llevar a cabo la transformación transitoria (Magniffection).

4.1.2 Transformación transitoria de plantas (protocolo Magniffection)

El vector HRA2pl-pICH11599 recombinante, se introdujo por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. Los otros módulos utilizados en este estudio fueron el módulo 5' (pICH4851) que contiene la replicasa y un módulo de integrasa (pICH10881). La *Agrobacteria* se inoculó en 25 ml de medio LB (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), que contiene 50 mg/ml rifampicina y 50 mg/ml ampicilina y se cultivó hasta la saturación. La suspensión de bacterias se centrifugó durante 10 min a 1,500 rpm y el sedimento se resuspendió en 500 ml de tampón de infiltración (MES 10 mM pH 5.5, MgSO₄ 10 mM). Las plantas de tabaco se cultivaron en tierra estéril y aproximadamente cuatro semanas más tarde se utilizaron para transformar por infiltración al vacío. El vacío se aplicó durante 1 min y después las plantas se devolvieron al invernadero en condiciones estándar.

4.1.3 Análisis de transcripción por RT-PCR para el transcrito HRA2pl

La extracción de ARN total se realizó con 300 a 500 mg de hojas infiltradas (3, 7, 10 y 12 días después de la infiltración), utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para eliminar la contaminación de ADN genómico, los extractos de ARN se trataron con ADNasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para sintetizar la primera cadena de ADNc, el cebador oligo dT (Invitrogen) y la Taq



polimerasa para la transcripción inversa (Invitrogen) se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores específicos para el gen HRA2pl utilizados en el análisis de PCR fueron HRA2pl-F (5'-ATGCATCACCATCACACC-3') y HRA2pl-R (5'-CTTCAATTCCCTAACAGCGG-3'). La mezcla de reacción contenía 200 ng de ADNc, MgCl₂ 1.5 mM, 2.5 U de Taq ADN polimerasa, dNTP 1 mM, y 1 M de cebadores.

El programa de amplificación fue de 94°C durante 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C durante 45s y 72°C durante 60s y por último 60s a 72°C utilizando un termociclador Techne (Cole-Parmer, VernonHills, Illinois, EE.UU.). La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1.5% y se tiñó con 0.1% de bromuro de etidio.

4.1.4 Extracción de proteínas y cuantificación por Bradford

Después de 10 días posteriores a la infiltración se recogieron las hojas y a continuación, 100 mg de hojas se trituraron en 300µl de tampón de extracción de proteína (tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0 / 2-mercaptoetanol 5 mM/ EDTA10 mM/ Triton X-1000.1%). La proteína soluble total (PST) se cuantificó por el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

4.1.5 SDS-PAGE y Western blot

Cincuenta microgramos de PST a partir de muestras se mezclaron con tampón de carga 2X y se separó mediante SDS-PAGE (18% acrilamida) siguiendo un protocolo estándar. Después de la electroforesis de proteínas, el gel fue teñido con azul de Coomassie. Se realizó el análisis de Western blot usando anticuerpo de ratón anti-histidina como el anticuerpo primario y el anticuerpo de rábano picante producido en ratón como anticuerpo secundario. La señal fue detectada mediante un método quimioluminiscente utilizando Thermo Scientific SuperSignal West Pico quimioluminiscente como sustrato.

4.1.6 Líneas celulares y los virus

Las células HEp-2 (carcinoma de laringe humana) se adquirieron de ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma Aldrich, St. Louis) suplementado con 5% de suero bovino fetal (SBF) y 100 U



de penicilina / estreptomycin 100 mg. La cepa clínica de hMPV utilizada (Mex3670fus) fue tratada previamente con tripsina TPCK (Worthington Bioquímicos, Tryp-MEM) para estimular su fusogenicidad. El hMPV se cultivó en células HEp-2 utilizando DMEM (DMEM, Sigma Aldrich, St. Louis) sin suero fetal bovino.

4.1.7 Protocolos para el manejo de la línea celular HEp-2

4.1.7.1 Conservación de la línea celular HEp-2

1. Observar caja confluyente
2. Retirar medio y realizar 2-3 lavados con 5ml PBS
3. Retirar PBS y agregar 750µl EDTA y 150µl tripsina
4. Incubar 10 min a 37 °C y 5 % CO₂
5. Golpear ligeramente y resuspender en 3ml medio 5%
6. Retirar 2ml y agregar 7ml medio 5%
7. Resuspender e incubar 37°C/ 5% CO₂

4.1.7.2 Duplicación

Repetir 1-5 conservación

6. Dejar 1.5ml en la caja y pasar 1.5ml a otra caja
7. Agregar 6.5ml medio 5%
8. Incubar 37°C/5%CO₂

4.1.7.3 Congelamiento

Repetir 1-5 conservación

6. Pasar todo el volumen a tubo cónico de 15ml
7. Centrifugar 1500rpm por 10min
8. Decantar medio y agregar 600 µl medio para congelar



9. Resuspender y pasar a criotubo de 1.5ml
10. Incubar a -20°C por 2h
11. Incubar a -70°C

4.1.7.4 Titulación viral

Repetir 1-5 conservación

6. Colocar 2.5ml de células en el multicanal y agregar 12.5ml de medio
7. En una caja de 96 pozos, colocar 150 µl de células por pozo
8. Esperar 2h a 37°C, posteriormente retirar los 150 µl
9. Adicionar 150 µl de medio 5% por pozo
10. Incubar hasta el día siguiente a 37°C
11. En una placa nueva, colocar 100 µl del virus en el primer carril y 70 µl de medio incompleto en el resto de los carriles
12. Tomar 35 µl del primer carril y pasar al segundo, cambiar puntas y repetir en el resto de los carriles. Dejar el último carril solo con medio
13. Pasar 50 µl de la placa de diluciones a la placa con células por pozo, excepto el último carril que serán solo células
14. Incubar 2h a 37°C
15. Retirar medio y completar con 150 µl de medio incompleto
16. Incubar a 37°C y observar a diario hasta tener el EFC (efecto citopático)

$TCID_{50} = -\Delta + [\delta(s^{-1/2})]$ donde,

Δ = dilución donde todos los pozos presentan efecto

S = suma de los % de todas las diluciones, donde se presenta el EFC 100%-0%



$\delta = \log_{10}$ del factor de dilución

4.1.7.5 Infección con virus de referencia

1. Retirar medio de caja confluyente
2. Lavar 3 veces con 4ml PBS
3. Lavar 3 veces con 4ml PBS
4. Retirar y poner 500 μ l virus
5. Incubar 4-5h /37°C y 5%CO₂
6. Retirar medio y completar con 8ml de medio incompleto (para infectar)
7. Observar diario hasta obtener ECP

4.1.7.6 Cosecha virus de referencia

1. Retirar medio de caja infectada cuando se observe ECP
2. Sonicar el medio y agregar X ml de MgSO₄ 2M para obtener concentración 0.1M
3. Colocar a -80°C

4.1.7.7 Tinción de caja Petri

1. Colocar 2ml MetOH y esperar 5min
2. Retirar y adicionar gotas de cristal violeta
3. Esperar 1min
4. Enjuagar con agua y secar

4.1.7.8 Extracción ARN para PCR

1. Retirar medio de la caja confluyente (dejar una capa)
2. Adicionar 1ml Trizol y resuspender



3. Pasar a tubo eppendorf de 1.5ml y agregar 200 μ l de cloroformo
4. Vórtex 15-20s
5. Centrifugar 10,000rpm por 10min
6. Obtener la fase inorgánica y agregar 500 μ l de isopropanol
7. Precipitar por 48-72h a -70°C
8. Centrifugar 10,000rpm por 10min
9. Decantar y lavar con etanol 75% v/v
10. Centrifugar 10,000rpm por 10min
11. Decantar y resuspender en agua DEPC (dietilpirocarbonato) 20-30 μ l
12. Cuantificar ARN (Abs: 260nm)

4.1.7.9 Ensayo de viabilidad celular (Alamar blue®)

La resazurina es el ingrediente activo del reactivo Alamar blue® el cual es no tóxico pero permeable a la célula, es azul y no fluorescente. Dentro de la célula la resazurina es reducida a resorufina, un compuesto rojo y fluorescente. Las células viables convierten constantemente la resazurina a resorufina, incrementando la fluorescencia y el color de las células de alrededor.

Procedimiento:

1. Añadir 10 μ l de reactivo Alamar blue 10X al cultivo de células por cada 100 μ l de medio
2. Incubar 1-4 h a 37°C pero 24h es mejor
3. Leer absorbancia o fluorescencia a 570nmutilizando 600nm como referencia de longitud de onda



4.1.8 Ensayo de unidades formadoras de placa

1. En la caja confluyente lavar con PBS 3 veces (2ml)
2. Adicionar EDTA-tripsina
3. Incubar 10min
4. Adicionar 25ml SFB con antibiótico
5. En un canal poner 2.5ml y completar a 12ml
6. En cada pozo poner 2ml
7. Incubar a 37 °C / 5%CO₂

4.1.8.1 Infección en placa de 6 pozos

1. En el pozo 1 adicionar 500 µl-1000 µl de virus
2. En los pozos 2-6adicionar 45 µl del medio incompleto
3. Tomar una alícuota del carril 1 (50µl) y hacer diluciones seriadas 2-5, el 6 es control negativo
4. Por otra parte, retirar el inóculo de la caja de 6 pozos sin infectar
5. Lavar con PBS 400 µl por 3 veces
6. Poner el virus como se realizó las diluciones de la menos diluida a la más diluida
7. Incubar 4 h
8. Quitar el inóculo de la placa
9. Adicionar 3ml por pozo por las paredes
10. Incubar a 37 °C, 5%CO₂



11. Después de 7 días añadir 2ml formaldehído al 1% hecho en solución salina 0.15M o PBS
12. Dejar fijar para que penetre en la agarosa, debe hacerse con agitación (toda la noche)
13. Lavar el pozo cuidadosamente para quitar agarosa
14. Añadir 2-3ml rojo neutro 0.05%
15. Dejar a temperatura ambiente 1h
16. Retirar el rojo neutro
17. Enjuagar con H₂O y dejar secar para una posterior observación

4.1.8.2 Conteo de Unidades Formadoras de Placa por ml (PFU/ml)

$$\text{PFU} = \text{Dilución} \times P_1 + P_2 + \dots \times 1/v$$

Donde:

P= No. de placas contadas por ensayo

N= No. de ensayos

V= volumen de inóculos en mililitros

4.1.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con ANOVA por Graph Pad Prism software 5. Se utilizó la prueba de la diferencia estadísticamente significativa de Tukey (HSD) para comparar todos los pares de grupos en la prueba de ANOVA. Una $p < 0.001$ fue considerado estadísticamente significativo.

4.2 Proteína antigénica hMPVpI

4.2.1 Diseño y síntesis de genes

Algunos de los epítomos de la Tabla 1 (ver sección de Resultados) tienen un tamaño de entre 8 aa y 9 aa por lo que en su totalidad no constituyen un polipéptido con un



tamaño lo suficientemente grande para garantizar inmunogenicidad, por lo que para aumentar el tamaño se hizo coincidir estos epítomos con los picos de antigenicidad que resultan del análisis de la proteína completa en el software *Antheprot* (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr>). Este software predice regiones antigénicas basadas en las características fisicoquímicas (hidrofilicidad) de los aminoácidos por el método de Parker y col. (1986). De este análisis se tomaron en cuenta aminoácidos adyacentes a los epítomos. En el caso de la proteína N para el epítomo N1, esta secuencia no coincide con un pico de antigenicidad, pero se tomó en cuenta debido a que el análisis con otro software (SYFPEITHI) sí dio buenos resultados. Este último software toma en consideración los aminoácidos que se unen o anclan al complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I), o bien los que son posiciones auxiliares del ancla así como otros aminoácidos frecuentes y cuenta con una base de datos de epítomos publicados (ligandos naturales). En el caso de los epítomos seleccionados de las proteínas del hMPV, se buscó la predicción de epítomos para los alelos H2D^b (de ratón) y HLA-A*0201 (de humano). Las Tablas S1 y S2 muestran la secuencia de la proteína analizada que recibe la puntuación indicada; esta puntuación indica un valor numérico que resulta de la contribución independiente de cada aminoácido en el péptido a la unión a la molécula clase I. Una vez estructurados los genes sintéticos, la secuencia en aminoácidos se mandó sintetizar a la compañía GenScript que optimizó dicha secuencia para la expresión en lechuga (*Lactuca sativa*) y tabaco.

4.2.2 Construcciones genéticas

4.2.2.1 Construcción módulo 3'-hMPVn

El gen hMPVn fue digerido con *Nco* I y *Hind* III sitios de restricción que flanquean el gen sintético. El vector módulo 3' (pICH11599) también posee estos sitios. Los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% y la banda de 890 pb correspondiente al gen hMPVn se purificó del gel de agarosa con el kit Promega. Para la ligación se empleó T4 ADN ligasa y esta ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* por choque térmico y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina.



Posteriormente se analizaron las clonas por análisis del patrón de restricción y se mandó secuenciar para confirmar la construcción al Langebio-CINVESTAV, Irapuato.

4.2.2.2 Construcción pBI121-hMPVn

El vector pBI121 fue digerido con las enzimas *Sma* I y *Sac* I para la eliminación del gen reportero GUS; al mismo tiempo se llevó a cabo la digestión del gen hMPVn con las mismas enzimas. Cabe mencionar que se realizaron digestiones parciales en el gen hMPVn debido a que este tiene un sitio *Sac* I interno. Los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 1% y la banda de 890 pb correspondiente al gen se purificó con el kit Promega y el vector pBI121 de 12 kb digerido también se purificó. Posteriormente se procedió a la ligación empleando T4 ADN ligasa y con este producto de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* y se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina. Las clonas obtenidas se analizaron por PCR con oligonucleótidos específicos que amplifican dentro del gen nuclear; así mismo dicha construcción fue enviada a secuenciar al Langebio-CINVESTAV, Irapuato.

4.2.2.3 Construcción pBIC-hMPVc

El vector para la transformación de cloroplastos de *N. tabacum* es el pBIC; éste fue digerido con *Xba* I y *Xho* I; dichos sitios también flanquean el gen diseñado para la expresión en cloroplastos (hMPVc). El pBIC posee un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las clonas transformantes. El vector pBIC digerido fue ligado al gen hMPVc y con la ligación se transformaron células competentes de *E. coli*. Se analizaron las clonas resistentes al agente de selección (ampicilina) por perfil de restricción con *Xba* I y *Xho* I; además se confirmó la construcción por PCR con oligonucleótidos que amplifican el gen de cloroplastos y por secuenciación realizada en el Langebio-CINVESTAV, Irapuato.

4.2.3 Transformación transitoria de *N. tabacum* sin nicotina y *N. benthamiana*

La construcción módulo 3'-hMPVn fue electroporada a células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 (25µF, 400Ω por 2.5kv, 8-9 ms). La construcción en *A.*



tumefaciens cepa GV3101 del módulo 3'-hMPVn se creció en 50 ml de medio LB líquido con ampicilina y rifampicina durante dos días a 28°C y 150 rpm. Al mismo tiempo, por separado se cultivaron los preinóculos del módulo 5' y el módulo integrasa así como el módulo 3' que tiene GFP (como ensayo control para probar la eficiencia del sistema de expresión) y se observó la producción de GFP, como un control de la transformación transitoria en *N. tabacum* y *N. benthamiana*. Se centrifugaron los cultivos que contienen cada módulo a 4,000 rpm por 10 min y se obtuvo una pastilla que se resuspendió en 5 ml del buffer de infiltración. Posteriormente las suspensiones de bacteria se diluyeron de 1:10 hasta 1:1000 en 2-3 L de buffer de infiltración. Se utilizaron plantas crecidas en tierra de *N. tabacum* sin nicotina y *N. benthamiana* de 4-6 semanas de edad que fueron cuidadosamente arrancadas de la tierra y se lavaron las raíces con agua destilada para eliminar el exceso de tierra; inmediatamente fueron colocadas en el matraz que contenía los 3 módulos resuspendidos en el buffer de infiltración (MES-NaOH10mM, pH 5.5 y MgSO₄ 10mM) y se les aplicó vacío por 30-45 s; posteriormente se liberó lentamente el vacío y se regresaron a tierra. La cosecha del tejido (hojas) se realizó entre 7-14 días post infiltración. El tejido se almacenó a -20°C, luego se liofilizó y molió.

4.2.4 Extracción de proteína soluble total y determinación de cantidad de proteína soluble total por el método de Bradford

Se congelaron 100 mg de tejido vegetal, se agregaron de 500-1000 µl de buffer de extracción de proteínas vegetales adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas y se homogenizó la mezcla. El homogenado se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C, la fase superior que es la que contiene las proteínas totales solubles se pasó a un tubo nuevo y se almacenó a -80°C. Para determinar la cantidad de proteína soluble total por el método de Bradford, se colocó 1 µl de la solución problema en una placa para ELISA, se añadió 199 µl del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm en el fluorómetro TECAN modelo Genios. Se empleó albúmina de suero de bovino para realizar la curva estándar.



4.2.5 Transformación nuclear vía *A. tumefaciens*

300 cotiledones de lechuga y de 3 a 5 hojas de tabaco de cuatro semanas de edad obtenidos del cultivo *in vitro* fueron heridos con un bisturí por la cara abaxial, éstos fueron colocados en el medio MSO líquido para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una solución de *A. tumefaciens* que portaba el plásmido de interés con una carga bacteriana medida en DO_{600nm} de 0.2. Después de eliminar el exceso de bacterias con papel absorbente estéril, se colocaron en el medio de cocultivo UM. Pasado el periodo de cocultivo de 2 días, los explantes se transfirieron al medio de selección MSJ (100 mg/l o 200 mg/l de kanamicina para lechuga y tabaco respectivamente, adicionado con 500 mg/l de cefotaxima para eliminar a la *Agrobacteria*). Los tejidos fueron subcultivados cada dos semanas, seleccionando sólo los explantes resistentes a la selección.

4.2.6 Transformación de cloroplastos de *N. tabacum* sin nicotina con pBIC-hMPVc por biobalística

Se utilizaron hojas de tabaco sin nicotina de cuatro semanas de edad, dichas semillas se esterilizaron y germinaron *in vitro*. Se colocaron en medio RMOP con la cara abaxial hacia arriba. Las partículas de oro que se usan para el bombardeo deben ser preparadas con un día de anticipación. Se pesaron 50 mg de partículas de oro 0.6µm (Bio-Rad) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Para preparar las partículas de oro se agregó 1 ml de etanol 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 µl de glicerol al 50%. La



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

4.2.7 Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés

La suspensión de partículas de oro previamente preparadas se mezcló en vórtex hasta estar completamente resuspendidas, se tomaron 50 μl de estas partículas y en estricto orden se agregaron: 10 μl de ADN plasmídico de concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 50 μl de CaCl_2 2.5M recién preparado, 20 μl de espermidina 0.1M. Después de añadir cada solución se agitó con vórtex durante 5 segundos, posteriormente se mezcló con vórtex durante 20 min a 4°C ; se agregaron 200 μl de etanol absoluto a temperatura ambiente y se mezcló en vórtex, durante 5 segundos. La mezcla se centrifugó durante 30 segundos a 13,000rpm. Se desechó el sobrenadante y se repitieron los lavados con etanol por lo menos 5 veces, hasta que las partículas de oro eran fácilmente resuspendidas. El paso final fue resuspender las partículas en 35 μl de etanol al 100% y se dejaron en hielo hasta su uso. Este material se utilizó para 6 bombardeos. Se utilizaron discos de ruptura de 1,100 psi, por lo cual la presión del manómetro de salida se ajustó a 1,400 psi. Se encendió la bomba de vacío BIORAD y la cámara de vacío para realizar los disparos. Se colocaron 6 μl de la suspensión de micropartículas con ADN en los macro acarreadores previamente esterilizados con etanol, se colocó la caja Petri con la hoja a 9 cm de distancia y se cerró la cámara de vacío. Se generó vacío hasta que el indicador marcó 15 Hg (mm de mercurio). Se mantuvo el vacío y se realizó el disparo de las micropartículas con el ADN. Las hojas bombardeadas se incubaron durante 48h a 25°C en la oscuridad. Después de este periodo, cada hoja se cortó en fragmentos de alrededor de 5mm^2 y se colocaron en medio RMOP con espectinomicina 500 mg/l para inducir la selección de las plantas transplastómicas.

Los explantes se cambiaron a medio nuevo cada dos semanas y se seleccionaron los explantes resistentes al antibiótico.



4.2.8 Detección de la proteína recombinante por Dot blot y Western blot

Para el Dot blot en una membrana de nitrocelulosa se dibujó un círculo donde se colocó un volumen de extracto de proteína (0.1 µg de proteína soluble total). Se llevó la membrana a secar, luego se bloquearon los sitios inespecíficos con un lavado en 5% BSA en TBS-T (1h/ temperatura ambiente). Se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:10,000 en BSA-TBS-T (30min/ temperatura ambiente), se lavó 3 veces con TBS-T (3 lavados de 5min). Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP diluido 1:4,000 (30 min/ temperatura ambiente). Se lavó 3 veces con TBS-T (15 min el primer lavado, 5 min los siguientes). Se incubó con el reactivo de revelado por 1 min y se tomó la foto por quimioluminiscencia.

Para el Western blot, 50 microgramos de PST a partir de muestras se mezclaron con tampón de carga 2X y se separó mediante SDS-PAGE (18% acrilamida) siguiendo un protocolo estándar. Después de la electroforesis de proteínas, el gel fue transferido a la membrana de nitrocelulosa y se realizó el análisis de Western blot usando anticuerpo anti-histidina como el anticuerpo primario y el anticuerpo de rábano picante como anticuerpo secundario. La señal fue detectada mediante un método quimioluminiscente utilizando Thermo Scientific SuperSignal West Pico quimioluminiscente como sustrato.

4.2.9 ELISA para determinación de la cantidad de proteína recombinante en el extracto infiltrado

Se utilizó un anticuerpo primario contra la etiqueta de histidinas para determinar en placa la cantidad de proteína recombinante y como anticuerpo secundario se utilizó uno conjugado a la fosfatasa alcalina. El sustrato utilizado fue el paranitrofenilfosfato. Para la curva estándar se utilizó la proteína producida en bacteria con etiqueta de histidinas del HIV (donación Dr.Sergio Rosales, UASLP).

4.2.10 Administración de la proteína antigénica de lechuga hMPVn a ratones Balb/c

4.2.11 Preparación del material vegetal

Se utilizaron hojas de lechugas transgénicas de la línea 6 (L6) y de tipo silvestre (wt). Una vez congelado en nitrógeno líquido se liofilizó completamente posteriormente se trituró y se cuantificó como se describe en la sección 4.2.4 de este apartado.

4.2.12 Inmunización

25 ratones hembra de 4 semanas de edad fueron divididos en 5 grupos de 5 ratones. El grupo 1 se utilizó como control; a éste se le administró 50µg vía oral en el día 1 de hojas de tejido vegetal de lechuga silvestre liofilizadas (WT). El grupo 2 recibió 100µg de pro toxina Cry sola (la cual se utilizó como adyuvante). El grupo 3 recibió 50 µg de liofilizado MPVpl de lechuga transgénica sola mientras que el grupo 4 fue inmunizado con la lechuga transgénica emulsionada con 100µg de la toxina Cry. Por último, el grupo 5 se utilizó como control y fue inmunizado con PBS. Todas las dosis se resuspendieron en 500µl de PBS. Las dosis siguientes se administraron en los días 8, 15, 22 y 29. Los ratones fueron sacrificados en el día 36 para recoger sueros, lavados traqueopulmonares e intestinales. El procedimiento fue llevado a cabo bajo las normas de investigación animal establecidas por el comité de bioética del IPICYT.

4.2.13 Colección de muestras

La sangre se extrajo por punción cardiaca y posteriormente se separó el suero. El intestino delgado fue lavado con 1ml de PBS frío con inhibidor de proteasas. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000rpm a 4°C por 10min y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

4.2.14 Determinación de nivel de anticuerpos por ELISA

Las muestras fueron descongeladas y colocadas en placa para ELISA e incubadas toda la noche a 4°C. De acuerdo al análisis se añadieron anticuerpos anti-IgA, anti-IgG, anti-IgG1 y anti-IgG2a de ratón; éstos se incubó por 2h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se incubó con anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina por 2h a temperatura ambiente. Las placas fueron reveladas incubándolas



por 15min con paranitrofenilfosfato (5mg/ml) y la reacción fue detenida con 25 μ l de H₂SO₄ 2.5M. La absorbancia se registró a 495nm en un lector de microplacas.

4.2.15 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con ANOVA por Graph Pad Prism software 5. Se utilizó la prueba de la diferencia estadística significativa de Tukey (HSD) para comparar todos los pares de grupos en la prueba de ANOVA. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Péptido HRA2pl

5.1.1 Diseño de HRA2pl péptido

Los péptidos exógenos de HRA y HRB de la proteína F del hMPV pueden competir con péptidos endógenos del mismo virus e inhibir la fusión y, por lo tanto, la infección (Miller y col., 2007; Deffrasnes y col., 2008). El diseño del péptido con acción profiláctica se basó en el estudio de Deffrasnes y col., 2008, en el cual se evaluaron diferentes secuencias de los dominios HRA y HRB de la proteína F como potenciales inhibidores de la infección por hMPV. En este estudio se describe un péptido análogo a la secuencia HRA de la proteína F del hMPV que resultó tener actividad inhibitoria de la fusión del virus con la célula hospedera de manera que podría ser utilizado como profiláctico. En la estructura del gen que se describe en la Fig. 7, se utilizó la secuencia del dominio HRA (48aa) de la proteína F del hMPV; además se añadió un fragmento del vector pET30a (52aa) pues se sugiere en el trabajo de Deffrasnes y col., 2008, que éste ayuda a brindarle estabilidad a la estructura y con ello se mejora la actividad antiviral.

En el extremo 5' se puso una etiqueta de seis histidinas que será útil para la purificación de la proteína recombinante y un sitio proteasa que permite la eliminación tanto de la etiqueta como del fragmento del vector pET30a.

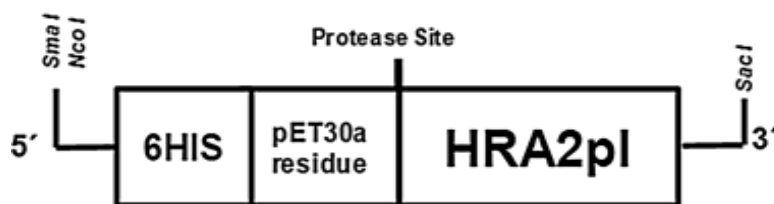


Figura 7. Estructura del gen sintético HRA2pl con actividad profiláctica contra el hMPV. 6His, etiqueta de histidinas; el sitio proteasa se utilizará para eliminar el fragmento del vector pET30a así como la etiqueta de histidinas. Se muestran sitios de restricción (Márquez-Escobar y col., 2015).

5.1.2 Modelado de la estructura del péptido *in silico*

Usando el software iTASSER (Roy y col., 2010) se realizó la predicción de la estructura de este péptido. Los resultados de la predicción de este modelo demostraron que forma dos estructuras de hélice alfa en el extremo C-terminal (Fig. 8). El fragmento del vector pET30a también forma parte de la hélice alfa y probablemente da más estabilidad, dichas hélices son determinantes para la actividad potencial y pueden ser responsables de la inhibición de la unión y su especificidad (Miller y col., 2007).

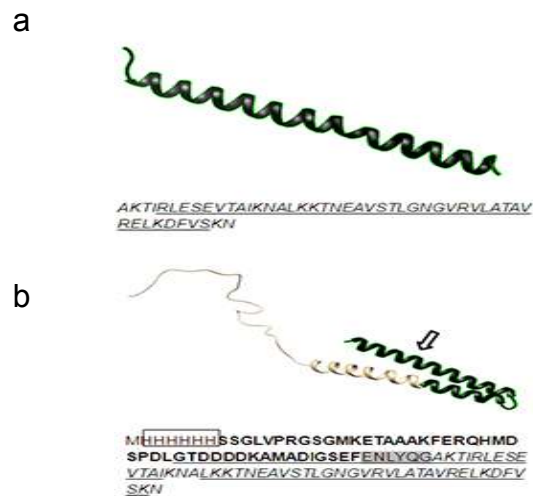


Figura 8. Modelo del péptido HRA2pl por predicción *in silico*. a) péptido antiviral sin fragmento pet30a, b) con fragmento pET30a. La secuencia HRA2pl está en negro, mientras que el resto del péptido está en color beige; la flecha muestra la estructura coil-coiled. La secuencia de aminoácidos se describe como sigue: seis histidinas (caja), fragmento de pet30a (negrita), sitio de la proteasa TEV (caja gris), péptido HRA2pl (cursiva), y hélice alfa (letras subrayadas)(Márquez-Escobar y col., 2015).

5.1.3 Construcción módulo 3'-HRA2pl

El gen sintético que expresa el péptido HRA2pl fue ligado al módulo 3' para la transformación transitoria (Fig. 9 y 10). Las clonas resistentes al agente de selección se analizaron por perfil de restricción con las enzimas *Nco* I y *Sac* I y se obtuvieron 4 clonas con el fragmento esperado de 330 pb.

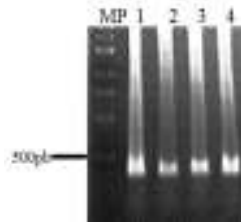


Figura 9. Análisis de restricción de las clonas módulo 3'-HRA2pl con las enzimas *Nco* I y *Sac* I. Fragmento esperado de 330pb. MP: Marcador de peso molecular 1Kb.



Figura 10. Representación esquemática de la construcción módulo 3'-HRA2pl para la transformación transitoria. Se muestran los sitios de clonación para amplificar el gen HRA2pl y el sitio donde se alinean los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen clonado.

5.1.4 Transformación transitoria de *N. tabacum* sin nicotina

La construcción módulo 3'-HRA2pl fue electroporada a células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101. Se infiltraron por vacío plantas de *N. tabacum* sin nicotina. El tejido molido se utilizó para extraer proteínas solubles totales (PST) y se cuantificó la proteína como se describe en la sección 4.1.4. Como control se realizó la transformación con el vector módulo 3'-GFP que expresa la proteína verde fluorescente.

5.1.5 Análisis de transcripción por RT-PCR para el transcrito HRA2pl

La expresión del gen HRA2pl a diferentes días post- infiltración fue confirmada por RT-PCR (Fig. 11). Se logró amplificar un fragmento de 300 pb que corresponde al tamaño del producto amplificado esperado.

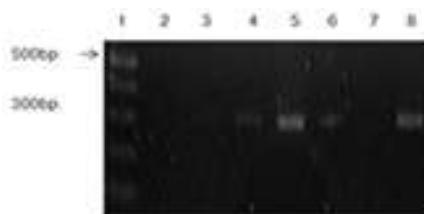


Figura 11. Expresión del transcrito del gen HRA2pl medido por RT-PCR. Carriles 1, marcador de peso molecular; 2, plantas no transformadas; 3-6, plantas transformadas con la construcción que expresa HRA2pl a los 3, 7, 10 y 12 días post-transformación respectivamente; 7, Control negativo RT-PCR; 8, Control positivo (construcción módulo 3' - HRA2pl). El fragmento de RT-PCR esperado es de 300 pb para el gen HRA2pl (Márquez-Escobar y col., 2015).

5.1.6 Identificación del péptido HRA2pl por SDS-PAGE, Dot blot y Western blot

La presencia de la proteína recombinante en los extractos transgénicos se confirmó preliminarmente por un Dot blot en el que se utilizó un anticuerpo anti-etiqueta de histidinas como anticuerpo primario pues la proteína recombinante posee en el extremo amino terminal una etiqueta de 6 histidinas, Fig. 12.

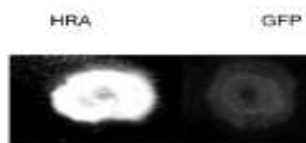


Figura 12. Dot blot de la proteína recombinante obtenida por Magniflection (construcción módulo 3'-HRA) usando como control extractos de plantas transformadas con el módulo 3'-GFP que no cuentan con colas de histidinas.

La proteína soluble total se analizó por electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 18%. El gel fue teñido con Coomassie blue y se observó una banda de 11.6 kDa que corresponde a la masa molecular del péptido (Fig. 13a). La banda fue identificada por Western blot con un anticuerpo primario contra la etiqueta de histidinas (Fig. 13b). De acuerdo con estos resultados, el péptido se sintetiza correctamente en las hojas de tabaco por transformación transitoria, con un máximo de expresión al día 10 post-

infiltración. El péptido HRA2pl consiste en 106aa con una masa molecular de 11.6 kDa.

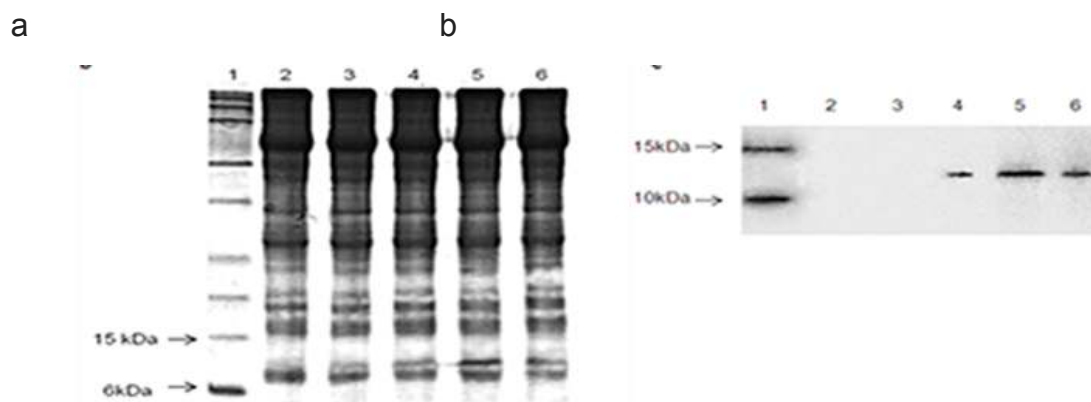


Figura 13. Expresión del péptido HRA2pl a diferentes días post-infiltración a) SDS – PAGE. Carril 1, proteína marcadora; 2, planta no transformada de tabaco; 3-6, planta de tabaco transformada con péptido a HRA2pl 3, 7, 10 y 12 días post-transformación, respectivamente. b) Western blot utilizando etiqueta de anticuerpo contra histidinas. 15 µg de proteína soluble total por carril. Carril 1, marcador estándar de proteínas con etiqueta de histidinas; 2, planta de tabaco no transformada; 3-6, planta de tabaco transformada con HRA2pl péptido a los 3, 7, 10 y 12 días post-transformación, respectivamente.

5.1.7 Ensayos *in vitro* en la línea celular HEP-2

5.1.7.1 Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos *in vitro* fueron realizados en colaboración con la Dra. Rocío Tirado de la Facultad de Medicina de la UNAM. Con el fin de confirmar su eficacia como antiviral, el péptido HRA2pl se evaluó en la línea celular HEP- 2 para inhibir la entrada del hMPV. Para esto primero es importante evaluar si el péptido es citotóxico o no. El efecto del extracto de péptido HRA2pl sobre la viabilidad de la línea celular HEP- 2 se determinó mediante el ensayo con Alamarblue®. Los porcentajes de viabilidad fueron 83.4, 85.5 y 92% para 94.3, 9.43 y 0.943 µg/ ml de PST del extracto HRA2pl, ver



Tabla 4. Ninguna de estas diluciones comprometió la viabilidad de la línea celular HEp- 2.

%viabilidad= (intensidad de fluorescencia problema/ intensidad de fluorescencia en el control de las células)*(100)

Tabla 4. Intensidad de fluorescencia determinada en el ensayo con Alamar blue®.

| Dilución (µg/ ml) | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 | Promedio | % Viabilidad |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|----------|-----------------|
| dil1 (94.3) | 531468 | 517654 | 545810 | 531644 | 83.4 |
| dil2 (9.43) | 559777 | 543875 | 530367 | 544673 | 85.5 |
| dil3 (0.943) | 586228 | 582881 | 589080 | 586063 | 92 |
| wt (94.3) | 519905 | 521537 | 523236 | 521559,3 | 81.8 |
| Control cel | 643770 | 621800 | 645862 | 637144 | |

wt: planta sin transformar

5.1.7.2 Ensayo de inhibición de la formación de sincicios o ensayo de unión

La cepa de hMPV utilizada fue tratada previamente para hacerla fusogénica, con el fin de observar las células sinciciales características en la línea celular HEp-2. El efecto citopático característico de hMPV fue observado durante su replicación en células HEp-2 infectadas (Figura 14b).

Si el extracto del péptido HRA2pl inhibe la fusión de la proteína F con la célula huésped, la formación de sincicios podría ser inhibida y fácilmente observarse en el microscopio. Con un ensayo de inhibición de la formación de sincicios se demostró este punto (Tabla 5). El extracto de proteína HRA2pl se mezcló con el stock viral de 10^8 TCID₅₀ (1:1). Se encontró que en la primera dilución del extracto de la proteína de la planta la replicación del virus fue inhibida (Figura 14e). Las tasas de inhibición de extracto de péptido HRA2pl contra la formación de sincicios fueron 41.8 % y 98.7 % en la concentración de 9.43µg/ml y 94.3µg/ml respectivamente (Figura 14 d y e).



%inhibición de la formación de sincicios= $100 - [(\#promedio \text{ de sincicios en la dilución} / \#promedio \text{ de sincicios en el pozo con solo virus}) * (100)]$

Tabla 5. Número de sincicios observados en el ensayo de inhibición de sincicios.

| Dilución ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 | Promedio | Desviación | % Inhibición |
|---|--------------|--------------|--------------|----------|------------|-----------------|
| dil1 (94.3) | 0 | 0 | 3 | 1 | 1.73 | 98.7 |
| dil2 (9.43) | 43 | 47 | 49 | 46.3 | 3.05 | 41.8 |
| dil3 (0.943) | 70 | 75 | 70 | 71.6 | 2.88 | 10.05 |
| wt (94.3) | 70 | 71 | 73 | 71.3 | 1.52 | 10.42 |
| Control solo virus | 75 | 81 | 83 | 79.6 | 4.16 | |

wt: planta sin transformar

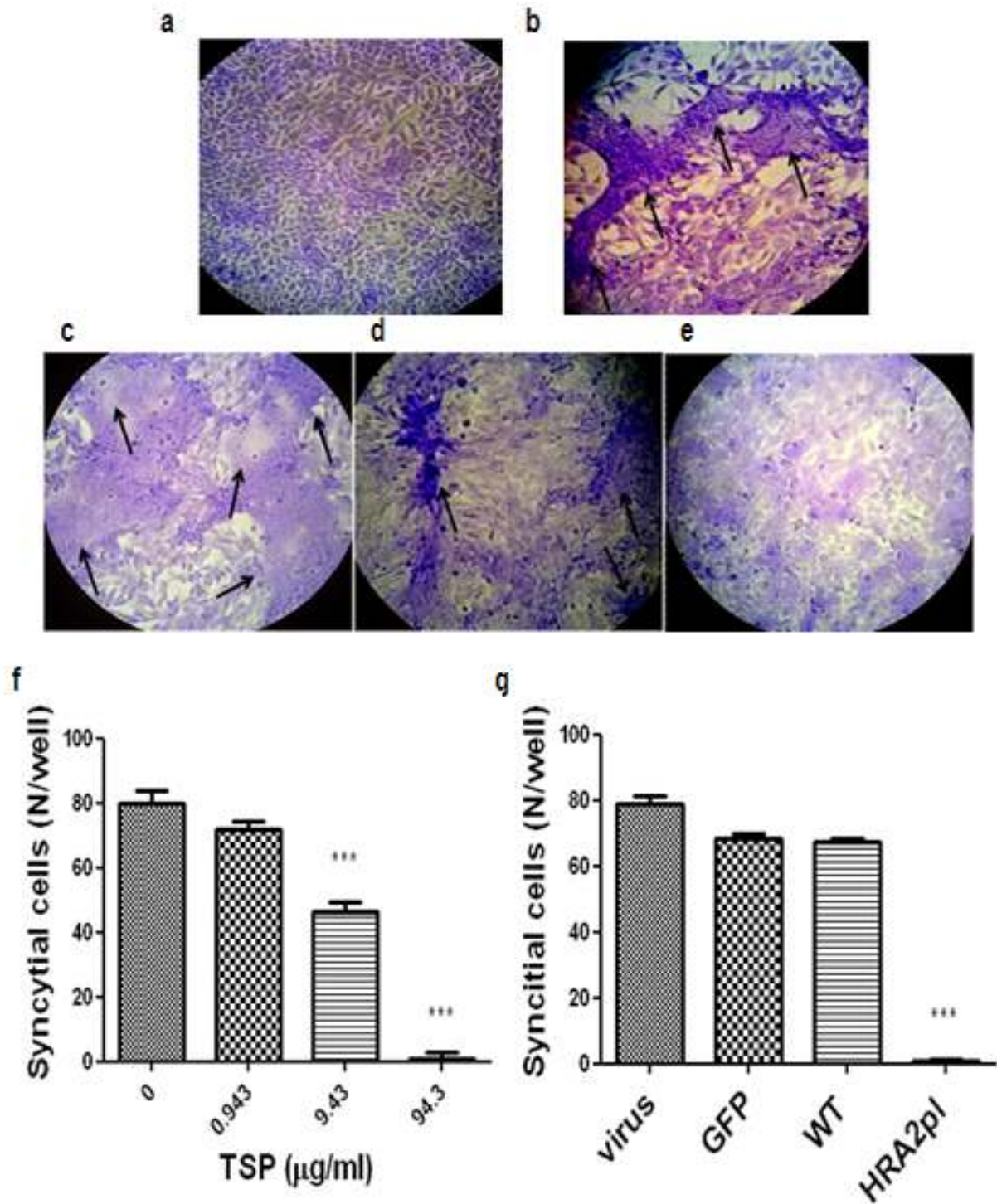


Figura 14. Ensayo de inhibición de la formación de sincicios. Células HEp-2 sin (a) o con (b) infección por hMPV. Las flechas señalan la formación de sincicios inducidos por la infección. Extracto de péptido HRA2pl es dosis-dependiente para la inhibición

de la formación de sincicios por hMPV [(c)–(e)]. Se determinó el número de sincicios por pozo (N/pozo). (a) Control de células (100X), (b) Control viral (100X), (c) Infección de células HEp-2 tratadas con 0.943 µg/ml de extracto del péptido HRA2pl (100X), (d) Infección de células HEp-2 tratadas con 9.43 µg/ml de extracto del péptido HRA2pl (100X) (e) Infección de células HEp-2 tratadas con 94.3 µg/ml de extracto del péptido HRA2pl (100X). (f) Gráfico de barras del número de sincicios encontrados en cada una de las diluciones analizadas (g) Como control 94.3 µg/ml PST de diferentes extractos (extracto de plantas transformadas con proteína fluorescente verde GFP, extracto de WT de las plantas de tipo silvestre, HRA2pl extracto de plantas transformadas con HRA2pl), que se analizaron en un ensayo de inhibición de sincicios.

Cabe mencionar que se realizaron experimentos control donde se evaluaron los extractos de proteína de planta no transformada (WT) y de plantas transformadas con proteína verde fluorescente (GFP) con el objetivo de evaluar la funcionalidad del péptido HRA2pl (Fig. 14g). Con este experimento pudimos descartar que la inhibición de la formación de sincicios fuera resultado del método de transformación o de extracción de la proteína. Concluyendo así que es el extracto de la proteína transgénica de HRA2pl el responsable de la inhibición de sincicios, pues el extracto HRA2pl tuvo una $p < 0.0001$, lo cual es estadísticamente significativo.

5.1.7.3 Ensayo de reducción de placas líticas en la unión

La actividad de HRA2pl como un antiviral de unión se evaluó mediante un ensayo de reducción de placas líticas en células HEp-2. La monocapa celular se infectó con una mezcla de 770 PFU/pozo de hMPV ya sea con el extracto de proteína de tabaco sin transformar o con extracto de proteína de tabaco transgénico (1:1) durante 1 hora a 4°C para permitir la fijación del virus sin internalización (Tabla 6). Se observó una reducción en el número de placas líticas en los cultivos expuestos a HRA2pl. Con estos resultados, confirmamos que el péptido HRA2pl interfiere con la unión viral a la célula huésped (94.3 µg/ml de PST) (Fig. 15); $p < 0.0001$. La base para evaluar la unión viral en este experimento es usar la temperatura de 4°C.

Tabla 6. Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de unión del virus-célula. WT: planta sin transformar

| | Virus (PFU) x10 ² /ml | WT (PFU) x10 ² /ml | HRA2pl (PFU) x10 ² /ml | Buffer (PFU) x10 ² /ml |
|--------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Repetición 1 | 8.06 | 6.66 | 2.80 | 7.93 |
| Repetición 2 | 7.93 | 7.06 | 2.93 | 8.06 |
| Repetición 3 | 6.53 | 6.73 | 2.67 | 8.20 |
| Repetición 4 | 7.73 | 6.86 | 2.80 | 7.93 |
| Promedio | 7.56 | 6.83 | 2.8 | 8.03 |

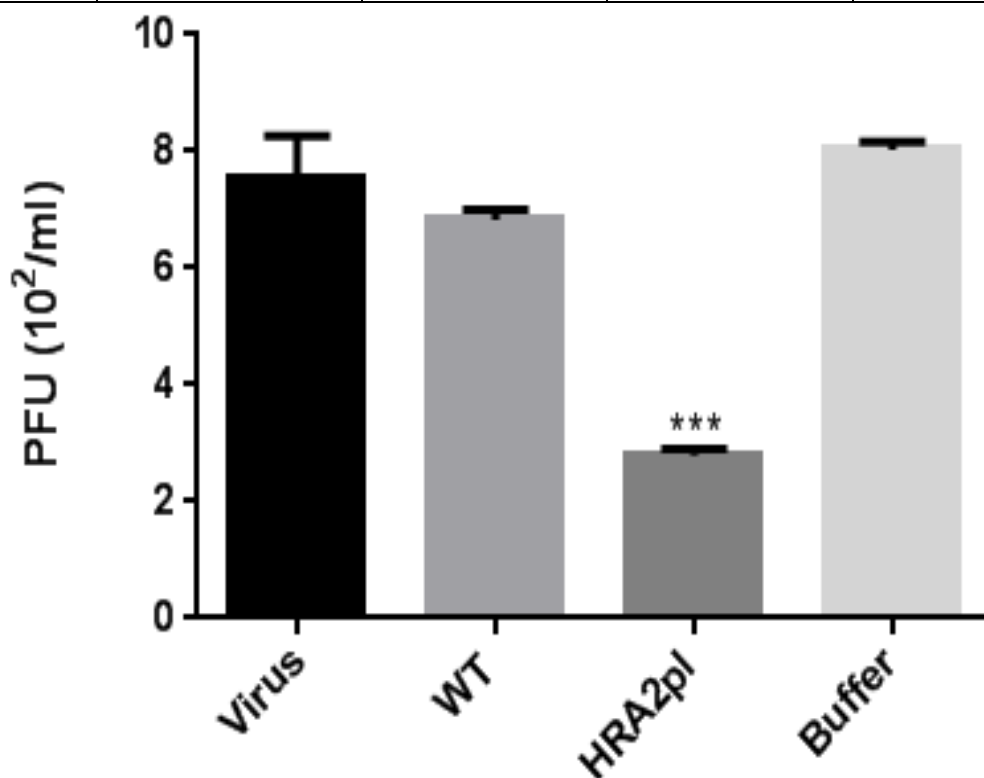


Figura 15. Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de unión del virus-célula. Datos \pm S.D. de 4 repeticiones ***p<0.0001

5.1.7.4 Ensayo de efectividad antiviral en la replicación

El efecto de HRA2pl en la replicación se evaluó mediante un ensayo de reducción de placas líticas. La monocapa celular se infectó con una mezcla de 770 PFU/pozo hMPV ya sea con extracto de proteína de tabaco sin transformar o extracto de proteína de tabaco transgénico (1:1) y se incubaron a 37°C durante 2 h para permitir la internalización de virus (Tabla 7). Se observó que el extracto HRA2pl (94.3µg/ml de PST), puede inhibir la replicación una vez internalizado el virus ($p < 0.001$), comparado con la planta WT y el buffer; sin embargo, el efecto es menos notable que el efecto inhibitorio de la unión el cual fue significativo a una $p < 0.0001$ (Fig. 16).

Tabla 7. Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de replicación del virus.

| | Virus (PFU) x10²/ml | WT (PFU) x10²/ml | HRA2pl (PFU) x10²/ml | Buffer (PFU) x10²/ml |
|---------------------|---|--|--|--|
| Repetición 1 | 8.06 | 6.46 | 5.47 | 7.6 |
| Repetición 2 | 7.93 | 6.93 | 5.27 | 8.2 |
| Repetición 3 | 6.53 | 6.73 | 5 | 7.66 |
| Repetición 4 | 7.73 | 6.8 | 5.33 | 8.06 |
| Promedio | 7.56 | 6.73 | 5.26 | 7.88 |

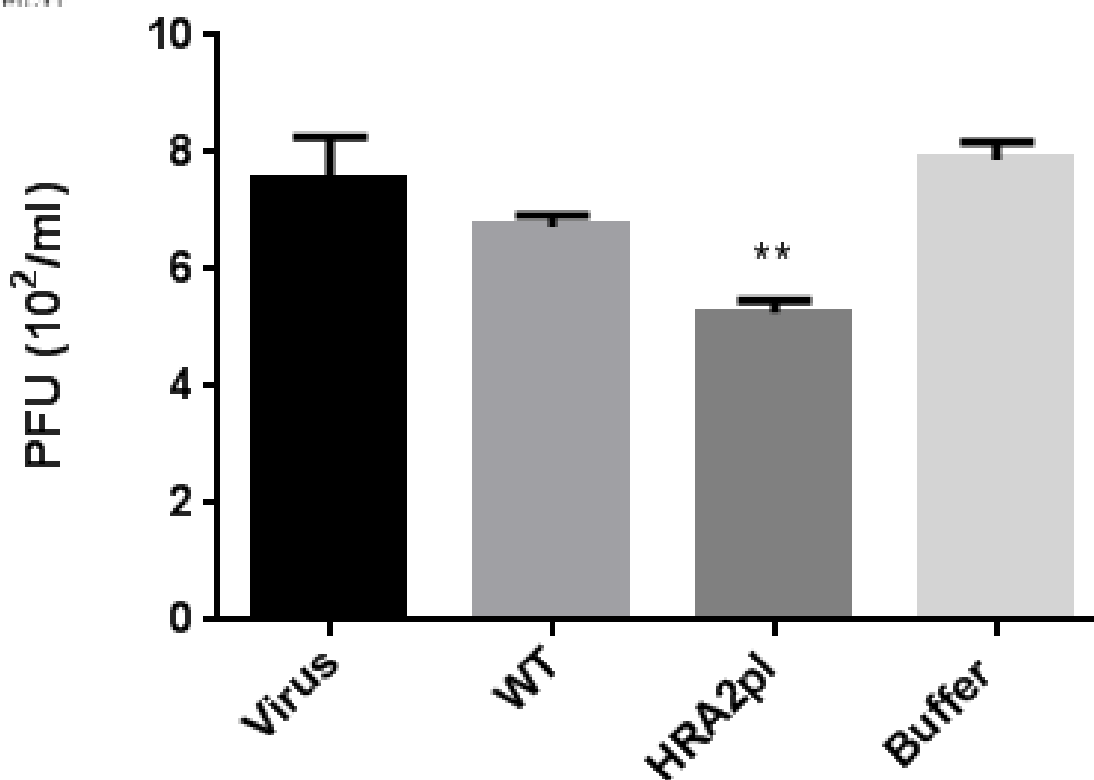


Figura 16. Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de replicación del virus. Datos \pm S.D. de 4 repeticiones ** $p < 0.001$.

5.1.7.5 Ensayo de inhibición de la infección *de novo* por HRA2pl

Después de la unión e internalización del virus, la replicación se lleva a cabo con lo cual se pueden generar mas viriones y por lo general infectar a las células vecinas. Por un ensayo de reducción de placas, se evaluó el proceso de infección *de novo*. Las células se trataron como en el ensayo de replicación pero con una modificación: después del tiempo de incubación con la mezcla de virus-extracto, se añadió más extracto de planta transformada, sin el virus, y las células se cultivaron en las condiciones estándar (Tabla 8). El extracto HRA2pl (94.3 μ g/ml de PST) puede inhibir la infección *de novo*, aunque a una $p < 0.05$, comparado con la planta WT y el buffer; sin embargo, el efecto es menos notable que el efecto inhibitorio de la unión el cual fue significativo a una $p < 0.0001$ (Fig. 17).

Tabla 8. Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de infección *de novo*.

| | Virus (PFU) x10 ² /ml | WT (PFU) x10 ² /ml | HRA2pl (PFU) x10 ² /ml | Buffer (PFU) x10 ² /ml |
|--------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Repetición 1 | 8.06 | 6.93 | 5.27 | 7.8 |
| Repetición 2 | 7.93 | 7.2 | 5.6 | 7.86 |
| Repetición 3 | 6.53 | 6.86 | 5.53 | 8.13 |
| Repetición 4 | 7.73 | 7.13 | 5.13 | 7.93 |
| Promedio | 7.56 | 7.03 | 5.38 | 7.93 |

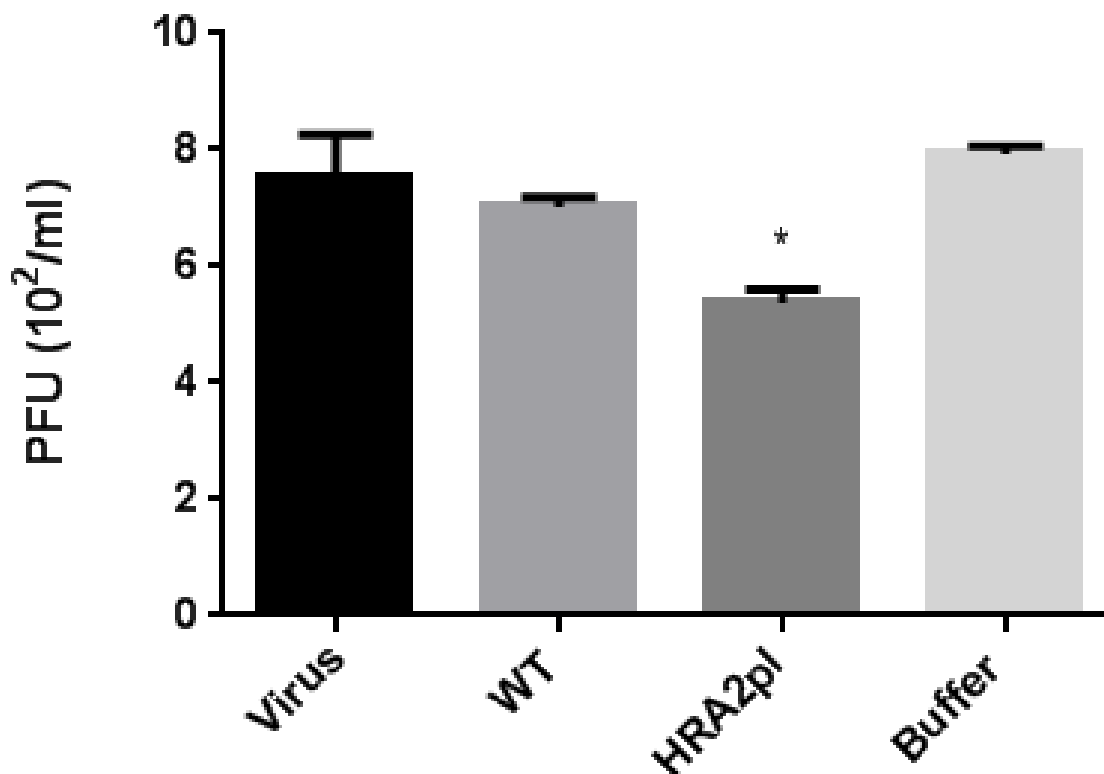


Figura 17. Ensayo de reducción de placas líticas por HRA2pl en el proceso de infección *de novo*. Datos \pm S.D. de 4 repeticiones * p<0.05.



5.2 Proteína antigénica contra el hMPV (hMPVpl)

5.2.1 Diseño de genes sintéticos para los epítomos relevantes de las proteínas del metapneumovirus humano

Basándose en lo mencionado en la metodología se decidió hacer una construcción utilizando diversos epítomos (Tabla 9); los genes sintéticos consisten en una fusión de estos epítomos relevantes.

En el caso de la proteína de fusión F, se eligieron tres epítomos diferentes: F1 (58-71aa), F3 (388-413aa) (Melendi y col., 2007) y F2 (286-328aa) (Ulbrant y col., 2008), que comprenden la región que evaluaron estos autores.

Además se incluyó una proteína de fusión llamada G1F/M2 que contiene fragmentos de las proteínas G y M2-1 del VSR y de la proteína F del virus del sarampión. Esta proteína de fusión induce producción de anticuerpos neutralizantes contra VSR, proliferación de células T y un balance entre la respuesta inmune Th1/Th2; este balance resulta ser importante debido a que la respuesta Th1 induce la producción de citocinas pro-inflamatorias que estimulan la inmunidad mediada por células que fagocitan y destruyen los patógenos mientras que la respuesta Th2 estimula la inmunidad mediada por anticuerpos, pero además puede conducir a reacciones alérgicas (Fan y col., 2005; Zeng y col., 2005).

Tabla 9. Epítomos utilizados en la construcción para el diseño de los genes sintéticos.

| EPÍTOPO (aa) | DESCRIPCIÓN | REFERENCIA |
|---|--|--------------------------------------|
| F1 (63-71) F3 (384-392) | Produce altos niveles de INF γ posterior a una infección i.p. secundaria. | Melendi y col., 2007. |
| F2 (234-338) | Induce producción de anticuerpos que neutralizan a hMPV A1 y B1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Conservado en todos sublinajes de hMPV. | Ulbrandt y col., 2008. |
| M2-1(81-89) | Epítopo dominante, reconocido por el complejo principal de histocompatibilidad en ratones Balb/c. | Melendi y col., 2007. |
| N1 (164-172) | Aumento de la expresión de citocinas tipo Th1: IL-12 (en pulmón) e INF γ (en pulmón y nódulos linfáticos pulmonares). Epítopo conservado en todos los subtipos de hMPV (A1, A2, B1 y B2). | Herd y col., 2006. |
| N2 (307-315) | Epítopo subdominante, da lugar a respuesta de linfocitos T citotóxicos cuando se reta intranasalmente con el hMPV a ratones Balb/c. | Melendi y col., 2007. |
| G1F/M2 (G VSR: 125-225) (F Sarampión: 113-131) (M2-1 VSR: 81-95) | Induce producción de anticuerpos neutralizantes, proliferación de células T y balance en respuesta inmune Th1/Th2. | Zeng y col., 2005; Fan y col., 2005. |



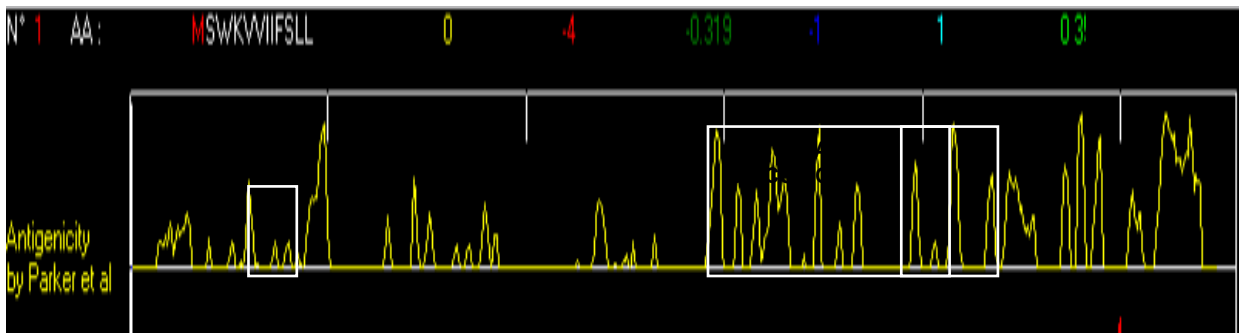
Con el fin de obtener epítomos más grandes se utilizó el software Antheprot (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr>); este programa ayuda a predecir las regiones de hidrofiliidad las cuales resultan ser las más expuestas en su estructura proteica, (Fig.18).

Por último se utilizó el software (SYFPEITHI) que toma en consideración los aminoácidos que se unen o anclan al complejo principal de histocompatibilidad clase I, o bien los que son posiciones auxiliares del ancla así como otros aminoácidos frecuentes y cuenta con una base de datos de epítomos publicados (ligandos naturales). En el caso de los epítomos seleccionados de las proteínas del hMPV, se buscó la predicción de epítomos para los alelos H2D^b (de ratón) (Tabla 10) y HLA-A*0201 (de humano) (Tabla 11). Las Tablas 10 y 11 muestran la secuencia de la proteína analizada y la puntuación obtenida para cada una de ellas; esta puntuación es un valor numérico que resulta de la contribución independiente de cada aminoácido en el péptido a la unión a la molécula clase I.

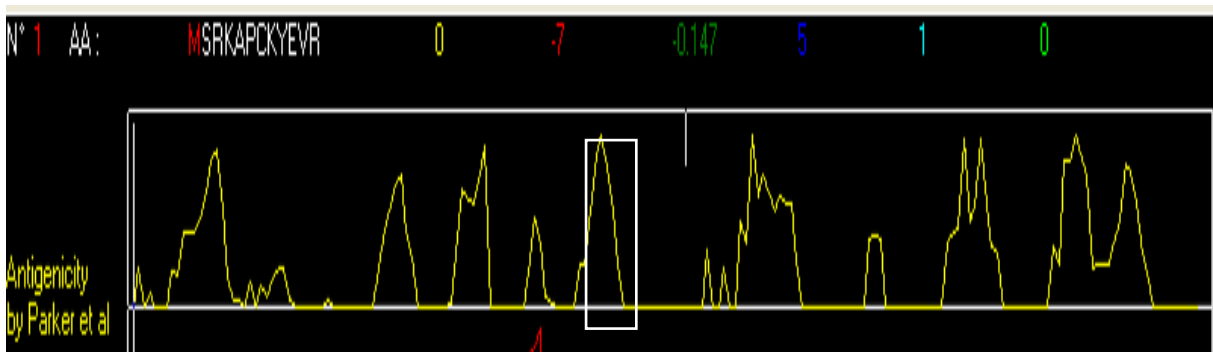
Finalmente se utilizaron linkers o espaciadores ricos en prolina GPGPG (Livingston y col., 2002) que proporcionan flexibilidad a la construcción y exponen los epítomos y facilitan la respuesta de los linfocitos T cooperadores (Th).

Una vez estructurados los genes sintéticos (Fig.19), la secuencia en aminoácidos se mandó sintetizar a la compañía GenScript que optimizó dicha secuencia para la expresión en lechuga (*Lactuca sativa*) y tabaco.

a



b



c

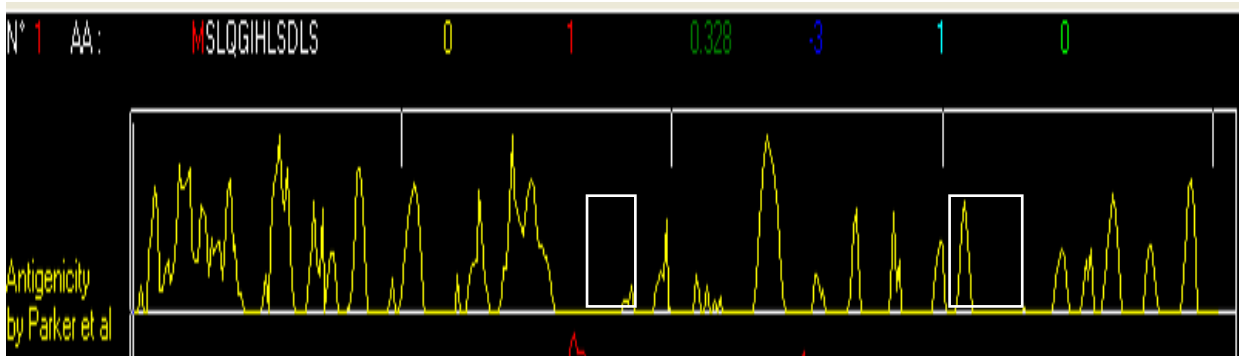


Figura 18. Análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas del hMPV en el software AntheProt. a) Proteína F; b) Proteína M2-1; c) Proteína N; cada pico representa antigenicidad; en recuadros se muestran las secuencias que se eligieron. Algunos picos aunque pequeños, se eligieron por ser regiones importantes y ser reconocidas por MHC.

Tabla 10. Predicción de epítomos de las proteínas del hMPV por SYFPEITHI para el alelo HLA-A*0201. Aminoácidos en negritas son principalmente reconocidos por el MHC y aminoácidos subrayados son secundarios en la unión del MHC.

| EPÍTOPO | AA | SECUENCIA EN AA | POSICIÓN | SECUENCIA | PUNTUACIÓN |
|-------------|---------|--|----------|---------------------------------|------------|
| F1 | 58-71 | NLTCSGPSLI KTEL | 1 | N L T C S <u>G</u> P S L | 22 |
| F2 | 286-328 | KAAPSCSGK KGN ^{Y} ACLLRE DQGWYCQNA GSTV ^{Y} YPNEK DCET | 8 | G K K G N <u>Y</u> A C L | 14 |
| | | | 16 | L L R E D <u>Q</u> G W Y | 14 |
| | | | 24 | Y C Q N A <u>G</u> S T V | 14 |
| F3 | 388-413 | CYKGVSCSIG SNRVGIIKQL NKGCSYIT | 8 | S I G S N <u>R</u> V G I | 21 |
| | | | 19 | Q L N K G <u>C</u> S Y I | 21 |
| M2-1 | 78-89 | MSKGYIDDN QSI | 4 | G Y I D D <u>N</u> Q S I | 14 |
| N1 | 164-172 | VGALIFTKL | 1 | V G A L I <u>F</u> T K L | 15 |
| N2 | 307-315 | LHLRQSPKAG LLSL | 6 | S P K A G <u>L</u> L S L | 20 |

Tabla 11. Predicción de epítomos de las proteínas del hMPV por SYFPEITHI para el alelo H2D^b. Aminoácidos en negritas son principalmente reconocidos por el MCH y aminoácidos subrayados son secundarios en la unión del MCH.

| EPÍTOPO | AA | SECUENCIA EN AA | POSICIÓN | SECUENCIA | PUNTUACIÓN |
|-------------|---------|--|----------|--|------------|
| F1 | 58-71 | NLTCSG PSLI KTEL | 6 | G P <u>S</u> <u>L</u> I <u>K</u> T <u>E</u> L | 14 |
| F2 | 286-328 | KAAPSCSGK KGN Y ACLLRE DQGW Y CQNA GSTV Y YPNE KDC E T | 8 | G <u>K</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> A C L | 19 |
| F3 | 388-413 | CYKGVSCSIG SNRVG I IKQL NKGCS Y IT | 8 | S I G S <u>N</u> R V G I | 24 |
| M2-1 | 78-89 | MSKGYIDD N QSI | 4 | G Y I D D <u>N</u> Q S I | 15 |
| N1 | 164-172 | V G ALIFT K L | 1 | V <u>G</u> A L I F T <u>K</u> L | 16 |
| N2 | 307-315 | LHLRQSP K A G L L S L | 6 | S P K A <u>G</u> L L S L | 14 |

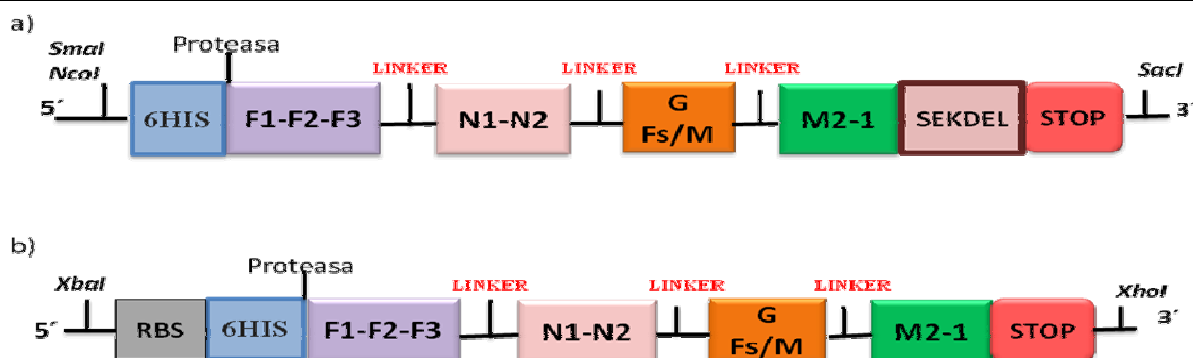


Figura 19. Estructura de los genes sintéticos usados para transformación de tabaco y lechuga. a) transformación nuclear y transitoria (hMPVn); b) transformación de

cloroplastos (hMPVc); 6His, etiqueta de histidinas; F1-F2-F3, epítomos del gen F; N1-N2, epítomos del gen N; G Fs/M, proteína de fusión; M2-1, epítomos del gen M2-1. RBS, sitio de unión al ribosoma; SEKDEL, señal de retención al retículo endoplásmico; STOP, codón de paro. Se muestran sitios de restricción.

5.3 Construcción módulo 3'-hMPVn y transformación transitoria de *N. tabacum* y *N. benthamiana*

Como se mencionó en los antecedentes (sección 2.5.3) la transformación transitoria (Magnifection) utiliza la estrategia de un virus desensamblado (módulos) y se basa en la amplificación transitoria de vectores virales liberados en múltiples partes de la planta por *Agrobacterium* (Marillonnet y col., 2004).

El vector para la transformación transitoria consta de 3 módulos:

1. El módulo 5' contiene la replicasa viral y señales que dirigen a la proteína hacia compartimentos de la célula vegetal, así como la ARN polimerasa dependiente de ARN y el promotor de actina 2 de *Arabidopsis*.
2. El módulo integrasa contiene el gen que codifica para la enzima integrasa que se encarga de ensamblar el módulo 5' con el 3', esto debido al hecho de que dichos módulos poseen sitios de recombinación attP y attB.
3. El módulo 3' contiene sitios de clonación para introducir el gen de interés y el terminador de la transcripción en plantas NOS.

Para la construcción del módulo 3'-hMPVn, el gen hMPVn se subclonó en el módulo 3' que se utiliza para la transformación transitoria (Fig. 20).



Figura 20. Representación esquemática del vector módulo 3'-hMPVn para la transformación transitoria donde se muestran los sitios de clonación para el gen

hMPVn. Se muestra el sitio donde se alinean los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen clonado. LB, borde izquierdo; RB, borde derecho; AttB, sitio de recombinación; Tnos, terminador de la nopalina sintetasa.

Se analizaron las clonas transformantes resistentes al agente de selección (ampicilina) por perfil de restricción con enzimas *Nco* I y *Sac* I (Fig. 21).

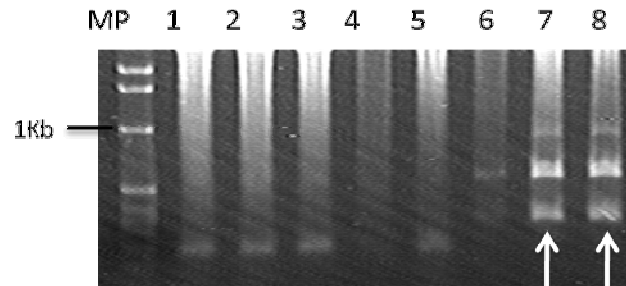


Figura 21. Perfil de restricción de las clonas positivas para la construcción del módulo 3'-hMPVn. Digestión con *Nco* I y *Sac* I; Las clonas 7 y 8 resultaron positivas con fragmentos esperados de 890, 563, 327 pb. MP: marcador de peso molecular 1kb.

Obtuvimos dos clonas positivas (7 y 8) con el perfil esperado de 3 bandas (debido a que la enzima *Sac* I corta dos veces en el gen y *Nco* I solo una vez; fragmentos esperados 890, 563, 327 pb). Las clonas 7 y 8 se analizaron por PCR con oligonucleótidos específicos que se diseñaron para amplificar el gen nuclear, ambas clonas resultaron tener el transgén clonado fragmento esperado 810 pb (Fig. 22).

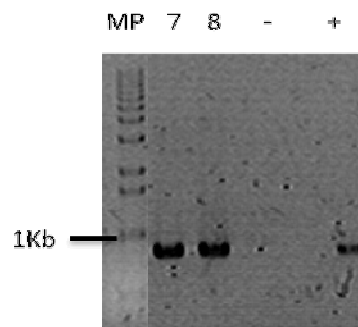


Figura 22. PCR de las clonas 7 y 8 con oligonucleótidos específicos para la transformación del gen nuclear. Se observa el fragmento esperado de 810 pb. MP: marcador de peso molecular 1 Kb. Controles (-) negativo, (+) positivo.

La construcción módulo 3'-hMPVn se usó para la transformación transitoria. El tejido molido se utilizó para extraer proteínas solubles totales y se cuantificaron por el método de Bradford y se realizó una curva estándar para determinar la cantidad de proteínas en los extractos vegetales. Las concentraciones obtenidas de PST fueron las siguientes: para el extracto transgénico de *N. tabacum* se obtuvo 8.99 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y para *N. benthamiana* 10.31 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La relación de PST de planta transformada respecto a planta no transformada es mayor en la especie *benthamiana* que en *tabacum*, lo que nos sugiere que para este tipo de transformación con este vector viral es más recomendable usar la especie *benthamiana*.

La presencia de la proteína recombinante en los extractos transgénicos se confirmó por un Dot blot en el que se utilizó un anticuerpo anti-etiqueta de histidina como anticuerpo primario debido a que la proteína recombinante posee en el extremo amino terminal una etiqueta de 6 histidinas (Fig. 23).

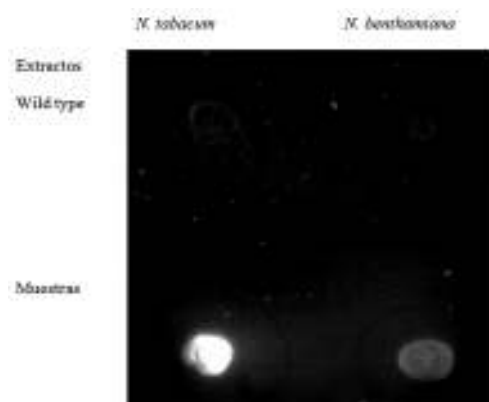


Figura 23. Dot blot de la proteína recombinante obtenida por Magniflection (construcción módulo 3'-hMPVn). Se muestran además los extractos de plantas silvestres (wild type), los cuales no dan señal.

5.4 Construcción pBI121-hMPVn para la transformación nuclear

Para la transformación nuclear se utilizó el vector binario pBI121 el cual posee el gen reportero GUS que puede ser eliminado con enzimas de restricción para insertar en su lugar el gen de interés; la expresión de dicho gen tiene lugar bajo el promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) y contiene un gen de resistencia a kanamicina para la selección de las células vegetales transformadas (Fig. 24).

Una vez liberado el cassette de GUS del vector pBI121 se subclonó el gen para la transformación nuclear (hMPVn) en este vector. La presencia del transgén se confirmó mediante perfil de restricción con enzimas *BamH* I y *EcoR* I, que liberó un fragmento de 1,150 pb (Fig. 25). Además se realizó PCR con oligonucleótidos que se alinean en el promotor 35SCaMV y en el terminador NOS, obteniendo un producto de 1,300 pb (Fig. 26). Finalmente se realizó PCR a las clonas 16 y 22 con oligonucleótidos específicos diseñados para que alineen y amplifiquen dentro del gen nuclear hMPVn dando un producto de 810 pb (Fig. 27). Se obtuvo así la construcción pBI121-hMPVn para la transformación nuclear de lechuga y tabaco.

La transformación nuclear de plantas consiste en la integración estable del transgén en el genoma nuclear de la planta. Para ello la construcción pBI121-hMPVn se transfirió a *A. tumefaciens* cepa LBA4404 por electroporación. Se transformaron cotiledones de lechuga y plántulas de 4 semanas de *N. tabacum* sin nicotina. El tejido se cultivó en medio MSJ con 100mg/ l de kanamicina y 500 mg/ l cefotaxima hasta la formación de callos para lechuga y para tabaco 200 mg/ l de kanamicina.



Figura 24. Representación esquemática del vector pBI121 para la transformación nuclear. Se muestra el sitio de clonación del gen hMPVn y el sitio donde se alinean los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen clonado. Esta construcción posee un gen de resistencia a kanamicina para la selección de las clonas transformantes.

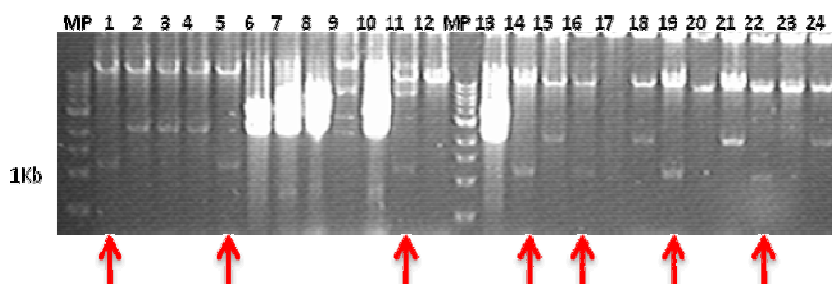


Figura 25. Análisis de restricción de las clonas pBI121-hMPVn con las enzimas *BamH* I y *EcoR* I. Se señalan con flechas rojas las clonas que muestran el fragmento esperado de 1,150 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb.

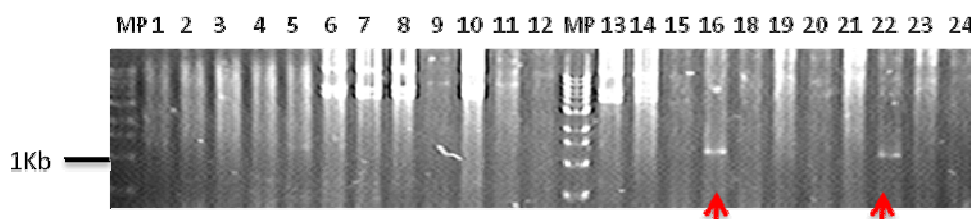


Figura 26. Análisis por PCR de las clonas pBI121-hMPVn. Se muestran con flechas rojas las clonas con el fragmento esperado de 1,300 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb.

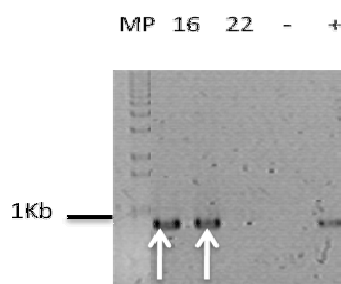


Figura 27. Análisis por PCR de las clonas 16 y 22 de la construcción pBI121-hMPVn. Se observa el fragmento esperado de 810 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb. Controles positivo (+) y negativo (-)

5.4.1 Transformación nuclear de lechuga

Se realizó la transformación nuclear de lechuga con el vector pBI121-hMPVn y se obtuvieron 25 líneas de la generación T1 que fueron analizadas por PCR (Fig. 28). Del análisis del PCR se determinó que solo 7 líneas eran transgénicas.

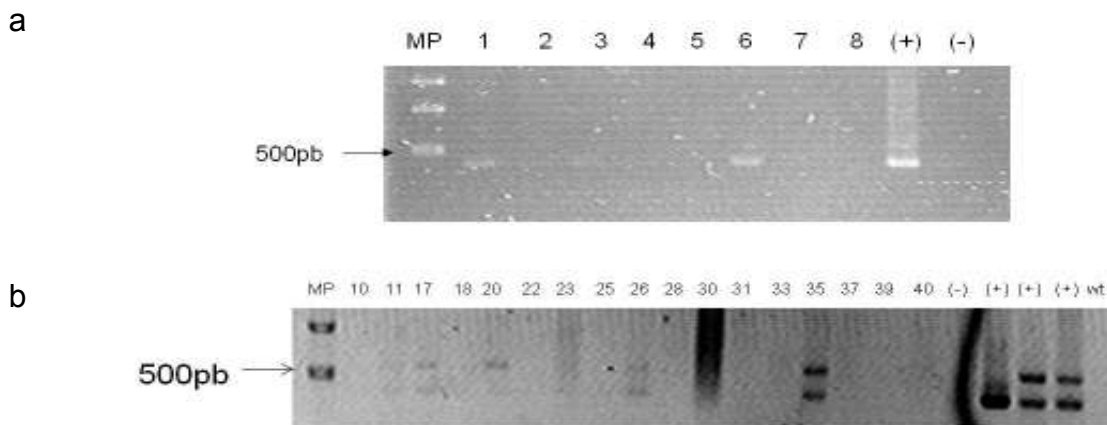


Figura 28. Análisis por PCR de las líneas de lechugas transgénicas generación T1 (pBI121-hMPVn). a) Análisis de PCR solo para el gen de resistencia a kanamicina. b) Análisis de PCR multiplex para el gen de interés y de resistencia. Fragmento esperado de 650 pb para el gen hMPVn y 500pb para el gen de resistencia a kanamicina. MP: Marcador de peso molecular 1kb. Controles positivo (+) y negativo (-)

Posteriormente se seleccionó al azar, la línea 6 y 35 para obtener la generación T2 de las lechugas transgénicas y de ellas se obtuvo ADN para realizar PCR con oligos que amplifican desde el promotor 35S y terminador NOS (Fig. 29).

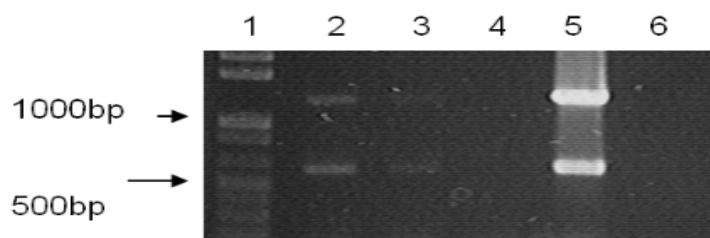


Figura 29. Análisis por PCR multiplex de las líneas de lechugas transgénicas generación T2 (pBI121-hMPVn). Productos obtenidos 1,200pb para el gen hMPVn y 500pb para el gen de resistencia a kanamicina. 1, marcador de peso molecular 1Kb; 2, línea L6; 3, línea L35; 4, wild type; 5, control positivo; 6, control negativo

5.4.1.1 Southern blot para lechuga transgénica

De estas líneas se escogió al azar la línea 6 para análisis del número de copias en el genoma de la planta por Southern blot (Fig. 30). El ADN genómico se digirió con la enzima *EcoRI* y se utilizó una sonda del gen hMPVpl (banda esperada 810pb). Se observaron dos bandas correspondientes a dos copias del gen utilizando una sonda para el gen de interés, se requiere realizar un Southern blot para el gen de resistencia para confirmar el análisis.

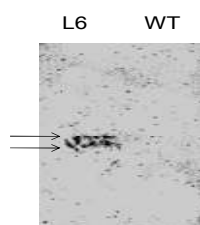


Figura 30. Southern blot de la línea 6 de lechuga transgénica (pBI121-hMPVn). Se utilizó una lechuga no transformada como control negativo.

5.4.1.2 SDS- PAGE y Western blot para lechugas transgénicas

Se recolectaron hojas frescas de lechuga transgénica línea 6 para la extracción de proteína soluble total y se cargaron en un gel desnaturizante de acrilamida al 16%, la proteína antigénica tiene un tamaño de 32kDa y fue visible en el gel como lo señala la Figura 31a. Además para identificar la proteína se utilizó un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas y se realizó un Western blot como se muestra en la Fig. 31b. La proteína transgénica se denominó MPVpl.

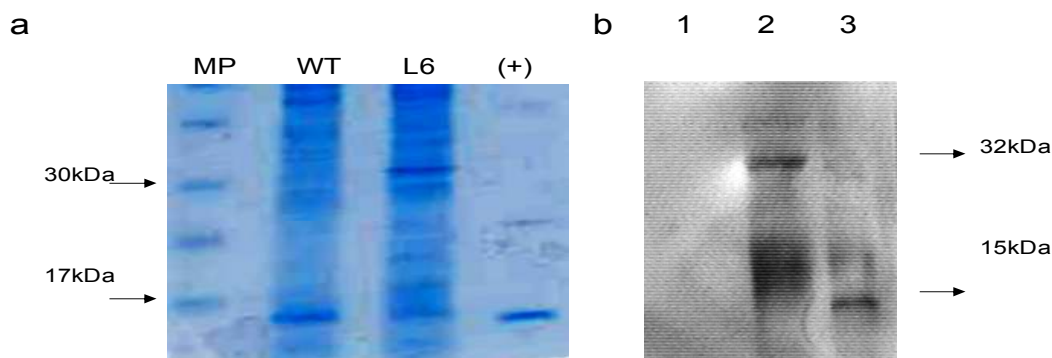


Figura 31. Detección de la proteína hMPVpl. a)SDS-PAGE de la línea 6 de lechuga transgénica nuclear (pBI121-hMPVn). La concentración de proteína por carril fue 15µg.b)Western blot para la línea 6 de lechuga nuclear, en el carril 1 control negativo



(proteína de lechuga wild type) y se muestra control positivo en el carril 3 (una proteína de 15kDa con etiqueta de histidinas). La proteína transgénica tiene un peso de 32kDa.

5.4.1.3 Ensayos en ratones con la proteína antigénica (hMPVpl)

Una vez caracterizada la proteína antigénica se obtuvo cantidad suficiente para preparar extractos de proteína soluble total con la cual se realizaron los experimentos en ratones. Previo al ensayo en ratones se realizó la cuantificación de la proteína recombinante expresada en las plantas de lechuga transgénica mediante un análisis de ELISA utilizando un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas de la proteína antigénica, dicho análisis reveló que las lechugas expresan 0.015% de la proteína recombinante.

El objetivo fue cuantificar la respuesta inmune por subtipos de anticuerpos después de la inmunización con la proteína antigénica. Se inmunizaron ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad por vía oral.

El protocolo utilizado para la administración oral se muestra en la Figura 32.

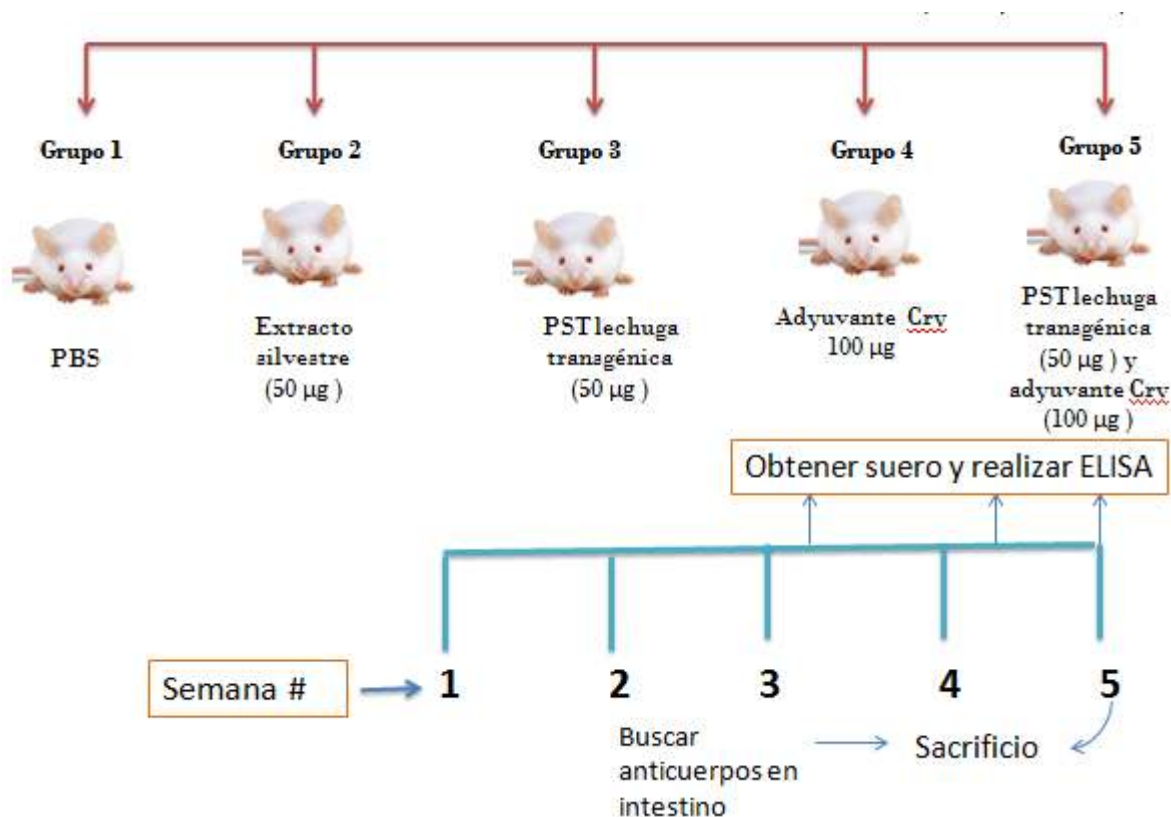


Figura 32. Esquema de inmunización de ratones Balb/c por vía oral.

La protóxina Cry usada como adyuvante en este ensayo tiene efecto auxiliar en la respuesta celular cuando es administrada junto con un antígeno de mucosas, ya que estimula la proliferación de células inmunocompetentes de una manera más eficiente que cuando se administra el antígeno por sí solo. Este efecto estimulante parece tener como célula blanco al monocito pues la estimulación con la protóxina Cry aumenta considerablemente la explosión oxidante, el estallido respiratorio es importante en la respuesta fagocítica la cual es potenciada además del aumento de la producción de anticuerpos IgA (Vázquez-Padrón y col., 1999; Rodríguez-Orozco 2006).

5.4.1.4 Determinación de anticuerpos IgG totales y subtipos de inmunoglobulinas: IgG1 e IgG2a en suero por ELISA

A partir del suero obtenido se realizó la sensibilización de las placas de ELISA para la determinación de anticuerpos totales IgG así como específicos IgG1 e IgG2a. La

presencia de estos subtipos de anticuerpos se cuantificó y se muestra en la gráfica (Fig. 33).

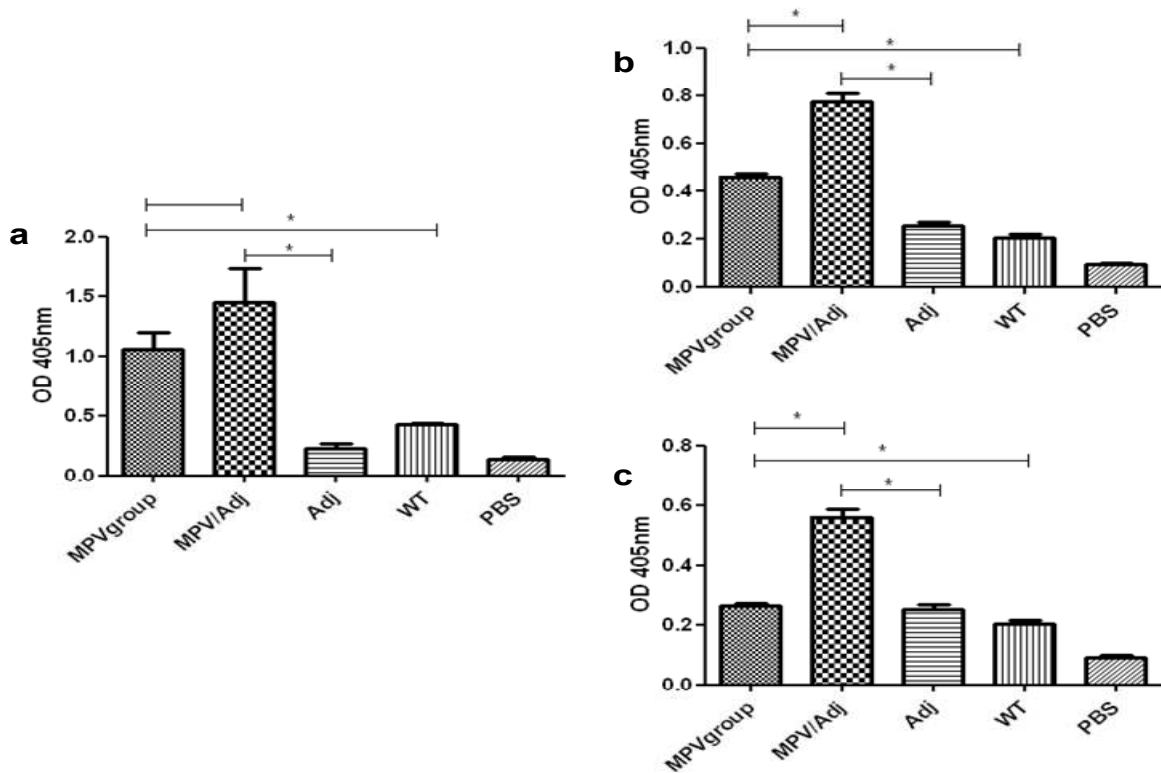


Figura 33. Cuantificación por ELISA de inmunoglobulinas producidas en ratón. a) IgG total, dilución 1:20;b) IgG1,dilución 1:20;c) IgG2a, dilución 1:20. $p < 0.05$

Al evaluar la producción de IgG total encontramos que no existe diferencia significativa entre el grupo MPV inmunizado con la proteína antigénica sin el adyuvante y el grupo MPV/Adj al cual se le administró la pro toxina Cry como adyuvante (Fig. 33a); pero sí encontramos diferencia significativa al comparar el grupo MPV contra el grupo WT al igual que el grupo MPV/Adj contra el grupo Adj. $p < 0.05$ (Fig. 33a).

Así mismo se encontró que la producción IgG1 versus IgG2a alcanzó mejores niveles medidos en densidad óptica (OD) para el subtipo IgG1 lo cual representa que la respuesta inducida tras la inmunización está polarizada hacia Th2, que es favorable pues este tipo de respuesta está relacionada con la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos (Fig. 33 b y c).

5.4.1.5 Determinación de anticuerpos IgA en lavados traqueo pulmonares e intestinales por ELISA

Los anticuerpos IgA actúan como la defensa inicial contra los patógenos invasores (virus y bacterias) antes de que penetren en el plasma; éstos identifican a los antígenos patógenos e impiden que se instalen en las mucosas. La presencia de este subtipo de anticuerpo se muestra en la Fig.34.

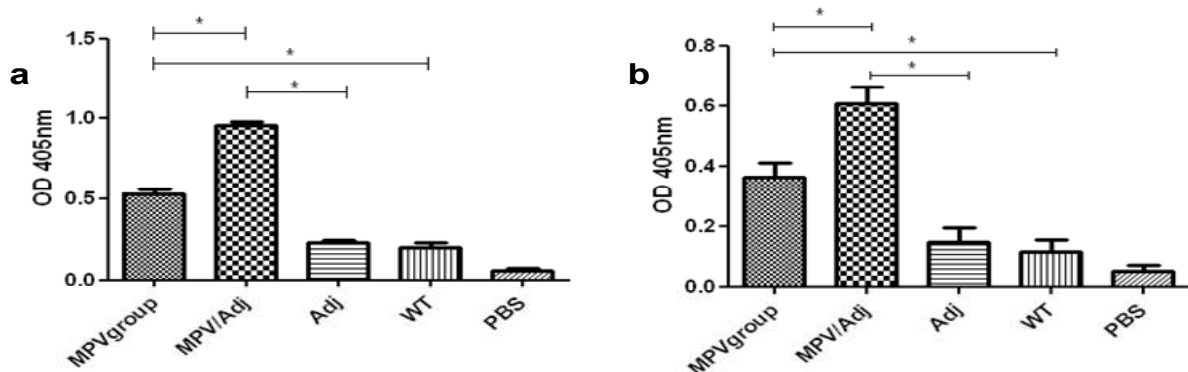


Figura 34. Cuantificación por ELISA de IgA de a) lavado traqueo pulmonar, dilución 1:20; b) intestinal, dilución 1:2. $p < 0.05$

En el caso del lavado traqueo pulmonar, se observó que la administración conjunta de la proteína antigénica con el adyuvante Cry mejora la producción de IgA; la OD se duplicó en comparación con el grupo al que solo se le administró la proteína antigénica MPV. Además se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos MPV y MPV/Adj con WT y Adj, respectivamente (Fig.34 a).

Para el lavado intestinal también se observó un incremento de IgA cuando se administró el adyuvante comparado con el grupo al cual solo se administró la proteína antigénica (Fig.34 b).

5.4.2 Transformación nuclear de tabaco sin nicotina

Vía *Agrobacterium tumefaciens* previamente transformada con pBI121-hMPVn se transformaron hojas de 4 semanas de edad de *Nicotiana tabacum* sin nicotina.

Una vez obtenidos los brotes en medio de selección con kanamicina se pasaron estos brotes a medio MSO con kanamicina para la formación de raíz (Fig. 35).



Figura 35. Generación T0 de tabaco transgénico nuclear *in vitro* y posterior pase a tierra para obtener semilla transgénica.

Posteriormente se pasaron a tierra y se obtuvo la generación T0, estas plantas se analizaron por PCR para amplificar el gen de resistencia kanamicina con oligos para NPTII (Fig. 36), y con oligos que amplifican desde el promotor 35S al transgén y terminan en el terminador NOS (Fig. 37).

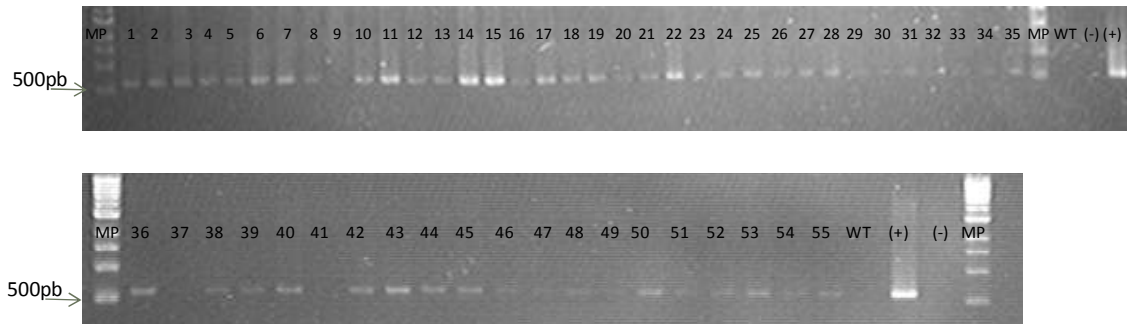


Figura 36. PCR de plantas transgénicas nucleares T0 con oligos para NPTII. Banda esperada de 500pb.

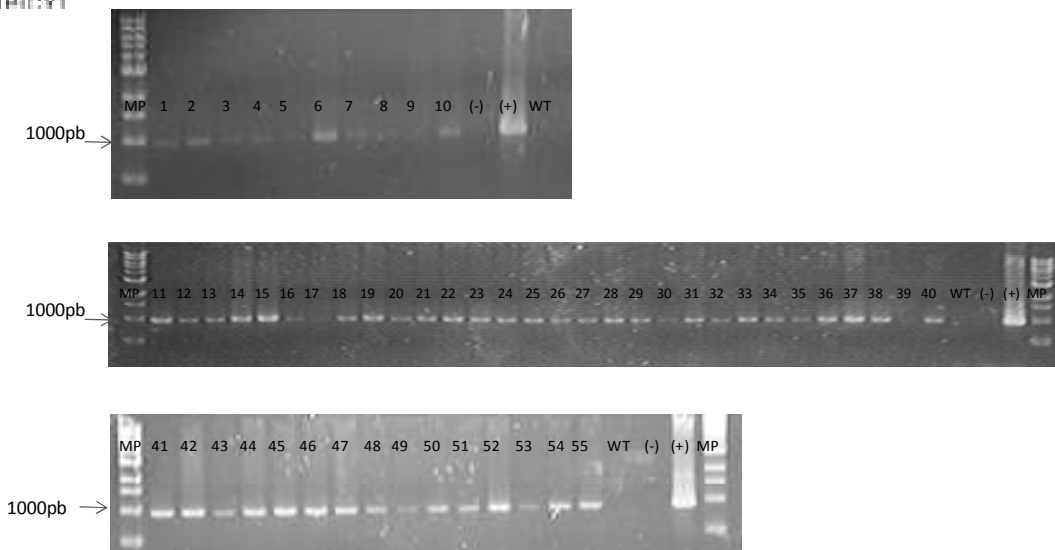


Figura 37. PCR de plantas transgénicas nucleares T0 con oligos para el promotor35S y el terminador NOS. Banda esperada de 1000pb.

Con estos análisis de PCR se eliminaron las líneas 8, 9, 17 y 39. Por lo que se obtuvieron 51 líneas transgénicas nucleares T0. A los dos meses se obtuvo la semilla y se germinó en medio con antibiótico y se seleccionaron solo las plántulas verdes para pasar a tierra obteniéndose así la generación T1. De la generación T1 se escogieron al azar solo 18 líneas para analizar por PCR utilizando en la misma reacción oligos para amplificar el gen de resistencia (tamaño esperado 500pb) y el gen nuclear (tamaño esperado 650pb) (Fig. 38).

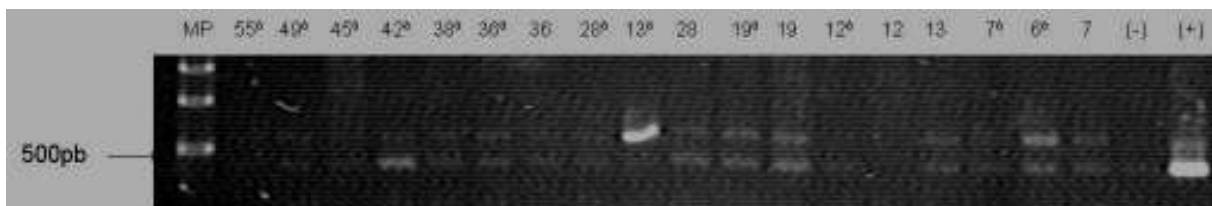


Figura 38. PCR de plantas transgénicas nucleares T1 con oligos para el gen de resistencia y para el transgén. Bandas esperadas de 500pb y 650pb respectivamente.

5.5 Construcción pBIC-hMPVc

Para obtener la construcción pBIC-hMPVc, el vector pBIC fue digerido con *Xba* I y *Xho* I; dichos sitios también flanquean el gen diseñado para la expresión en cloroplastos (hMPVc) (Fig. 39). El pBIC también posee un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las clonas transformantes de *E. coli*. El vector digerido se ligó al gen hMPVc y se analizaron las clonas resistentes por PCR con oligonucleótidos que amplifican el gen de cloroplastos (Fig. 40).

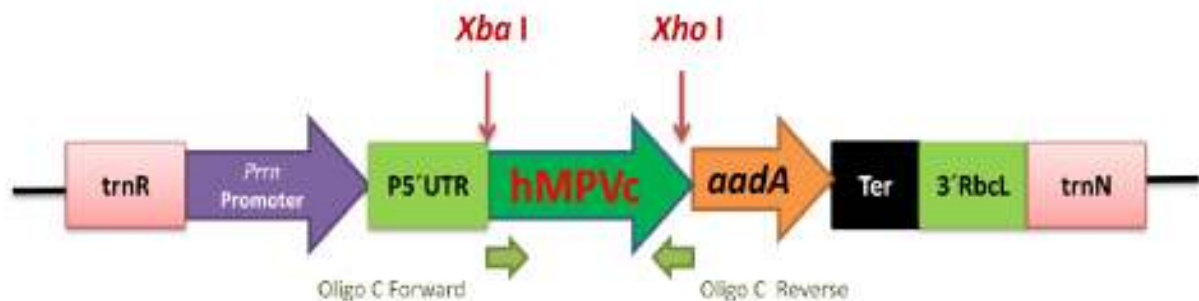


Figura 39. Representación esquemática del vector bicistrónico pBIC para la transformación de cloroplastos de tabaco. Se muestra donde se clonó el gen hMPVc y el sitio donde se alinean los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen clonado. Este vector posee un gen de resistencia a espectinomicina para la selección del tejido vegetal transformado.

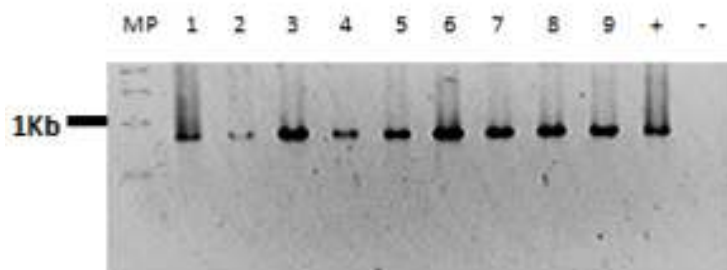


Figura 40. Análisis por PCR de las clonas pBIC-hMPVc. Se observa un fragmento esperado de 795 pb. MP: Marcador de peso molecular 1kb, Controles positivo (+) y negativo (-)

5.5.1 Transformación de cloroplastos de *N. tabacum* sin nicotina

Con el objetivo de obtener una mayor producción de proteína antigénica en planta se realizó también la transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística. Las líneas transplastómicas tras tres rondas de selección en medio con antibiótico se pasaron a tierra para obtener semilla (Fig. 41).



Figura 41. Tabacos transplastómicos T0 *in vitro* que se pasaron a tierra para obtener semilla.

La semilla se germinó en medio de selección con espectinomicina y se pasaron a tierra las plántulas verdes obteniéndose así la generación T1 (Fig.42).



Figura 42. Plántulas de tabaco transplastómicas generación T1, en medio de selección con 500mg/L de espectinomicina. Se muestran 3 líneas transplastómicas y la línea silvestre (abajo a la izquierda).

VI. CONCLUSIONES

Péptido HRA2pl

1. Es posible expresar el péptido HRA2pl contra hMPV en tabaco de manera transitoria.
2. El péptido HRA2pl puede inhibir la formación de sincicios cuando se utiliza en dilución 94.3 y 9.43 $\mu\text{g/ml}$ de PST.
3. Este péptido puede inhibir el proceso de unión del virus a la célula hospedera y en un menor grado la replicación o infección de novo, por lo que se recomendaría usarlo como un profiláctico.

Proteína antigénica hMPVpl

4. Las plantas de lechuga transgénica nuclear pueden expresar hasta un 0.015% de la proteína recombinante.
5. La proteína antigénica recombinante hMPVn es inmunogénica en ratones Balb/c vía oral, en los cuales induce predominantemente una respuesta humoral así como una mayor producción de anticuerpos IgG1 que IgG2a.
6. Es posible producir plantas de tabaco transgénicas y transplastómicas que contienen la proteína antigénica contra hMPV



VII. PERSPECTIVAS

Con base en el trabajo doctoral realizado se pueden enunciar algunas perspectivas relevantes:

Péptido HRA2pl

1. Evaluar *in vivo* actividad antiviral del péptido HRA2pl en la infección con hMPV en ratones.

Proteína antigénica hMPVpl

2. Evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos producidos en ratones tras la inmunización oral con la proteína antigénica en la línea celular HEp-2 o bien, evaluar *in vivo* la respuesta inmune de la proteína antigénica después del reto con el hMPV.

VIII. ANEXOS I: PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

8.1 Preparación de células calcio competentes de *E.coli*

A partir de un cultivo de *E. coli* Top 10 F' de 24 horas, crecido en medio LB líquido a 37 °C. Se tomaron de este preinóculo 500 µl y se añadieron a 50 mL de medio LB líquido, se incubó por 90 minutos a 37°C y agitación de 150 rpm. El cultivo se enfrió en baño de hielo y se centrifugó 7 minutos a 8,000 rpm, se descartó rápidamente el sobrenadante y se mantuvieron las bacterias en hielo todo el tiempo. La pastilla se lavó con 7.7 mL de una solución fría de cloruro de calcio 0.1 M y glicerol al 15%, y se volvió a centrifugar. Finalmente las células se resuspendieron en 1.27 ml de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 30 µl.

8.2 Transformación de *E. coli* por choque térmico

Se descongelaron las células calcio competentes sobre hielo y se añadió 3.0 µl del ADN a introducir en ellas, se mezcló y se incubaron en hielo por 15 minutos. Los tubos se llevaron a un baño de agua 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 medio LB sólido con 100 mg/l del antibiótico adecuado según fuera el caso.

8.3 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 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 µl de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50µl y se almacenaron a -80°C.

8.4 Extracción de ADN plasmídico (método de lisis alcalina)

Basado en el método de Sambrook y col., 1989. Se tomó 5 ml de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos, se eliminó parte del sobrenadante, se resuspendió la pastilla con vórtex y se añadió 200 µl de la solución I de Birnboim (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, Glucosa 10 mM), se mezcló en vortex y se agregaron 300 µl de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién preparada, se agitó por inversión 5 veces, se añadieron 400 µl 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 500 µl de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se agregó ARNsa 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 µl de agua milli "Q".

8.5 Manipulación enzimática del ADN

8.5.1 Digestión de clonas positivas con enzimas de restricción

Mediante la digestión con enzimas de restricción, se utilizaron aproximadamente 2 µg de ADN plasmídico, el buffer de reacción 10X sugerido por el fabricante, en un volumen de reacción de 20 µl, con 0.2 U de enzima de restricción. La mezcla de



reacción se dejó incubando durante 2 h a 37°C o a la temperatura sugerida por el fabricante.

8.5.2 Purificación de fragmentos de ADN

Se realizaron digestiones utilizando aproximadamente de 1 a 5 mg de ADN, con la enzima de restricción deseada en presencia del Buffer de reacción recomendado por la compañía y agua estéril en un volumen total de 50 µl de reacción. Se incubaron las digestiones a la temperatura adecuada por espacio de 4 horas o durante toda la noche según lo sugerido por el proveedor. Posteriormente el producto de la digestión fue separado en geles de agarosa del 1-2% dependiendo del tamaño de la banda de interés, fue cortada utilizando un bisturí limpio, la cual fue observada brevemente con intensidad baja de luz UV, finalmente se utilizó el QIAquick® Gel Extraction kit de Qiagen o bien el kit Promega y siguiendo las instrucciones del proveedor, se purificó el ADN.

8.5.3 Extremos romos

Se utilizó el fragmento Klenow de la Polimerasa de acuerdo a las especificaciones del fabricante: aproximadamente 800 ng de ADN con extremos cohesivos 5', se agregaron a 2 µl de Buffer 10X, 1 µl de dNTP's 10 mM, 1 µl de Klenow (2 U/µl) y agua desionizada estéril para 20 µl de volumen de reacción, y se incubó 20 min a 37 °C. Debido a que la enzima Klenow tienen actividad de endonucleasa para rellenar y exonucleasa para rasurar, también se usó para generar extremos romos al rasurar los extremos 3', lo cual se realizó de la misma forma que para rellenar, solo que no se usaron dNTP's para favorecer su actividad de exonucleasa.

8.5.4 Reacciones de ligación

Siguiendo las instrucciones del fabricante, usando un rango molar 1:1 o 5:1 inserto-vector. Se agregó T4 DNA ligasa comercial (Promega®) y se agregó el Buffer de reacción 10X, en un volumen total de 20 µl de reacción.



8.6 Preparación de soluciones

8.6.1 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

8.6.2 Agarosa 1%

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

8.6.3 Antibióticos

8.6.3.1 Kanamicina (Stock de 50 mg/mL)

Se disolvieron 5 g de sulfato de kanamicina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m) y se almacenó a -20 °C.

8.6.3.2 Carbenicilina (Stock de 50 mg/mL)

Se disolvieron 5 g de Carbenicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 mm) y se almacenó a -20 °C.

8.6.3.3 Ampicilina (Stock de 50 mg/mL)

Se disolvieron 5 g de ampicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 mm) y se almacenó a -20 °C.

8.6.3.4 Espectinomicina (Stock de 50 mg/mL)

Se disolvieron 5 g de dihidrocloruro de espectinomicina en agua desionizada. Se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 mm) y se almacenó a -20 °C.

8.6.4 Reguladores del crecimiento

8.6.4.1 Acido Naftalenacético (ANA; 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.



8.6.4.2 Benciladenina (BA; 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.

8.6.4.3 Cinetina (Cin; 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.

8.6.4.4 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 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.

8.6.5 Buffers

8.6.5.1 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.

8.6.5.2 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.

8.7 Preparación de medios de cultivo

8.7.1 Medios de cultivo para bacterias

8.7.1.1 Medio de cultivo YM

Para preparar 1 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.



8.7.1.2 Medio de cultivo LB

Para preparar un litro de medio LB se pesaron 10 g de cloruro de sodio, 5g de extracto de levadura y 10g de bacto triptona se disolvieron, se aforó con agua destilada y se esterilizó. Cuando fue necesario se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico.

8.7.2 Medios de cultivo para plantas

8.7.2.1 Estrategia general para la preparación

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

Cuando fue necesario, es añadió el antibiótico previamente esterilizado al medio después de esterilizar una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50°C.

8.7.2.2 Composición de medios de cultivo

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

8.7.2.3 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.

8.7.2.4 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.

8.7.2.5 Vitaminas B5

| Compuesto | Concentración (mg/l) | Concentración del Stock 1000 X (mg/ml) |
|------------------|----------------------|--|
| Myo Inositol | 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.

8.8 Proteínas

8.8.1 Extracción de proteínas de plantas

Se congelaron 100 mg de tejido vegetal utilizando nitrógeno líquido, se agregaron 500 µL de buffer de extracción de proteínas vegetales y se homogenizó la mezcla. El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1968). Se colocaron 10 µL de la solución problema en tubos de ensayo, se añadió 1 mL del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm. Se empleó albumina de suero de bovino como estándar (5-20 ng/µL).

8.8.2 Buffer de extracción de proteínas de plantas

PMSF 1mM



Cóctel de inhibidor de proteasas

8.8.3 Cuantificación de proteína soluble total (PST)

8.8.3.1 Soluciones Bradford

8.8.3.1.1 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.

8.8.3.1.2 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.

8.8.3.2 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 7.4 con ácido clorhídrico 1N/hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó a un litro con agua desionizada.

8.8.3.3 Análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida de las proteínas totales solubles

Las muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford y posteriormente se analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970). Los geles se prepararon en placas de vidrio empleando un equipo de electroforesis en placa vertical Bio- Rad modelo Mini-PROTEAN® 3 System. Se preparó el gel separador al 16% y el gel concentrador al 8%. Se analizaron alícuotas de 15-20 µl del material proteico extraído de plantas. Las muestras se corrieron en paralelo con estándares preteñidos de peso molecular conocido.

Preparación de las soluciones empleadas:

a).- Acrilamida-bisacrilamida (30%). Se pesaron 29.4 g de acrilamida y 0.6 g de bisacrilamida usando protección de vías respiratorias y colocándose en un vaso de



precipitado de 250 ml y se disolvieron en agitación constante. Una vez disueltos se aforó el volumen a 100 ml con agua desionizada.

b).- Tampón A. (separador). Se disolvieron 9.0855 g de Tris en 25 mL de agua desionizada. Posteriormente se añadieron 2 g de SDS y se ajustó a un pH de 8.8 con HCL (1:1), la solución se aforó a 50 mL con agua desionizada.

c).- Tampón B (concentrador). Se disolvieron 3.0285 g de Tris en 25 mL de agua desionizada. Se agregaron 2 g de SDS y se ajustó el pH a 6.8 con HCL (1:1), la solución se aforó a 50 ml con agua desionizada.

d).- Persulfato de amonio. Se pesaron 0.02 g de persulfato de amonio y se disolvieron en 50 μ l de agua desionizada, agitando en un vórtex (se prepara en el momento de su uso).

e).-Tampón de corrida (Buffer de corrida). Se añadieron 11.5307 g de glicina y 2.4228 g de Tris en un vaso de precipitado de 400 ml y se disolvieron con aproximadamente 300 mL de agua desionizada. Posteriormente se agregaron 2 ml de SDS al 20 %. La solución se aforó a 400 ml con agua desionizada.

f).- Solución solubilizadora. Se añadieron 5.7 g de SDS, 25 mg de azul de bromofenol, 25 ml de Tris 1M pH 8.0, 28.6 mL de glicerol y agua c.b.p. 100 ml. Al momento de utilizarse se adicionó 1 μ l de 2-mercaptoetanol por cada ml de tampón de muestra.

Para la preparación del gel separador al 14% y el gel concentrador al 6% se tomaron las siguientes cantidades:

| Gel separador 16% | | Gel concentrador 6% | |
|----------------------|------------|----------------------|---------------|
| Acrilamida | 5.36 ml | Acrilamida | 1.072 μ l |
| Tampón A | 3.75 ml | Tampón B | 1.6 μ l |
| Agua destilada | 0.81 ml | Agua destilada | 1.275 ml |
| Persulfato de amonio | 75 μ l | Persulfato de amonio | 48 μ l |
| Temed | 5 μ l | Temed | 5 μ l |

8.8.3.4 Condiciones de electroforesis

Las proteínas a analizarse se corrieron paralelamente con los estándares preteñidos de peso molecular conocido. La electroforesis se realizó a voltaje constante empleando para el gel concentrador una corriente eléctrica de 50 milivolts durante 30



min y para el gel separador 100 milivolts por 2.5 h, o hasta que la marca de azul de bromofenol estuvo a una distancia aproximada de 1-2 mm del extremo inferior de la placa.

8.8.3.5 Tinción de los geles con azul de Coomassie

Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante 1 h por inmersión en una solución de azul de Coomassie al 0.5% (p/v) en alcohol isopropílico al 25% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), con agitación suave a temperatura ambiente. La decoloración de los geles se realizó mediante cuatro pasos sucesivos de 2 h cada uno en una solución de alcohol isopropílico al 20% y ácido acético a 10% en agua destilada, a temperatura ambiente y con agitación suave. Los geles obtenidos previamente teñidos, fueron fotografiados y se analizó el patrón de bandas con el programa LabWorks®.

IX. ANEXOS II: ARTÍCULO PUBLICADO

Este artículo puede ser consultado con el siguiente doi: 10.1007/s00425-015-2277-5

Planta (2015) 242:69–76
DOI 10.1007/s00425-015-2277-5



ORIGINAL ARTICLE

HRA2pl peptide: a fusion inhibitor for human metapneumovirus produced in tobacco plants by transient transformation

Verónica A. Márquez-Escobar¹ · Rocío Tirado-Mendoza² · Daniel E. Noyola³ · Abel Gutiérrez-Ortega⁴ · Ángel G. Alpuche-Solís¹

Received: 10 January 2015 / Accepted: 11 March 2015 / Published online: 1 April 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Main conclusion The HRA2pl peptide expressed by transient transformation in *N. tabacum* plants is capable of inhibiting the binding of the human metapneumovirus to HEp-2 cells at the fusion stage.

Human metapneumovirus (hMPV) is an agent responsible for acute respiratory infections that mainly affects children under 3 years, the elderly and immunocompromised patients. In children younger than 5 years, respiratory tract infections account for 20 % of deaths worldwide. However, there is currently no treatment or vaccine available against hMPV. The production of a safe, efficient and low cost treatment against this virus is a current challenge. Plants provide a system for recombinant protein production that is cost effective and is easier to scale up to an industrial level than other platforms; in addition, the plant tissue

may be used as raw food, dried or, alternatively, proteins may be partially or fully purified and administered in aerosol or capsules as dry powder. In this study, we designed a gene expressing an antiviral peptide against hMPV based on the heptad repeat A domain of the F protein of the virus. We produced the recombinant peptide by a viral transient expression system (Magniflection[®]) in *Nicotiana tabacum* plants. The efficacy of this antiviral peptide was confirmed by in vitro assays in HEp-2 cell line. This is a promising result that can offer a prophylactic approach against hMPV.

Keywords Transient transformation · Antiviral peptide · hMPV · HRA domain

✉ Ángel G. Alpuche-Solís
alpuche@ipicyt.edu.mx

¹ División de Biología Molecular, IPICYT/Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa de San José 2055, 78216 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

² Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Delegación Coyoacán, Distrito Federal, Mexico

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Venustiano Carranza 2405, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78210, Mexico

⁴ Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, Mexico

X. REFERENCIAS

Abara S (2006) Metapneumovirus humano: Un nuevo agente en IRA alta y baja. *Neumol Pediatr* 1:11-13

Alvarez ML1, Cardineau GA (2010) Prevention of bubonic and pneumonic plague using plant-derived vaccines. *Biotechnol Adv* 1:184-96

Álvarez ML, Topal E, Martin F, Cardineau GA (2010) Higher accumulation of F1-V fusion recombinant protein in plants after induction of protein body formation. *Plant Mol Biol* 72:75–89

Berry M, Gamielien J, Fielding BC (2015) Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses* 3:996-1019

Bharaj P, Sullender W, Kabra S, Mani K, Cherian J, Tyagi V, Chahar HS, Kaushik S, Dar L, Broor S(2009) Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *J Virol* 6:89

Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang L, Lamirande EW, Tran KC, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ (2004) Recombinant human metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and / or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol* 23:12877-12887

Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ(2005) Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J Virol* 79:12608–12613

Birch-Machin I, Newell CA, Hibberd JM, Gray JC (2004) Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. *PlantBiotechnol J* 2:261–270



Bradford MM (1979) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Broor S, Bharaj P, Chahar HS (2008) Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen. *J Biosci* 33:483–493

Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G, Nester EW (1991) Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Methods Enzymol* 204:384-397

Cseke G, Wright DW, Tollefson SJ, Johnson JE, Crowe JE Jr, Williams JV (2007) Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *J Virol* 81:698–707

Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* 311:1001–1009

Daniell H, Ruiz G, Denes B, Sandberg L, Langridge W (2009) Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. *BMC Biotechnol* 9:1-33

Davoodi-Semiromi A, Samson N, Daniell H (2009) The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. *Hum Vaccin* 7: 488–493

Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nallapali S, Verma D, Singh ND, Banks RK, Chakrabarti D, Daniell H (2010) Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *PlantBiotechnol J* 8:223–242

Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, Boivin G (2008) Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicro Agents Chemother* 52:279-287



- Fan CH, Zeng RH, Sun CY, Mei XG, Wang YF, Liu Y (2005) Fusion of DsbA to the N-terminus of CTL chimeric epitope, F/M2:81-95, of respiratory syncytial virus prolongs protein- and virus-specific CTL responses in Balb/c mice. *Vaccine* 23:2869–2875
- Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G (2012) Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol* 53:97–105
- Govea-Alonso DO, Rubio-Infante N, García-Hernández AL, Varona-Santos JT, Korban SS, Moreno-Fierros L, Rosales-Mendoza S (2013) Immunogenic properties of a lettuce-derived C4(V3)6 multiepitopic HIV protein. *Planta* 238:785–792
- Herd KA, Mahalingam S, Mackay IM, Nissen M, Sloots TP, Tindle RW (2006) Cytotoxic T-Lymphocyte epitope vaccination protects against human metapneumovirus infection and disease in mice. *J Virol* 80:2034–2044
- Herfst S, Fouchier RA (2008) Vaccination approaches to combat human metapneumovirus lower respiratory tract infections. *J Clin Virol* 41: 49-52
- Kahn JS (2006) Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* 19:546–557
- Karg SR, Kallio PT (2009) The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnol Adv* 27:879–894
- Kwon KC, Verma D, Singh ND, Herzog R, Daniell H (2013) Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Adv Drug Deliv Rev* 65:782–799
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685



Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Y, Appella E, Sidney J, Sette A (2002) A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol* 168:5499–5506

Lössl AG, Waheed MT (2011) Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes. *Plant Biotechnol J* 9:527–539

Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2004) In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *PNAS* 101:6852-6857

Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*–mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 23:718-723

Martínez T, Cabrera P, Herrera E (2004) Las plantas transgénicas: una visión integral. *e-Gnosis* 2:1-28

Melendi GA, Zavala F, Buchholz UJ, Boivin G (2007) Mapping and characterization of the primary and anamnestic H-2d-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in mice against human metapneumovirus. *J Virol* 81: 11461–11467

Miller SA, Tollefson S, Crowe JE Jr, Williams JV, Wright DW (2007) Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region. *J Virol* 81:141–149

Noyola DE, Alpuche-Solís AG, Herrera-Díaz A, Soria-Guerra RE, Sánchez-Alvarado J, López-Revilla R (2005) Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics. *J Med Microbiol* 54: 969–974

Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Adv* 29:210–222



Pham QN, Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ (2005) Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian Metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. *J Virol* 79:15114-15122

Parker JMR, Guo D, 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. *Biochem* 25:5425-5432

Rodriguez-Orozco AR (2006) Efecto coadyuvante de la protoxina Cry1Ac en la inmunidad celular al administrarla con un buen agente patógeno de mucosas *Rev Alergia Mex* 4:125-129

Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solis AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martínez-González L, Herrera-Díaz A, Korban, SS (2009) Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J* 57:45–54

Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 4:725-738

Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H (2007) Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts—oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol J* 5:495–510

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory

Santi L, Giritch A, Roy CJ, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y, Webb R, Arntzen CJ, Mason HS (2005) Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis*



antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. PNAS 103:861-866

Santi L, Huang Z, Mason H (2006) Virus like particles production in green plants. NIH40:66-76

Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E, McAuliffe JM, Elkins WR, St Claire M, Collins PL, Murphy BR (2004) The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. J Virol 78:6927-6937

Tang RS, Schickli JH, MacPhail M, Fernandes F, Bicha L, Spaete J, Fouchier RA, Osterhaus AD, Spaete R, Haller AA (2003) Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. J Virol 20:10819-10828

Tang RS, Mahmood K, Macphail M, Guzzetta JM, Haller AA, Liu H, Kaur J, Lawlor HA, Stillman EA, Schickli JH, Fouchier RA, Osterhaus AD, Spaete RR (2005) A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. Vaccine 14:1657-1667

Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S (2010) Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. Biotechnol Adv 28:214-221

Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Barnes AS, Wilson S, Kiener PA, Suzich JA, McCarthy MP (2008) Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus. J Gen Virol 89: 3113-3118

van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med 7:719-724



Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de la Riva GA, López-Revilla R (1999) Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sciences* 64:1897-1912

Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA (2003) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin *in vitro*. *Antiviral Res* 60: 51–59

Wyde PR, Moylett EH, Chetty EH, Jewell AM, Bowlin TL, Piedra PA (2004) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Res* 63: 51–59

Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ (2011) Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol Adv* 30:1171-1184

Yim KC, Cragin RP, Boukhvalova MS, Blanco JC, Hamlin ME, Boivin G, Porter DD, Prince GA (2007) Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged. *Vaccine* 25:5034-5040

Zeng RH, Gong W, Fan CF, Wang YF, Mei XG (2005) 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