



IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Respuesta de inmunoglobulinas en ratones Balb/c inmunizados
con una proteína recombinante de tabaco, que contiene epítopos
relevantes de *Bordetella pertussis*”.**

Tesis que presenta

Karla Sánchez Álvarez

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., junio de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Respuesta de inmunoglobulinas en ratones Balb/c inmunizados con una proteína recombinante de tabaco, que contiene epítomos relevantes de *Bordetella pertussis***” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karla Sánchez Álvarez** y aprobada el **27 de mayo de 2021** 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

Dr. Rubén López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Miembro del Comité Tutorial

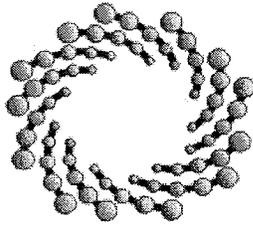
Dra. Leticia Moreno Fierros
Miembro del Comité Tutorial



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. 223337) y el apoyo del proyecto CONACYT 56980.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 123 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de junio del año 2021, se reunió a las 12:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Sinodal	IPICYT

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karla Sánchez Alvarez

sobre la Tesis intitulada:

Respuesta de inmunoglobulinas en ratones Balb/c inmunizados con una proteína recombinante de tabaco, que contiene epítomos relevantes de Bordetella pertussis

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

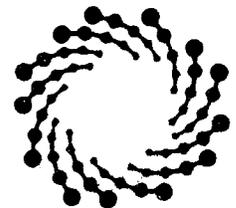
APROBARLA

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

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes de junio de 2021.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Dedicatorias

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

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

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

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

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

En memoria de mi padre, Antonio Sánchez Silva.

Agradecimientos

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

Al Dr. Sergio Rosales Mendoza por todas sus enseñanzas, consejos, apoyo, y también por la amistad brindada.

Al Dr. Rubén López Revilla y a la Dra. Leticia Moreno Fierros por aceptar fungir como ms sinodales, por todos sus consejos y aportaciones para mejorar mi trabajo.

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

A mi hermana y mi cuñado, porque siempre están conmigo, por darme su apoyo y cariño.

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

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

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

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

ÍNDICE

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen de grado	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tos ferina	3
1.2 Mecanismos de patogénesis	5
1.3 Tos ferina, una enfermedad reemergente	7
1.4 Vacunas contra la tos ferina de células completas	9
1.5 Vacunas acelulares contra la tos ferina	10
1.6 Inmunidad a la tos ferina	12
1.7 Plantas transgénicas para la producción de nuevas vacunas	13
1.7.1 Expresión transitoria de proteínas usando vectores virales desarmados	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 Metodología	22
4.1.1 Diseño de las construcciones genéticas	22
4.1.2 Propagación de las construcciones genéticas	24
4.1.2.1 Construcción para la transformación transitoria Clonación del gen BPsnMOD en el vector pBI121	25
4.1.2.2 Construcción para la transformación nuclear Clonación del gen BPsnM3' en el vector pICH11599	25
4.1.3 Transformación genética de plantas	26

4.1.3.1	Transformación nuclear vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
4.1.3.2	Obtención de hojas de tabaco	26
4.1.3.3	Ensayos de transformación genética nuclear vía <i>A. tumefaciens</i>	26
4.1.3.4	Expresión transitoria de BPs _n M3' con la metodología de "Magniffection" en <i>Nicotiana tabacum</i>	27
4.2	Análisis de transformantes	28
4.2.1	Extracción de ADN	28
4.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
4.2.3	Extracción de proteína soluble total	29
4.2.3.1	Análisis de SDS-PAGE de los extractos proteicos de los tabacos infiltrados	30
4.2.3.2	Dot blot	30
4.3	Purificación de proteína recombinante de tejido liofilizado por la técnica de Magniffection (proteína PTF-M3')	30
4.3.1	Cuantificación de la proteína PTF-M3' purificada	31
4.3.2	Western blot de la proteína PTF-M3' purificada	32
4.4	Purificación de la proteína PTF de <i>E. coli</i>	32
4.5	Ensayos preliminares de inmunización	33
4.5.1	Inmunización oral de ratones Balb/c	33
4.5.2	Obtención de las muestras	34
4.5.2.1	Determinación de los niveles de anticuerpos	34
5.	RESULTADOS	36
5.1	Diseño de genes sintéticos	37
5.1.2	Construcción para transformación nuclear	38
5.1.3	Clonación del gen BPs _n M3' en el vector pICH11599	40
5.2	Purificación de la proteína PTF de <i>E. coli</i>	40
5.3	Transformación genética de plantas	43
5.3.1	Transformación nuclear de tabaco vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
5.3.2	Expresión transitoria de GFP con la metodología de "Magniffection" en <i>Nicotiana tabacum</i>	43
5.4	Dot blot	45
5.5	Western blot	46

5.6 Purificación de proteína recombinante de tejido liofilizado producido por la técnica de Magniffection (proteína M3')	48
5.6.1 Ensayos de inmunogenicidad por vía oral en ratones Balb/c de la proteína M3' purificada	48
5.7 Determinación de los niveles de anticuerpos séricos	49
5.8 Determinación de los niveles de anticuerpos en lavados traqueo pulmonares	50
5.9 La respuesta de IgA e IgG a la proteína purificada PTF-M3' fue más evidente en los lavados gastrointestinales	51
5.10 Determinación de los isotipos IgG1 e IgG2a	52
6. DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES	57
8. REFERENCIAS	58
9. ANEXO I	67
10. ANEXO II	68

Lista de tablas

Tabla 1	Mecanismos de virulencia de <i>B. pertussis</i>	6
Tabla 2	Preocupaciones de seguridad identificadas a partir de ensayos clínicos y estudios post-licencia de vacunas DTP, DTaP y Tdap	11
Tabla 3	Ejemplos recientes de vacunas orales derivadas de plantas contra enfermedades infecciosas humanas	14
Tabla 4	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del transgén BPs _n	28
Tabla 5	Protocolo de PCR empleado para el escrutinio de líneas candidatas	28
Tabla 6	Composición de los buffers utilizados para la extracción de la proteína soluble total de las hojas agroinfiltradas liofilizadas	46

Lista de figuras

Figura 1	Tasa de incidencia de tos ferina por grupo de edad reportado al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades entre 1990 y 2014	4
Figura 2	Casos probables y confirmados, tasa de incidencia por 100,000 derechohabientes adscritos a médico familiar de tos ferina en todos los grupos de edades. IMSS, 1992-2011	9
Figura 3	Mecanismo de inmunidad de <i>B. pertussis</i> inducido por la vacunación y por la infección	13
Figura 4	Esquema para el proceso de la administración oral de vacunas derivadas de plantas	17
Figura 5	Representación esquemática de la tecnología de expresión transitoria llamada "Magniffection"	19
Figura 6	Representación esquemática de la construcción pBIBPsnMOD	23
Figura 7	Gen BPs _n y vectores usados para la transformación transitoria	24
Figura 8	Transformación nuclear de hojas de tabaco sin nicotina con <i>A. tumefaciens</i> con la construcción BPs _n MOD-pBI121	27
Figura 9	Esquema de inmunización de ratones Balb/c.	34
Figura 10	Análisis de PCR y digestión de muestras de ADN para verificar la construcción PBI121BPs _n MOD	39
Figura 11	Análisis de los productos de amplificación por PCR de las clonas con la construcción pICH-BPs _n M3' con oligonucleótidos que se alinean dentro del gen sintético	40
Figura 12	Producción y detección de la proteína PTF purificada de <i>E. coli</i>	41
Figura 13	Análisis de Western blot para la detección de la proteína PTF en <i>E. coli</i>	42
Figura 14	Presencia de la proteína PTF recombinante purificada	42

Figura 15	Transformación de hojas de tabaco con baja cantidad de nicotina	43
Figura 16	Transformación transitoria de <i>N. tabacum</i> con el gen reportero (GFP)	44
Figura 17	SDS-PAGE de extractos de proteína soluble total de tabacos infiltrados 7 días post-infección	45
Figura 18	Dot blot de extractos de proteína total soluble de plantas transformadas con la construcción pICHBPsnM3', utilizando 2 buffers diferentes	46
Figura 19	Western blot de extractos de proteína soluble total de plantas agroinfiltradas 7 días postinfección	47
Figura 20	Cuantificación de la proteína PTF-M3' de planta por ELISA	47
Figura 21	Análisis de las eluciones de la proteína PTF-M3' purificada en resina de níquel	48
Figura 22	Experimento de inmunización con ratones Balb/c	49
Figura 23	Respuestas séricas de anticuerpos contra la proteína PTF	50
Figura 24	Respuesta de anticuerpos en pulmones	51
Figura 25	Respuesta de anticuerpos en lavados gastrointestinales	52
Figura 26	Respuesta de isotipos IgG1 e IgG2a en suero	53

RESUMEN

Respuesta de inmunoglobulinas en ratones Balb/c inmunizados con una proteína recombinante de tabaco, que contiene epítomos relevantes de *Bordetella pertussis*.

Bordetella pertussis causa tos ferina o pertussis, enfermedad que no ha sido erradicada y es reemergente a pesar de la disponibilidad y aplicación masiva de Boostrix®, vacuna acelular que contiene dos regiones de la subunidad S1 de la toxina pertúsica, una región de la hemaglutinina y una región de pertactina. En 2008, la Organización Mundial de Salud estimó 16 millones de nuevos casos de tos ferina y el 95% ocurrieron en países en desarrollo con 195,000 defunciones en niños. Nosotros pretendemos mejorar la vacuna contra la tos ferina y reducir sus costos de producción mediante la obtención de plantas y bacterias que expresen proteínas heterólogas que contienen los epítomos de pertactina, toxina pertúsica, y hemaglutinina filamentosa de *B. pertussis* y probando su inmunogenicidad después de la administración oral de ratones. Primero diseñamos un gen sintético que codifica una proteína multiepítomos con una etiqueta de histidina que clonamos en un vector para transformación transitoria por infiltración de plantas de tabaco con bajo contenido de nicotina; también clonamos el gen sintético optimizado para el uso de codones en un vector de expresión en *Escherichia coli*. Purificamos las proteínas recombinantes de células de *E. coli* (PTF) y de hojas de tabaco (PTF-M3') por afinidad a níquel con un rendimiento de 0.740 mg de proteína recombinante por g de peso seco. Las proteínas recombinantes purificadas fueron administradas por vía oral a ratones Balb/c; usamos Boostrix® como control positivo y el vehículo (PBS) como control negativo. Obtuvimos una mayor respuesta de anticuerpos tanto en mucosas como a nivel sistémico en ratones que recibieron PTF y PTF-M3' que la vacuna Boostrix® o el PBS. Estos resultados prueban el concepto de que la administración oral de la proteína recombinante multiepítomos expresada en plantas induce una respuesta de inmunoglobulinas mayor que una vacuna comercial y constituyen una vacuna comestible potencial.

Palabras clave: Tos ferina, nueva plataforma para vacunas, vacunas comestibles.

ABSTRACT

Response of immunoglobulins in Balb/c mice immunized with a recombinant protein of tobacco that harbors relevant epitopes from *Bordetella pertussis*.

Bordetella pertussis causes whooping cough or pertussis, disease that has not been eradicated and is reemerging despite the availability and massive application for decades of Boostrix®, an acellular vaccine that harbors two regions of S1 subunit of the pertussis toxin, one region of filamentous hemagglutinin and one region of pertactin. In 2008, the World Health Organization estimated 16 million new cases of whooping cough and 95% occurred in developing countries with 195,000 children's deaths. We attempt to improve the vaccine against whooping cough and reduce its production costs by obtaining plants and bacteria expressing a heterologous protein, harboring epitopes of pertactin, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin from *B. pertussis* and assessing its immunogenicity after oral administration to mice. First, we designed a synthetic gene that encodes a multiepitope protein with a histidine tag that was cloned into a vector for transient transformation by infiltration of tobacco plants with low amounts of nicotine; the codon bias-optimized construct was also cloned into an *Escherichia coli* expression vector. Recombinant proteins from *E. coli* cells (PTF) and tobacco leaves (PTF-M3') were purified by nickel affinity with a yield of 0.740 mg of recombinant protein per g dry weight. Purified recombinant proteins were administered orally to groups of Balb/c mice using the Boostrix® vaccine and vehicle (PBS) as a positive and negative controls, respectively. A higher mucosal and systemic antibody responses were obtained in mice receiving the PTF and PTF-M3' proteins than Boostrix® or PBS. These findings prove the concept that oral administration of multiepitope recombinant proteins expressed in plants may be a potential edible vaccine.

Keywords: Whooping cough, new vaccine platform, edible vaccine.

1. INTRODUCCIÓN

La población actual mundial ha alcanzado los 7.3 millardos y se espera que supere a los 9 millardos para el 2050 (Population Reference Bureau, 2015). La mayor parte de este incremento ocurrirá en países en desarrollo, particularmente en países con ingresos bajos. Entre estos países, el mayor crecimiento será en África, donde se espera que la población se duplique de 1.1 a 2.3 millardos (Population Reference Bureau, 2015). Debido a este aumento de la población, se espera que la gente de los países en desarrollo sea más seriamente afectada en comparación con los países industrialmente desarrollados en cuanto a recursos, pobreza y enfermedades. En los países en desarrollo, los factores principalmente responsables del incremento de enfermedades y mortalidad incluyen la pobreza, baja sanidad, falta de servicios de salud adecuados y la falta de recursos para adquirir medicinas costosas. Aproximadamente 1.3 millardos de personas, que constituyen un tercio de la población en desarrollo, tienen ingresos menores a 1 dólar en los países en desarrollo, lo que hace difícil contar con recursos para el cuidado de la salud. Adicionalmente, la guerra, el terrorismo, así como la inestabilidad social y económica llevan al desplazamiento masivo de gente en distintas partes del mundo, lo que no solamente hace a estas personas vulnerables a enfermedades infecciosas, sino que también puede causar la propagación de enfermedades a otras áreas. A pesar de que muchas enfermedades se han controlado en la mayor parte del mundo, la reaparición de algunas enfermedades como la polio, aún representa una amenaza. Hay muchos obstáculos para controlar las enfermedades contagiosas en los países en desarrollo. Entre estos se encuentran los altos precios de medicinas y fármacos, la resistencia de los microorganismos a las medicinas y la falta de desarrollo de nuevos medicamentos. Existen muchas enfermedades como rabia, influenza, cólera y algunos nuevos desafíos como el Ébola, que pueden causar alto índice de mortalidad y morbilidad localmente (Waheed et al., 2016).

Las enfermedades infecciosas hoy en día son una de las principales causas de mortalidad infantil en muchos países en desarrollo sobre todo por la falta de vacunas

de bajo costo y accesibles, así como otras proteínas terapéuticas incluyendo anticuerpos monoclonales (mAbs), los cuales son fáciles de adquirir en países desarrollados, lo cual ha sido señalado por la plataforma de la iniciativa para vacunas para niños, establecida en 1992 mediante una asamblea de grupos filantrópicos en conjunto con la Organización Mundial de la Salud. Esta iniciativa pretende desarrollar vacunas orales accesibles que sean seguras, económicas, eficaces, estables a temperaturas ambiente y fáciles de trasladar a áreas remotas (Hefferon, 2013).

El uso de las vacunas existentes es una manera efectiva de prevenir la ocurrencia de estas enfermedades. Con el desarrollo de la biotecnología, las vacunas de microorganismos inactivados o atenuados han migrado a vacunas acelulares, pero estos productos son difíciles de comercializar por sus altos costos de producción (Guan et al., 2013).

Las vacunas son generalmente producidas en órganos o células animales con el riesgo inherente de contaminación a algún patógeno animal. Los avances recientes en el campo de la inmunología molecular y la biotecnología han creado oportunidades para el uso de vacunas recombinantes y anticuerpos monoclonales (mAbs) en la prevención y control de enfermedades infecciosas o cáncer (Ko et al., 2009). La ingeniería genética vegetal puede ahora ser aplicada de forma rápida para producir proteínas biofarmacéuticas recombinantes a escala industrial. Las ventajas de los sistemas de expresión vegetal incluyen capacidad de producción a gran escala, ausencia de contaminación patógena animal, y bajo costo de producción de biomasa, en comparación con los mamíferos, además que las proteínas recombinantes producidas presentan modificaciones postraduccionales similares a las de mamífero que las hacen biológicamente activas (Koprowsky, 2005; Ko, 2014). Recientemente, el interés industrial en los productos de producción vegetal ha incrementado (Paul et al., 2015). Uno de los productos terapéuticos de origen vegetal, la enzima glucocerebrosidasa ha sido sintetizada y comercializada por Protalix (<http://www.protalix.com/gluocerebrosidase.html>). Medicago ha iniciado la segunda fase de pruebas clínicas para una vacuna de origen vegetal cuadrivalente contra la influenza

(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02236052?term=plantbased+vaccine&rank=2>; Ward et al., 2020). La empresa estadounidense Mapp Biopharmaceutical, Inc y varios grupos de investigación: LeafBio en San Diego (empresaria filial comercializadora de Mapp Biopharmaceutical); Defyrus Inc. de Toronto; el gobierno de Estados Unidos y la Agencia de Salud Pública de Canadá, desarrollaron un suero inmunológico, el cual es la combinación de tres anticuerpos monoclonales para el tratamiento del Ébola, y lo tratará de comercializar Kentucky BioProcessing.

Las plantas se están convirtiendo gradualmente en una plataforma atractiva para la producción de fármacos y muchas compañías se están interesando en estos sistemas por sus bajos costos incluso en países en vías de desarrollo (Waheed et al., 2016; Rosales-Mendoza et al., 2021).

1.1 TOS FERINA

La tos ferina es una infección respiratoria severa causada por la bacteria *Bordetella pertussis*, y en 2008, la tos ferina fue asociada con un estimado de 16 millones de casos y 195,000 muertes a nivel mundial. En los últimos 5 años se han reportado brotes considerables de tos ferina y la reaparición de la enfermedad ha sido el foco de atención internacional para desarrollar un entendimiento más profundo de la virulencia y evolución genética de las cepas de *B. pertussis* y la generación de vacunas de larga duración. Durante los últimos 20 años, la comunidad científica ha reconocido tos ferina entre adultos, infantes y niños. El incremento en el reconocimiento de que los niños mayores y adolescentes están en riesgo de contraer y transmitir *B. pertussis* a hermanos menores ha subrayado la necesidad de comprender mejor el papel de la inmunidad innata, humoral y mediada por células, incluyendo el papel de la inmunidad decreciente. A pesar de que el diagnóstico de la tos ferina en adultos con base en sintomatología ha mejorado la comprensión de la patogénesis de *B. pertussis*, la tos ferina en recién nacidos y adultos puede manifestarse con síntomas clínicos atípicos complicando su diagnóstico y llevando a retrasos en el tratamiento (Kilgore et al., 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la vacunación global actualmente previene 687,000 muertes anuales por tos ferina (Fig. 1).

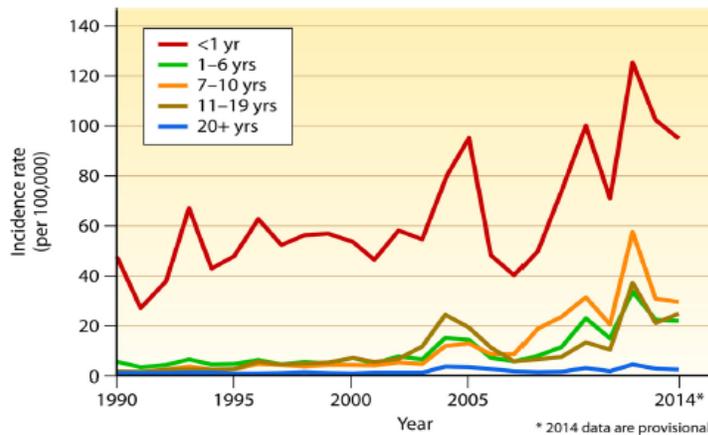


Figura 1. Tasa de incidencia de tos ferina por grupo de edad reportado al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades entre 1990 y 2014. (Adaptado de CDC National Notifiable Disease Surveillance System and Supplemental Pertussis Surveillance System) [<http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>].)

La tos ferina es claramente una enfermedad prevenible con vacunación y la cobertura de la vacuna ha incrementado en décadas recientes, entonces, ¿por qué vemos un resurgimiento de tos ferina en muchos países desarrollados?, una explicación puede ser el cambio realizado en la mayoría de los países desarrollados a mediados de los 1990's de vacunas de células completas (Pw) a vacunas acelulares (Pa). Cuando las Pw fueron introducidas en los 1940's redujeron significativamente la incidencia de tos ferina, en niños, adolescentes, y adultos, sin embargo, los efectos secundarios asociados con el uso de Pw, incluyendo una alta incidencia de fiebre y casos aislados de convulsiones, motivaron el desarrollo de Pa. La Pa había mejorado sustancialmente los perfiles de seguridad y para finales de los 1990's la mayoría de los países desarrollados reemplazaron Pw con Pa, a pesar de que muchos países en desarrollo continuaban usando Pw. El número de casos de tos ferina continuó decayendo tras la introducción de Pa. Sin embargo, a pesar de la alta cobertura de vacunas, mejores programas de salud, y publicidad extenuante de los productores de vacunas, la incidencia en tos ferina está ahora aumentando en muchos países, con incrementos dramáticos en el número de casos de infantes, pero también en proporción significativa de casos en niños mayores y

adultos. Patrones cíclicos recientes de tos ferina que brotan cada 2 a 5 años, reflejan los ciclos anteriores de vacunación, indicando que la circulación de *B. pertussis* en la población no ha sido interrumpida por los programas de vacunación. En el décimo Simposio Internacional de Bordetella (Dublín, Irlanda, septiembre 2014), el resurgimiento de la tos ferina fue un punto muy importante de discusión, con la mayoría de los participantes de academia, profesionales de la salud y la industria acordando que había un problema y que se necesita reevaluar la Pa y las estrategias de vacunación contra *B. pertussis*. Una explicación para el incremento de la incidencia de la tos ferina en las vacunaciones es que cepas circulantes de *B. pertussis* han experimentado variación en los antígenos incluidos en la vacuna. La presión de la selección inmune por la vacunación o mutaciones aleatorias en epítomos clave de los antígenos de la vacuna pudieran permitir que *B. pertussis* escape a la inmunidad protectora inducida por Pa. De hecho, existe evidencia que sugiere que diversas cepas antigénicas de *B. pertussis* han emergido en la década pasada con mutaciones en la toxina pertúsica (TP) y pertactina (PRN) causando enfermedad en huéspedes previamente vacunados o inmunes. Aunque la variación de antígeno puede permitir el desarrollo de tos ferina en individuos vacunados, no hay evidencia directa de que eso haya causado una falla completa de la vacuna. (Kingston et al., 2014).

1.2 Mecanismos de patogénesis

B. pertussis es transmitida por vía aérea e infecta el epitelio ciliado de las vías respiratorias. No hay más diseminación de la infección, sin embargo, las toxinas bacterianas producidas en el tracto respiratorio contribuyen a la patogénesis de la enfermedad local y sistémica (Melvin et al., 2014; Carbonetti, 2015; Masin et al., 2015). La tos ferina típica se caracteriza por tos paroxística severa que puede persistir por semanas después del inicio de la enfermedad. Sin embargo, la causa específica de la severidad y longevidad de la tos ferina es desconocida. La tos ferina en infantes puede ser más seria, con problemas respiratorios complicados incluyendo apnea y neumonía, así como leucocitosis marcada e hipertensión pulmonar (Rocha et al., 2015). Usualmente se requiere de hospitalización y

tratamiento de cuidados intensivos y un buen número de muertes por tos ferina ocurren en este sector de edad (Berger et al., 2013; Winter et al., 2015). A pesar de bastantes décadas de investigación, existen aún dudas en cuanto al entendimiento total del papel y la actividad de los factores de virulencia de *B. pertussis* y de la patogénesis de la tos ferina, especialmente la enfermedad severa en infantes, sin embargo, hay reportes que manifiestan el papel y la actividad de los factores de virulencia severa en *B. pertussis*, como se describe en la Tabla 1.

TABLA 1. FACTORES DE VIRULENCIA DE *B. pertussis*.

Factor de virulencia	Estructura	Localización	Acción, función y papel en la inmunidad
Toxina pertúsica (PT)	Compuesta por 2 subunidades (94 kDa): Exotoxina tipo AB ₅ , la subunidad catalítica A y la subunidad B (S2-S5), tiene actividad de ADP ribosilasa	Periplasma	La producción de la PT funcional es única de <i>B. pertussis</i> , la subunidad S1 tiene la actividad de ADP-ribosiltransferasa (ribosilación de proteínas G); las subunidades S2 a S5 se unen a los receptores de la célula blanco, induce la linfocitosis y la secreción de insulina y modifica la respuesta de las células T; es un componente de las vacunas acelulares.
Toxina adenilato ciclasa (AC)	Dos dominios funcionales C- y N- terminal (25 y 18 kDa respectivamente); activada por calmodulina y genera AMPc	Extracitoplásmica	Se une a las células blanco por medio del dominio C-terminal; convierte el ATP en AMPc por medio del dominio N-terminal; hemólisis enzimáticamente activa; inhibe la activación y migración de fagocitos; bloquea la inducción de óxido nítrico bactericida en macrófagos; suprime el efecto citotóxico de neutrófilos, monocitos, y células natural killer; suprime la activación y quimiotaxis de células T; la infección natural y la vacunación con DTP inducen anticuerpos contra la AC
Toxina dermonecrótica (DNT)	Toxina termolábil; toxina bacteriana típica tipo A-B	Citoplasma	Su papel en la patogénesis no es claro; induce vasoconstricción en primates; induce necrosis celular <i>in vitro</i> .
Hemaglutinina filamentosa (FHA)	Proteína en forma de horquilla asociada a la superficie y secretada (220 kDa); tiene un dominio de unión a heparina; FHA y la proteína transportadora de hemaglutinina filamentosa (FhaC) funcionan como miembros prototipos de la vía de secreción	Pared celular	Media la adhesión inicial de <i>B. pertussis</i> al epitelio ciliado del tracto respiratorio alto; es esencial para la progresión de la infección del tracto respiratorio alto y bajo; promueve la fagocitosis de <i>B. pertussis</i> por macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares; induce la liberación de IL-6 e IL-10; suprime la producción de IL-12 por los macrófagos y células dendríticas.

Fimbria (pili tipo I)	Los productos de <i>fim</i> tipo 2 y 3 representan el serotipo específico AGG; las cepas <i>fim</i> son susceptibles a cambios y polimorfismos; el antígeno FimD es común en todas las cepas	Proyecciones de la superficie	Fim 2 y 3 son componentes importantes para la colonización de la mucosa del tracto respiratorio bajo; involucradas en la adherencia e inhiben la respuesta inicial inflamatoria a la infección; AGG está presente en todas las vacunas de células completas; los antígenos FIM pueden estar presentes en mínimas cantidades en las vacunas acelulares
Pertactina (PRN)	La proteína autotransportadora media la unión de células eucariotas a través del motivo Arg-Gly-Asp	Superficie	Resisten el aclaramiento mediado por neutrófilos; contribuye a la adherencia de <i>B. pertussis</i> a al epitelio ciliado del tracto respiratorio en conejos; PRN2 y PRN3 son los tipos de cepa circulante más comunes; el antígeno PRN1 está presente en la mayoría de las vacunas acelulares; la variación antigénica de PRN en las vacunas está implicada en el escape de inmunidad
Factor de colonización traqueal	Proteína autotransportadora (60 kDa)	Superficie	Colonización traqueal
Lipopolisacárido	Endotoxina	Superficie	Induce fiebre después de la administración de la vacuna de células completas; tiene propiedades antigénicas y adyuvantes pero no protectoras; no es un componente de las vacunas acelulares

Adaptado de Kilgore et al. (2016).

1.3 Tos ferina, una enfermedad reemergente

En la era prevacunación, la tos ferina era considerada una enfermedad endémica con picos epidémicos cada 2 a 5 años. En EUA se estimó que la incidencia de la enfermedad era en promedio de 157 casos por 100,000 habitantes y ocurría casi exclusivamente en niños no vacunados. La introducción de la vacuna triple de células completas (décadas de 1940 y 1950) fue altamente efectiva, y para los años setenta la tasa de reporte de la infección disminuyó cerca de 150 veces y se mantuvo entre 0.5 y 1 caso por 100,000 habitantes (Forsyth, 2007). Entre 1982 y 2002 se observó un incremento lineal en la tasa de reporte de *pertussis* que llegó hasta 3.1 casos por 100,000 habitantes. Esta tasa aumentó notablemente hasta 8.8 casos por 100,000 habitantes en 2004 (Aoyama et al., 1992; Miller et al., 2000).

Se estima que cada año se presentan entre 20 y 50 millones de casos de *B. pertussis* en el mundo con aproximadamente 20,000 a 40,000 muertes al año, de

las cuales 90% ocurre en países en desarrollo, la mayoría en lactantes de edad muy temprana para haber sido vacunados o tener un esquema completo de vacunación. La inmunidad después de la vacunación tiene una duración limitada. Con la vacuna triple de células completas y la vacuna Pa pediátrica, la inmunidad empieza a disminuir después de 3 a 5 años, y no existe protección demostrable de los 10 a los 12 años. Con la vacuna Pa no se ha determinado aún la duración de la protección, pero los valores de anticuerpos post-vacunación sugieren que la protección dura entre 5 y 10 años (Halperin, 2007). Reportes recientes sugieren que la inmunidad posterior a la infección natural por *B. pertussis* no es mayor que la que se obtiene por inmunización. En estudios llevados a cabo en Canadá y RU, donde se evaluaron grupos de niños menores de 16 años con tos prolongada (≥ 14 días), se encontró tos ferina en 35% de los adolescentes y que entre 60 y 80% habían sido inmunizados en la infancia.

Debido a esto, México emitió su aviso epidemiológico de tos ferina en julio de 2012, donde se destacó el comportamiento de los casos de tos ferina entre 2000 a 2011, el cual muestra un patrón oscilatorio similar al observado en otros países, con exacerbaciones cada tres a cinco años, la última de ellas en 2009 con 579 casos de tos ferina notificados. Para 2010 se presentó un descenso, pero en 2011 se registraron 455 casos, lo que refleja un ascenso del 19 % con respecto al año anterior. Sin embargo, dicho hallazgo está condicionado a la implementación del diagnóstico mediante reacción de cadena polimerasa (PCR) que el método tradicional. Lamentablemente el 85 % de los casos ocurrieron en lactantes menores de un año de edad. En el IMSS, durante el periodo estudiado, la tos ferina ha presentado ciclos epidémicos cada tres a cinco años, la mayor incidencia se registró en 1997 y 2009 (Fig. 2); en este último año se presentó un brote en el norte del país, desde la semana 48 de 2008 a la semana 22 del 2009, en el cual se involucraron las delegaciones de Nuevo León, Sonora, Tamaulipas y Jalisco, las cuales concentraron el 79.8 % de los casos. Así mismo se registraron ocho defunciones en Tamaulipas, Sonora, y Nuevo León (Expert group on vaccinations for pertussis, 2011).

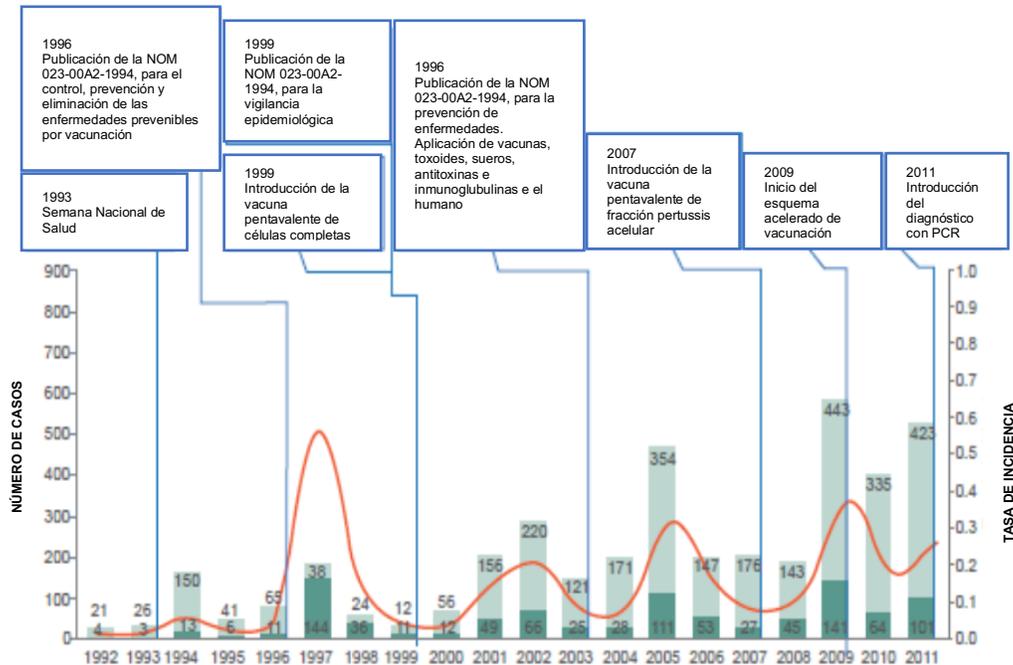


Figura 2. Casos probables y confirmados, tasa de incidencia por 100,000 derechohabientes adscritos a médico familiar de tos ferina en todos los grupos de edades. IMSS, 1992-2011 (Pérez-Pérez et al., 2015).

1.4 Vacunas contra la tos ferina de células completas

Las primeras vacunas basadas en organismos enteros y muertos de *B. pertussis* fueron probados en niños de Túnez y en Dinamarca (Howson et al., 1991). Para el año 1930, estas vacunas de células completas contra la tos ferina (Pw) fueron producidas y utilizadas en muchos países y combinadas con las vacunas de tétanos y difteria durante los años 40's y 50's.

Estas vacunas combinadas Pw siguen siendo hoy en día las fórmulas más utilizadas para proteger a los niños simultáneamente contra la difteria, el tétanos y la tos ferina. Hay poca diferencia en los procesos de producción de las vacunas Pw. Todas contienen bacterias enteras de *B. pertussis* que han sido inactivadas por calor, tratamiento con formaldehído u otros procedimientos químicos. Las vacunas Pw han sido administradas a millones de niños alrededor del mundo y han prevenido cientos de miles de muertes. Sin embargo, efectos adversos dieron resultado a una confianza decreciente en las vacunas Pw durante los 1970's y 1980's. Las reacciones adversas más comúnmente observadas son dolor local, enrojecimiento e inflamación leve a moderada, así como efectos sistémicos transitorios, como

fiebre, somnolencia, irritabilidad y anorexia. Estas reacciones adversas fueron experimentadas por aproximadamente el 50% de los niños vacunados, y su incidencia se incrementa con las dosis subsecuentes (Waruiru y Appelton, 2004). Una estrategia para reducir la reactogenicidad ha sido la remoción de los lipopolisacáridos presentes en la vacuna ha sido recientemente desarrollada en Brasil y se encuentra actualmente bajo evaluación clínica (Zorzeto et al., 2009).

1.5 Vacunas acelulares contra la tos ferina

Las controversias alrededor de la vacuna de células completas (Pw) han resultado en esfuerzos de búsqueda para desarrollar nuevas vacunas más seguras contra la tos ferina, intentando separar los antígenos protectores de los componentes tóxicos de los extractos de *B. pertussis*. La estrategia de descubrimiento de antígenos se basaba en encontrar que en las pruebas del Consejo Médico Británico, la eficacia parecía relacionarse con la potencia en un modelo roedor desarrollado por Kendrick en 1947. Este test de potencia fue entonces utilizado para identificar antígenos protectores. Después de las preparaciones iniciales de los extractos crudos, los cuales mostraban potencia en el test de Kendrick, así como eficacia en pruebas clínicas, se desarrollaron procedimientos para purificar antígenos individuales los cuales son ahora parte de las vacunas a celulares de segunda generación contra la tos ferina. Las primeras vacunas Pa fueron desarrolladas por Sao y col. en 1984 y consistían en antígenos purificados de *B. pertussis*, esencialmente toxina pertúsica (TP) y hemaglutinina filamentosa (FHA). Las vacunas Pa subsecuentes se derivaron de antígenos individuales purificados, agrupados en la composición final de 1-5 antígenos. Todas las vacunas Pa actualmente comercializadas contienen al menos formas desintoxicadas de TP, la mayoría de ellas contienen adicionalmente FHA, y muchas otras contienen pertactina y a veces fimbrias (Storsaeter, 2007).

Las cantidades de antígenos individuales por dosis pueden variar entre vacunas (Tabla 2). Pruebas clínicas han demostrado que las vacunas Pa tienen un mejor perfil de seguridad que las vacunas Pw y son eficaces. Sin embargo, el nivel de eficacia de las vacunas Pa se correlaciona con el número de antígenos protectores presentes en la fórmula. Basado en la eficacia similar y en el incremento de la

seguridad respecto a las vacunas Pw, las vacunas Pa progresivamente reemplazaron a las anteriores en muchos países. Aunque la superioridad de las vacunas Pa sobre las Pw con respecto a la reactogenicidad es indiscutible, administrar repetidamente las vacunas Pa puede en ocasiones causar reacciones locales, incluyendo hinchazón de todo el miembro. Por ello, las vacunas con contenido reducido de antígenos fueron desarrolladas y se utilizan ahora como refuerzos para adolescentes y adultos (Grimpel et al., 2005).

Tabla 2. Preocupaciones de seguridad identificadas a partir de ensayos clínicos y estudios post-licencia de vacunas DTP, DTaP y Tdap

Vacuna	Efectos adversos	Precauciones	Contraindicaciones
DTP	<p>Moderados: Fiebre, fatiga, dolor de cabeza, mareos, irritabilidad, anorexia, reacción cutánea local en el sitio de la inyección</p> <p>Moderados a severos: Reacción de Arthus, hinchazón severa de la extremidad, fiebre $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$, convulsiones febriles, llanto inconsolable en lactantes/niños por más de 3 h, episodios hipotónicos hipoactivos</p>	<p>El episodio hipotónico hiporreactivo ocurrió dentro de la vacunación; antecedentes de fiebre $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ dentro de las primeras 48 h después de haber recibido la vacuna</p> <p>Antecedentes de reacción de Arthus después de recibir una vacuna que contiene toxoide tetánico; síndrome de Guillain-Barré <6 semanas después de recibir una vacuna que contiene toxoide tetánico; llanto persistente en lactantes/niños durante más de 3 h después de recibir la vacuna; enfermedad aguda moderada a grave; convulsiones ≤ 3 días después de recibir la vacuna</p>	<p>Reacción anafiláctica previa a la vacuna o a sus componentes; la encefalopatía ocurrió dentro de los 7 días después de la vacunación y no se identificó ninguna otra causa.</p>
DTaP	<p>Reacciones cutáneas locales (dolor, hinchazón en todo el miembro, enrojecimiento, calor), fiebre, irritabilidad</p>	<p>El episodio hipotónico hiporreactivo ocurrió dentro de las 48 hrs después de la vacunación; antecedentes de fiebre $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ dentro de las primeras 48 h después de haber recibido la vacuna; síndrome de Guillain-Barré <6 semanas después de recibir una vacuna que contiene toxoide tetánico; llanto persistente en lactantes/niños durante más de 3 h después de recibir la vacuna; enfermedad aguda moderada a grave; convulsiones ≤ 3 días después de recibir la vacuna</p>	<p>Reacción anafiláctica previa a la vacuna o a sus componentes; la ecefalopatía ocurrió dentro de los 7 días después de la vacunación y no se identificó ninguna otra causa</p>
Tdap	<p>Reacción cutánea local (dolor, hinchazón, enrojecimiento) en el lugar de la inyección</p>	<p>síndrome de Guillain-Barré <6 semanas después de recibir una vacuna que contiene toxoide tetánico</p>	<p>Antecedentes de reacciones de artrosis después de recibir una vacuna que contiene toxoide tetánico; enfermedad aguda moderada a grave, con o sin fiebre</p>

Adaptado de Grimpel et al., (2005).

1.6 Inmunidad a la tos ferina

La inmunidad a la tos ferina, adquirida ya sea por infección natural o a través de la vacuna no es para toda la vida. Se ha estimado que la infección natural de la tos ferina rinde de 3.5 a 30 años de protección: la protección estimada obtenida de la vacuna contra la tos ferina de células enteras es de 5 a 14 años, y la de la vacuna acelular es de 4 a 7 años. Como resultado de la inmunidad decreciente con el tiempo, los adolescentes y adultos son susceptibles a una infección con *B. pertussis*. La severidad de su enfermedad parece estar fuertemente relacionada con el tiempo desde la última vacunación o la más reciente enfermedad por *B. pertussis*. A nivel mundial, se ha observado que muchos pacientes adolescentes y adultos con tos ferina confirmada y con historial de vacunación contra esta enfermedad, han tenido tos ferina durante la infancia, o en la infancia y la adolescencia. Estudios inmunológicos de los últimos 15 a 20 años sugiere que la inmunidad celular tiene un rol fundamental en la respuesta inmune para todas las vacunas que contienen pertussis (de células completas y acelulares). En particular, el receptor tipo Toll 4 (TLR4) en conjunto con las células CD4+, células T helper-1 (Th-1) e interleucina-17 (IL-17) producidas por células T helper-17 (Th-17), parecen jugar un rol central en el medio de protección inmune después de la vacuna con células completas, mientras que las células Th-1 solas median la respuesta de protección inmune después de la recuperación de una infección por *B. pertussis*. En infantes, las vacunas convencionales de células completas contra la tos ferina provocaron un nivel más alto de proliferación de linfocitos T CD3 que la vacuna de células completas de bajo contenido en lipopolisacáridos. Otras moléculas que juegan un rol en la protección contra la tos ferina incluyen el $INF\gamma$, que parece proteger contra la diseminación sistémica, la IL-12, que induce células Th-1, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que aumenta la fagocitosis por macrófagos de *B. pertussis*. Por el contrario, las vacunas acelulares de pertussis parecen inducir una respuesta inmunitaria celular predominantemente con Th-2 CD4+. Sin embargo, en otros estudios, también se observó una respuesta Th-1 o Th-1/ Th-2 mixta después de la vacunación con Pa de tres componentes (Kingsgton et al., 2014) (Fig. 3).

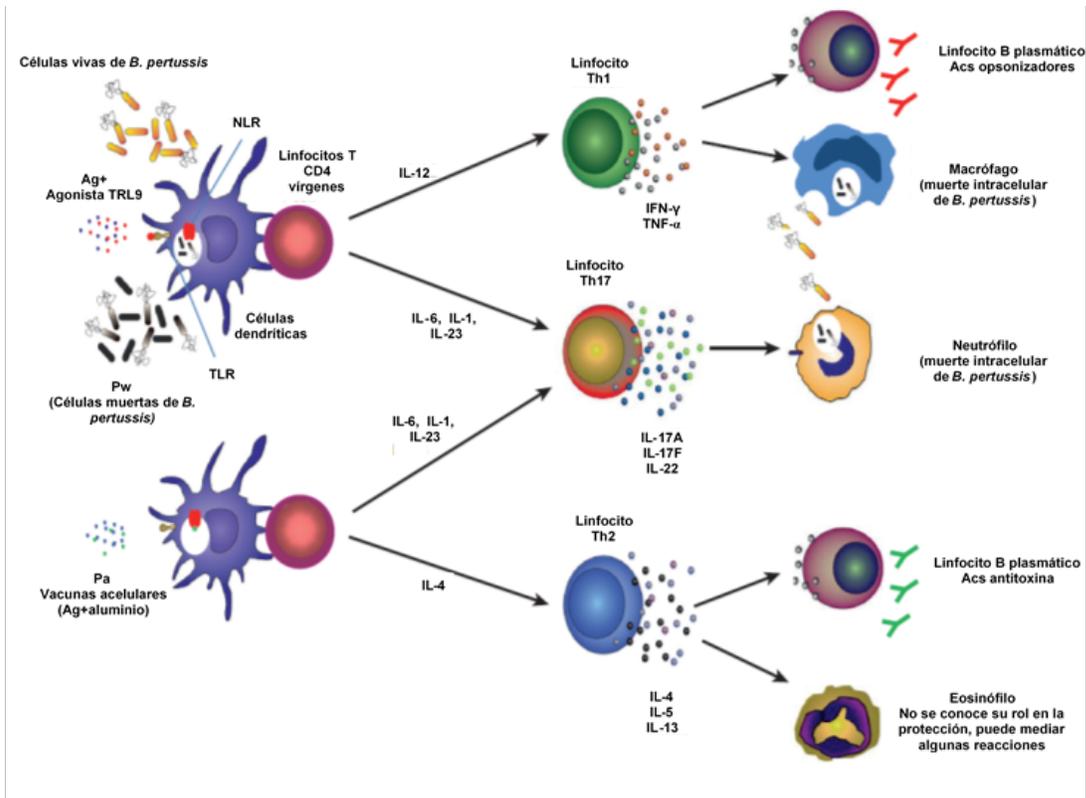


Figura 3. Mecanismo de inmunidad de *B. pertussis* inducido por la vacunación y por la infección. La infección con células vivas de *B. pertussis* o la inmunización con vacunas Pw, contienen cientos de antígenos y agonistas del receptor tipo Toll (TLR), incluyendo el lipopolisacárido (LPS) y agonistas del receptor tipo Nod (NLR) que activan células dendríticas y promueven la diferenciación de células T naive a Th1 secretoras de IFN γ o Th17 secretoras de IL-17. Ambos tipos de células se requieren para la protección óptima contra *B. pertussis* mediada por el reclutamiento y la activación de neutrófilos y macrófagos, los cuales junto con la ayuda de anticuerpos opsonizantes, matan a *B. pertussis*. Las vacunas acelulares están hechas de 3-5 antígenos diferentes de *B. pertussis* y se usa el aluminio como adyuvante. Las células dendríticas activadas por Pa promueven la inducción de células Th17, las cuales activan y reclutan neutrófilos, y células Th2 secretoras de IL-4 y promueven la activación de eosinófilos y la inducción de anticuerpos IgG1 neutralizantes de toxinas (Kingsston, 2014).

1.7 Plantas transgénicas para la producción de nuevas vacunas

Las plantas están probando ser bioreactores atractivos para producir proteínas biofarmacéuticas incluyendo vacunas, anticuerpos y moléculas inmunomoduladoras como las citocinas. Los principales retos para los antígenos recombinantes derivados de plantas incluyen bajos rendimientos y el largo proceso requerido para generar líneas de plantas transgénicas (Hernández et al., 2014). Así, diferentes estrategias para mejorar el rendimiento proteico han sido investigadas recientemente. La Tabla 3 resume ejemplos recientes de vacunas orales de origen vegetal contra enfermedades humanas infecciosas (Chant y Daniell, 2015).

Tabla 3. Ejemplos recientes de vacunas orales derivadas de plantas contra enfermedades infecciosas humanas.

Sistema de expresión	Gen utilizado	Vector utilizado	Enfermedad	Resultado	Referencia
Plátano	HBsAg	pHBS	Hepatitis B	Máximo nivel de expresión de HBsAg visto en hojas	Kumar et al. (2005)
Arroz	MOMP	· pHER · pEFEHBS · pEFEHER · pMD18-T	Psittacosis	Inmunidad humoral y celular activadas	Zhang et al. (2013)
	Gen P1	<i>A. tumefaciens</i>	Enfermedad de pies y boca	El modo de inmunización dio resultados significativos	Wang et al. (2012)
	Cry j I y Cry j II	<i>A. tumefaciens</i>	Alergia	Inmunoterapéutica para las alergias	Takagi et al. (2005)
Alfalfa	eBRV4	Betaglucuronidasa (betaGUS)	Diarrea por rotavirus	Inmunidad lactogénica inducida	Wigdorovitz et al. (2004)
Papa	Antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg)	pHB114, <i>A. tumefaciens</i>	Hepatitis B	El antígeno transformado fue capaz de generar respuesta sistémica en el intestino humano	Thanavala et al. (2005)
	<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC) y norovirus (NV)	<i>A. tumefaciens</i>	Enfermedades diarreicas	LTB suministrado en células de papa indujeron un grado similar de células B como ocurre después del reto experimental con <i>E. coli</i> enterotoxigénica	Tacket (2007)
	HBsAg	<i>A. tumefaciens</i>	Hepatitis B	El antígeno transformado fue capaz de generar una respuesta sistémica en el intestino humano.	Hayden et al. (2012)
Tomate	DPT	<i>A. tumefaciens</i>	Difteria, pertussis, tétanos	Niveles significativos de anticuerpos IgG e IgA en intestino	Soria-Guerra et al. (2007)
Chícharo	Proteína Hemaglutinina (H)	<i>A. tumefaciens</i>	Enfermedades endémicas en África (virus de la peste bovina)	La integración del gen H dentro del genoma del chícharo y el nivel de expresión de esta proteína se confirmó.	Satyavathi et al. (2003)
Tabaco	Proteína de la cápside del Virus Norwalk (NVCP)	<i>A. tumefaciens</i>	Gastroenteritis epidémica aguda	El derivado rNV de planta fue activo oralmente	Mason et al. (1996)

	Vt2e-B y FedA	<i>A.tumefaciens</i>	Enfermedad del edema porcino	Protector contra infecciones de <i>E. coli</i> verotoxigénica	Sala et al. (2013)
Maíz	Proteína de la matriz del virus PRRS	pU57	Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino	La respuesta inmune celular fue detectada por la presencia de IFN γ específico para PRRS y el IC-10 en esplenocitos y cuantificado por ELISA	Hu et al. (2012)

Tomado de Anjali et al. (2016).

El concepto de las vacunas de origen vegetal involucra el uso de células vegetales como biorreactores para que mediante ingeniería genética producir antígenos recombinantes (Fig. 4).

Idealmente, la biomasa vegetal se utiliza como vehículo de entrega para vacunas orales. Descrito por Curtis y Cardineau en 1990, el concepto fue bien aceptado por la comunidad científica. Su adopción ha llevado a prototipos de vacuna mejorados desarrollados durante las últimas tres décadas, abriendo un panorama prometedor en el campo de la vacunología. Debido a la complejidad de la meta, se identificaron inconvenientes iniciales en el desarrollo de dichas vacunas, incluyendo bajos niveles de acumulación de antígeno en la biomasa vegetal lo que junto con los mecanismos que rigen el sistema inmune asociado a la mucosa han limitado la formulación de vacunas orales eficientes; y las preocupaciones de bioseguridad sobre el flujo no deseado de genes que codifican antígenos y marcadores de selección. El sello distintivo del desarrollo de una vacuna exitosa es la inducción de una respuesta prolongada del sistema inmune después del menor número de dosis de una vacuna fácil de administrar y a bajo costo. La vacunación oral llena estos rasgos deseables, y el principal objetivo de la investigación sobre vacunas está actualmente en las vacunas orales. Adicionalmente, se espera que se pueda lograr un mayor efecto protector utilizando la misma vía por la cual el patógeno entra al cuerpo, y la mayoría de los patógenos entran al cuerpo a través de las superficies mucosas. Por lo tanto, la vacunación oral permite activar la inmunidad humoral y celular tanto en la mucosa como a nivel sistémico.

El reto de una vacuna administrada oralmente es evitar el ambiente perjudicial al que están expuestos todos los productos de ingesta oral, incluyendo bajo pH, la

degradación de los antígenos por las enzimas digestivas, transporte ineficiente desde el lumen intestinal hasta el tejido linfático asociado al intestino y la inducción de la tolerancia inmune local y sistémica. En este sentido, las plantas tienen bastantes ventajas sobre los sistemas convencionales de producción y podrían mejorar el desempeño de las vacunas orales. De hecho, el uso de plantas para expresar moléculas antigénicas podría preservar la inmunogenicidad del epítipo ya que las respuestas de la mucosa y del sistema inmune son exitosamente inducidas; los altos niveles de IgA y IgG fueron observados, y en ciertos casos algo de inmunidad celular fue eliminado. Otro tema importante en la vacunación oral es la necesidad de producir moléculas y células de efecto exitoso, evitando la tolerancia inmune. La incidencia de la tolerancia oral puede depender de las condiciones que rodean la entrega de antígenos y en la respuesta local de la mucosa intestinal. La tolerancia oral podría ocurrir ya sea después de la administración de una sola alta dosis de antígenos o después de la exposición a dosis bajas repetidas (Hernández, 2014).

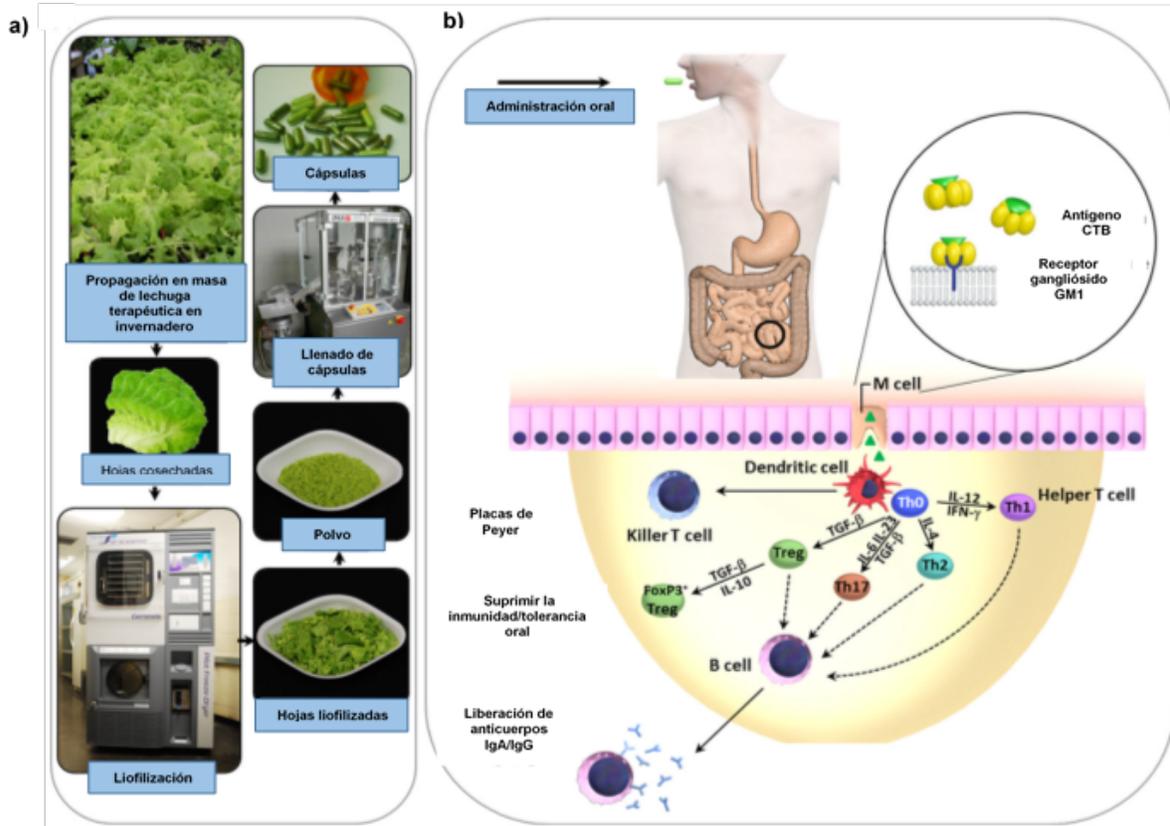


Figura 4. Esquema para el proceso de la administración oral de vacunas derivadas de plantas. a) Se introducen y expresan genes foráneos en cloroplastos de lechuga mediante bombardeo de partículas. Tras la confirmación de la integración estable de los genes foráneos en todos los genomas del cloroplasto en cada célula vegetal (logrando homoplastía) y la caracterización de la dosificación y funcionalidad, las líneas transplastómicas se transfieren al invernadero para aumentar la biomasa. Las hojas cosechadas se liofilizan en máquinas programadas para mantener la temperatura de sublimación por debajo de 20 ° C, se pulverizan y almacenan en un ambiente libre de humedad. b) Mecanismo propuesto de vacunas orales derivadas de plantas. Los antígenos fusionados con el adyuvante de la toxina de cólera (CTB) administrados oralmente son absorbidos por células M localizadas en el tejido linfoide asociado al intestino a través de la unión al receptor gangliósido GM1. A continuación, los antígenos son capturados por células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, que inducen células T y B específicas de antígeno. Las citocinas asociadas con Th1, tales como IFN- γ y citocinas Th2, tales como IL-4 e IL-10, juegan un papel importante en la inmunidad mediada por células y en la inmunidad humoral. Las células dendríticas inducen FoxP3 + Tregs a través de la producción de TGF- β . El TGF- β media la tolerancia inmune a través de la inducción y el mantenimiento de FoxP3 + Treg, que suprimen las respuestas Th1 y Th2 (Hernández et al., 2014).

1.7.1 Expresión transitoria de proteínas usando vectores virales desarmados.

Este sistema de transformación vegetal se basa en la expresión sistémica mediada por la infección de un virus vegetal, el cual se puede replicar, transcribir y traducir lo suficiente para producir muchas copias de una proteína recombinante introducida a través del genoma viral. También combina las ventajas de usar módulos con genomas virales flanqueados por los bordes izquierdo y derecho del plásmido Ti de *Agrobacterium* para dirigir al núcleo los genes a transcribir, la capacidad de

diseminación del virus y en contar con una recombinasa que *in vivo* produce un transcrito que contiene la información de la proteína de movimiento y la recombinante. Además, la transformación puede producir grandes cantidades de proteína recombinante en poco tiempo y con menos demanda de área de plantación. Mejorando los sistemas de expresión de los virus vegetales, los genes exógenos pueden no solo expresarse como proteína soluble y distribuida en el citoplasma de las células de la planta huésped, sino que también pueden fusionarse con los genes de la cápside vírica y ser expresadas constantemente cuando las partículas de virus se replican y traducen proteínas virales en el estado infectado (Guan et al., 2013).

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido mejorar el sistema de expresión usando virus desarmados, creando una nueva tecnología llamada magnICON® (protocolo comúnmente conocido como “Magniffection”), la cual permite la amplificación transitoria de genes a partir de vectores virales que son introducidos a la planta vía *Agrobacterium*. Esta moderna tecnología desarrollada por el grupo del Dr. Marillonet en Icon Genetics, Alemania, empresa que posteriormente fue comprada por Bayer Crop Sciences (Álvarez y Cardineau, 2010), presenta diversas características que la hacen ser un protocolo excelente para producir proteínas recombinantes en plantas en corto tiempo. Estos vectores virales están divididos en varios módulos: el módulo 3' es donde se inserta la secuencia genética a expresarse (gen de interés), el módulo 5' que contiene a la RNA polimerasa dependiente de RNA, así como el péptido señal que puede dirigir a la proteína hacia algún sitio específico dentro de la célula vegetal; y por último un vector que contiene una integrasa, cuya función es unir a los dos módulos anteriores mediante un proceso de recombinación *in vivo* (Gleba et al., 2005) (Fig. 5).

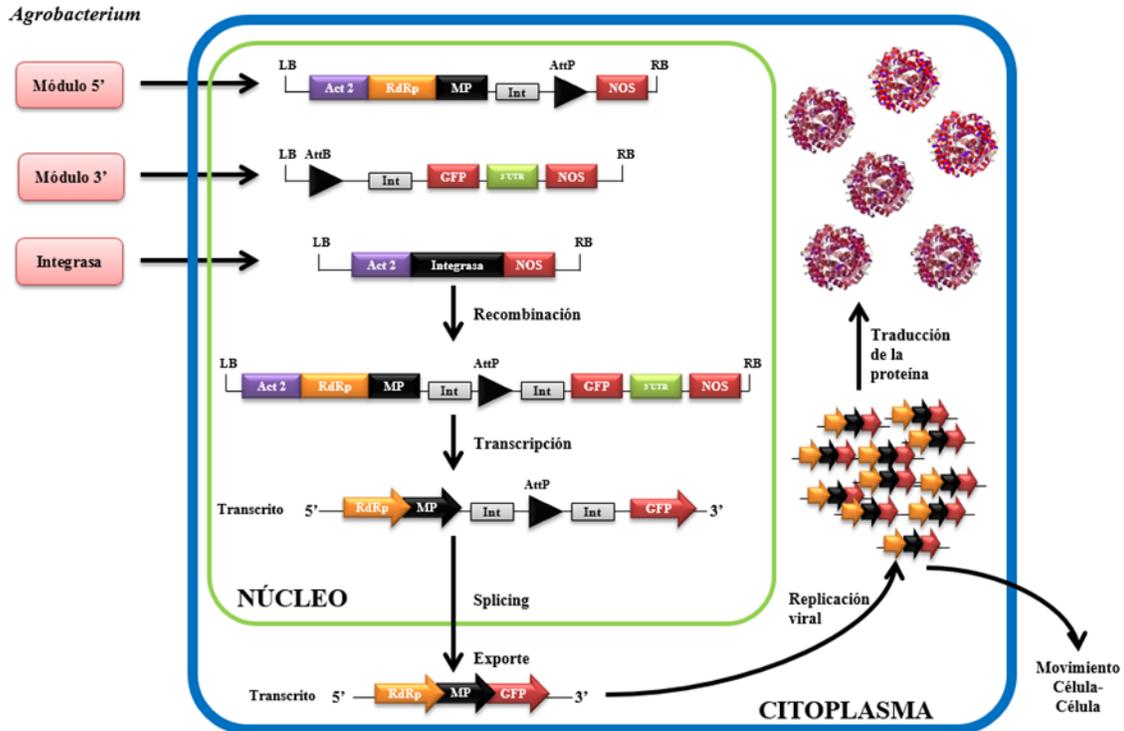


Figura 5. Representación esquemática de la tecnología de expresión transitoria llamada “Magnifection”. LB y RB, borde derecho e izquierdo del vector binario respectivamente; Int, intrón; AttB y AttP, elementos de recombinación específicos de ADN; UTR, región no traducible; NOS, terminador de la nopalina sintasa; Act2, promotor del gen 2 de actina de *Arabidopsis*; MP, proteína de movimiento del virus; RdRP, gen de la RNA polimerasa dependiente de ARN; GFP, proteína verde fluorescente (Gebala et al., 2005).

La técnica consiste en infectar a la planta con una suspensión diluida de *Agrobacterium* (la cual contiene cada uno de los tres módulos descritos anteriormente) aplicando presión por medio de vacío, o inoculando directamente con la ayuda de una jeringa sobre el tejido foliar de la planta; después de 2-3 semanas la biomasa se recolecta y se realiza la extracción de la proteína recombinante, que puede llegar a alcanzar niveles de expresión de hasta un 40% de la proteína soluble total (PST). Así esta nueva tecnología combina las ventajas de tres sistemas biológicos: la rapidez y los niveles de expresión del virus, la eficiencia de transfección de *Agrobacterium* y las capacidades pos-traduccionales y bajos costos de producción de las plantas. Hasta la fecha se han expresado más de 50 proteínas usando esta tecnología, la cual ha mostrado altos niveles de expresión y las proteínas generadas han sido biológicamente activas (Marillonet et al., 2004).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que el sistema de vacunación actual contra tos ferina no es eficiente ya que se han detectado brotes de la enfermedad en adolescentes, se requiere replantear el esquema de vacunación con refuerzos extras, o diseñar mejores vacunas que tengan una respuesta más duradera de título de anticuerpos, por lo que el contemplar nuevos determinantes antigénicos del patógeno pudieran generar una vacuna mejorada.

Por otro lado, el utilizar plataformas alternativas como las plantas, pueden reducir el tiempo y costo de producción de generación de vacunas acelulares.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Expresar en plantas genes sintéticos que posean epítomos inmunogénicos de *B. pertussis*, por medio de la transformación estable (nuclear y de cloroplastos) y transitoria (vectores virales), para realizar análisis posteriores de inmunogenicidad *in vivo* en modelos murinos y verificar la eficacia de la proteína antigénica.

3.2 Objetivos específicos

- Diseñar y obtener genes sintéticos optimizados para expresión en vegetales, que codifiquen para una proteína de fusión que comprenda regiones de epítomos relevantes de *B. pertussis*.
- Obtener líneas transformadas para los genes y cultivos de interés, obtenidas de la transformación estable, y obtener tejido vegetal transformado transitoriamente.
- Demostrar la presencia de la proteína por medio de ensayos de Dot blot y Western blot.
- Realizar ensayos de inmunización en ratones y medir el nivel de anticuerpos en suero.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La preparación de reactivos, soluciones y medios de cultivo así como los protocolos detallados se describen el Anexo I.

4.1 Metodología

4.1.1 Diseño de las construcciones genéticas

Se trabajó con dos construcciones genéticas las cuales fueron utilizadas tanto para la transformación estable de tabaco con baja cantidad de nicotina (donado por la Dra. Menassa), vía *Agrobacterium tumefaciens* (BPsnMOD), como para la transformación transitoria de tabaco con baja cantidad de nicotina mediante vectores virales (BPsnM3'). Los genes fueron diseñados y optimizados para el mejor uso de codones en plantas. Estos genes poseen epítomos relevantes de *B. pertussis*. Se eligieron 2 epítomos de la subunidad S1 de la toxina pertúsica (TPS1 y TPS2) previamente reportados como relevantes e inmunogénicos (Askelof et al., 1990; Barbieri et al., 1992), correspondientes a los primeros 17 aminoácidos de la subunidad S1 y a otros 17 aminoácidos de la posición 99-115. Por otro lado, se seleccionó una región que comprende el dominio inmunodominante tipo I de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y la región inmunodominante II de la pertactina (PRN), estas regiones fueron tomadas de *Bordetella bronchiseptica*, patógeno respiratorio Gram negativo que causa enfermedades en cerdos y perros, sin embargo, se utilizó en este trabajo debido a que análisis inmunológicos y de estructura de proteínas sugieren que las proteínas FHA de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* son similares y tienen un conjunto común de epítomos inmunogénicos (Zhao et al., 2008). Los epítomos de la subunidad S1 de la toxina pertúsica y la proteína de fusión están unidos por espaciadores, los cuales son ricos en prolina (GPGPG). Dichos espaciadores han permitido el despliegue apropiado de epítomos en otras proteínas de fusión para epítomos lineales (Livingston et al., 2002). A ambos genes se les agregó en el extremo 3' seis codones que codifican para una etiqueta de histidinas con la finalidad de purificar la proteína recombinante y también se añadió un sitio para corte con proteasa del Tobacco Etch Virus (TEV), el cual permite eliminar las histidinas una vez que la proteína ha sido purificada. Al gen diseñado para transformación nuclear se le añadió una secuencia que codifica

para SEKDEL en el extremo 3' con la finalidad de retener a la proteína recombinante en el retículo endoplásmico y disminuir degradación; además se le agregó la secuencia del TEV 5'UTR para dar estabilidad, así como un adyuvante, la secuencia completa de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB). También añadimos un péptido señal al retículo endoplásmico de *Nicotiana plumbaginifolia* (30 aminoácidos) probado por Lu et al. (2012), así como los sitios de restricción *Sma*I y *Sac*I para su clonación en el vector binario pBI121 (Fig. 6). Estos genes fueron sintetizados por la compañía GeneArt en EUA.

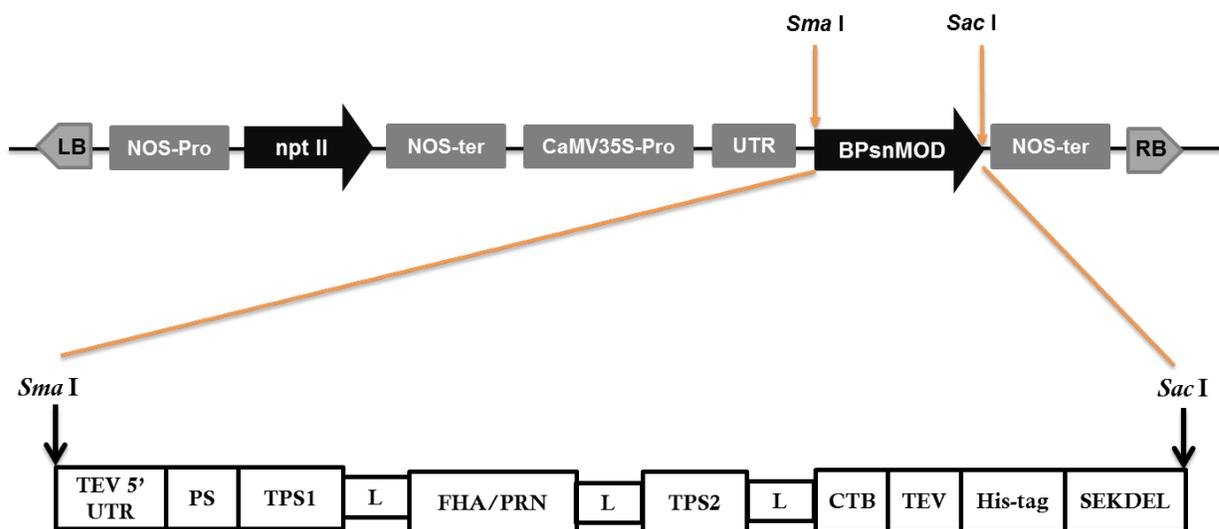


Figura 6. Representación esquemática de la construcción pBIBPsnMOD. La construcción contiene el gen sintético BPsnMOD formado por las secuencias de TEV 5'UTR: Secuencia 5' no traducida del Tobacco etch potyvirus; PS: Péptido señal; TPS1 y TPS2: Epítopos subunidad S1 toxina pertúsica; FHA/PRN: Proteína de fusión de hemaglutinina filamentososa y pertactina; L: Espaciador; CTB: toxina de cólera; His-tag: Etiqueta de histidinas; TEV: Sitio de corte de proteasa; SEKDEL: señal de retención en el retículo endoplásmico. Se indican los sitios de enzimas de restricción para la subclonación en el vector binario pBI121.

Con la finalidad de expresar el gen BPsnM3' utilizando la tecnología de vectores virales magnICON, se utilizó una versión diferente a BPsnMOD, el cual contiene los mismos epítopos anteriormente descritos, los epítopos de la subunidad S1 de la toxina pertúsica, la proteína de fusión, los espaciadores ricos en prolina, la señal de retención en retículo endoplásmico, y la etiqueta de histidinas, pero en esta versión del gen, se encuentra en el extremo 5'. En la Figura 7 se muestran todos los módulos correspondientes al sistema de "Magnifection" que fueron utilizados.

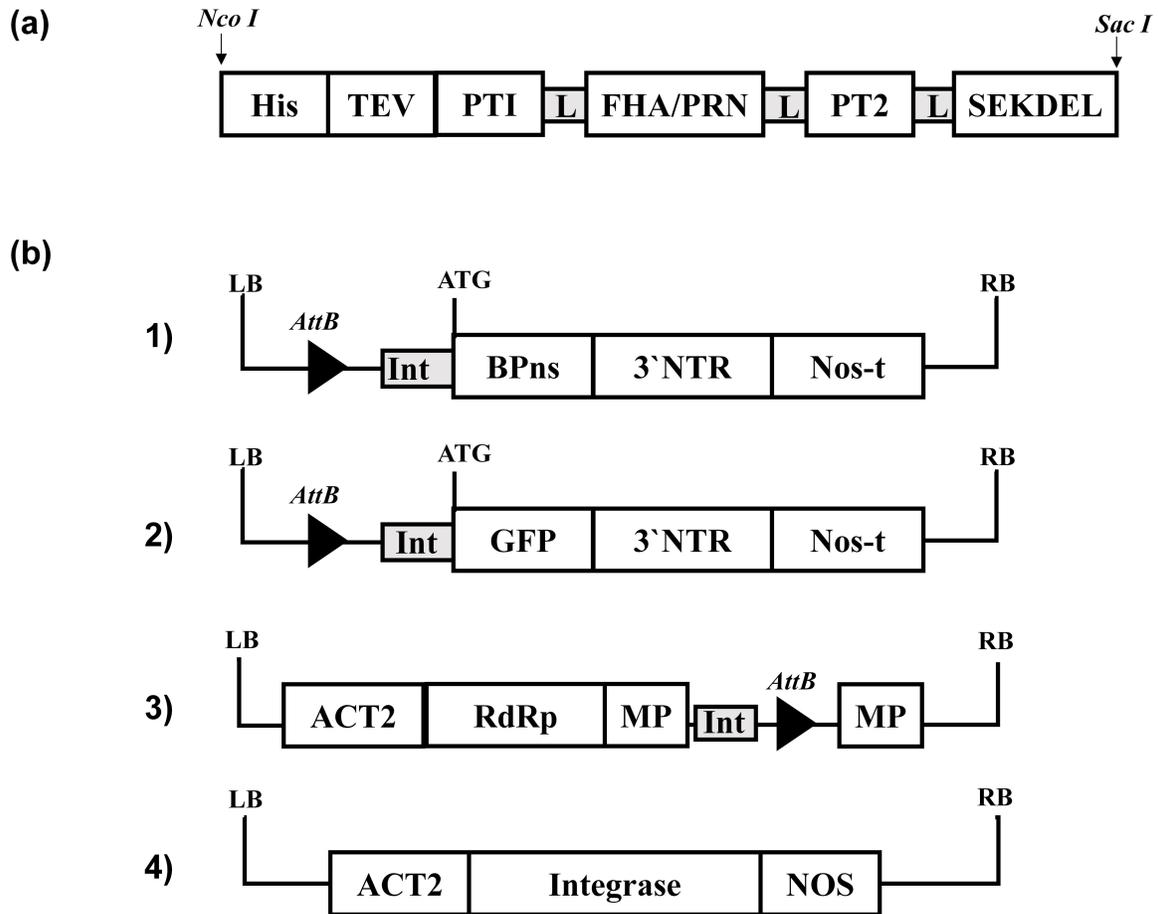


Figura 7. Gen BPsñ y vectores usados para la transformación transitoria. **a)** Gen BPsñ: His: etiqueta de histidinas; TEV: sitio de corte de proteasa; TPS1 and TPS2: epitopos de la subunidad S1 de la toxina pertúsica; FHA / PRN: proteína de fusión de hemaglutinina filamentososa y pertactina; L: espaciadores; SEKDEL: señal de retención al retículo endoplásmico. Los sitios de restricción están indicados por flechas. **b)** Módulos utilizados para la estandarización de la metodología de Magnifection y expresión de BPsñ. **1)** Módulo 3' para el gen de interés, pICHBPsnM3'; **2)** Módulo 3' para el gen reportero, pICHGFP; **3)** Módulo 5' que facilita el movimiento (módulo pICH4851); **4)** Módulo Integrasa (pICH10881) que facilita la recombinación *in vivo*. LB y RB, bordes izquierdo y derecho del vector binario, respectivamente; Int, intrón; *AttB* y *AttP*, elementos específicos de recombinación de ADN; NTR, región no traducible; NOS, terminador de la nopalina sintasa; ACT2, promotor del gen 2 de actina; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA; MP, proteína de movimiento.

4.1.2 Propagación de las construcciones genéticas

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

Los genes diseñados fueron sintetizados por la compañía GenScript en EUA. Los genes BPsñM3' y BPsñMOD fueron originalmente clonados en el vector pUC19 y

pUC57, respectivamente; los productos liofilizados fueron disueltos en 20 μL de agua desionizada estéril, quedando a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, de este volumen se tomaron 3 μL (600 ng) para transformar células químicamente competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (Anexo I). Los vectores pUC cuentan con un gen de resistencia a ampicilina, por lo cual se seleccionaron cinco clonas de cada gen resistente a este antibiótico, se extrajo ADN plasmídico de cada una de ellas y se comprobó la identidad de cada construcción mediante digestión con *NcoI*/ *SacI* y *SmaI*/ *SacI* para los genes BPs_nM3' y BPMOD, respectivamente. Una vez comprobada la identidad de cada gen se procedió a realizar un stock en glicerol de cada una de las construcciones y se almacenaron a -80°C.

4.1.2.1 Construcción para transformación nuclear

Clonación del gen BPs_nMOD en el vector pBI121

El gen BPs_nMOD fue subclonado en el vector binario pBI121, sustituyendo el marco de lectura abierto del gen reportero *uidA* por el gen de interés. Dicho vector dirige la expresión del gen con el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV), además contiene un gen de selección que le confiere resistencia a kanamicina a las células vegetales que han sido transformadas. Para eliminar el gen reportero GUS, se realizó una doble digestión con las enzimas *SmaI* y *SacI*, posteriormente se purificó el plásmido digerido con el kit QIAquick gel de extracción (Qiagen). Las mezclas de ligación se emplearon para transformar células competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (ver Anexo I). Las clonas resistentes a kanamicina se seleccionaron y propagaron para aislar ADN plasmídico de acuerdo a Sambrook et al. (1989). El ADN de las clonas obtenidas fue analizado mediante el perfil de restricción obtenido con las enzimas *SmaI* y *SacI*.

4.1.2.2 Construcción para transformación transitoria

Clonación del gen BPs_nM3' en el vector pICH11599

En el caso del gen BPs_nM3' para la transformación transitoria, el gen se flanqueó con los sitios de restricción *NcoI* y *SacI* y se clonó en el vector pICH11599, para

finalmente lograr obtener el vector pICHBPsnM3' el cual corresponde al módulo 3' del sistema magnICON, metodología que comúnmente es conocida como "Magniffection". Todas las construcciones genéticas de los módulos, se transformaron individualmente en *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 y se almacenaron los stocks en glicerol, a -80°C. Las construcciones tienen elementos que le confieren resistencia a kanamicina y rifampicina. Dos días antes de realizar cada experimento se sembraba un pre-inóculo en medio LB con los dos antibióticos (100 mg/L de cada uno) para realizar la infiltración de las hojas de tabaco (4-6 semanas de edad).

4.1.3 Transformación genética de plantas

4.1.3.1 Transformación nuclear vía *Agrobacterium tumefaciens*

La construcción BPsMOD en el plásmido pBI-121 se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 por electroporación, las bacterias transformadas se utilizaron para la transformación nuclear de hojas de tabaco con baja cantidad de nicotina.

4.1.3.2 Obtención de hojas de tabaco

Para obtener los explantes iniciales (hojas de aproximadamente 4 semanas de edad) se utilizaron semillas esterilizadas superficialmente de *Nicotiana tabacum* con baja cantidad de nicotina, se sembraron aproximadamente 5-10 semillas en medio Murashige Skoog (MS) al 50%. A las 4 semanas, de las plántulas obtenidas se cortaron las hojas que se emplearon para los ensayos de transformación genética y, estas se colocaron en medio RMOP con la cara abaxial hacia arriba.

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

Se utilizaron de 3 a 5 hojas de cuatro semanas de edad por experimento, éstas se cortaron en fragmentos de 0.5 x 1.0 cm sobre papel filtro estéril, los cuales se colocaron en medio MSO para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una suspensión de *A. tumefaciens* (DO 0.2) que portaba el plásmido de interés durante 10 minutos. Después de eliminar el exceso de bacterias con papel

absorbente estéril, se colocaron en el medio RMOP sin antibiótico durante dos días. Pasado el periodo de cocultivo, los explantes se transfirieron al medio RPMOP con 200 mg/L de kanamicina adicionado con 500 mg/L de cefotaxima para eliminar a la agrobacteria. Los tejidos fueron subcultivados cada dos semanas, seleccionando solo los explantes resistentes a la selección (Fig. 8).



Figura 8. Transformación nuclear de hojas de tabaco sin nicotina con *A. tumefaciens* con la construcción BPsnMOD-pBI121.

4.1.3.4 Expresión transitoria de BPsnM3' con la metodología de "Magnifection" en *Nicotiana tabacum*

Para el presente ensayo se utilizó la técnica de agroinfiltración conocida como "Magnifection", (Marillonet et al., 2004. Se utilizó la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Los vectores virales contenidos en los tres diferentes módulos independientes se introdujeron por separado en *Agrobacterium* por el método de electroporación y posteriormente la bacteria se creció en 5 mL de medio LB a 28°C con agitación constante y con el antibiótico adecuado (Carbenicilina 50 µg/L). Cuando el cultivo bacteriano alcanzó la OD_{625nm} de 1.6-2.5 (aproximadamente en 2 días), las bacterias se recuperaron por centrifugación a 8,000 rpm durante 5 minutos y se le agregaron 10 mL de buffer de infiltración (MES 10 mM y MgSO₄ 10 mM y con un pH de 5.5) para resuspender la pastilla bacteriana, se lavó por lo menos dos veces con el buffer de infiltración. Finalmente la pastilla bacteriana se resuspendió en 5 mL de buffer de infiltración, para después mezclar las tres suspensiones bacterianas que contenían cada uno de los módulos independientes: módulo 3' (módulo que contiene el gen de interés ya sea BPsnM3' o GFP como

control positivo), módulo 5' (módulo donde se encuentra la proteína de movimiento y la replicasa dependiente de RNA) y el módulo de la integrasa; y para su uso en la infiltración se les adicionó aproximadamente 1 L de buffer de infiltración.

Se utilizaron plantas de tabaco con baja cantidad de nicotina (*N. tabacum* v. 81V9), las cuales fueron germinadas en medio MS (50%) bajo condiciones asépticas, posteriormente los brotes de aproximadamente 2 semanas, se pasaron a macetas con tierra y a las 6 semanas de edad, las plantas fueron extraídas de la tierra cuidadosamente con todo y raíz y enjuagadas con agua para eliminar el exceso de tierra. Las plantas fueron colocadas con la parte aérea hacia abajo y la raíz hacia arriba en la cámara de infiltración previamente llenada con la suspensión de *Agrobacterium* (1.8×10^8 unidades formadoras de colonia por mL). Se aplicó vacío durante aproximadamente 1-1.5 minutos, el vacío se rompió lentamente y las plantas fueron extraídas de la suspensión bacteriana eliminando el exceso con papel absorbente. Finalmente, las plantas infiltradas fueron colocadas nuevamente en tierra para incubarse durante 7 días en condiciones de invernadero (16 h/8 h luz/obscuridad) a 25° C, posteriormente se recolectaron todas las hojas de 10 plantas planta (30 g en total), las cuales fueron congeladas y liofilizadas durante 24 horas. Tras el proceso de liofilización las hojas de tabaco fueron molidas con nitrógeno líquido y mezcladas para favorecer la homogeneidad de la proteína heteróloga presente. Cada lote proviene de un evento de infiltración, por lo tanto, a cada evento de infiltración se le considera como un lote diferente. Tres gramos de tejido liofilizado se utilizaron para extraer proteína soluble total, con los cuales se realizaron los ensayos de actividad.

4.2 Análisis de transformantes

4.2.1 Extracción de ADN

El ADN genómico se aisló de tejido vegetal siguiendo el protocolo de Michiels et al. (2003).

4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la Tabla 4 se describen los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diferentes transgenes.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del transgén BPsn.

Nombre	Secuencia
BPsnF	GGAGATGATCCACCAGCAAC
BPsnR	GGTTGAGGAGGTTGTGGTCC

BPsnF y BPsnR: Oligonucleótidos del gen sintético nuclear, sentido y antisentido respectivamente.

La mezcla maestra de reacción (25 μ L) contenía ADN genómico (20 ng), buffer de Taq polimerasa (1X), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.2 mM), oligonucleótidos (10 μ M) y Taq polimerasa (1U).

La amplificación se llevó a cabo en un equipo de Techne mediante el protocolo descrito en la Tabla 5.

Tabla 5. Protocolo de PCR empleado para el escrutinio de líneas candidatas

Gen	Tamaño de amplicón (pb)	Oligonucleótidos	Condiciones				
			Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
BPsn	731	BPsnF+BPsnR	5 min 94°C	30 s 94°C	30 s 52°C	1 minutos 72°C	5 minutos 72°C

Después de la amplificación, las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1%, corridos en TAE 1X a 70 V, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV en un fotodocumentador Chemisystem (UVP) empleando el software Labworks 4.0.0.8.

4.2.3 Extracción de proteína soluble total

Se homogenizó el tejido vegetal liofilizado en nitrógeno líquido y la proteína fue extraída a 4°C en 30 mL de buffer de extracción: PBS, Tritón X-100 al 0.5% y 30 μ L coctel inhibidor de proteasas (SIGMA P9599 10 mL/L). El tejido homogenizado se

centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford (1968), se colocaron 25 µL de la solución problema y se añadió 1.0 mL del reactivo de Bradford se empleó albúmina de suero bovino como estándar (5-20 ng/ L). La calidad de las proteínas obtenidas fue analizada mediante electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) en un gel de acrilamida al 16% teñido con azul de Coomassie coloidal.

4.2.3.1 Análisis de SDS-PAGE de los extractos proteicos de los tabacos infiltrados

Se realizó un análisis SDS-PAGE a los extractos proteicos obtenidos del tejido de tabaco infiltrado liofilizado, con el fin de identificar alguna banda diferencial del peso molecular de la proteína M3' (33 kDa) que pudiera ser un indicio de la presencia del péptido en el extracto proteico. Se realizó el gel de SDS-PAGE al 16% y la electroforesis se dejó corriendo por un tiempo aproximado de 2.5-3 horas. El gel fue teñido con el colorante azul de Coomassie y se tomaron fotografías del gel para poder observar el patrón de bandas.

4.2.3.2 Dot blot

Se realizó la extracción de proteínas, mediante sonicación de 100 mg de tejido vegetal liofilizado en 500 µL de buffer de extracción: PBS, Tritón 0.1% y coctel inhibidor de proteasas (SIGMA P9599 10 mL/L). El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante, 5 µL de este sobrenadante se colocaron en una membrana de nitrocelulosa para realizar el ensayo, como control positivo se utilizó la proteína PTF purificada de bacteria y como control negativo proteína soluble total de una planta silvestre. El procedimiento se describe en el Anexo I.

4.3. Purificación de proteína recombinante de tejido liofilizado por la técnica de Magnifection (proteína PTF-M3')

A los 7 días posterior a la infiltración (dpi), se recolectó tejido de las hojas de las plantas infiltradas y se homogenizaron mecánicamente con el fin de analizar la

expresión de la proteína recombinante. El tejido se colocó en agitación a 4°C junto con el buffer de extracción, fue después centrifugado, se separó el extracto acuoso y el extracto se purificó usando cromatografía de afinidad (columnas pre-empacadas HP Ni, GE Healthcare, NJ) utilizando buffer de extracción (50 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, 40 mM Imidazol, pH to 7.5). Las fracciones de la proteína recombinante fueron eluidas con 3 diferentes concentraciones de Imidazol: 100, 300 y 500 mM, se recolectaron y almacenaron las fracciones eluidas. El protocolo se describe a detalle en el Anexo I.

4.3.1 Cuantificación de la proteína PTF-M3' purificada

La concentración de proteína PTF-M3 ' se determinó mediante un ELISA indirecto. La curva estándar se realizó mediante diluciones seriadas de 500 a 1 ng/mL de una proteína control con una etiqueta de histidina (SdrP de *Thermus thermophilus*) en una placa de 96 pozos. Las muestras fueron diluidas en un buffer de carbonatos y se incubaron 12 h a 4°C. Se realizaron lavados con TBS Tween 20 al 0.1%. El bloqueo se realizó con el buffer A (NaB₄O₇ 15 mM + NaCl 120 mM + BSA al 0.25% + Tween 20 al 0.05% + EDTA 1 mM + NaN₃ al 0.05%, pH: 8.5). Posteriormente, la placa se incubó con un anticuerpo Monoclonal Anti-His de ratón a una dilución 1: 3,000 durante 2 h. Después, se incubaron los pocillos con un anticuerpo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina producido en conejos a una dilución 1: 1,500 (A1902; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). La reacción colorimétrica se realizó con una solución 3 mM de p-nitrofenilfosfato, se leyó a 405 nm en el lector de absorbancia de microplacas iMar™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La concentración del péptido en los extractos se determinó mediante regresión lineal. Los datos se analizaron mediante el análisis pareado de la prueba t (P <0.05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa). El análisis estadístico y el gráfico se realizaron en el software GraphPad Prism 6.

La pureza de la proteína PTF-M3 'se determinó mediante SDS-PAGE y se confirmó mediante ensayos de Western blot, respectivamente.

4.3.2 Western blot de la proteína PTF-M3' purificada

Se elaboró el análisis Western blot utilizando proteínas purificadas obtenidas de hojas infiltradas y *E. coli*. Se resuspendieron 20 µL de cada proteína purificada en 200 µL de buffer Laemmli desnaturalizado por ebullición durante 10 minutos a 95°C. Las proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes. El gel se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) BioTrace (Pall Corporation, Cortland, NY) utilizando un Módulo de Electrodo Mini-Trans-Blot (BioRad) contenedor de buffer de transferencia (Tris 20 mM, glicerina 150 mM y metanol 20%). Tras bloquear con PBS más 3% de leche descremada, la transferencia fue incubada con anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la etiqueta de Histidina (diluida 1:,5000, Serotec) por toda la noche a 4°C. Un anticuerpo conjugado de peroxidasa de rábano (diluido 1:10,000, A5420, Sigma-Aldrich) fue aplicado por dos horas a temperatura ambiente. La detección específica de anticuerpos fue completada con solución SuperSignal West (Thermo Scientific, <http://www.thermoscientific.com>).

4.4 Purificación de la proteína PTF de *E. coli*

Para contar con un control positivo, el gen BPsnM3' se optimizó para el uso de codones en cloroplastos, con el fin de que pudiera ser expresado eficientemente en el modelo bacteriano, con el fin de tener un control positivo para ensayos inmunológicos. El gen BPsnM3' optimizado para su expresión en bacteria, se clonó en el vector pET28b, dando como resultado la construcción rBPns, el cual produce la proteína PTF. A las clonas obtenidas se les realizó un análisis de restricción con las enzimas *Xho*I y *Xba*I. La clona que mostró el perfil de restricción esperado, se secuenció y se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* para la transformación. Se realizó la inducción de ésta con IPTG durante toda la noche a una temperatura de 37°C. Se tomaron alícuotas del extracto de las proteínas totales de la bacteria antes y después de la inducción, para su separación por electroforesis en un gel SDS-PAGE. Posteriormente se realizó un Western blot utilizando el extracto de proteínas totales de la bacteria usando como anticuerpo primario uno dirigido a la etiqueta de histidinas. En base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se procedió a

la purificación de la proteína por columna de Níquel y a la realización de Western blot para verificar la pureza de la proteína. Se utilizó como anticuerpo primario uno dirigido a la etiqueta de histidinas y como control positivo un péptido de VIH con etiqueta de histidinas purificado (donado por el Dr. Sergio Rosales).

4.5 Ensayos preliminares de inmunización

4.5.1 Inmunización oral de ratones Balb/c

Se utilizaron ratones Balb/c machos de 8-9 semanas de edad en todos los experimentos, todos ellos manipulados de acuerdo a las regulaciones federales mexicanas para el cuidado y experimentación con animales (NOM062-ZOO-1999, Ministerio de Agricultura, México).

Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos diferentes (n=5) y recibieron los siguientes tratamientos: 5 µg de la proteína producida en *E. coli* derivada de rBPns (grupo PTF); 5 µg de proteína purificada de hojas infiltradas por Magniffection (grupo PTF-M3'); 5 µg de la vacuna comercial Boostrix® (grupo BSX), y el vehículo solo (grupo PBS). A todos los grupos (a excepción de la vacuna comercial) se les administró la proteína purificada más 10 µg de protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* como adyuvante (Vázquez-Patrón et al., 1999a; b), dicha proteína fue donada por la Dra. Leticia Moreno. Cuatro dosis semanales fueron administradas vía oral alimentando a cada grupo los días 0, 7 14 y 21. Debido al que en resultados preeliminares se observaban respuestas bajas de producción de anticuerpos con la inmunización oral, con base en la experiencia del grupo de la Dra. Leticia Moreno, se administró un refuerzo intranasal el día 28 con la misma dosis de todos los antígenos administrados previamente. Los animales fueron sacrificados en el día 32 para recolectar muestras de suero y fluidos traqueopulmonares e intestinales (Fig. 9).

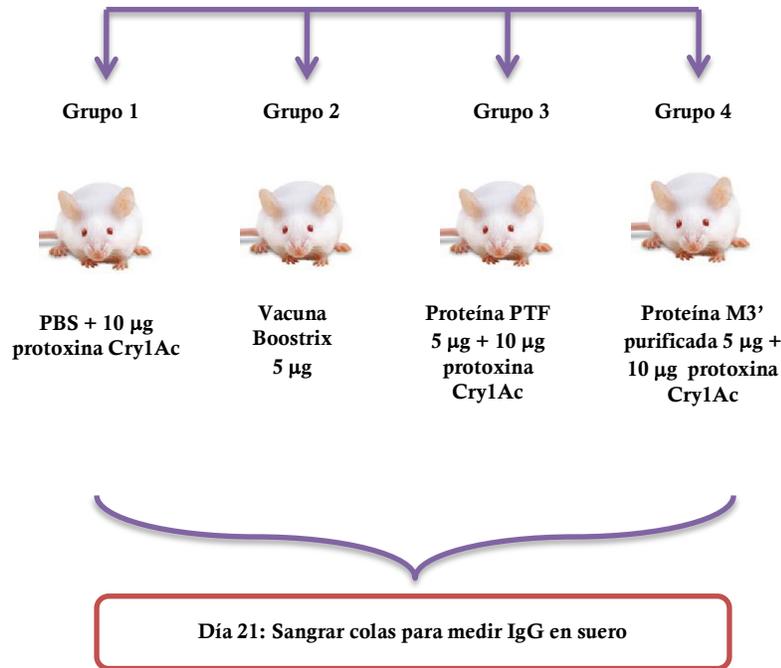


Figura 9. Esquema de inmunización de ratones Balb/c. Se administraron cuatro dosis, los días 0, 7, 14 y 21; el día 28 fueron sacrificados y se recolectaron muestras de suero y lavados traqueo-pulmonares.

4.5.2 Obtención de las muestras

Los ratones fueron anestesiados con cloroformo y se extrajo sangre por punción cardiaca. El suero se recuperó por centrifugación a 7,000 rpm por 10 minutos y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Para obtener los lavados traqueopulmonares, después de la obtención de la sangre se diseccionó al ratón exponiendo el aparato respiratorio; se introdujo una cánula en la tráquea, se llenaron los pulmones con 1 mL de PBS adicionado de 1 μL de cocktail inhibidor de proteasas (SIGMA P9599) y sin retirar la cánula se extrajeron 500 μL de PBS de los pulmones de cada ratón. Para los lavados gastrointestinales, se llenaron con 3 mL de PBS frío adicionado de 1 μL de cocktail inhibidor de proteasa. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm a 4°C por 10 minutos y almacenadas a -70°C hasta que fueron analizadas.

4.5.2.1 Determinación de los niveles de anticuerpos

Los niveles de anticuerpos en el suero, los fluidos pulmonares y lavados gastrointestinales fueron determinados por un ensayo de ligación

inmunoabsorbente (ELISA). Tras lo anterior, placas con 96 pozos se recubrieron con 1 μg de proteína PTF en 100 μg de buffer de bicarbonato-carbonato por pozo (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9.6). Las placas se incubaron toda la noche a 4°C y fueron lavadas tres veces con PBST (.05% v/v Tween-20 en PBS). Se realizó un bloqueo de sitios no específicos con 5% de leche descremada en PBS. El suero fue diluido 1:10 en PBS, los fluidos intestinales y traqueopulmonares fueron diluidos en PBS 1:2 y añadidos a los micropocillos. Se incubaron duplicados de cada muestra toda la noche a 4°C y fueron lavados tres veces con PBST. Los siguientes anticuerpos secundarios fueron utilizados: anticuerpo de fosfatasa alcalina de conejo anti-IgG o anti-IgA (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO) o anticuerpo IgG1 policlonal secundario de cabra en ratón y anticuerpo IgG2a policlonal secundario de cabra en ratón (Abcam, Cambridge, MA) las placas fueron incubadas por una hora a 37°C. Las placas fueron lavadas y se desarrolló respuesta enzimática con solución de sustrato siguiendo las instrucciones del fabricante (Agdia, <http://www.agdia.com>). Se registró el OD a 450 nm en un lector de microplacas (Microplate Reader 550, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los datos se analizaron por ANOVA de una sola vía ($P < 0.001$) con la prueba de comparación múltiple de Tukey (95% de confianza) y Graph Pad Prism (Version 9.1.0 -216) y Minitab Express (Version 1.5.1). Una $p < 0.001$ fue considerada estadísticamente significativa. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con letras diferentes. El tratamiento con mayor diferencia se muestra con la letra a.

5. RESULTADOS

La vacuna de la difteria, tos ferina y tétanos (DPT) es ampliamente utilizada en lactantes y niños en todo el mundo y ha reducido notablemente los casos reportados de estas enfermedades. Aunque su eficacia está bien documentada, se siguen reportando efectos secundarios y se han hecho esfuerzos para producir vacunas acelulares que reduzcan estos efectos indeseables, sin embargo, este tipo de vacunas son costosas debido al proceso de producción, el cual involucra sistemas de reactores de alto costo y procesos de purificación de proteínas recombinantes de bacterias.

La tos ferina está resurgiendo como un problema público de salud serio en muchas partes del mundo a pesar del extendido uso de la vacuna. Este hecho justifica el que se hagan más estudios relacionados con el entendimiento del proceso de infección y virulencia de *B. pertussis* así como las respuestas inmunes del huésped y la patogénesis de la enfermedad. El problema es especialmente agudo para los infantes ya que la enfermedad puede ser mortal para ellos. Nuevos estudios sobre la biología básica de las actividades del factor de virulencia y sobre la genética y evolución de cepas de *B. pertussis* revelan información potencialmente importante para consideraciones de vacunas. Estudios recientes también apuntan a nuevas estrategias terapéuticas potenciales para el tratamiento de la tos ferina pero con éxito limitado. Estos incluyen inmunización materna, vacunación en recién nacidos y estrategias de aislamiento. Cada una tiene sus límites debido a las restricciones o dificultades biológicas e inmunológicas para implementarlas de manera efectiva (Locht y Mielcarek, 2012).

Gracias al progreso de las técnicas de biología molecular, han sido desarrolladas nuevas estrategias para la producción de vacunas de subunidades en plantas, sobresaliendo empresas como Dow AgroScience, Ventria, MedicaGo, Fraunhofer y Bayer con los resultados más prometedores que proyectan que un futuro cercano podamos ver los productos en el mercado. Por otro lado, existen reportes a nivel laboratorio en los cuales se demuestra que al expresar genes sintéticos que codifican proteínas de origen bacteriano o viral diseñados para expresión en plantas, mejora considerablemente la expresión de la proteína heteróloga (Haq et al. 1995), así como que la expresión de epítomos relevantes en lugar de proteínas

completas reduce el riesgo de generar reacciones adversas, como en el caso de las vacunas de células completas (Yu y Landrige, 2001). Tomando en cuenta esto, y debido a que la tos ferina es considerada una enfermedad reemergente, en el presente trabajo se plantea la posibilidad de generar plantas transgénicas de tabaco con baja cantidad de nicotina, además de expresar de forma transitoria un gen sintético optimizado para plantas, el cual codifica un polipéptido, que contiene epítomos relevantes con probables propiedades inmunoprotectoras de los principales agentes de patogenicidad de *B. pertussis*, esto como fase inicial para el desarrollo de una vacuna comestible.

5.1 Diseño de genes sintéticos

Para seleccionar las regiones incluidas en los genes sintéticos, se eligieron los epítomos de la subunidad S1 de la toxina pertúsica (Askelof et al., 1990; Barbieri et al., 1992; Soria-Guerra et al., 2007), se seleccionaron los primeros 17 aminoácidos y 17 aminoácidos adicionales (posición 99-115); la toxina pertúsica es el factor de virulencia más importante de *B. pertussis*, el cual ha sido usado en las formulaciones de las vacunas acelulares contra la tos ferina. La toxina pertúsica es una de las proteínas bacterianas más complejas. Es una proteína multimérica compuesta por cinco sub unidades diferentes, nombradas de S1 a D5 de acuerdo con sus pesos moleculares decrecientes. Mientras que los genes que codifican las subunidades de la toxina están presentes en los genomas de *Bordetella parpertussis* y *Bordetella bronchiseptica*, sólo *B. pertussis* produce y secreta la toxina (Coutte y Locht, 2015). Por otro lado, también se utilizó el trabajo realizado por Zhao et al. (2008) en donde inmunizaron ratones con una proteína de fusión, la cual contenía el dominio inmunodominante tipo I de la FHA (465 pares de bases) y el dominio inmunogénico tipo II de la PRN (300 pares de bases), estas regiones fueron tomadas de *Bordetella bronchiseptica*, patógeno respiratorio Gram negativo que causa enfermedades en cerdos y perros, sin embargo, se utilizó en este trabajo debido a que análisis inmunológicos y de estructura de proteínas sugieren que las proteínas FHA de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* son similares y tienen un conjunto común de epítomos inmunogénicos. De tal forma que el gen diseñado incluye regiones de epítomos,

tanto los de la subunidad S1 de la toxina pertúsica, como la proteína de fusión de la FHA y la PRN. Se diseñaron dos genes en total, uno para transformación nuclear (BPsnMOD) y otro para transformación transitoria (BPsnM3'), ambos genes contenían espaciadores ricos en prolina (GPGPG), los cuales ayudan a mantener la estructura de los epítomos expuestos. Se colocaron sitios de restricción en los extremos 5' y 3' para *NcoI* y *SacI*, respectivamente para la clonación en los vectores de expresión de magnICON.

Para transformación nuclear, al gen BPsnMOD se le añadió una secuencia codificante de SEKDEL para la retención en el retículo endoplásmico ya que se ha reportado reducen la degradación de proteínas recombinantes y sitios de restricción para su clonación en el vector binario pBI121. Además cuenta con un péptido señal al retículo endoplásmico de *Nicotiana plumbaginifolia* (30 aminoácidos) probado por Lu et al. (2012) comprobando que gracias a este péptido señal y a la secuencia KDEL la estabilidad de la proteína recombinante era mayor. Esta estabilidad puede ser explicada por su localización en ER y consecuentemente es protegida por la actividad proteolítica encontrada a través de las vías secundarias en los espacios intracelulares y extracelulares.

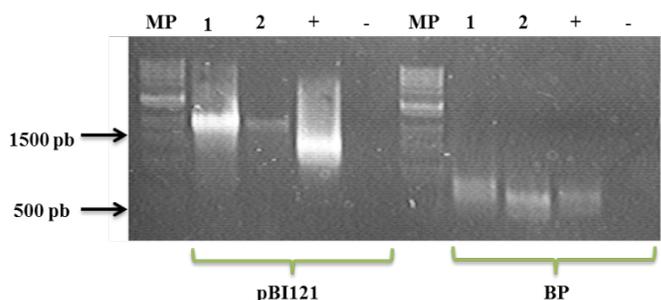
A ambas construcciones se les agregaron seis codones que codifican para histidina con la finalidad de permitir la purificación de la proteína recombinante, en el caso de BPsnM3' está en el extremo 5' y para BPsnMOD en el extremo 3', con la finalidad de saber si afecta la posición de la etiqueta en el procesamiento de la proteína, si hay degradación o no, y también se añadió a ambos genes un sitio de proteasa (TEV) que permite eliminar la etiqueta de histidinas una vez purificada la proteína. Sólo uno de los genes tiene la secuencia completa de la subunidad B de la toxina de cólera CTB como adyuvante, ya que se ha demostrado en diversos trabajos que es un potente adyuvante de mucosas (Thiam et al., 2015; Kim et al., 2016). Ambos genes se optimizaron para su expresión eficiente con base en el uso de codones en plantas y al análisis evitando secuencias desestabilizantes del ARNm, los genes fueron sintetizados por la compañía GenScript y mantienen la secuencia de aminoácidos de origen bacteriano. Trabajos previos han demostrado que los niveles

de proteínas aumentan de manera significativa después de optimizar la secuencia del gen (Rosales-Mendoza et al., 2007; Soria-Guerra et al., 2007).

5.1.2 Construcción para transformación nuclear

Las construcciones genéticas fueron clonadas en el vector pUC por la compañía GenScript. Una vez en el laboratorio, se disolvió el liofilizado y transformado por choque térmico en células competentes TOP 10 F' (Anexo I). Se realizó miniprep del cultivo obtenido y éste se digirió con las enzimas de restricción *Sma*I y *Sac*I para liberar la secuencia del gen BPsnMOD. A la par, el vector binario pBI121 fue digerido con las mismas enzimas con la finalidad de liberar el gen codificante de GUS. El vector binario pBI121 contiene el gen de selección *npt* II que confiere resistencia a kanamicina a las células vegetales transformadas, este gen está bajo el control del promotor 35S del virus del Mosaico de la Coliflor (35SCaMV). Después, tanto el vector digerido como el gen BPsnMOD liberado fueron purificados con el kit QIAquick (gel extracción de Qiagen), y de esta manera se procedió a la ligación de los mismos. Se obtuvieron 2 posibles clonas, a las cuales se les realizaron análisis de PCR con oligonucleótidos que alinean dentro del vector binario y otro con oligonucleótidos que se alinean dentro del gen sintético, en ambos análisis se mostró el amplicón esperado, de aproximadamente 1,564 pares de bases para el primer PCR y de 544 para el segundo PCR (Fig. 10a), y también análisis de restricción con las enzimas *Sac*I y *Sma*I, donde se muestra el fragmento liberado del gen BPsnMOD, pero en este caso solo fue para la clona 1 (Fig. 10b).

a)



b)

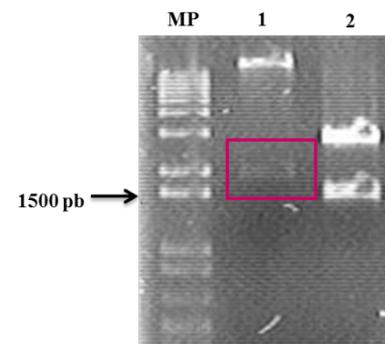


Figura 10. Análisis de PCR y digestión de muestras de ADN para verificar la construcción PBI121BPsnMOD. a) Se muestran 2 análisis de PCR, en el primer caso, se utilizaron los oligonucleótidos que alinean dentro de pBI121, y en el segundo, se utilizaron los oligonucleótidos que alinean dentro del gen sintético. b) Se muestra la digestión de las colonias 1 y 2 con las enzimas *SacI* y *SmaI*. MP. Marcador de peso molecular 1Kb; 1. Colonia 1; 2. Colonia 2; +. Control positivo (plásmido pBI121-BPsnMOD); -. Control negativo.

5.1.3 Clonación del gen BPsnM3' en el vector pICH11599

Con el fin de poder expresar el gen BPsnM3' utilizando la tecnología magnICON, se diseñó el gen para la expresión nuclear con codones de uso preferencial para su expresión en citoplasma. Se realizó la digestión del vector pICH11599 de la técnica de Magniffection, conocido como módulo 3', con *NcoI* y *SacI* y al mismo tiempo se digirió también el gen BPsnM3' con ambas enzimas, y se procedió a ligar los productos digeridos. De 3 clonas que se obtuvieron, se realizó PCR para verificar cuál de las clonas era la que nosotros esperábamos, utilizando los oligonucleótidos que se alinean dentro del gen sintético (Fig. 11).

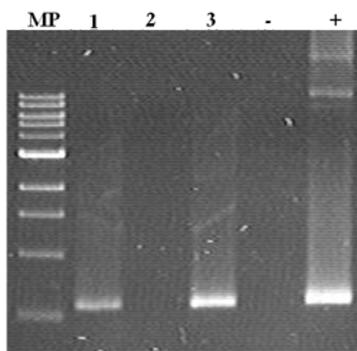


Figura 11. Análisis de los productos de amplificación por PCR de las clonas con la construcción pICH-BPsnM3' con oligonucleótidos que se alinean dentro del gen sintético. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb; 1-3: Posibles clonas; -: Control negativo; +: Control positivo (plásmido pUC-BPsnM3').

5.2 Purificación de la proteína PTF de *E. coli*

Para contar con un control positivo de nuestra proteína recombinante decidimos expresarla en bacteria. El gen BPsnM3' se optimizó para el uso de codones en cloroplasto, con el fin de que éste pudiera ser expresado en el modelo bacteriano. Dicho gen se clonó en el vector pET28b, generándose la construcción rPBns. Se obtuvieron 5 clonas y se les realizó un análisis de restricción con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. Solo una clona mostró el perfil de restricción esperado, dicha clona se envió

a secuenciar y fue utilizada para la transformación de la cepa BL21 de *E. coli*. Dicha cepa fue inducida con IPTG en una concentración de 1mM por toda la noche a 37°C. Se tomaron alícuotas de las bacterias totales antes y después de la inducción y posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales de bacteria para su separación por electroforesis en un gel SDS-PAGE para ver si existía alguna banda diferencial del peso molecular esperado de la proteína recombinante de aproximadamente 33 kDa, la cual pudo identificarse como se muestra en la Figura 12.

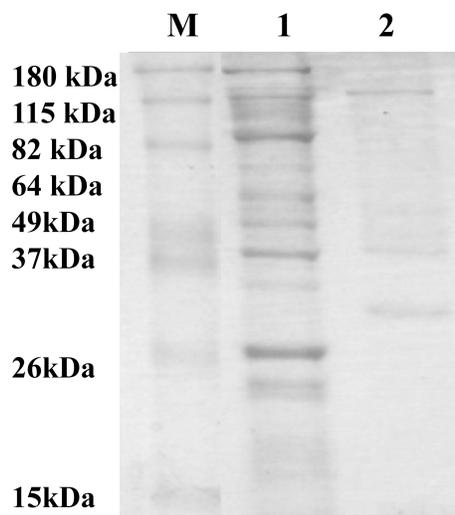


Figura 12. Producción y detección de la proteína PTF purificada de *E. coli*. La proteína PTF purificada de *E. coli* se visualizó mediante SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Carriles: **M**, marcador de peso molecular pre-teñido BenchMark™; **1**, control negativo (proteína soluble total de *E. coli* no transformada); **2**, proteína PTF purificada.

Para corroborar que se trataba de la proteína de interés (llamada PTF), se realizó un análisis de Western blot, utilizando un anticuerpo primario dirigido a la etiqueta de histidinas y se utilizaron diferentes volúmenes del extracto total de las bacterias inducidas (Fig. 13).

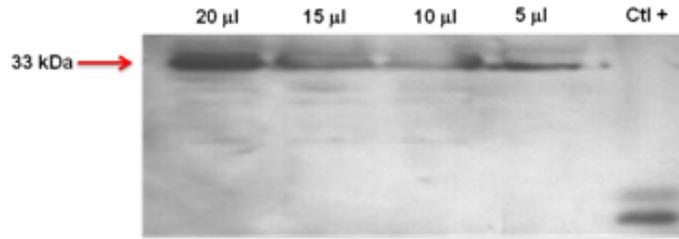


Figura 13. Análisis de Western blot para la detección de la proteína PTF en *E. coli*. El control positivo es un péptido de VIH con etiqueta de histidinas donado por el Dr. Sergio Rosales.

Con los resultados obtenidos en el análisis Western blot de las bacterias, se realizó la purificación de la proteína por medio de una resina de Níquel. La proteína purificada fue cuantificada por el método de Bradford, obteniéndose una concentración final de 0.79 µg/µL.

A la proteína purificada se le realizó un ensayo de Western blot, utilizando un anticuerpo primario dirigido a la etiqueta de histidinas, en este caso utilizando como control positivo un péptido purificado de VIH con etiqueta de histidinas, proporcionado por el Dr. Sergio Rosales. En cada pozo se cargaron las fracciones obtenidas de la proteína purificada, y se cargaron 2 mg/mL por pozo (Fig. 14).

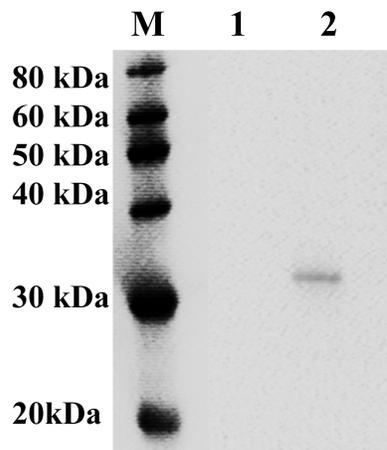


Figura 14. Presencia de la proteína PTF recombinante purificada. Se determinó mediante análisis de Western blot usando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la etiqueta de histidinas. Carriles: **1**, control negativo (proteína soluble total de *E. coli* no transformada); **2**, proteína PTF purificada.

5.3 Transformación genética de plantas

5.3.1 Transformación nuclear de tabaco vía *Agrobacterium tumefaciens*

La estandarización de la regeneración de plantas de tabaco fue realizada con anterioridad por Martínez-González (2005). La infección de hojas de tabaco con los plásmidos binarios se realizó como se describe en la metodología. Las hojas de tabaco infectadas con el plásmido pBI121-BPsnMOD se colocaron en medio de selección (RMOP) hasta la formación de callo y brotes organogénicos. Sólo se llegó a la formación de callo, aún no se sabe si esto se debe a que la variedad de tabaco que utilizamos en este trabajo fue con bajo nivel de alcaloides, probablemente y la proteína recombinante afecta la regeneración de la planta, ya que no fue posible obtener brotes (Fig. 15).

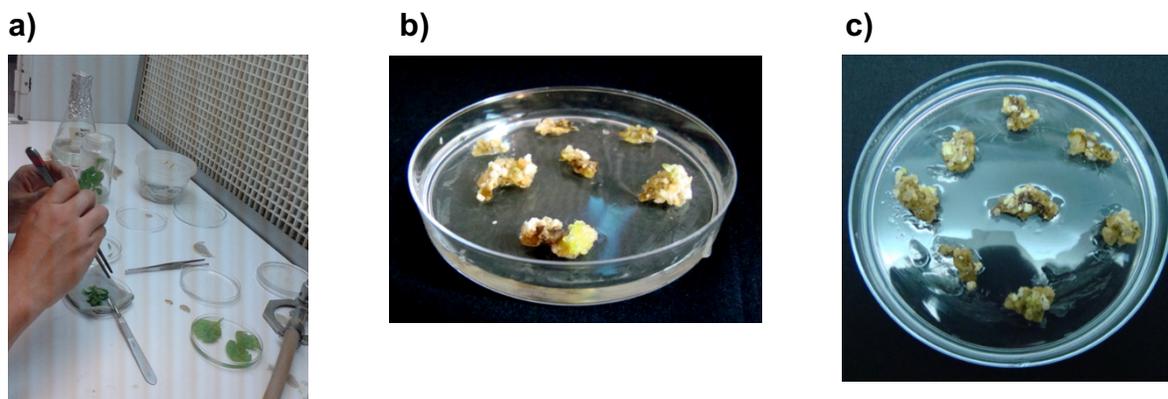


Figura 15. Transformación de hojas de tabaco con baja cantidad de nicotina. a). Corte de hojas de tabaco e infección de las mismas con *Agrobacterium* conteniendo el plásmido pBI121-BPsnMOD. b). Callos a las 4 semanas post-infección en medio RMOP. c). Control negativo.

5.3.2 Expresión transitoria de GFP con la metodología de “Magniffection” en *Nicotiana tabacum*

En nuestro grupo de trabajo, Omar Patiño estandarizó la técnica de Magniffection, realizando primero la infiltración de plantas de tabaco utilizando como gen reportero la proteína verde fluorescente (GFP). En reportes previos se había usado la especie *benthamiana* pero contábamos con la variedad de *N. tabacum* que produce un bajo nivel de alcaloides (Menassa et al., 2007), y fue utilizada anteriormente por Omar Patiño para producir una proteína antigénica por transformación transitoria, por lo

que seguimos ese protocolo detallado a continuación: se utilizaron plantas de aproximadamente 6 semanas y se infiltraron en una ocasión durante 45-60 segundos con la suspensión de *Agrobacterium* con los tres módulos (módulo 3', módulo 5' y módulo integrasa), usando el módulo 3' que tiene el gen reportero (pICHGFP). Se evaluaron los resultados de la infección a los 7 días posteriores (d.p.i), y los resultados se muestran en la Figura 16.

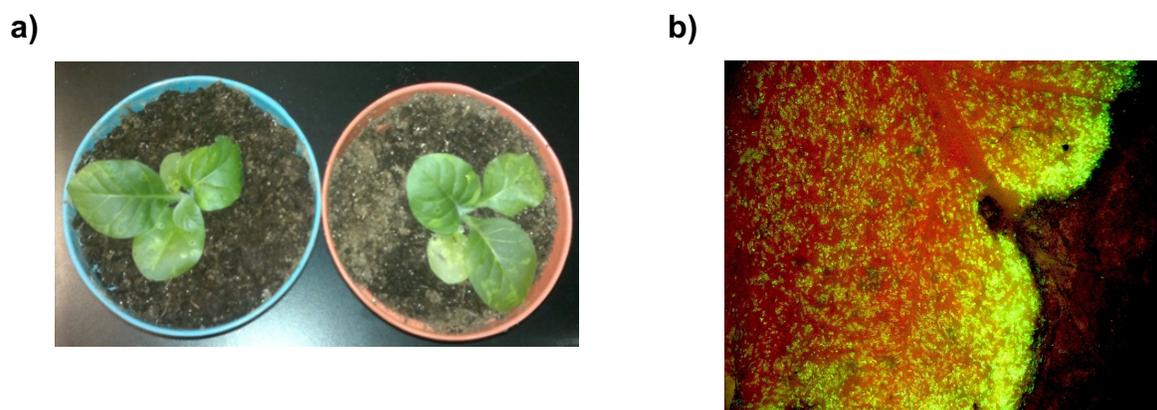


Figura 16. Transformación transitoria de *N. tabacum* con el gen reportero (GFP). a) Tabacos de 6 semanas de edad agroinfiltrados. b) Expresión de GFP en hojas de tabaco 7 dpi expuestas a luz UV.

Es importante probar un gen reportero, ya que puede dar una idea del tiempo en el cual se debe cosechar el material con la proteína recombinante. Se ha observado que dependiendo del vector viral, tipo de bomba de vacío o cámaras de infiltración, los tiempos de cosecha pueden variar de 3 a 10 días post infiltración. Con base en esto y comprobando que el sistema utilizado funcionaba, se procedió a agroinfiltrar plantas de tabaco con bajo nivel de alcaloides con la construcción pICHBPs_n-M3'. Se cosecharon las hojas a los 5 y 7 días posteriores a la infección, se congelaron y liofilizaron. Con las hojas liofilizadas y pulverizadas, se realizó la extracción de proteína soluble total (ver Anexo I). Se realizó un gel SDS-PAGE para verificar alguna banda diferencial con respecto a la planta sin transformar, para ello se cuantificó por el método de Bradford el extracto soluble del tejido liofilizado de las plantas agroinfiltradas y de una planta silvestre tomando aproximadamente 20 µg de proteína y se corrieron en un gel al 16%. Los resultados se muestran en la Fig. 17 y como se puede observar, se presenta una banda diferencial del mismo peso

molecular que la proteína PFT de bacteria utilizada como control positivo (aprox 33 kDa).

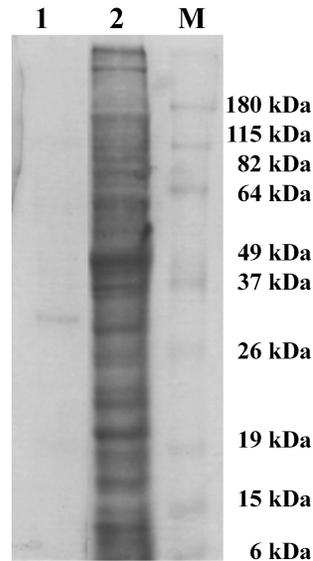


Figura 17. SDS-PAGE de extractos de proteína soluble total de tabacos infiltrados 7 días post-infección. 1: Elución con imidazol 500 μ M de la construcción BPsM3'. 2: Extracto de planta wild type. MP: Marcador de peso molecular.

Esto demuestra la posible presencia de la proteína recombinante en los extractos de las plantas agroinfiltradas, sin embargo, para corroborar su presencia es necesario realizar los ensayos de Dot blot y Western blot.

5.4 Dot blot

Con el fin de demostrar que la banda diferencial que fue observada en el SDS-PAGE correspondía a la proteína de interés, se realizó un ensayo de dot blot de los extractos de proteína soluble total a los 5 y 7 días post-infección (5D y 7D, respectivamente), utilizando como anticuerpo primario uno dirigido a la etiqueta de histidinas, ya que la construcción BPsM3' cuenta con esta etiqueta, y en ambos casos se pudo observar la presencia de la proteína presentándose la reacción similar al control positivo, en este caso se utilizó la proteína PTF purificada de bacteria (Fig. 18).

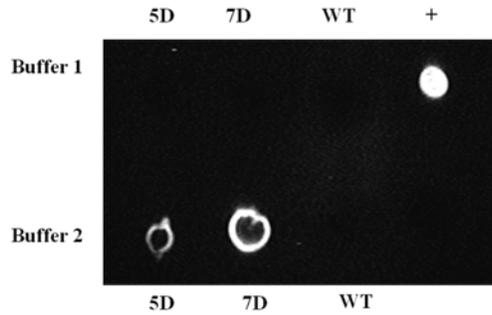


Figura 18. Dot blot de extractos de proteína total soluble de plantas transformadas con la construcción pICHBPsnM3', utilizando 2 buffers diferentes. El control positivo es la proteína PTF purificada de bacteria.

Para la extracción de la proteína soluble total, se utilizaron 2 buffers diferentes para determinar cuál de los 2 era el más efectivo, y con el ensayo anterior se comprobó que la mejor opción fue el buffer 2. Los componentes de los buffer se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición de los buffers utilizados para la extracción de la proteína soluble total de las hojas agroinfiltradas liofilizadas.

Buffer 1	Buffer 2
Fosfato de sodio 50 mM	PBS
Tritón 0.1%	Tritón 0.1%
EDTA 10 mM	Coctel inhibidor
β -mercaptoetanol 5mM	

5.5 Western blot

El análisis de Dot blot descrito con anterioridad no solo confirma la presencia de la proteína heteróloga que veíamos como banda diferencial en el SDS-PAGE, además nos indica que nuestra proteína puede ser reconocida por un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta de histidinas; en otras palabras, que es antigénica. Sin embargo, para confirmar esto, realizamos un análisis de Western blot a los extractos, utilizando el mismo anticuerpo primario que se usó en el Dot blot. En la Fig. 19 podemos ver el extracto utilizado es positivo para este ensayo.

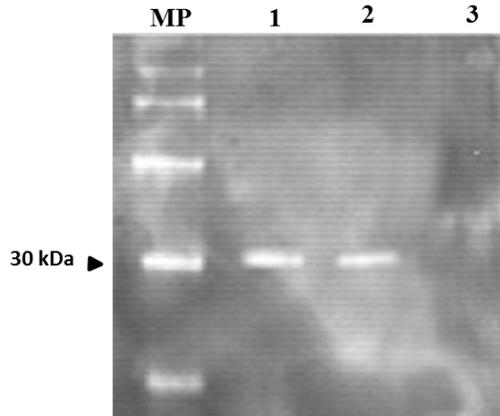


Figura 19. Western blot de extractos de proteína soluble total de plantas agroinfiltradas 7 días postinfección. MP: Marcador de peso molecular. 1: Proteína PTF purificada. 2: Extracto de plantas transformadas con pICHBPsnM3'. 3: Extracto de planta wild type.

Además, se realizó un ELISA para estimar la concentración y el rendimiento de proteína recombinante (Fig. 20), obteniendo 0.443 mg de PTF-M3' por mL y un rendimiento de 0.0739 mg de proteína por g de peso fresco. Es una cantidad similar de proteína recombinante producida en un protocolo mejorado para obtener niveles altos en *E. coli* (Sivashanmugam et al., 2009) y también similar a las producidas por Regnard et al. (2010) utilizando un vector derivado de geminivirus de replicación autónoma. Por lo tanto, nuestra estrategia de transformación puede ser un enfoque prometedor para producir buenos niveles de proteínas recombinantes.

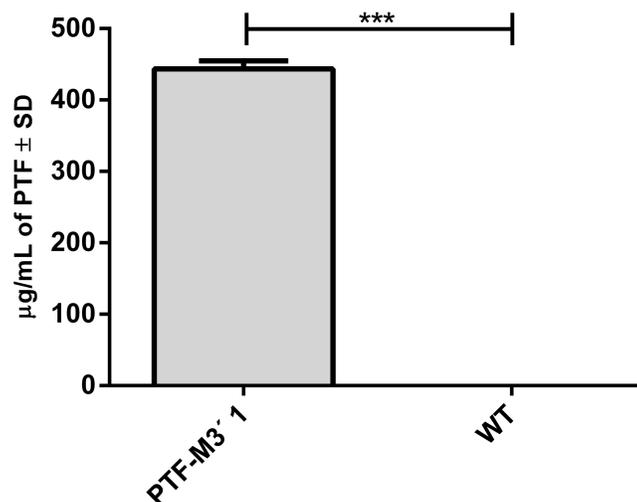


Figura 20. Cuantificación de la proteína PTF-M3' de planta por ELISA. La proteína PTF-M3' eluída en 500 mM de Imidazol y la proteína soluble total de planta wild type fueron analizados con un anticuerpo anti-histidina.

PTF-M3' 1, proteína PTF-M3' de planta; WT, extracto de la planta wild type. Los resultados muestran las medias de las desviaciones estandar \pm (SD) de tres ensayos diferentes. Los resultados fueron analizados por la prueba t, donde es estadísticamente significativo ($P < 0.05$) (**=0.001).

5.6 Purificación de proteína recombinante producida por la técnica de Magniffection (proteína M3')

Una vez determinada la presencia de las proteínas en estos extractos, se procedió a la purificación de dicha proteína a través de una resina de níquel por medio de un protocolo previamente utilizado, Ortega-Berlanga (2015). En dicho protocolo se utilizan 3 diferentes concentraciones de imidazol (100, 300 y 500 mM) para eluir la proteína purificada, por lo que se tenían 3 eluidos de proteína purificada. Se cuantificó la proteína y se realizaron ensayos de SDS-PAGE así como ensayos de Western blot, para éste se utilizó como anticuerpo primario uno dirigido contra la etiqueta de histidinas y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y como control positivo la proteína PTF purificada de bacteria; la membrana se reveló por quimioluminiscencia y en ambos ensayos se observó que en la elución de 500 μ M se encontraba la proteína PTF-M3' purificada (Fig. 21).

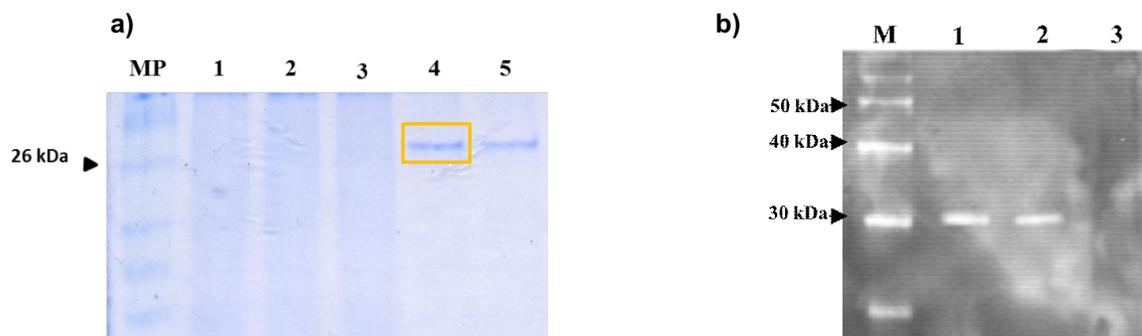


Figura 21. Análisis de las eluciones de la proteína PTF-M3' purificada en resina de níquel. a). SDS-PAGE de las eluciones, teñido con azul de Coomasie. MP: Marcador de peso molecular. 1: Extracto de planta wild type. 2: Elución 100 μ M. 3: Elución 300 μ M. 4: Elución 500 μ M. 5: Proteína PTF purificada de bacteria b) Western blot de extractos de proteína purificada de plantas agroinfiltradas 7 días post-infección. MP: Marcador de peso molecular. 1: Proteína PTF purificada. 2: Elución 500 μ M de imidazol de la construcción BPnsM3'. 3: Extracto de planta wild type.

5.6.1 Ensayos de inmunogenicidad por vía oral en ratones Balb/c de la proteína M3' purificada

Con el objetivo de comprobar la inmunogenicidad *in vivo* de la proteína PTF-M3' se realizaron estudios inmunológicos en donde se evaluó la producción de anticuerpos

IgG, IgA, y los isotipos IgG2a e IgG1 en muestras de suero, lavados traqueopulmonares y gastrointestinales obtenidos de ratones macho Balb/c de 8-9 semanas de edad a los que se les administró por vía oral la proteína PTF-M3' purificada y como control positivo se utilizó la proteína PTF purificada de bacteria. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos diferentes (n=5) y recibieron los siguientes tratamientos: 5 µg de la proteína producida en *E. coli* derivada de rPBns (grupo PTF); 5 µg de proteína purificada de hojas infiltradas por Magniffection (grupo PTF-M3'), en ambos grupos, las proteínas purificadas fueron coadministradas con 10 µg de protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* donada por la Dra. Leticia Moreno, como agente adyuvante de mucosas; 5 µg de vacuna comercial Boostrix® (grupo BSX), y el vehículo más 10 µg de protoxina Cry1Ac (grupo PBS). Cuatro dosis semanales fueron administradas oralmente a cada grupo en los días 0, 7, 14, y 21. El día 28 se administró una dosis adicional por vía intranasal con la misma dosis de todos los antígenos administrados previamente. Los animales fueron sacrificados el día 32 para recolectar muestras de suero y de fluidos traqueopulmonares e intestinales (Fig. 22).

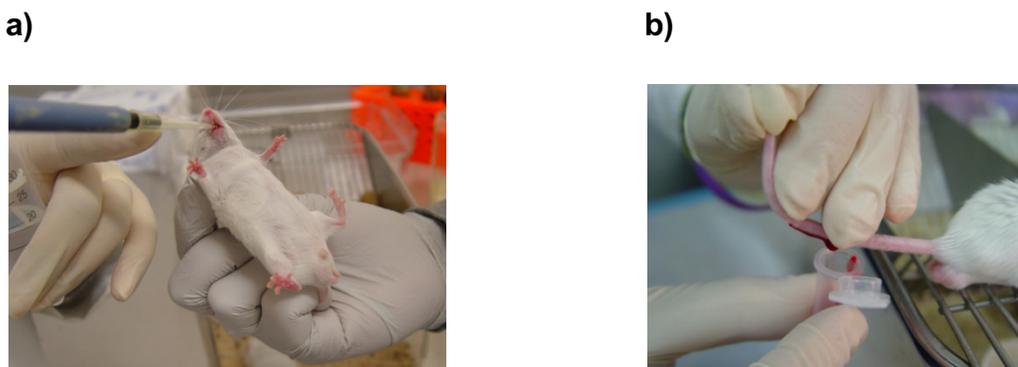


Figura 22. Experimento de inmunización con ratones Balb/c. a) Inmunización vía oral con micro pipeta, se muestra la manera correcta de manipular al ratón. b) Sangrado de las colas para la colecta de muestras de suero.

5.7 Determinación de los niveles de anticuerpos séricos

Para evaluar la respuesta inmune sérica de las proteínas purificadas recombinantes PTF y PTF-M3', se alimentó a los ratones con dichas proteínas. Los ratones fueron inmunizados utilizando cuatro dosis orales y una dosis intranasal tanto del vehículo

sólo (PBS) o con las proteínas purificadas, todas coadministradas con 10 µg de protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* como adyuvante de la mucosa. Los sueros fueron analizados por ELISA indirecto en una dilución 1:50 y se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. Como se observa en la Figura 23, los ratones inmunizados con la proteína PTF-M3', la vacuna comercial Boostrix® y la proteína PTF de bacteria, generaron respuesta de IgG en suero, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en comparación con el vehículo solo. Es importante resaltar que la respuesta más alta se observó con la proteína PTF-M3' de planta.

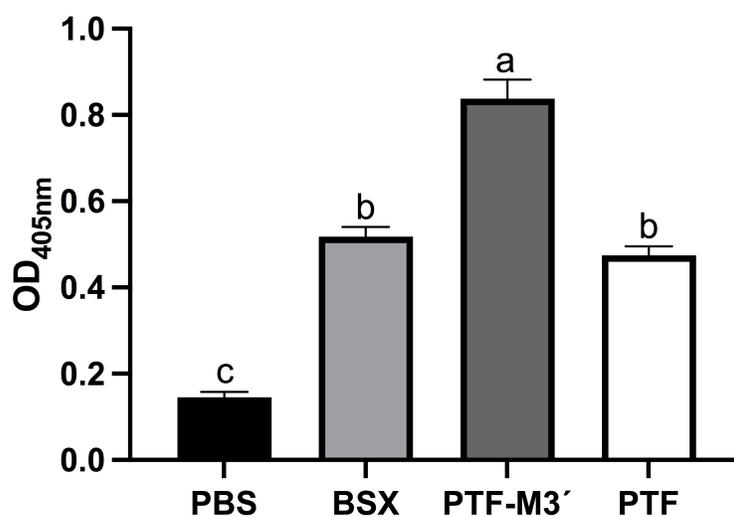


Figura 23. Respuestas séricas de anticuerpos contra la proteína PTF. Se administraron cuatro dosis semanales de la vacuna Boostrix® (5 µg, BSX), la proteína purificada de hojas infiltradas por Magniflection (5 µg, PTF-M3'), la proteína producida en *E. coli* (5 µg, PTF) y el vehículo solo (PBS), fueron administrados en ratones Balb/c por vía oral y un refuerzo intranasal. A los grupos PTF y PTF-M3' se les administraron 10 µg de la protoxina Cry1AC de *Bacillus thuringiensis* como adyuvante. Los niveles de anticuerpos IgG fueron determinados por ELISA en muestras de suero diluidas 1:10. Se muestra la media de los valores leídos a 405 nm, de cada grupo (n = 5). Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron con un análisis de ANOVA de una vía ($P < 0.001$) con la prueba de comparación múltiple de Turkey (95% de confianza). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas por diferentes letras. El tratamiento con diferencia mayor se muestra con la letra a.

5.8 Determinación de los niveles de anticuerpos en lavados traqueo pulmonares

Los lavados traqueo pulmonares se analizaron en una dilución 1:2. Los valores de IgG para lavados traqueo pulmonares fueron bajos y solo se observó diferencia respecto a PBS en la muestra con la proteína recombinante del extracto de plantas

(Fig. 24a). En el caso de IgA en los fluidos traqueopulmonares de ratones inmunizados con la vacuna Boostrix[®], PFT-M3' y PFT vía oral, fueron estadísticamente significativos respecto a PBS ($P < 0.05$) (Fig. 24b).

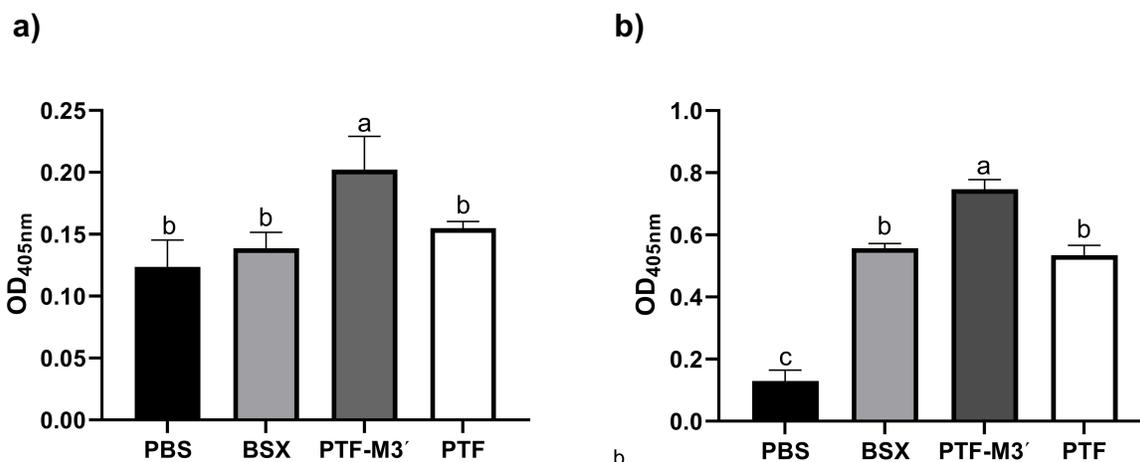


Figura 24. Respuesta de anticuerpos en pulmones. Se administraron cuatro dosis semanales de la vacuna Boostrix[®] (5 µg, BSX), la proteína purificada de hojas infiltradas por Magniffection (5 µg, PTF-M3'), la proteína producida en *E. coli* (5 µg, PTF) y el vehículo solo (PBS), fueron administrados en ratones Balb/c por vía oral y un refuerzo intranasal. A los grupos PTF y PTF-M3' se les administraron 10 µg de la protoxina Cry1AC de *Bacillus turingensis* como adyuvante. Los niveles de anticuerpos a) IgG y b) IgA fueron determinados por ELISA en lavados intestinales en una dilución 1:2. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron con un análisis de ANOVA de una vía ($P < 0.001$) con la prueba de comparación múltiple de Turkey (95% de confianza). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas por diferentes letras. El tratamiento con diferencia mayor se muestra con la letra a.

5.9 La respuesta de IgA e IgG a la proteína purificada PTF-M3' fue más evidente en los lavados gastrointestinales

En los lavados gastrointestinales, la respuesta de los anticuerpos IgG e IgA fue estadísticamente significativa en todos los tratamientos, en comparación con el grupo PBS ($P < 0.05$; Fig. 25). La respuesta de IgA fue considerablemente más elevada que la obtenida para IgG, y en estos fluidos, la respuesta mayor se dio en animales inmunizados con PTF-M3'.

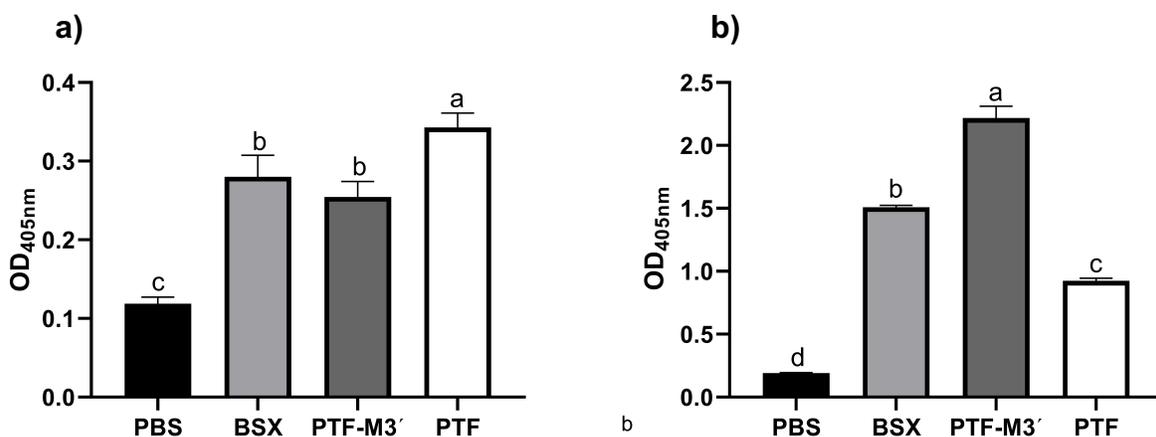


Figura 25. Respuesta de anticuerpos en lavados gastrointestinales. Se administraron cuatro dosis semanales de la vacuna Boostrix® (5 µg, BSX), la proteína purificada de hojas infiltradas por Magniflection (5 µg, PTF-M3'), la proteína producida en *E. coli* (5 µg, PTF) y el vehículo solo (PBS), fueron administrados en ratones Balb/c por vía oral y un refuerzo intranasal. A los grupos PTF y PTF-M3' se les administraron 10 µg de la protoxina Cry1AC de *Bacillus thuringiensis* como adyuvante. Los niveles de anticuerpos a) IgG y b) IgA fueron determinados por ELISA en lavados intestinales en una dilución 1:2. Se muestra la media de los valores leídos a A405 nm de cada grupo (n = 5). Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron con un análisis de ANOVA de una vía (P<0.001) con la prueba de comparación múltiple de Turkey (95% de confianza). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas por diferentes letras. El tratamiento con diferencia mayor se muestra con la letra a.

5.10 Determinación de los isotipos IgG1 e IgG2a

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

Se sensibilizaron placas de ELISA con la proteína PTF purificada de bacteria, se agregó el suero de los ratones inmunizados con todos los antígenos y se utilizaron como anticuerpos secundarios los subtipos IgG1 e IgG2a conjugados con fosfatasa alcalina.

Anticuerpos específicos IgG1 (Fig. 26 barras grises) e IgG2a (Fig. 26 barras oscuras) fueron observados en ratones inmunizados con todos los antígenos mostrando diferencias estadísticamente significativas en comparación con el vehículo solo (P<0.05). Basados en las absorbancias, se observó un balance entre los dos isotipos (valores similares) sugiriendo un balance en la respuesta Th1/Th2, lo cual es recomendable ya que no se exacerbaría una respuesta tipo Th2 causando eosinofilia. Además, los resultados indican que la inmunización oral de PTF y PTF-M3' fue inmunogénica para los animales evaluados y ligeramente en mayor cantidad

que la vacuna comercial. La respuesta más alta se observó en los ratones inmunizados con la proteína PTF-M3' producida en plantas.

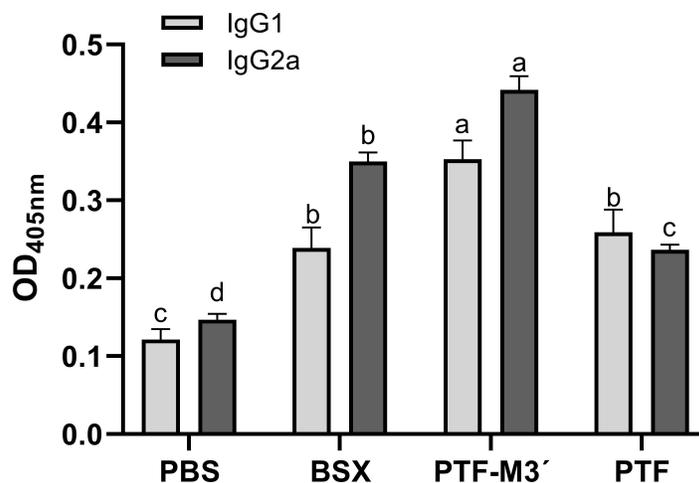


Figura 26. Respuesta de isotipos IgG1 e IgG2a en suero. Se administraron cuatro dosis semanales de la vacuna Boostrix® (5 µg, BSX), la proteína purificada de hojas infiltradas por Magniffection (5 µg, PTF-M3'), la proteína producida en *E. coli* (5 µg, PTF) y el vehículo solo (PBS), fueron administrados en ratones Balb/c por vía oral y un refuerzo intranasal. A los grupos PTF y PTF-M3' se les administraron 10 µg de la protoxina Cry1AC de *Bacillus turingensis* como adyuvante. Los niveles de isotipos de IgG fueron determinados por ELISA en suero en una dilución 1:10. Se muestra la media de los valores leídos a A405 nm de cada grupo (n = 5). Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron con un análisis de ANOVA de una vía (P<0.001) con la prueba de comparación múltiple de Turkey (95% de confianza). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas por diferentes letras. El tratamiento con diferencia mayor se muestra con la letra a.

6. DISCUSIÓN

Aunque la tos ferina es una enfermedad que se puede prevenir por medio de la vacunación y que hace 60 años se inició la vacunación masiva contra esta enfermedad, sigue habiendo dificultades para llevar a cabo un control adecuado de la misma. En particular las vacunas de células completas o las acelulares utilizadas actualmente proporcionan una buena protección contra la tos ferina grave y típica, pero su protección es menor contra una tos leve contagiosa, lo que sugiere que aunque la vacunación prevenía la enfermedad o al menos sus manifestaciones más graves, la transmisión de la infección continuó. Así como pasa después de la infección natural, la inmunidad de la vacunación disminuye (más rápido para las vacunas acelulares que para las vacunas de células completas) y la protección contra la transmisión de infección es menos completa que contra las manifestaciones más graves de la enfermedad (Dorji et al., 2018).

Las vacunas contra la tos ferina han llevado a una disminución de casos durante muchos años desde la introducción de la inmunización generalizada. Sin embargo, un aumento notable en la incidencia de la tos ferina fue detectado en muchos países desde el 2004. En particular del 2006 hasta 2015 la mayoría de los casos de tos ferina reportados fueron en niños de menos de 1 año de edad, pero se ha observado un incremento en todos los grupos de edad (Hozbor et al., 2019). A pesar de que las vacunas de células completas y las acelulares han demostrado ser seguras y eficaces, ninguna proporciona una protección inmune de larga duración o una protección inmune de por vida contra la tos ferina (Akinola et al., 2019).

Por otro lado, aunque se ha detectado un incremento en el número de casos en adolescentes, la vigilancia en este grupo de edad sigue siendo inadecuada, por lo tanto no está claro si la administración de refuerzos en adolescentes son importantes.

Para reducir el número de casos en lactantes, la inmunización materna ha sido introducida en muchos países durante la última década. Esta estrategia ha tenido un impacto no solo en la reducción del número de casos, sino también en el número de muertes causadas por la enfermedad (Kandeil et al., 2019).

Las deficiencias de las vacunas acelulares actuales aumentan la necesidad de generar vacunas de tercera generación contra la tos ferina. Por lo tanto, se propuso en este trabajo la posibilidad de generar una vacuna de subunidades con epitopos relevantes adicionales a los ya reportados, que pudieran conferir propiedades antigénicas e inmunogénicas y probablemente inmunoprotectoras basados en los principales determinantes de patogenicidad de *B. pertussis* y al considerar solo regiones de epítopos, se evitarán reacciones secundarias. Adicionalmente el uso de una nueva plataforma como las plantas para producir proteínas antigénicas, nos puede servir para demostrar la prueba de concepto, ésto como fase inicial del desarrollo de una vacuna comestible.

Las vacunas producidas en plantas transgénicas mediante vectores virales, representan una nueva plataforma (biorreactor) para producir proteínas recombinantes, que combina la ingeniería genética vegetal, el uso de vectores virales que en poco tiempo producen altos contenidos de proteínas, y la gran cantidad de biomasa de las plantas. En comparación con las vacunas tradicionales, las vacunas en plantas tienen ventajas significativas como bajo costo, mayor seguridad y mayor efectividad (Guan et al., 2013).

En este trabajo se diseñaron dos genes con epitpos antigénicos de *B. pertussis* y se expresó uno transitoriamente en plantas y también de forma estable en bacteria. Se utilizó la tecnología de transformación transitoria magnICON para la producción de proteínas recombinantes de *B. pertussis*, utilizando plantas de *N. tabacum* 81V9 como biorreactor por estar entre los candidatos más efectivos para la producción de proteínas recombinantes debido a propiedades como tasa de crecimiento, rendimiento de biomasa de la hoja, alto nivel de proteínas solubles y bajo contenido de alcaloides, además se utilizó transformación estable de tabaco para sistemas de expresión nuclear en donde no hay necesidad de una purificación posterior de la proteína recombinante (Gutiérrez et al., 2013; Kolotinin et al., 2013).

Los vectores virales entregados por transferencia agrobacteriana del T-ADN, se han convertido a su vez en importantes fuentes de investigación. La estrategia plantea utilizar a *Agrobacterium* como un vector para entregar copias de ADN de una o más réplicas virales; las bacterias son llevadas a las hojas mediante infiltración al vacío,

la maquinaria bacteriana se hace cargo de la transferencia de T-ADN al núcleo de la planta y la recombinación *in vivo* y procesamiento de intrones produce una gran cantidad de ARN y posteriormente la propagación de célula a célula de las réplicas (Gleba et al., 2005). Este sistema de transformación transitoria es rápido en comparación con los sistemas de transformación estables ya que requiere de sólo 10-15 días para obtener plantas transformadas en lugar de meses.

Las respuestas humorales detectadas en los ratones, tanto a nivel de mucosa y sistémico, demostraron que la administración de la proteína recombinante PTF-M3' producida transitoriamente en las hojas de tabaco con el sistema magnICON es inmunogénica, incluso más que la vacuna comercial Boostrix®, por ende, podría utilizarse para originar anticuerpos neutralizantes en futuros estudios.

Las propiedades inmunoadyuvantes de la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* se han demostrado con anterioridad (Vázquez-Padrón et al., 1999a; Vázquez-Padrón et al., 1999b; González-González et al., 2015) por lo que fue incluida en el esquema de inmunización, por otro lado se incluyeron cuatro dosis orales y un quinto refuerzo intranasal debido a que hay reportes que este tipo de refuerzos puede potenciar la respuesta inmune vs enfermedades de mucosas (Moreno-Fierros et al., 2003; Birkhoff et al. 2009; Lobaina-Mato, 2019).

Los resultados sugieren que las proteínas recombinantes PTF-M3' producida en tabaco y PTF producida en bacteria, indujeron respuestas específicas de anticuerpos en suero, mucosas respiratorias y gastrointestinales en ratones. Para determinar inmunoprotección con este tipo de vacuna sería necesario evaluar las respuesta y supervivencia animal inmunizado con la proteína recombinante ante un reto letal con *B. pertussis*.

7. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demuestran que:

- 1) Es posible mediante transformación transitoria producir en tabaco y purificar la proteína recombinante (PTF-M3') que contiene epítomos vacunales relevantes de *B. pertussis*.
- 2) La proteína PTF-M3' administrada vía oral a ratones Balb/c es inmunogénica.
- 3) Los ratones inmunizados con la proteína PTF-M3' desarrollan niveles mayores de inmunoglobulinas séricas que los inmunizados con la vacuna comercial y los inmunizados con la proteína producida en bacterias.

8. REFERENCIAS

- Álvarez ML, Cardineau GA (2010). Prevention of bubonic and pneumonic plague using plant-derived vaccines. *Biotechnology Advances*. 28: 184-196.
- Akinola F, Muloiwa R, D Hussey G, Dirix V, Kagina B, Amponsah-Dacosta E (2019). Assessment of humoral and cell-mediated responses to pertussis vaccination: a systemic review protocol. *BMJ Open*. 1-6.
- Anjali A, Vignesh G, Keerthana RN, Rathinasabapathi P (2016). New strategies toward edible vaccines: An overview. *Journal of Dietary Supplements*. 1-16
- Aoyama T, Takeuchi Y, Goto A, Iwai H, Murase Y, Iwata T (1992). Pertussis in adults. *Am J Dis Child*. 146:163-166.
- Askelof P, Rodmalm K, Wrangsell G, Larsson U, Svenson S, Cowell J, Bartfais T (1990). Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of *Bordetella pertussis* toxin subunit S1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 1347-1351.
- Barbieri JT, Armellini D, Molkentin J, Rappuoli R (1992). Construction of a diphtheria toxin A fragment-C180 peptide fusion protein which elicits a neutralizing antibody response against diphtheria toxin and pertussis toxin. *Infection and Immunity*. 60:5071-5077.
- Berger JT, Carcillo JA, Shanley TP, Wessel DL, Clark A, Holubkov R, Meert KL, Newth CJ, Berg RA, Heidemann S, Harrison R, Pollack M, Dalton H, Harvill E, Karanikas A, Liu T, Burr JS, Doctor A, Dean JM, Jenkins TL, Nicholson CE; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) Collaborative Pediatric Critical Care Research Network (CPCCRN) (2013). Critical pertussis illness in children: a multicenter prospective cohort study. *Pediatric Critical Care Medicine*. 14: 356–365.
- Birkhoff M, Leitz M, Marx D (2009) Advantages of intranasal vaccination and considerations on device selection. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 71(16):729-731.
- Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G, Nestei EW (1991). Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Methods Enzymology*. 204: 384-397.

- Carbonetti NH (2015). Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathogens and Disease*. 73, 8: 1-8.
- Chant HT, Daniell H (2015). Plant-made oral vaccines against human infectious diseases-Are we there yet? *Plant Biotechnology Journal*.13 (8): 1056–1070.
- Coutte I, Loch C (2015). Investigating pertussis toxin and its impact on vaccination. *Future Microbiology*. 10(2): 241–254.
- Dorji D, Mooi F, Yantorno O, Deora R, Graham R, Mukkur T (2018). *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Medical Microbiology and Immunology*. 207: 3-26.
- Curtis RI, Cardineau CA (1990). Oral immunization by transgenic plants. World Patent Application, WO 90/02484
- Expert group on vaccinations for pertussis (2011). Consensus on the clinical and microbiologic diagnosis of *Bordetella pertussis*, and infection prevention. *Salud Pública México*. 53: 57-65.
- Forsyth K (2007). Pertussis, still a formidable foe. *Clinical Infectious Diseases*. 45:1487–1491.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005). Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*. 2042-2048.
- Grimpel E, von Sonnenburg F, Saenger R, Abitbol V, Wolter J, Schuerman L (2005). Combined reduced-antigen-content diphtheria-tetanus-acellular pertussis and polio vaccine (dTpa-IPV) for booster vaccination of adults. *Vaccine*. 23: 3657–3667.
- González-González E, García-Hernández AL, Flores-Mejía R, López-Santiago R, Moreno-Fierros L (2015). The protoxin Cry1AC of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Veterinary Microbiology*. 175(2-4).
- Guan ZJ, Guo B, Huo YL, Guan ZP, Dai JK, Wei YH (2013). Recent advances and safety issues of transgenic plant-derived vaccines. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97:2817-2840.

- Gutiérrez SP, Saberianfar R, Kohalmi SE, Menassa R (2013). Protein body formation in stable transgenic tobacco expressing elastin-like polypeptide and hydrophobin fusion proteins. *BMC Biotechnology*. 10; 13-40.
- Halperin SA (2007). The control of pertussis 2007 and beyond. *The New England Journal of Medicine*. 356:110-113.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995). Oral Immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*. 268:714-716.
- Hayden CA, Streatfield SJ, Lamphear BJ, Fake GM, Keener TK, Walker JH, Clements JD, Turner DD, Tizard IR, Howard JA (2012). Bioencapsulation of the hepatitis B surface antigen and its use as an effective oral immunogen. *Vaccine*. 30:2937-2942.
- Hefferon K (2013). Plant-derived pharmaceuticals for the developing world. *Biotechnology Journal*. 8: 1193-1202.
- Hernández M, Rosas G, Cervantes J, Fragoso G, Rosales-Mendoza S, Sciutto E (2014). Transgenic plants: a 5-year update on oral antipathogen vaccine development. *Expert Review. Vaccines* Early online. 1–14.
- Howson CP, Howe CJ, Fineberg HV (1991). *Adverse Effects of Pertussis and Rubella Vaccines*. National Academy Press, Washington, DC. 382 pp.
- Hozbor D, Ulloa-Gutiérrez R, Marino C, Heinz Wirsing von Köning C, Tan T, Forksyth K (2019). Pertussis in Latinamerica: Recent epidemiological data presented at the 2017 Global Pertussis Initiative meeting. *Vaccine*. 72: 5414-5421.
- Hu J, Ni Y, Dryman BA, Meng XJ, Zhang C (2012). Immunogenicity study of plant-made oral subunit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vaccine*. 30:2068-2074.
- <http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>
- <http://www.protalix.com/glucocebrosidase.html>
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02236052?-term=plant-based+vaccine&rank=2>

- Kandeil W, Atanasov P, Avramioti D, Fu J, Demarteau N, Li X (2019). The burden of pertussis in older adults: what is the role of vaccination? A systematic literature review. Expert Review of Vaccines. Vol. 18, No. 5. 439-455.
- Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt H-J (2016). Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology Review*. 29:449–486.
- Kim D, Kim YG, Seo SU, Kim DJ, Kamada N, Prescott D, Chamaillard M, Philpott DJ, Rosenstiel P, Inohara N, Núñez G (2016). Nod2-mediated recognition of the microbiota is critical for mucosal adjuvant activity of cholera toxin. *Nature Medicine*. 22: 524–530.
- Kim MY, Kim BY, Oh SM, Reljic R, Jang YS, Yang MS (2016). Oral immunisation of mice with transgenic rice calli expressing cholera toxin B subunit fused to consensus dengue cEDIII antigen induces antibodies to all four dengue serotypes. *Plant Molecular Biology*. 92: 347-356.
- Kingston HGM, Pa' Craig JR, Aideen CA, Mieszko MW (2014). Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends in Microbiology*. 22: 49-52.
- Ko K, Brodzik R, Steplewski Z (2009). Production of antibodies in plants: approaches and perspectives. *Curr Topics Microbial Immunology*. 332:55–78.
- Ko K (2014). Expression of recombinant vaccines and antibodies in plants. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*. 33, 3: 192-198.
- Kolotilin I, Kaldis A, Pereira EO, Laberge S, Menassa R (2013). Optimization of transplastomic production of hemicellulases in tobacco: effects of expression cassette configuration and tobacco cultivar used as production platform on recombinant protein yields. *Biotechnology Biofuels*. 6(1):65.
- Koprowski H (2005). Vaccines and sera through plant biotechnology. *Vaccine*. 2005; 23:1757–1763.
- Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA (2005). . Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta*. 222:484-493.

- Kwon KC, Daniell H (2016). Oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells. *Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy*. 24(8): 1342-1350.
- Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Appella E, Sidney J y Sette A (2002). A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *Journal of Immunology* 168: 5499–5506.
- Lobaina-Mato Y (2019) Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities. *International Journal of Pharmaceutics*. 572:118813.
- Locht C (2016). Pertussis: Where did we go wrong and what can we do about it? *Journal of Infection*. 20:1-7.
- Locht C, Mielcarek N (2012). New pertussis vaccination approaches: in route to protect newborns? *FEMS Immunology Medical Microbiology*. 66:121–133.
- Lu Z, Lee KJ, Shao Y, Lee JH, So Y, Choo YK, Oh DB, HwangKA, Oh SH, Han YS, Ko K (2012). Expression of GA733-Fc fusion protein as a vaccine candidate for colorectal cancer in transgenic plants. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 364240: 1-11.
- 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.
- Masin J, Osicka R, Bumba L, Sebo P (2015). *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. *Pathogens and Disease*. 73:ftv075.
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.USA*. 93:5335-5340.
- Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA (2014). *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nature Reviews Microbiology*. 12:274–288.
- Menassa R, Du C, Yin Z, Ma S, Poussier O, Brandle J, Jevnikar AM (2007). Therapeutic effectiveness of orally administered transgenic low-alkaloid

- tobacco expressing human interleukin-10 in a mouse model of colitis. *Plant Biotechnology Journal*. 5: 50-59.
- Michiels A, Van den Ende W, Tucker M, Riet LV y Laere AV (2003). Extraction of high quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*. 1(315): 85-89.
- Miller E, Fleming DM, Ashworth LA, Mabbett DA, Vurdien JE, Elliott TS (2000). Serological evidence of pertussis in patients presenting with cough in general practice in Birmingham. *Communicable Disease and Public Health*. 3:132-134.
- Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, López-Revilla R, Piña-Cruz S (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scandinavian Journal of Immunology*. 57(1):45-55.
- Ortega-Berlanga B, Musiychuk K, Shoji Y, Chichester JA, Yusibov V, Patiño-Rodríguez, Noyola DE, Alpuche-Solís AG (2016). Engineering and expression of a RhoA peptide against respiratory syncytial virus infection in plants. *Planta*. 243: 451-458.
- Paul MJ, Thangaraj H, Ma JK-C (2015). Commercialization of new biotechnology: a systematic review of 16 commercial case studies in a novel manufacturing sector. *Plant Biotechnology Journal*. 13:1209-1220.
- Pérez-Pérez GF, Rojas-Mendoza T, Cabrera-Gaytán DA, Grajales-Muñiz C (2015). Panorama epidemiológico de la tos ferina, 19 años de estudio epidemiológico en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 53(2):164-170.
- Population Reference Bureau (2015). Population Reference Bureau: World population datasheet 2015.
- Regnard GL, Halley-Stott RP et al (2010) High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant Biotechnology Journal* 8(1):38–46.

- Rocha G, Soares P, Soares H, Pissarra S, Guimarães H (2015). Pertussis in the newborn: certainties and uncertainties in 2014. *Paediatric Respiratory Reviews*. 16:112–118.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra R, Olivera-Flores MT, López-Revilla R, Argüello-Astorga GR, Jiménez-Bremont JF, García-de la Cruz RF, Loyola-Rodríguez JP, Alpuche-Solís AG (2007). Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin b subunit (LTB) in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*. 26(7): 969-976.
- Rosales-Mendoza S, Cervantes-Rincón, T, Romero-Maldonado A, Monreal-Escalante E, Nieto-Gómez R (2021) Transgenic plants expressing a *Clostridium difficile* spore antigen as an approach to develop low-cost oral vaccines. *Biotechnology Progress*. <https://doi.org/10.1002/btpr.3141>.
- Sala V, Dell'Orto V, Coddens A, Cox E, Fogher C (2013). Expression of verocytotoxic *Escherichia coli* antigens in tobacco seeds and evaluation of gut immunity after oral administration in mouse model. *The Journal Veterinary. Sci*. 14:263-270.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 3 vols, 1659 pp.
- Satyavathi VV, Prasad V, Khandelwal A, Shaila M.S, Sita GL (2003). Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] plants. *Plant Cell Reports*. 21:651–658.
- Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Qianqian L (2009) Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science*. 18(5): 936-948.
- Soria-Guerra ER, Rosales-Mendoza S, Marquez-Mercado C, Lopez-Revilla R, Castillo- Collazo R, Alpuche-Solis AG (2007). Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene. *Plant Cell Reports*. 26:961–968.
- Storsaeter J, Wolter J, Loch C (2007). Pertussis vaccines. *Bordetella Molecular Microbiology*. 245–288.

- Tacket CO (2007). Plant-based vaccines against diarrheal disease. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 118:79-87.
- Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N, Goodwin P, Arntzen CJ, Mason HS (2005). Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. PNAS USA.102:3378–3382.
- Thiam F, Charpilienne A, Poncet D, Kohli E, Basset C (2015). B subunits of cholera toxin and thermolabile enterotoxin of *Escherichia coli* have similar adjuvant effect as whole molecules on rotavirus 2/6-VLP specific antibody responses and induce a Th17-like response after intrarectal immunization. Microbial Pathogenesis. 89:27-34.
- Takagi H, Hiroi T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamura K, Ishimitsu R, Kawauchi H, Kiyono H, Takaiwa F (2005). A rice based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. PNAS. U.S.A. 102: 17525-17530.
- Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, de la Riva GA, López-Revilla R (1999a). Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1ac protoxin from bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice. Life Sci 64(21):1897-912.
- Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, De La Riva GA, López-Revilla R (1999b). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. Scandinavian Journal of Immunology. 49(6):578-84.
- Waheed MT, Sameeullah M, Khan FA, Syed T, Ilahi M, Gottschamel J, Lössl AJ (2016). Need of cost-effective vaccines in developing countries: What plant biotechnology can offer? SpringerPlus. 5, 65.
- Wang Y, Shen Q, Jiang Y, Song Y, Fang L, Xiao S, Chen H (2012). Immunogenicity of foot-and-mouth disease virus structural polyprotein P1 expressed in transgenic rice. Journal of Virological Methods. 181:12-17.
- Ward BJ, Makarkov A, Séguin A, et al. (2020) Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥65 years): two multicentre, randomised

- phase 3 trials. The Lancet; published online Oct 13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32014-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32014-6).
- Waruiru C, Appelton R (2004). Febrile seizures: an update. Arch Dis Child 89: 751–756.
- Wigdorovitz A, Mozgovej M, Santos MJ, Parreño V, Gómez C, Pérez-Filgueira DM, Trono KG, Ríos RD, Franzone PM, Fernández F, Carrillo C, Babiuk LA, Escribano JM, Borca MV (2004). Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. Journal of Virology. 85:1825-1832.
- Winter K, Zipprich J, Harriman K, Murray EL, Gornbein J, Hammer SJ, Yeganeh N, Adachi K, Cherry JD (2015). Risk factors associated with infant deaths from pertussis: a case-control study. Clinical Infectious Disease. 61(7): 1099-106.
- Zhang XX, Yu H, Wang XH, Li XZ, Zhu YP, Li HX, Luo SJ, Yuan ZG (2013). Protective efficacy against *Chlamydomonas psittaci* by oral immunization based on transgenic rice expressing MOMP in mice. Vaccine. 31:698-703.
- Zhao Z, Xuea Y, Tanga X, Wu B, Cheng X, Hea Q, Zhangb C, Guoa A, Jin M, Chen H (2008). Immunogenicity of recombinant protective antigen and efficacy against intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica*. Vaccine. 27(18): 2523-2528.
- Zorzeto TQ, Higashi HG, da Silva MT, Carniel EF, Dias WO, Ramalho VD, Souza Lima SC, Morcillo AM, Stephano MA, de Góes Antonio MA, Zanolli ML, Raw I, dos Santos MM (2009). Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. Clinical Vaccine Immunology. 16: 544–550.

9. ANEXO I

9.1 Artículo generado

Sanchez-Alvarez K, Rosales-Mendoza S, Reyes-Barrera KL, Moreno-Fierros L, Soria-Guerra RE, Castillo-Collazo R, Monreal-Escalante E, Alpuche-Solis AG (2021). Antibodies induced by oral immunization of mice with a recombinant protein produced in tobacco plants harboring Bordetella pertussis epitopes. *Plant Cell, Tissue and Organic Culture*. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02107-1>.

9.2 Participaciones em Congresos (presentación de cartel)

Sánchez-Alvarez K, Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Castillo-Collazo R, and Alpuche-Solis AG. (2012). Immunoassays of relevant epitopes of *Bordetella pertussis* produced in plants. *XIV Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y 7th Symposium México-USA*. Campeche, México.

Sánchez-Alvarez K, Rosales-Mendoza, S, Soria-Guerra RE, Castillo-Collazo R, Monreal-Escalante, E y Alpuche-Solís AG (2012). Ensayos inmunológicos de epítomos relevantes de *Bordetella pertussis* producidos en plantas. *XX Congreso Nacional de Inmunología*, Mérida, México.

Sánchez-Alvarez K, Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Castillo-Collazo R, and Alpuche-Solis AG.(2013). Immunoassays of relevant epitopes of *Bordetella pertussis* produced in plants. *XV Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y 8vo Simposio México-Estados Unidos*. Xcaret, México.

10. ANEXO II

10.1 Reactivos generales

10.1.1 TAE 50X

- 98.8 g de Tris base
- 22.84 mL de ácido acético
- 40 mL de EDTA 0.5 M pH 8

Disolver y aforar a 1 L con agua destilada, esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

10.1.2 Soluciones Bradford

Solución A

- 25 mL de etanol al 95%
- 50 mL de ácido fosfórico al 85%
- 87.5 mg de azul de Coomassie

Agitar hasta disolver completamente, almacenar a 4°C.

Solución B

- 7.5 mL de etanol al 95%
- 15 mL de ácido fosfórico
- 15 mL de la solución A

Aforar a 250 mL con agua destilada estéril y almacenar a 4°C.

10.1.3 Buffer salino de fosfatos 10X (PBS 10X)

- 14.2 g de fosfato de sodio
- 4.08 g de fosfato de monobásico de potasio
- 58.5 g de cloruro de sodio

Disolver en agua desionizada estéril, ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico 1 N / hidróxido de sodio 1.0 N, aforar a un litro. Almacenar a temperatura ambiente.

10.1.4 Buffer de carbonatos

- 1.59 g de carbonato de sodio
- 2.94 g de bicarbonato de sodio

Disolver en agua destilada estéril, ajustar el pH a 9.6 con ácido clorhídrico 1 N.
Aforar a un litro.

10.1.5 Buffer de fosfatasa alcalina

- 1.017 g de cloruro de magnesio
- 1.211 g de Tris base
- 584.4 mg de cloruro de sodio

Disolver en agua destilada estéril, ajustar el pH a 9.5 con ácido clorhídrico 1 N/hidróxido de sodio 1.0 N. Aforar a 100 mL.

10.2 Antibióticos

10.2.1 Kanamicina

Para preparar un stock de 100 mg/mL.

1. Disolver 2 gramos de sulfato de kanamicina en agua desionizada.
2. Aforar a 20 mL.
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m).
4. Almacenar en alícuotas de 1.5 mL a -20 °C.

10.2.1 Cefotaxima

Para preparar un stock de 250 mg/mL.

1. Disolver 2.5 gramos de cefotaxima en agua desionizada.
2. Aforar a 10 mL.
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m).
4. Almacenar en alícuotas de 1.5 mL a -20 °C.

10.2.3 Ampicilina

Para preparar un stock de 100 mg/mL.

1. Disolver 500 g de Ampicilina en agua desionizada.
2. Aforar a 5 mL.
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m).
4. Almacenar en alícuotas de 1.5 mL a -20 °C.

*Este antibiótico es viable hasta 6 por meses

10.2.4 Espectinomicina

Para preparar un stock de 200 mg/mL

1. Disolver 2 gramos de sulfato espectinomicina en agua desionizada.
2. Aforar a 10 mL
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m).
4. Almacenar en alícuotas de 1.5 mL a -20 °C.

10.2.5 Estreptomicina

Para preparar un stock de 200 mg/mL,

1. Disolver 2 gramos de sulfato de estreptomicina en agua desionizada.
2. Aforar a 10 mL.
3. Esterilizar por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m).
4. Almacenar en alícuotas de 1.5 mL a -20 °C.

10.3 Reguladores de crecimiento

10.3.1 Ácido naftalenacético (ANA)

Para preparar un stock de 1.5 mg/mL

1. Disolver 150 mg de ANA en 1.0 mL de hidróxido de sodio.
2. Aforar a 100 mL con agua desionizada y se almacenar a -20°C.

10.3.2 Benciladenina (BA)

Para preparar un stock de 0.6 mg/mL

1. Disolver 60 mg de BA en 1.0 ml de ácido clorhídrico 1 N.
2. Aforar a 100 mL con agua desionizada y se almacenar a -20°C.

10.3.3 Cinetina (Cin)

Para preparar un stock de 1.0 mg/mL

1. Disolver 100 mg de cinetina en 1.0 mL de ácido clorhídrico 1 N.
2. Aforar a 100 mL con agua desionizada y almacenar a -20 °C.

10.3.4 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

Para preparar un stock de 1.0 mg/mL

1. Disolver 100 mg de 2,4-D en 1.0 mL de hidróxido de sodio 1 N
2. Aforar a 100 mL con agua desionizada y almacenar a -20 °C.

10.4 Medios de cultivo bacterianos

10.4.1 Medio de cultivo LB

- 5 mg de extracto de levadura
- 10 mg de cloruro de sodio
- 10 mg de bactotripton

Disolver en agua desionizada, aforar a un litro y esterilizar.

10.4.2 Medio de cultivo YM

- 400 mg de extracto de levadura
- 10 g de manitol
- 100 mg de cloruro de sodio
- 200 mg de sulfato de magnesio
- 500 mg de fosfato de potasio

Disolver en agua destilada, ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N, Aforar a un litro con agua desionizada y esterilizar.

10.5 Medios de cultivo para plantas

10.5.1 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 desionizada estéril y se almacenaron en alícuotas de 250 mL a 4°C.

10.5.2 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 desionizada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -20 °C.

10.5.3 Vitaminas B5

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

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

10.5.4 Procedimiento general para la preparación de medios de cultivo

Para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Añadir 10 mL de cada solución MS (MS I – MS V) a 700 mL de agua desionizada.
2. Adicionar 30 gramos de sacarosa.
3. Añadir reguladores de crecimiento y vitaminas apropiados
4. Ajustar el pH a 5.7 con hidróxido de sodio 1 N / ácido clorhídrico 1 N y se aforan con agua desionizada estéril.
5. Para los medios semisólidos se añaden 2.5 gramos de fitagel.
6. Los medios se esterilizan a 15 lb/pulgada² por 15 minutos.

*Si es necesario agregar antibióticos al medio de cultivo, éstos se agregan previamente estériles al medio una vez que éste ha sido esterilizado y se encuentre a una temperatura inferior a los 50°C.

10.5.5 Composición de medios de cultivo.

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

10.6 Protocolos generales

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

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

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

10.6.2 Preparación de células electrocompetentes y transformación por electroporación de *Agrobacterium tumefaciens*

Cepa LBA4404, de acuerdo al protocolo de Cangelosi et al. (1991).

- Inocular la cepa en medio de cultivo YM por dos días, de este cultivo (DO. 0.04-0.08 a 600 nm), tomar 5 mL y agregar medio YM hasta 100 mL, incubar a 28 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (aproximadamente 4 h).
- Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, eliminar el sobrenadante y resuspender la bacteria en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7.
- Centrifugar nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, Eliminar el sobrenadante y resuspender la bacteria en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7 y 10% de glicerol.
- Centrifugar y resuspender la bacteria en 2 mL de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol.
- Finalmente centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, resuspender la pastilla en 400 µL de buffer HEPES y 10% de glicerol, tomar alícuotas de 50 µL y almacenar a -70°C.

Para realizar la trasformación:

- Agregar 3.0 ul de ADN a 50 µL de células competentes
- Incubar en hielo por 2 minutos y trasferir a una cubeta de electroporación Bio-Rad para aplicar corriente bajo los parámetros establecidos por el proveedor Bio-Rad (25 F, 400, 2.5kV por 8-9 milisegundos).
- Inmediatamente añadir 1 mL de medio de cultivo YM y pasar a un tubo Eppendorff de 1.5 mL.
- Las células se recuperan a 28°C por dos horas.
- Finalmente centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos, resuspender la pastilla en 200 µL de medio de cultivo YM e inocular en el medio de cultivo YM adicionado del antibiótico correspondiente.

10.6.3 Extracción de ADN plasmídico

Método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989).

1. Tomar 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas y se centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos.
2. Eliminar el sobrenadante, resuspender la pastilla con vórtex y añadir 150 μ L de la solución I de Birnboim (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 10 mM).
3. Mezclar en vortex y agregar 300 μ L de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién preparada, agitar suavemente por inversión 5 veces.
4. Añadir 225 μ L de la solución III de BD (Acetato de sodio 3M, pH 4.8), mezclar por inversión y colocar los tubos por 5 minutos en hielo.
5. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos, recuperar la fase acuosa, agregar un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm.
6. Recuperar el sobrenadante y adicionar un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7 y un volumen de isopropanol frío, mezclar por inversión.
7. Precipitar a -20°C por 30 minutos.
8. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C , eliminar el sobrenadante y lavar la pastilla con 300 μ L de etanol al 70 %, centrifugar por 5 minutos a 12,000 rpm.
9. Agregar RNAsa e incubar a 37°C por una hora.
10. Repetir el proceso de lavado con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, precipitar y lavar con etanol al 70%.
11. Secar la pastilla a $50-60^{\circ}\text{C}$ y resuspender en 20 μ L de agua milli Q.
12. Almacenar a -20°C .

10.6.4 Extracción de ADN vegetal (Michiels et al., 2003)

Buffer de extracción.

- Tris 100 mM, pH 8
- NaCl 1.4 M
- EDTA 20 mM, pH 8
- β -mercaptoetanol 0.2 % (v/v).

Se esteriliza y se añaden 2 % de polivinilpirrolidona y 2 % de CTAB inmediatamente antes de usarse.

Procedimiento

1. Triturar 50 mg de material vegetal en nitrógeno líquido en un mortero. Agregar 750 µL de buffer de extracción a 60 °C y mezclar con cuidado.
2. Incubar las muestras a 60°C por 60 minutos con mezclado ocasional para evitar agregaciones en el homogenizado.
3. Añadir 750 µL de cloroformo alcohol isoamílico (24/1) sobre el extracto, agitar con vórtex. Centrifugar por 5 minutos a 2500 g (20°C). Transferir la fase superior a un tubo limpio. Repetir la extracción con cloroformo alcohol isoamílico hasta limpiar la fase acuosa.
4. Mezclar la fase acuosa con 2/3 de volumen de isopropanol, mezclar por inversión e incubar a 25 °C toda la noche (25°C, es mejor que 4 °C usado comúnmente).
5. Centrifugar a 5,000 g por 10 minutos (20°C). Separar el sobrenadante y añadir 750 µL de solución de lavado (acetato de amonio 10 mM, 70% de etanol).
6. Resuspender la pastilla en la solución de lavado e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugar a 2,500 g por 6 minutos (20 °C). Repetir el lavado.
7. Eliminar el sobrenadante y secar la pastilla al aire. Resuspender en 50 µL de buffer TE e incubar a 37 °C con RNasa en una concentración final de 10 µg/mL por 30 minutos.
8. Añadir un volumen de fenol y mezclar vigorosamente para formar una emulsión. Centrifugar por 5 minutos a 2,500 g (20 °C). Transferir la fase superior a un tubo de centrifuga estéril y repetir la extracción con fenol cloroformo alcohol isoamílico (25/24/1) y con cloroformo alcohol isoamílico (24/1).
9. Añadir NH₄Ac, 7.5 M, pH 7.7, en una concentración final de 2.5 M y dos volúmenes de etanol frío a la fase acuosa transferida, mezclar e incubar en hielo por algunos minutos. Precipitar por centrifugación a 5,000 g por 10 minutos a 4 °C.
10. Lavar la pastilla dos veces con etanol al 70 %, secar al aire y resuspender en 30 µL de agua libre de DNasa.

10.6.5 Dot Blot

1. Pesar 100 mg de tejido vegetal liofilizado y agregar 500 μ L de buffer de extracción (Tris HCl pH: 8, PMSF 0.1% y cocktail inhibidor de proteasas).
2. Sonicar en intervalos de 1 min.
3. Centrifugar el homogenado a 10,000 rpm por 5 min a 4°C, recuperar el sobrenadante.
4. Colocar 5 μ L del sobrenadante en una membrana de nitrocelulosa, dejar secar a temperatura ambiente.
5. Bloquear con PBS – BSA al 3% durante 45 min.
6. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tween.
7. Añadir el anticuerpo primario (Anti-His) 1:5000 e incubar por 1 hora en agitación.
8. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS – Tween.
9. Incubar con el anticuerpo secundario (Anti-IgG acoplado a peroxidasa de rábano) por 45 min.
10. Revelar agregando el reactivo (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce, IL).

10.6.6 SDS – PAGE

Soluciones:

Stock de Acrilamida-bisacrilamida al 30%.

- Acrilamida 29.2 g
- Bisacrilamida 0.8 g

Aforar a 100 mL con agua desionizada estéril.

Buffer de resolución.

Mezclar 9.08 g de Tris y 2.0 g de SDS en 25 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 8.8 y aforar a 50 mL.

Buffer de concentración.

Mezclar 3.02 g de Tris y 2.0 g de SDS en 25 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 6.8 y aforar a 50 mL.

Buffer de electroforesis SDS (5X).

- Tris – base 0.125M
- Glicina 0.96 M
- SDS 5 %
- pH 8.3

Buffer de carga SDS (6X).

- Tris – HCl 0.3 M pH 6.8
- 2- mercaptoetanol 0.3 M
- Azul de bromofenol 0.6 %
- Glicerol 60%
- SDS 12%

Para preparar el gel de acrilamida 16%

1. Mezclar 2.68 mL de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 1.87 mL de buffer de resolución, 0.405 mL de agua desionizada, 37.5 μ L de persulfato de amonio al 20% y 2.5 μ L de TEMED.
2. Vaciar inmediatamente en la cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD), y sobre ella agregar 1mL de etanol para eliminar el aire que pueda interferir en la polimerización, dejar polimerizar por 60 minutos.
3. Mezclar 536 μ L de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 800 μ L de buffer concentrador, 635 μ L de agua destilada, 24 μ L de persulfato de amonio al 20% y 2.5 μ L de TEMED. Eliminar el etanol de la cámara de electroforesis y en su lugar agregar esta solución, se deja polimerizar por 45 minutos.
4. Antes de cargar la muestra en el gel; se mezcla con el buffer de carga 6X y se calienta a 95 °C por 5 minutos, posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente.

5. El gel se corre a amperaje constante (10 mA) hasta que las muestras pasan el gel de concentración, posteriormente se aumenta a 20 mA hasta que el colorante indicador llegara antes de 1 cm del fondo del gel (aproximadamente 45 minutos).

10.6.7 Western Blot

Transferencia a membrana de nitrocelulosa

1. Se separan las muestras en un gel de poliacrilamida
2. La proteína separada en el gel se transfiere a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia líquida en el equipo Miniprotean III de BIO-RAD.
3. Humedecer la membrana, dos hojas de papel filtro y las esponjas en el buffer de electroforesis (Tris – base 0.025 M, glicina 0.192 M, metanol 20 % y SDS 0.1%)
4. Colocar en el soporte de plástico del equipo miniprotean III, en estricto orden: esponja, papel filtro, membrana de nitrocelulosa, gel de acrilamida, papel filtro, esponja; cerrar el soporte de plástico y colocar en la cámara de electroforesis de manera que la membrana de nitrocelulosa este en dirección al ánodo.
5. La transferencia se lleva a cabo a 200-300 mA por dos horas.