



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Obtención y caracterización de plantas
productoras de antígenos relevantes de
Escherichia coli enterotoxigénica”**

Tesis que presenta

MC Sergio Rosales Mendoza

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Co-director:

Dr. Rubén López Revilla

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



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Obtención y caracterización de plantas productoras de antígenos relevantes de *Escherichia coli* enterotoxigénica**” presentada para obtener el Grado de de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por el **MC Sergio Rosales Mendoza** y aprobada el **29 de Enero de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

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

Dr. Rubén López Revilla
(Codirector de la tesis)

Dr. Gerardo Arguello Astorga
(Asesor de la tesis)

Dra. Leticia Moreno Fierros
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. y en el laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, bajo la co-dirección de los Drs. Ángel G. Alpuche Solís y Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo se recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 165946) y el apoyo del proyecto CONACYT 37048.



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

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

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

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Sergio Rosales Mendoza

sobre la Tesis intitulada:

Obtención y Caracterización de Plantas Productoras de Antígenos Relevantes de Escherichia coli Enterotoxigénica

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dr. Rubén López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 19:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

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

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

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

“Digno eres tú, Jehová, nuestro Dios mismo, de recibir la gloria y la honra y el poder, porque tú creaste todas las cosas, y a causa de tu voluntad existieron y fueron creadas. Tú mismo produjiste mis riñones; me tuviste cubierto en forma protectora en el vientre de mi madre. Te elogiaré porque de manera que inspira temor estoy hecho maravillosamente. Tus obras son maravillosas, como muy bien se da cuenta mi alma. Mis huesos no estuvieron escondidos de ti cuando fui hecho en secreto, cuando fui tejido en las partes más bajas de la tierra. Tus ojos vieron hasta mi embrión, y en tu libro todas sus partes estaban escritas, respecto a los días cuando fueron formadas y no había todavía ni una entre ellas.”

*Revelación 4:1; Salmo 139:13-16
Traducción del Nuevo Mundo de las Santas Escrituras*

Agradecimientos

Al concluir esta etapa, debo agradecer sinceramente a:

mi familia, especialmente a Cristina por su gran ejemplo de disciplina y a Eder, por traer un nuevo espíritu a la familia.

los colegas del laboratorio, con quienes tuve la oportunidad de enfrentar retos juntos, así como cosechar satisfacciones y lecciones muy importantes: M.C. Areli Herrera Díaz, Q.F.B. Luzmila Martínez González, Dra. Silvia Flores Benítez y Dra. Ruth Soria Guerra.

Dr. Ángel G. Alpuche Solís, por su apoyo constante para el desarrollo de este proyecto, especialmente su paciencia y empatía.

Dr. Rubén López Revilla, por compartir su gran experiencia y por sus buenos consejos.

Dr. Gerardo Arguello Astorga, por su gran interés en el avance del proyecto y sus valiosas sugerencias en el laboratorio.

M.C. Ma. Teresa Olivera Flores, por su ayuda generosa y compartir su experiencia.

Dra. Leticia Moreno Fierros, por acceder a la colaboración que contribuyó importantemente a terminar este proyecto.

Dr. Schuyler Korban, por la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio y de incorporarme a su grupo de investigación.

Dra. Ma. del Socorro Santos Díaz, por sus valiosos consejos y su ánimo para continuar en el campo de la investigación.

Dr. Ramón F. García de la Cruz, por las facilidades otorgadas en su laboratorio para el inicio de este proyecto.

Q.F.B. Rosalba Castillo Collazo, por su invaluable ayuda en el trabajo diario, así como al Biol. Salvador Ambrís Granados, por su ayuda en el laboratorio, y a la Téc. Verónica Zarate Chávez, por su buen compañerismo.

LISTA DE TABLAS

No.	Título	Página
1.	Proteínas farmacéuticas producidas en plantas cercanas a comercializarse para el tratamiento o prevención de enfermedades humanas	15
2.	Composición de los medios de cultivo empleados para el cultivo <i>in vitro</i> de zanahoria	26
3.	Descripción de los protocolos ensayados para la transformación de zanahoria	40

LISTA DE FIGURAS

No.	Título	Página
1.	Incidencia de diarrea del viajero por áreas geográficas producidas por <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	6
2.	Estructura de las toxinas producidas por <i>E. coli</i> enterotoxigénica	8
3.	Mecanismo de acción de las toxinas de ETEC	9
4.	Optimización de la secuencia codificante de LTB	20
5.	Estrategia utilizada para la clonación del gen LTBs en el vector pBI121	21
6.	Estrategia utilizada para construcción de una fusión LTB-ST y su clonación en el vector binario pBI121	23
7.	Esquemas de inmunización y de reto con toxina del cólera	34
8.	Proceso de clonación del gen LTBs en el vector binario pBI121	37
9.	Proceso de construcción y clonación de la fusión LTB-ST en el vector binario pBI121	38
10.	Efecto del medio de cultivo en la regeneración de zanahoria	42
11.	Efecto de la edad del explante en la transformación de zanahoria mediada por <i>Agrobacterium</i> y detección histológica de GUS	44
12.	Aspecto de las plantas transgénicas adultas	46
13.	Detección por PCR del gen LTB en plantas de zanahoria	47
14.	Análisis tipo Southern blot	48
15.	Cuantificación de los niveles de LTB pentamérica en plantas transgénicas de zanahoria	50
16.	Respuesta humoral anti-LTB en suero	52
17.	Respuesta humoral anti-LTB en intestino	54
18.	Protección inmune contra el desafío con toxina del cólera	55
19.	Detección por PCR del gen LTB-ST en plantas de tabaco	58
20.	Cuantificación de los niveles de LTB-ST en plantas transgénicas de tabaco	60
21.	Detección de la proteína de fusión LTB-ST en plantas transgénicas de tabaco mediante Western blot	61

ÍNDICE

	Página
Carátula	i
Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
ÍNDICE	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Impacto de las enfermedades diarreicas	4
2.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	3
2.2.1 Patogénesis	5
2.2.1.1 Toxina termolábil	7
2.2.1.2 Toxina termoestable	7
2.2.1.3 Factores de colonización	10
2.2.2 Prevención y estrategias de vacunación convencional	10
2.3 Producción de proteínas heterólogas en sistemas vegetales	12
2.3.1 Vacunas comestibles	13
2.3.1.1 Vacunas derivadas de plantas contra ETEC	14
2.4 Zanahoria y vacunas comestibles	17
III. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19

4.1 Construcciones genéticas	19
4.1.1 Clonación del gen sintético de LTB en el vector pBI121	19
4.1.2 Construcción y clonación del gen LTB-ST	22
4.2 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
4.3 Estandarización del proceso de obtención de plantas transgénicas de zanahoria	24
4.3.1 Obtención de explantes	25
4.3.2 Ensayos de regeneración	25
4.4 Ensayos de transformación genética	26
4.4.1 Zanahoria	26
4.4.2 Tabaco	26
4.5 Análisis de transformantes	27
4.5.1 Tinción histológica para GUS	27
4.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
4.5.2.1 Extracción de ADN genómico	27
4.5.2.2 Protocolo de PCR	28
4.5.3 Análisis por Southern blot	29
4.5.4 Determinación de transcritos por RT-PCR	30
4.5.5 Inmunoensayo enzimático (ELISA)	31
4.5.5.1 Extracción de proteína total soluble	31
4.5.5.2 Protocolo de ELISA	31
4.5.6 Western blot	32
4.6 Ensayos de inmunización	32
4.6.1 Preparación del material vegetal	32
4.6.2 Inmunización	33
4.6.3 Ensayo de protección contra toxina de cólera	33
4.6.4 Colección de muestras	33
4.6.5 Determinación de niveles de anticuerpos por ELISA	35
4.6.6 Análisis estadísticos	35
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1 Construcciones genéticas	36

5.1.1 Clonación del gen sintético de LTB en el vector pBI121	36
5.1.2 Construcción y clonación del gen LTB-ST	36
5.2 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
5.3 Estandarización del proceso de obtención de plantas transgénicas de zanahoria	39
5.3.1 Ensayos preliminares de transformación	39
5.3.2 Ensayos de regeneración	41
5.3.3 Ensayos de transformación con el gen <i>uidA</i>	43
5.4 Obtención de transformantes para el gen LTB	45
5.5 Análisis de transformantes	45
5.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	45
5.5.2 Análisis de Southern blot	45
5.5.3 Análisis de RT-PCR	49
5.5.4 Cuantificación de LTB	49
5.6 Análisis de la inmunogenicidad de LTB derivada de zanahoria	51
5.6.1 Contenido de LTB	51
5.6.2 Respuesta humoral sistémica	51
5.6.3 Respuesta humoral en intestino	53
5.6.4 Protección contra el desafío con CT	53
5.7 Obtención y caracterización de transformantes de tabaco para el gen LTB-ST	57
5.7.1 Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)	57
5.7.2 Análisis de RT-PCR	59
5.5.4 Cuantificación de LTB-ST	59
VI. CONCLUSIONES	63
VII PERSPECTIVAS	64
VIII. APÉNDICES	65
IX. ANEXOS	75
X. REFERENCIAS	83

RESUMEN

Las enfermedades diarreicas causada por *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) son problemas de impacto mundial que podrían ser prevenidas mediante vacunas comestibles, constituidas por plantas que produzcan la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) o de la toxina termolábil de ETEC (LTB). En este trabajo de tesis se produjo exitosamente LTB en zanahoria, la cual fue codificada por un gen sintético con codones optimizados. Para ello se estandarizó el protocolo de transformación de zanahoria mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Se obtuvieron nueve líneas transgénicas y se realizó un ensayo GM1-ELISA para determinar el contenido de LTB en las raíces de plantas adultas. Las líneas transgénicas expresaron LTB en niveles de hasta 0.3% de la proteína total soluble (PTS), lo cual representa niveles un orden de magnitud por arriba de los reportes que han usado el gen bacteriano. Este ensayo también confirmó el correcto ensamble del complejo pentamérico al ser reconocido por su ligando natural, GM1.

Por otro lado, se analizó la respuesta inmune inducida en ratones Balb/c por la ingestión de las zanahorias transgénicas. Después de la administración oral de tres dosis semanales de raíces que contenían 10 µg de LTB recombinante, se detectaron niveles significativos de anticuerpos anti-LTB de clase G (IgG) y A (IgA) en suero e intestino. El análisis de subclases de IgG reveló que se trata de una respuesta predominantemente humoral. Además, cuando los ratones fueron retados por vía oral con toxina del cólera, que es altamente homóloga a la toxina termolábil de ETEC, se observó un decremento en la acumulación de fluido intestinal en los que fueron inmunizados con las plantas transgénicas. Estos resultados sugieren que las zanahorias transgénicas productoras de LTB podrían ser usadas como una vacuna comestible eficaz contra el cólera y la diarrea causada por ETEC en humanos.

Por otro lado, se produjo en plantas de tabaco una proteína de fusión entre LTB y la toxina termoestable de ETEC (ST) con el objetivo de contar con un polipéptido que confiera mayor rango de protección contra las cepas de ETEC. Para ello, se construyó un gen sintético que codifica la fusión LTB-ST, el cual fue empleado para la transformación de tabaco mediante *A. tumefaciens*. Se obtuvieron ocho líneas transgénicas que fueron caracterizadas parcialmente. Los niveles de expresión máximos fueron de 0.5 ng/µg PTS (0.05% PTS). El ensayo GM1-ELISA confirmó la presencia de la estructura pentamérica de la proteína LTB-ST, así como la presencia de los determinantes antigénicos de LTB. La integridad de la proteína de fusión fue confirmada por un análisis tipo Western blot usando anticuerpos contra LTB. Estos resultados sugieren que la proteína de fusión LTB-ST es correctamente ensamblada y que podría ser útil en la inducción de respuestas inmunes de mucosas que resulten protectoras hacia ambas toxinas, las cuales constituyen factores de patogenicidad importantes en las infecciones por *V. cholerae* y ETEC.

ABSTRACT

Diarrheal diseases caused by *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are worldwide health problems that might be prevented with vaccines based on edible plants expressing the B subunit of the cholera toxin (CTB) or the *E. coli* heat labile toxin (LTB). We have successfully expressed the LTB encoded by a synthetic codon-optimized gene in an edible crop, carrot. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method was used for the transgene installation into carrot nuclear genome. Thirty independent kanamycin resistant transgenic lines were regenerated. GM1-ELISA assay was used to assess LTB protein content in mature tap roots. Transgenic lines expressed LTB up to 0.3% of the total soluble protein. Immunological assay also confirmed proper assembly of the pentameric complex. We analyzed the immunity induced in Balb/c mice by ingestion of three weekly doses of transgenic carrot material containing 10 µg of recombinant LTB. Anti-LTB immunoglobulin G (IgG) and IgA serum and intestinal antibody responses were elicited by transgenic carrots. A decrease of intestinal fluid accumulation after cholera toxin challenge was observed in mice immunized with either pure recombinant LTB or LTB-containing carrot material. These results suggest that transgenic carrots expressing LTB may be used as an effective edible vaccine against cholera and ETEC diarrhea in humans.

In other hand, we successfully expressed a fusion protein between LTB and the heat stable toxin (ST), as a first step to produce an antigenic protein to induce immunity against both toxins; this approach would lead to an improved vaccine against ETEC. A genetic fusion for LTB and ST was constructed and cloned into pBI121 binary vector and used to generate transgenic tobacco plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. Eight transgenic tobacco lines were regenerated and GM1-ELISA tests for protein extracts showed that LTB-ST fusion retains the LTB-pentameric structure and the levels of protein reached up to 0.5 ng/µg PTS (0.05% PTS). The integrity of the fusion protein was confirmed by Western blot analysis. These findings suggest that LTB-ST fusion protein is properly assembled in tobacco plants, and may be used as an effective and broader protective edible vaccine against cholera and ETEC diarrhea in humans.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen la fracción principal de las fuentes de alimento para el hombre. En las últimas décadas, el desarrollo de la ingeniería genética de plantas ha conducido a la obtención de plantas transgénicas, con mejoras agronómicas (por ejemplo resistencia a estrés e incremento en producción y valor nutricional), y las investigaciones en esta área siguen enfocándose a resolver este tipo de problemas, sin embargo, esta aumentando el interés por llevar al mercado nuevas aplicaciones de la agrobiotecnología. Ahora se cuenta con evidencia de que la ingeniería genética de plantas se puede utilizar para producir vacunas humanas en plantas (Mathers, 2006). A principios de la década de los 90's se publicaron los primeros hallazgos que respaldaban la hipótesis de que las plantas son capaces de expresar proteínas heterólogas que retuvieran su inmunogenicidad y fuesen presentadas al sistema inmune de mucosas cuando son ingeridas por animales de laboratorio (Mason y col., 2002).

A la fecha se ha reportado el desarrollo de una variedad de plantas candidatas a vacunas y se han realizado algunas pruebas de fase 1. Actualmente la FDA autorizó en el 2006 a Down AgroSciences la producción de una vacuna contra un virus de aves, la cual se producirá en células vegetales en cultivo. Así, la expansión en estas líneas de investigación ha consolidado una nueva alternativa en el campo de la vacunación (Mason y col., 2002).

En este proyecto se describe el desarrollo y caracterización de plantas que expresan antígenos relevantes de *Escherichia coli* enterotoxigénica, agente causal de diarrea endémica.

II. ANTECEDENTES

2.1 Impacto de las enfermedades diarreicas

La enfermedad diarreica aguda es un proceso infeccioso, concadenado en una larga cadena epidemiológica, que cobra importancia en los países en desarrollo debido a factores económicos y de estilos de vida de la población. Este problema de salud pública continuará vigente por años, debido a los factores de riesgo ambientales, humanos y a un complejo proceso epidemiológico (Riddell y Pollard, 2003).

Estas afecciones son una causa importante de morbimortalidad durante la infancia, especialmente por su relación con la desnutrición, los altos costos que implica para los sistemas de salud, y su alta demanda de atenciones ambulatorias y hospitalizaciones (Riddell y Pollard, 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se presentan 1,300 millones de episodios de diarrea en niños menores de cinco años y 4 millones de muertes por diarrea aguda, relacionadas en el 50-70% de los casos con deshidratación (WER, 1999).

La diarrea infecciosa es originada por la colonización y multiplicación de microorganismos a nivel del tubo digestivo, los cuales tienen diferentes mecanismos de acción: invasivo, toxigénico, o una combinación de ambos. Una variedad de agentes pueden ser los responsables: virus, bacterias, parásitos y hongos (Savarino y Bourgeois, 1993).

Entre los patógenos mas relevantes en la patogenia de la diarrea aguda se encuentran: *Rotavirus sp*, *Cryptosporidium sp*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Sack y col., 1991).

2.2 *Escherichia coli* enterotoxigénica

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, del género *Escherichia*, predominantemente anaerobio facultativo, que coloniza como no patógeno en el tracto gastrointestinal desde las primeras horas de vida del hombre. Sin embargo, existen cepas que son capaces de producir enfermedades en el humano y, según su patogenia, se clasifican como enterotoxigénicas, enteropatógenas, enterohemorrágicas o enteroinvasivas (Nataro y Kaper, 1998).

La denominación ETEC abarca las cepas de *E. coli* que producen alguna de dos enterotoxinas, la termolábil (LT) o la termoestable (ST). Las cepas de ETEC fueron en un principio identificadas como la causa de enfermedad diarreica en cerdos, en donde la infección avanzaba hasta ser letal en los animales recién nacidos (Nataro y Kaper, 1998). Los estudios de estas cepas permitieron dilucidar los mecanismos de la enfermedad, incluyendo la existencia de dos enterotoxinas codificadas por plásmidos. Posteriormente se describió que estas cepas eran causa de diarrea en humanos (Du Pont y col., 1971)

Se estima que ETEC produce al año 5 millones de episodios de diarrea. La población mas afectada son los infantes de países subdesarrollados, en donde causa 700,000 muertes anuales a nivel mundial, un impacto considerable en términos económicos y de morbilidad (Boedeker, 2004). Además, ETEC es uno de los principales causantes de la diarrea del viajero (TD), que es el problema de salud común en viajeros internacionales, particularmente cuando se arriba a países en desarrollo. De las aproximadamente 300 millones de personas de que viajan a otros países cada año, más de 20 millones tienen riesgo significativo de adquirir TD durante su viaje a países tropicales y semitropicales en desarrollo. Aunque TD es causada por una amplia gama de organismos infecciosos, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) son los patógenos que principalmente se asocian con esta enfermedad. México es una de las zonas endémicas para ETEC (DuPont, 1995; Long y col., 1999; Adachi y col., 2002) (ver Figura 1).

2.2.1 Patogénesis

ETEC causa diarrea aguda intensa debido a que induce la salida de iones y agua de las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado. La diarrea aguda es consecuencia de la producción de una toxina termolábil (LT) y/o una termoestable (ST). Otros factores de virulencia importantes son los factores de colonización (CFAs), los cuales median la adherencia de la bacteria a los enterocitos (Savarino y Bourgeois, 1993; Todd, 1997).

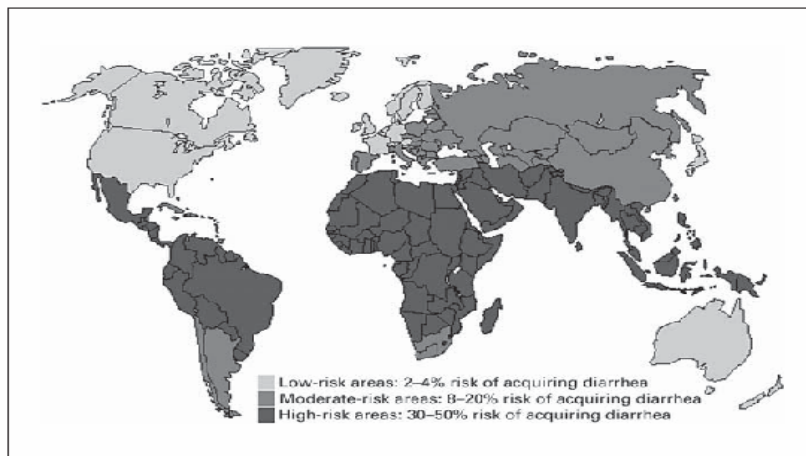


Figura 1. Incidencia de diarrea del viajero por áreas geográficas (tomado de Dupont, 1995).

2.2.1.1 Toxina termolábil

La toxina termolábil de ETEC (LT), es uno de los antígenos mejor caracterizados y comparte muchas características con la toxina del cólera (CT), tales como la estructura de la holotoxina, secuencia de aminoácidos (80%), receptor, actividad enzimática y actividad en ensayos con células *in vitro*. La holotoxina esta formada por dos subunidades, un oligómero de aproximadamente 85 kDa que contiene la subunidad A (LTA de 27 kDa) y un pentámero de subunidades B (LTB de 12 kDa) (Sixma y col., 1991) (ver Figura 2). Después de unirse a su receptor natural, el gangliósido GM1, la toxina es endocitada por las células epiteliales del intestino. Posteriormente es procesada para generar intracelularmente la subunidad A1 con actividad de ADP-ribosil transferasa, cuyo blanco es la proteína Gs, lo que resulta en un incremento en la actividad de adenilato ciclase. La consecuencia de esta activación es el incremento de AMP cíclico (AMPC) que a su vez activa a la cinasa A, que conduce a una fosforilación supranormal de los canales de cloro localizados en la membrana apical de las células epiteliales. Así, el resultado final es diarrea osmótica como producto de un incremento en la secreción del ion cloruro y un decremento en la absorción de cloruro de sodio (Gill y King, 1975) (ver Figura 3).

2.2.1.2 Toxina termoestable

A diferencia de LT, la toxina termoestable (ST) es una molécula pequeña (18-19 aminoácidos) que contiene varios residuos de cisteína, que forman puentes disulfuro, los cuales contribuyen a su estabilidad térmica. Recientemente se ha descrito que ST adquiere la conformación de hexámeros (Sato y Simonishi, 2004) (ver Figura 2). ST es producida por ETEC y otras bacterias Gram negativas, tales como *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholerae*.

Existen dos variantes de ST llamadas STp (ST porcina o STIa) y STh (ST humana o STIb), debido a que inicialmente se encontraron en cerdos y en humanos, respectivamente. Sin embargo, ambas variantes pueden ser halladas en humanos y son casi idénticas en los 13 residuos de aminoácidos que son suficientes para la actividad tóxica (Nataro y Kaper, 1998). El receptor de la toxina es una proteína de membrana que posee actividad de guanilato ciclase (GC-C). La unión de ST a GC-C

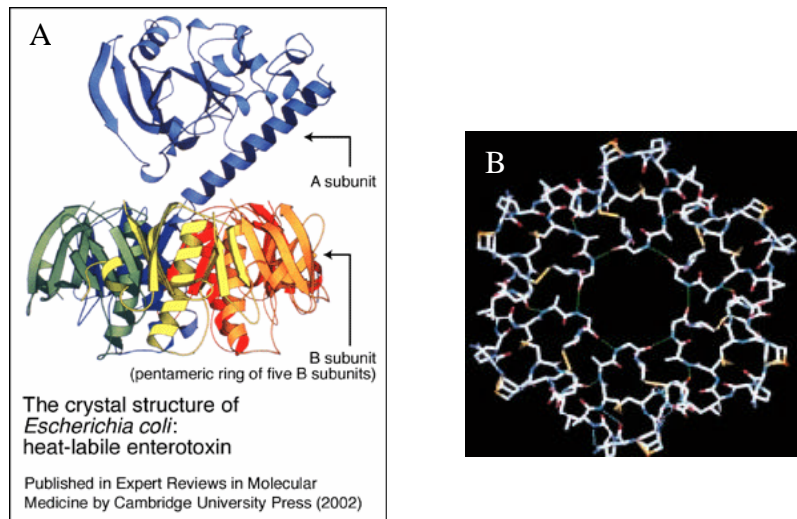


Figura 2. Estructura de las toxinas producidas por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). A¹. La toxina termolábil (LT, de 85 kDa) está formada por una subunidad A (LTA) y un pentámero de subunidades B (LTB). B². La toxina termoestable (ST, de 18 o 19 aminoácidos) posee una estructura con forma de anillo, compuesta de seis péptidos.

¹Tomado de Sixma y col. (1991).

²Tomado de Sato y Shimonishi (2004).

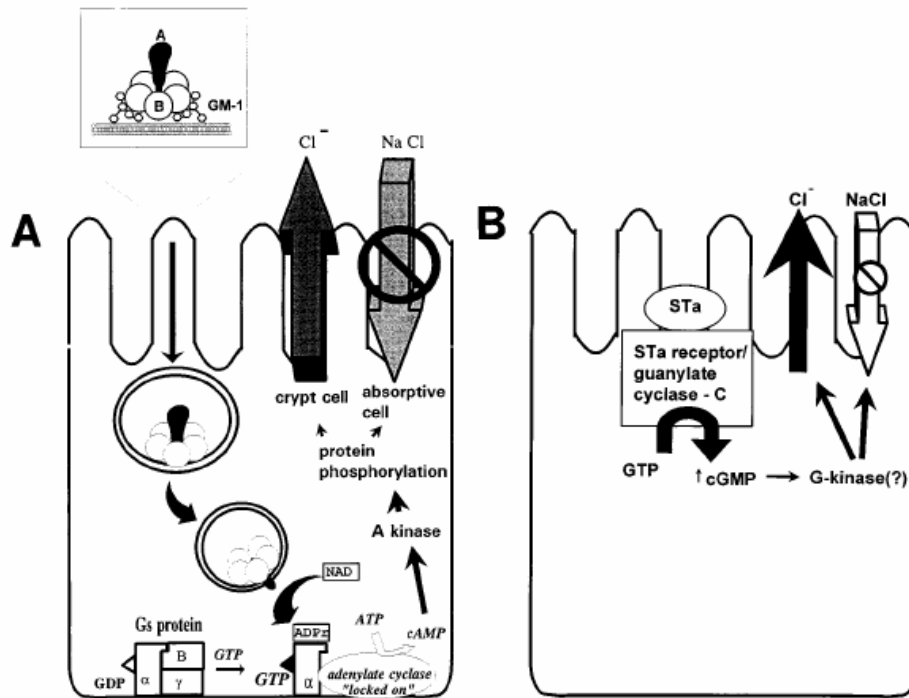


Figura 3. Mecanismo de acción de las toxinas de ETEC. LT ingresa a las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado vía endocitosis y es transportada y procesada para liberar la subunidad A, la cual tiene actividad de ADP-ribosil transferasa. Ésta eleva los niveles de AMP cíclico intracelular, lo que resulta en una secreción de aniones, predominantemente cloro, y un decremento de la absorción de sodio. La alteración en el transporte de iones ocasiona la salida de agua de las células epiteliales. Nataro y Kaper (1998).

lleva a su activación, conduciendo a un incremento en el GMP cíclico. Esto lleva posteriormente a la estimulación de la secreción del ion cloruro y a la inhibición de la absorción de cloruro de sodio, resultando en la secreción de fluido al lumen intestinal (Sato y Simonishi, 2004) (ver Figura 3).

2.2.1.3 Factores de colonización

Para causar diarrea, ETEC debe adherirse a los enterocitos, evento mediado por los pelos de superficie, también llamados factores de colonización (CFAs). A la fecha se han caracterizado una gran cantidad de CFAs y se tiene evidencia de que el patrón de CFAs que se expresan en una cepa dada de ETEC está relacionado con la especificidad del patógeno y que podrían servir como antígenos protectores (Nataro y Kaper, 1998).

2.2.2 Prevención y estrategias de vacunación convencional

Las investigaciones epidemiológicas han identificado al agua y los alimentos contaminados como el vehículo más común para la infección con ETEC. El análisis de alimentos y agua de las áreas endémicas para la infección ha demostrado altas tasas de contaminación por ETEC. Por tanto, es claro que la diarrea por ETEC puede ser prevenida mediante el mejoramiento de las prácticas de higiene y de manejo de alimentos. Sin embargo, el uso de la vacunación permanece como la estrategia más práctica y conveniente para la prevención de esta enfermedad (Boedeker, 2004).

En la década de los 90's se adoptó el criterio de que una vacuna contra ETEC debería ser dirigida hacia los tres principales CFAs (CFA/I, CFA/II y CFA/IV) y hacia LT. Esta idea se consolidó partiendo de la observación de que las infecciones por ETEC inducían una protección sustancial (47%) contra nuevas infecciones por cepas que poseían la misma combinación de toxinas y CFAs. La inclusión de ST, aunque deseable, ha sido difícil de realizar debido a su pobre inmunogenicidad y a la dificultad de obtener mutantes atóxicas que conserven la antigenicidad (Sato y Shimonishi, 2004).

La formulación más simple para las vacunas contra ETEC ha incluido componentes de los CFAs principales [CFA/I, CS3 (de CFA/II) y CS6 (de CFA/IV)].

Una formulación más conveniente se ha diseñado con organismos completos muertos que expresan componentes de los principales CFAs (CFA/I, CS1–3 y CS4–6), los cuales son producidos en fermentadores a gran escala. De estas vacunas se estimó que resultarán en protección contra el 90% de las cepas de ETEC (con combinaciones distintas de toxinas/CFAs) que pudieran encontrarse en infantes o viajeros (Boedeker, 2004).

Debido a la toxicidad de LT, se ha estudiado detalladamente la subunidad B de esta toxina, LTB, como un antígeno protector hacia LT. Se sabe que tanto LTB como CTB son moléculas capaces de modular respuestas inmunes por si solas, propiedades que fueron inicialmente notadas en ensayos *in vitro* en donde se investigaba los efectos de la unión a receptor en la activación, diferenciación y sobrevivencia de poblaciones de linfocitos. Se observó que LTB y CTB causan una depleción selectiva de las células T CD8+, lo que conducía a una sobreexpresión de marcadores de activación en las células B y en la modulación de la producción de citocinas y de la presentación del antígeno por parte de monocitos y macrófagos (Levine, 1983; Clements y col., 1986). Adicionalmente se ha comprobado que LTB puede actuar como adyuvante (potenciador de la respuesta inmune) fuerte de mucosas cuando se coadministra con una gran variedad de antígenos (Snider, 1995). En vista de que estas propiedades se comparten casi en su totalidad con CTB, se ha probado una formulación conteniendo células de *V. cholerae* muertas adicionadas con CTB recombinante, observándose protección hacia la diarrea por ETEC (Peltola, 1991).

Sin embargo, a pesar de estos antecedentes, en los últimos años los conceptos tradicionales sobre las vacunas contra ETEC han sido cuestionados debido a estudios epidemiológicos detallados. En primer lugar, el número de CFAs ha rebasado los 21, los cuales presentan pocas reacciones cruzadas en sus respuesta inmunes y estudios posteriores revelaron que la protección era atribuible solo al componente LT y no a los CFAs (Elsinghorst y col., 2002; Steinsland y col., 2003). Además, un estudio llevado a cabo en el Centro Internacional de Salud en la Universidad de Bergen, Guinea–Bissau, África, reveló que los brotes de diarrea son causados principalmente por cepas de ETEC productoras de ST (Wolf, 1997;

Steinsland y col., 2002). Este impacto de las cepas productoras de ST ha sido confirmado por estudios posteriores (Valentiner–Branth y col., 2003). Debido a que ST es un antígeno que no se ha incluido en las formulaciones de vacunas debido a su baja inmunogenicidad, algunos grupos se han encargado de desarrollar estrategias que permitan inducir una respuesta inmune protectora hacia dicha toxina.

Algunos autores han producido fusiones genéticas LTB-ST con resultados prometedores. Por ejemplo, Clements (1990) ha reportado la construcción de una fusión LTB-ST mediante la unión del extremo 5' del ORF de ST al extremo 3' del ORF de LTB mediada por un linker. Se observó que la antigenicidad máxima de ST se presentó cuando la unión entre ambos péptidos estaba mediada por un linker de siete aminoácidos, entre ellos una prolina. Interesantemente, esta proteína de fusión conservó los determinantes antigénicos de ambas toxinas sin mostrar toxicidad. Además, esta proteína quimérica fue capaz de inducir la producción de anticuerpos capaces de reconocer a ST y de neutralizar su actividad biológica en un modelo de inmunización en ratones por vía parenteral. Posteriormente, el mismo grupo de investigación encontró los mismos hallazgos en un sistema de inmunización a través de mucosas empleando como vector de entrega del antígeno a *Salmonella dublin* (Cardenas y Clements, 1993).

Otro problema a abordar consiste en disminuir el costo de producción de estas vacunas, pues las zonas más afectadas son los países en desarrollo. De ahí que, aunque la OMS considera necesario incluir una vacuna contra ETEC en su Programa Expandido de Vacunación, la accesibilidad de esta determinará en gran manera su inclusión en dicho programa (WER, 1999).

2.3 Producción de proteínas heterólogas en sistemas vegetales

Con el advenimiento de las técnicas de manipulación del ADN y la transformación genética de plantas, a principios de la década de los 90's se planteó una nueva aplicación de la biotecnología, que consiste en emplear sistemas vegetales para la producción de proteínas de alto valor agregado en biomedicina o industria. Este sistema alternativo es novedoso dado que el costo del material vegetal es muy bajo y

es un sistema fácil de llevar a gran escala. Algunos grupos de investigación se enfocaron hacia la obtención de proteínas terapéuticas tales como anticuerpos, albúminas y hormonas. Otra aplicación importante en este campo consiste en la producción de vacunas (Daniell y col., 2001; Kaprowski y Yusibov, 2001; Mason y col., 2002).

2.3.1 Vacunas comestibles.

A pesar de que las vacunas son uno de los grandes y más importantes sucesos que ha tenido la medicina, sus costos de producción, almacenamiento y traslado, no permiten en muchos casos que alcancen una distribución completa, siendo afectados principalmente los países pobres (Mason y col., 2002).

Ante la necesidad de desarrollar vacunas efectivas, pero accesibles, el uso de plantas transgénicas que sirvan como vacunas orales resulta muy atractivo. El enfoque es obtener una respuesta inmune en las mucosas que resulte protectora (Streatfield y col., 2001).

Las ventajas de producir vacunas en vegetales son enormes, debido a que se elimina en gran medida el costo por producción, purificación, almacenamiento y transporte, ya que se pueden utilizar en vegetales de la región. Aunado a esto, las vacunas en plantas permiten evitar el uso de jeringas no estériles, práctica asociada a la transmisión de enfermedades como SIDA o hepatitis B (Daniell y col., 2001; Streatfield y col., 2001). Además, el empleo de subunidades antigénicas eliminaría los riesgos que acompañan al uso de organismos atenuados, tales como el desarrollo de la enfermedad y efectos secundarios.

La primera demostración de que una planta es capaz de liberar un antígeno al sistema inmune de mucosas, se reportó en 1990 con la proteína SpaA de *Streptococcus mutans* en tabaco (Curtiss y Cardineau, 1990). Este estudio aportó evidencia de que el desarrollo de vacunas comestibles era factible. A la fecha existen varios reportes de expresión de antígenos relevantes para la vacunación de humanos en algunas especies vegetales y también están en desarrollo vacunas orales de importancia pecuaria, con las que se pretende usar granos como el maíz y otros forrajes para la inmunización contra enfermedades que provocan pérdidas

importantes en este campo (Rice y col., 2005).

Lo ideal en este tipo de vacunas, es que se expresen en vegetales que se consuman crudos, ya que el antígeno puede degradarse con la cocción. Los primeros trabajos para generar vacunas en plantas comestibles utilizaron tabaco y papa, sin embargo, los sistemas vegetales ideales para este propósito no deben tener toxicidad y consumirse frescos (Daniell y col., 2001).

Una de las principales limitantes en este campo es el nivel de expresión de la proteína recombinante. Esto se debe en parte al uso diferencial de codones que existe entre procariontes y eucariontes. Así, la transferencia de genes virales o bacterianos resulta por lo general en una expresión modesta. Este problema se ha afrontado usando genes sintéticos diseñados con codones de mayor uso en las plantas, sin cambiar la secuencia de aminoácidos, a fin de hacer más eficiente la traducción de los transcritos correspondientes (Arakawa y col., 1999). Asimismo, se han usado secuencias de retención en organelos, lo que evita la degradación de la proteína sobreexpresada en el citoplasma. Con este mismo fin, recientemente se han desarrollado técnicas para la modificación genética del ADN contenido en los cloroplastos, que resulta en un gran incremento en la expresión de la proteína heteróloga, debido al alto número de copias de su genoma y de cloroplastos que existen por célula (Daniell y col., 2001; Streatfiel y col., 2001).

A la fecha se han expresado antígenos de diversos patógenos con miras a obtener vacunas contra hepatitis B, rabia, SIDA, infección por virus de Norwalk, entre otros. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de aplicaciones biotecnológicas para la producción de proteínas terapéuticas, o la generación de vacunas comestibles, que se encuentran en etapas cercanas a la comercialización. Como puede notarse, la diarrea por ETEC también ha sido blanco para el desarrollo de este tipo de vacunas.

2.3.1.1 Vacunas derivadas de plantas contra ETEC

Entre las proteínas terapéuticas más estudiadas para ser producidas en plantas se encuentran la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT) y la toxina del cólera (CT), que es homóloga en estructura, función e inmunogenicidad a LT. Dada la importancia de LTB como antígeno en la vacunación contra ETEC, varios grupos

Tabla 1. Proteínas farmacéuticas producidas en plantas cercanas a comercializarse para el tratamiento o prevención de enfermedades humanas*.

Producto	Clase	Indicación	Compañía	Cultivo	Etapas
Fragmentos Fv de anticuerpos, varios	Anticuerpo	Linfoma	Large Scale biology Crop	Vectores virales en tabaco	Fase I
CaroRx	Anticuerpo	Caries	Planet Biotechnology Inc.	Tabaco transgénico	Fase I
LT (ETEC)	Vacuna	Diarrea	Prodigene Inc. Grupo de Arntzen (Tacket y col., 1998)	Maíz transgénico Papa transgénica	Fase I Fase I
Lipasa gástrica	Enzima terapéutica	Fibrosis quística, pancreatitis	Meristem Therapeutics	Maíz transgénico	Fase II
Antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B	Vacuna	Hepatitis B	Grupo de Arntzen Thomas Jefferson University/Polish Academy of Sciences	Papa transgénica Lechuga transgénica	Fase I Fase I
Factor intrínseco humano	Suplemento alimenticio	Deficiencia de vitamina B12	Cobento Biotech AS	Arabidopsis transgénica	Fase I
Lactoferrina	Suplemento alimenticio	Infecciones gastrointestinales	Meristem Therapeutics	Maíz transgénico	Fase I
Proteína de la capsida del virus de Norwalk	Vacuna	Infección por virus de Norwalk	Grupo de Arntzen (Tacket y col., 2000)	Papa transgénica	Fase I
Glicoproteína de la rabia	Vacuna	Rabia	Yusibov y col., 2002	Vectores virales en espinaca	Fase I

*Tomado de Ma y col., (2005)

de investigación la han expresado en plantas. A la fecha existen reportes de expresión de estas proteínas en diferentes sistemas vegetales, como en tabaco, papa, maíz y tomate.

En 1995 Haq y col., reportaron la expresión de LTB (gen nativo) usando tabaco y papa como modelo, y probaron por primera vez la inmunogenicidad en ratones de la proteína producida en planta. Otro ejemplo es el reportado por Mason y col. (1998), en donde diseñaron y construyeron un gen sintético optimizado para plantas al que añadieron el péptido SEKDEL en el extremo carboxi-terminal, el cual dirige la proteína al retículo endoplásmico para evitar su degradación en el citoplasma e incrementar su acumulación. La proteína resultó inmunogénica en ratones al detectarse anticuerpos específicos de tipo IgG en suero e IgA en heces. Mas adelante, estudios clínicos han demostrado también la viabilidad de las plantas transgénicas como vehículo para la entrega de LTB, puesto que las papas fueron capaces de inducir una respuesta inmune vigorosa hacia LTB en la mucosa intestinal (Tacket y col., 1998). LTB ha sido expresada también en maíz empleando el promotor de la γ -zeína, específico de semilla (Chikwamba y col., 2002a). La proteína heteróloga también resultó inmunogénica en ratones (Chikwamba y col., 2002b) y humanos (Tacket y col., 2004).

Dados estos antecedentes resulta relevante explorar nuevos sistemas y estrategias que permitan mejorar los niveles de expresión conservando la funcionalidad de las proteínas heterólogas. También deberá profundizarse en la expresión de nuevas proteínas antigénicas de ETEC, tales como proteínas de fusión que incluyan ST, ya que a la fecha no se ha expresado esta proteína de fusión en plantas.

2.4 Zanahoria y vacunas comestibles

La zanahoria es el nombre común para algunos miembros de la familia Umbelliferae, (también llamada la familia del perejil) que son hierbas principalmente bienales o perennes de las regiones templadas del norte. La mayoría son caracterizadas por el follaje aromático y una inflorescencia en forma de paraguas. Las zanahorias han sido renombradas por más de 2,000 años por sus características que favorecen la salud y su alto contenido de la vitamina A. Son cosechables durante todo el año y su raíz se puede consumir cruda, lo que las ha convertido en un vegetal altamente popular, con una producción promedio de 13.5 millones de toneladas para consumo humano (en 1991), lo cual representa 3% de la producción mundial de vegetales (Simon, 1984). Bajo condiciones óptimas, se pueden cosechar entre 2-6 kg de raíces por m² de suelo en 90-120 días de cultivo. Sus raíces son ricas en vitamina A y fibra y, en promedio, contienen 88% agua, 6–8% azúcar, 1–2% fibra, 0.7–1.2% proteína y 0–3% grasa.

En cuanto a la biotecnología aplicada a este cultivo, las técnicas de cultivo *in vitro* y transformación genética de zanahoria han sido bien descritas para algunas variedades (Wurtele y Bulka, 1989; Hardegger y Sturm, 1998; Marquet-Blouin y col., 2003). Estos estudios emplean *Agrobacterium tumefaciens* como mecanismo de transformación y embriogénesis somática como vía de regeneración.

Estas características hacen de la zanahoria un modelo atractivo para la expresión de proteínas de interés en el desarrollo de vacunas comestibles. Ya existen antecedentes para esta aplicación, por ejemplo, Marquet-Blouin y col. (2003) han expresado la hemaglutinina del virus del sarampión en plantas de zanahoria. La inmunización de ratones con extractos de raíces indujo títulos altos de IgG1 e IgG2a que reconocieron al antígeno y fueron capaces de neutralizar al virus *in vitro*. Se obtuvieron resultados similares cuando se expresaron polipéptidos que contenía dominios de la hemaglutinina (Bouche y col., 2003). Estos resultados demostraron que la zanahoria podría ser usada como un sistema de expresión eficiente y práctico para producir proteínas inmunogénicas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar plantas transgénicas productoras de LTB y LTB-ST, debido a su relevancia en el desarrollo de vacunas contra *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica.

3.2 Objetivos específicos

1. Construir vectores que permitan expresar los péptidos LTB y LTB-ST en plantas.
2. Establecer métodos de cultivo *in vitro* y transformación genética eficientes para zanahoria y tabaco.
3. Obtener transformantes de los modelos propuestos para los transgenes LTB y LTB-ST.
4. Caracterizar las transformantes mediante técnicas inmunológicas y moleculares.
5. Evaluar la inmunogenicidad por vía oral de las proteínas heterólogas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Construcciones genéticas

4.1.1 Clonación del gen sintético de LTB en el vector pBI121

Se partió de la secuencia codificante para LTB de la cepa H10407 de ETEC, a la cual se le añadieron 18 nucleótidos en el extremo 3' que codifican para la secuencia SEKDEL. El gen LTB fue optimizado para su expresión en plantas de acuerdo al uso preferencial de codones mediante el programa backtranslation tools de Entelechon (Alemania, <http://www.entelechon.com/>). La secuencia optimizada (llamada gen LTBs) fue sintetizada comercialmente por la compañía Entelechon y clonado en el vector pCR4-TOPO (construcción llamada pCR4TOPO-LTB) (ver Figura 4).

El vector pCR4-TOPO-LTB fue propagado en células químicamente competentes de *E. coli*, que fueron preparadas y transformadas como se describe en el apéndice A. A fin de clonar el gen LTBs en el vector pBI121, se realizó la subclonación de este en el vector pGEM-T easy para contar con un sitio *Sac* I en el extremo 3' (Figura 5). Después de aislar el plásmido pCR4-TOPO-LTB (ver apéndice B), se liberó el gen LTBs por digestión con las enzimas de restricción *Nco* I y *Spe* I (ver apéndice C). La digestión se analizó en un gel de agarosa (ver apéndice D) y el fragmento obtenido (420 pb) se cortó y purificó empleando un kit de Qiagen (QIAEXII). A la par se digirió el plásmido pGEM-T easy bajo las mismas condiciones, al cual se ligó el gen LTBs empleando T4 ADN ligasa (ver apéndice E). El plásmido recombinante se empleó para transformar células competentes de *E. coli* y las clonas resistentes a ampicilina se propagaron para aislar ADN plasmídico, y obtener su perfil de restricción con las enzimas *Nco* I y *Spe* I.

Finalmente, el gen se liberó de esta construcción mediante una digestión con las enzimas *Bam* HI y *Sac* I y el fragmento purificado se clonó en los sitios *Bam* HI y *Sac* I del vector binario pBI121 (donado por el Dr. William Cress), para dar lugar a la construcción pBI-LTB (Figura 5). Este vector dirige la expresión del gen LTBs con el promotor 35S de Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV35S) y contiene el gen de selección *nptII* que confiere resistencia a kanamicina a las células vegetales transformadas. El ADN de las clonas obtenidas se analizó según su perfil de restricción con las enzimas *Bam* HI y *Sac* I.

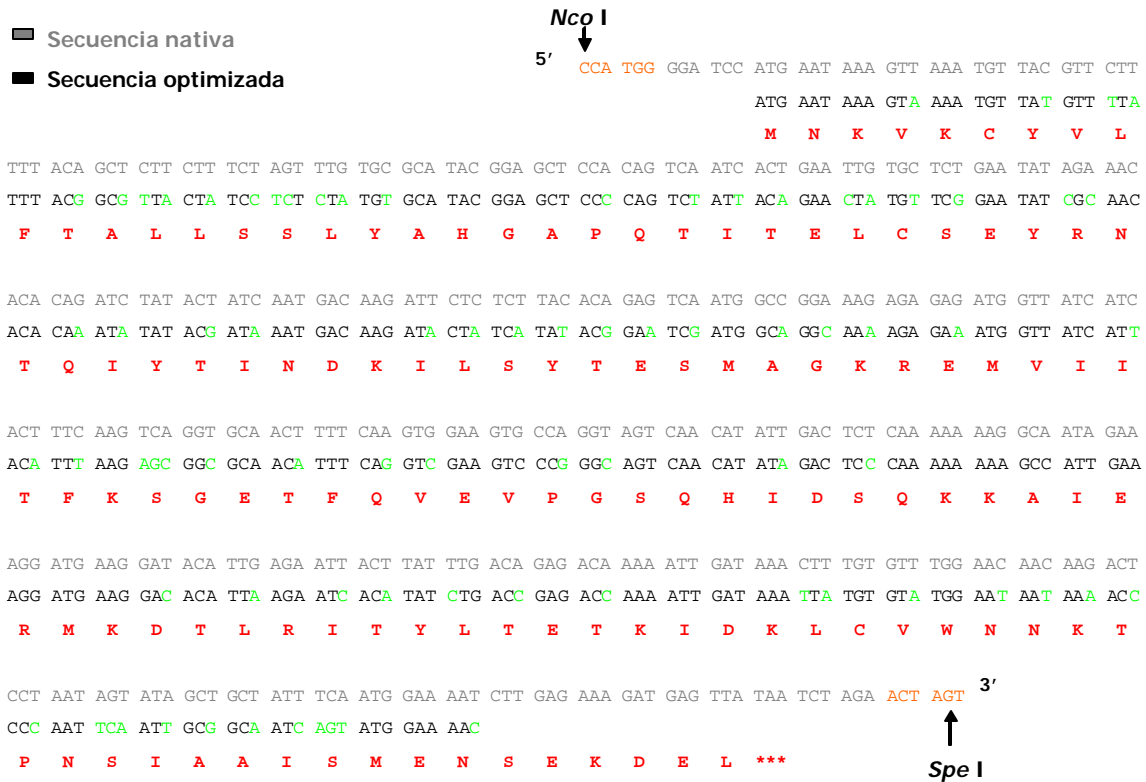


Figura 4. Optimización de la secuencia codificante de LTB. La secuencia nativa (gris) fue modificada de acuerdo con la frecuencia en el uso de codones para zanahoria y la estabilidad del RNA mensajero para obtener la secuencia óptima (en negro); la señal SEKDEL fue añadida en el extremo 3'. Los cambios con respecto a la secuencia nativa son mostrados en verde.

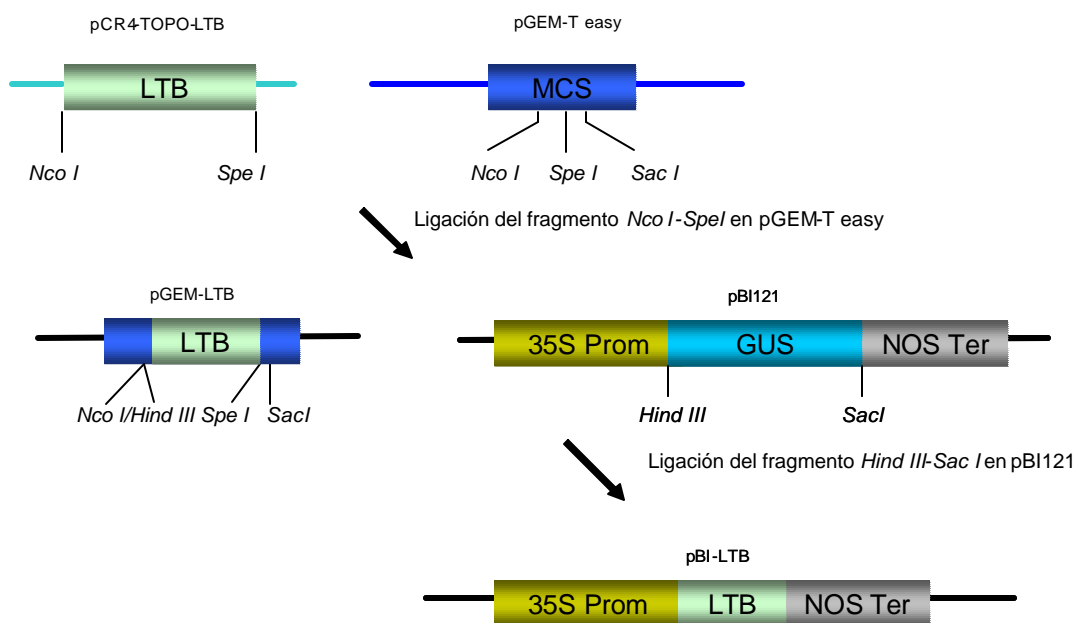


Figura 5. Estrategia utilizada para la clonación del gen LTBs en el vector pBI121. El gen LTBs fue liberado del vector pCR4TOPO y subclonado en el plásmido pGEM-T, empleando los sitios *Nco*I y *Spe*I. Esta subclonación en pGEM-T permite liberar el gen con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I y clonar el fragmento en el vector binario pBI121, sustituyendo al gen GUS para obtener la construcción pBI-LTB.

4.1.2 Construcción y clonación del gen LTB-ST

La estrategia para la construcción de la fusión LTB-ST se representa en la Figura 6. A fin de obtener el marco de lectura completa para la fusión LTB-ST, descrita por Cárdenas y Clements (1990), se amplificó por PCR un fragmento de 354 pb del extremo 5' del gen LTBs a partir del vector pCR4TOPO-LTB. Los oligonucleótidos empleados fueron: sentido 5'GGATCCATGGTGAAAGTTAAATGTTACGTTCTTTT3'; antisentido 5'CAGTCGCAATTGAATTAGGAGTCTTGTTGTTCC3' que introdujeron los sitios *Nco* I y *Mun* I (subrayados) en el extremo 5' y 3', respectivamente. Se empleó Taq DNA polimerasa Platinum *Pfx* siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un equipo de Techne bajo el siguiente protocolo: desnaturalización inicial, 2 min a 95°C; 30 s a 94°C, 60 s a 61°C y 90 s a 72°C (durante 35 ciclos); seguidos de una extensión final de 5 min a 72°C. El producto de PCR fue clonado en los sitios *Nco* I y *Mun* I del vector pPCRScript-ST (sintetizado por la compañía Geneart, Alemania), que contenía el resto de ORF para LTB, fusionado al linker, la secuencia codificante para ST y la señal SEKDEL, todos optimizados para su expresión en zanahoria. Este paso de clonación permitió obtener el vector pLTB-ST, que contiene el ORF completo para la fusión LTB-ST. La secuencia final fue confirmada por técnicas de secuenciación estándar.

A fin de obtener el cassette de expresión en plantas para el gen LTB-ST, la secuencia TEV5'UTR y el gen LTB-ST fueron clonados río abajo del promotor 35S CaMV, en el vector pBI121, reemplazando el gen GUS (ver Figura 6). Para obtener el fragmento TEV5'UTR, el vector pTRL0027 (donado por el Dr. James Carrington, Universidad de Oregon) fue digerido con *Eco* RI, tratado con la enzima Klenow de acuerdo al proveedor y digerido con *Nco* I. El gen sintético LTB-ST fue liberado de pLTB-ST por digestión con *Nco* I/Sac I. Finalmente, la construcción pBI-LTB-ST fue obtenida mediante la ligación de estos dos fragmentos al vector pBI121, previamente digerido con *Sma* I/Sac I. El ADN de las clonas obtenidas se analizó según su perfil de restricción con las enzimas *Hind* III y *Eco* RI.

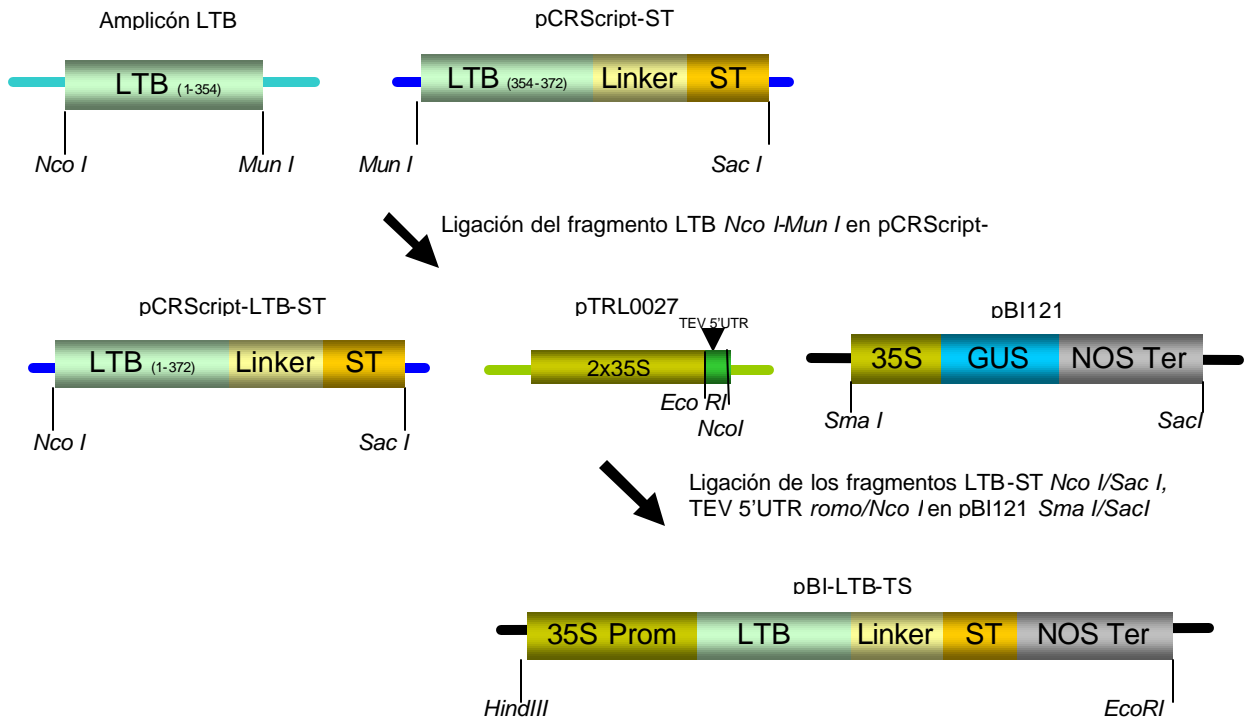


Figura 6. Estrategia utilizada para construcción de una fusión LTB-ST y su clonación en el vector binario pBI121. El gen LTB-ST fue generado mediante la clonación del amplicón LTB (1-354) en el vector pCRScript-ST, que contiene la parte 3' del ORF de LTB, el linker y el ORF de ST. En una segunda clonación este gen fue ligado junto con el TEV5'UTR en el vector binario pBI121.

4.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se empleó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, donada por el Dr. William Cress. Para transferir los vectores binarios a la agrobacteria se empleó la técnica de electroporación.

Se agregó 1 µg de ADN a 50 µL de células electrocompetentes (ver apéndice F) y, después de incubar en hielo por 2 min, se transfirieron a una celda de electroporación, para aplicar corriente bajo los parámetros establecidos por el proveedor BIORAD (25µF, 400Ω, 2.5kV por 8-9 milisegundos) en un equipo BTX Mod. 630. Inmediatamente se añadió 1.0 mL de medio de cultivo YM, se transfirió la suspensión a un tubo eppendorff y las células se recuperaron a 28°C por dos horas. Finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 2 min, se resuspendió la pastilla en 200 µL de medio de cultivo YM y se inocularon en el medio de selección (YM con 50 mg/L de kanamicina) para su cultivo por 3 días a 28°C, 150 rpm y su posterior uso en la transformación de plantas.

4.3 Estandarización del proceso de obtención de plantas transgénicas de zanahoria

Debido a los múltiples factores que influyen en la eficiencia de la transformación genética de plantas (tales como el genotipo y variedad de la planta, el tipo y edad de los explantes, la duración del cocultivo, entre otros), es frecuente encontrar poca reproducibilidad en los protocolos reportados. En nuestro laboratorio contamos con resultados preliminares que indican que el protocolo de Hardegger y Sturm (1998), basado en la infección de tallos de 1 semana de edad, no resultó en la generación de transformantes estables de zanahoria.

En base a estos antecedentes, se modificaron algunas condiciones en este protocolo, a fin de hacer funcional y eficiente el protocolo de transformación. Se empleó el medio descrito por Murashige y Skoog (1962) (ver apéndice G) y, a menos que se indique lo contrario, los cultivos se incubaron a 25 °C, bajo un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, en el cuarto de cultivo de tejidos vegetales y fueron subcultivados en medio fresco cada 15 días en ambiente estéril.

4.3.1 Obtención de explantes

Para obtener los explantes iniciales se utilizaron semillas de zanahoria variedad Nantes (donadas por la MC Teresa Olivera), las cuales se trataron con etanol al 70% por un min. Después, se enjuagaron con agua destilada estéril y se agregaron 100 mL de hipoclorito de sodio comercial al 20%, Tween 20 (5 gotas) y 5 gotas del desinfectante comercial "microdín". Después de agitar por 10 min se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril por 3 min y se sembraron en medio MS para su germinación. A las semanas 1 y 4 se cortaron los tallos de las plántulas obtenidas en segmentos de 1 cm, que se emplearon para los ensayos de regeneración y transformación genética.

4.3.2 Ensayos de regeneración

La regeneración eficiente es un prerequisite importante para establecer un sistema de transformación genética, pues es esencial recuperar plantas completas a partir de la población de células que son transformadas exitosamente. A fin de ensayar la respuesta morfogénica bajo nuestras condiciones de trabajo, se probaron los medios de cultivo CIM y MYT (para la composición ver la Tabla 2). Los explantes se cultivaron por 60 días en dichos medios para evaluar la formación de callo y la presencia de estructuras embriogénicas. Para finalizar el proceso de regeneración, los callos fueron subcultivados en medio que contenía solo la mitad de los reguladores (2,4-D, 0.5 mg/L y BA, 0.15 mg/L) y dos semanas después en medio con la cuarta parte de los reguladores (2,4-D, 0.25 mg/L y BA, 0.075 mg/L) y finalmente, en un tercer subcultivo, se empleó medio sin reguladores de crecimiento y con solo 15 g/L de sacarosa, a fin de inducir la maduración y germinación de los embriones somáticos.

Las plantas regeneradas que alcanzaron un tamaño de 5 cm se transfirieron a tierra estéril, después de eliminar el medio de cultivo adherido a las raíces y de aplicar una solución del antifúngico Terrazole (1.0 g/L). Las macetas fueron cubiertas con una bolsa de plástico para aclimatarlas gradualmente. Las plantas fueron transferidas a una cámara bioclimática para la obtención de semillas bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo, 16 h luz / 8 h oscuridad; riego, 250 mL/día; temperatura, 24°C de día/18°C de noche.

4.4 Ensayos de transformación genética

4.4.1 Zanahoria

Con la finalidad de analizar la eficiencia de transformación, se realizó un experimento inicial para cada protocolo de transformación, utilizando el plásmido pBI121 (que contiene el gen reportero GUS). Una vez encontradas las condiciones óptimas para la transformación, se realizaron experimentos en los que se empleó la cepa que porta la construcción pBI-LTB.

Se utilizaron aproximadamente 200 tallos por experimento que fueron heridos con un bisturí, sobre una cámara húmeda para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron por 10 min en un cultivo de dos a tres días de la agrobacteria ($OD_{600nm}=0.2$) que portaba el plásmido de interés. Después de eliminar el exceso de bacteria con papel absorbente estéril, se colocaron en el medio de cocultivo. Pasado el periodo de cocultivo de dos días, los explantes se transfirieron al medio de selección (con 50 mg/L de kanamicina) adicionado con 500 mg/L de cefotaxima para eliminar a la agrobacteria.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo empleados para el cultivo *in vitro* de zanahoria*.

Medio	Condición			
	Mezcla basal de sales	Vitaminas	Reguladores de crecimiento (mg/L)	
			2,4-D	BA
CIM	MS	MS	1	-
MYT	MS	coctel 20	1	0.3

Ver apéndice G

4.4.2 Tabaco

Se siguió el protocolo estándar para la transformación de hojas de tabaco mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch y col., 1985). Se emplearon plantas de tabaco germinadas asépticamente en medio MS. Las hojas fueron cortadas en fragmentos de 1 cm², que se inocularon con un cultivo de agrobacterias. Después del cocultivo en

medio RMOP por dos días (MS, ANA 0.1 mg/L y BA 1 mg/L), las transformantes se regeneraron en RMOP con 100 mg/L de kanamina y 500 mg/L de cefotaxima. Los brotes obtenidos se enraizaron en medio MS y dos semanas después las plantas fueron transferidas a suelo y cultivadas en una cámara bioclimática.

4.5 Análisis de transformantes

Las líneas resistentes a kanamicina obtenidas con el plásmido pB121 fueron analizadas por PCR y tinción histológica para GUS, mientras que las transformantes para el gen LTB y LTB-ST fueron analizadas por PCR y por ELISA, para comprobar la presencia del transgén y la producción de la proteína correctamente ensamblada, respectivamente. Adicionalmente, las plantas de zanahoria se sometieron a un ensayo tipo Southern blot para cuantificar el número de copias del transgén LTB integradas al genoma de la planta. Por otro lado, las transformantes de tabaco para el gen LTB-ST se sometieron a un ensayo tipo Western blot anti-LTB.

4.5.1 Tinción histológica para GUS

Para confirmar los eventos de transformación, se realizó un ensayo para detectar el gen reportero de la β -glucoronidasa (GUS) mediante tinción histológica de los tejidos resistentes a kanamicina. Para ello, se empleó el protocolo de Jefferson y col. (1987); el material vegetal se colocó en el buffer de reacción y posteriormente fue incubado a 37°C por 24 horas (apéndice H). Después, el tejido fue desteñido con etanol absoluto a 37°C hasta eliminar la clorofila, finalmente se conservó en etanol al 70%.

4.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.5.2.1 Extracción de ADN genómico

Se siguió el protocolo de Michiels y col., (2003). Para ello, se molieron, en presencia de nitrógeno líquido, 3 g de hojas frescas en un mortero. El polvo resultante se transfirió a un tubo Falcon conteniendo 15 mL de buffer de extracción (Tris, 100mM, pH 8; NaCl, 1.4M; EDTA, 20mM, pH 8; β -mercaptoethanol, 0.2%; PVP 2%; CTAB, 2%) precalentado a 60°C, se mezcló por inversión y se incubó a 60°C por 1 h con agitación ocasional. Después de llevar a temperatura ambiente, se realizó una extracción con 15 mL de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1) mezclando con vortex y se centrifugó a

temperatura ambiente por 5 min a 10,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se repitió dos veces la extracción con cloroformo/alcohol isoamílico. Posteriormente la fase acuosa fue mezclada con 2/3 de volumen de isopropanol y se incubó toda la noche a 25°C. Los ácidos nucleicos se colectaron por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y la pastilla fue lavada dos veces con etanol al 70% conteniendo acetato de amonio 10 mM. Después de secarla al aire, la pastilla se resuspendió en TE (Tris 10 mM, pH 8.0; EDTA 1mM) y se incubó con RNAsa (10 µg/mL) por 30 min. Se realizó una extracción con un volumen de fenol y después de separar la emulsión en dos fases mediante centrifugación a 10,000 rpm, la fase acuosa fue sometida a dos extracciones más, con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Finalmente, a la fase acuosa se añadió acetato de amonio 7.5 M, pH 7.7, a una concentración final de 2.5 M y 2 volúmenes de etanol para incubar en hielo por 5 min. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C, la pastilla recuperada se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y fue resuspendida en 200 µL de agua desionizada estéril.

Para la cuantificación de ADN se empleó un fluorómetro Tecan modelo genios, empleando el kit Pico Green. Se preparó una dilución de Pico Green 1:400 en TE 1X y se colocaron 198 µL de esta solución en placas de 96 pozos. Se añadieron 2 µL de la solución problema y se realizó la medición de fluorescencia (a 485 nm excitación/535nm emisión). Para la curva de calibración se emplearon estándares de 1, 10 y 50 ng/µL de ADN de esperma de salmón y los datos fueron analizados en el software Magellan 4.

4.5.2.2 Protocolo de PCR

Se emplearon los juegos de oligonucleótidos: sentido 5'CCATGGGGATCCATGAATAA3'/antisentido 5'AACTCATCTTTCTCAGAATTTTCCA3' para amplificar el gen LTB (417 pb) y sentido 5'GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG3'/antisentido 5'GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA3' para amplificar un fragmento de 1,200 pb del gen GUS. La mezcla de reacción (25 µL) contenía 20 ng de ADN genómico; buffer de Taq polimerasa, 1X, MgCl₂, 1.5mM; dNTPs, 0.2 mM; oligonucleótidos, 10 µM; Taq polimerasa, 1U. La amplificación se llevó a cabo en un equipo termociclador marca Techne, bajo el siguiente protocolo: desnaturalización inicial, 2 min a 95°C; 30 s a 94°C, 60 s a 61°C y 90 s a 72°C (durante

35 ciclos); seguidos de una extensión final de 5 min a 72°C. Las reacciones finalmente se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

4.5.3 Analisis por Southern blot

Se realizó una digestión con 60 µg de ADN genómico con la enzima *Hind* III (para la cual existe un sitio único de restricción en el T-DNA, que se encuentra fuera del gen LTB) por 12 h, para posteriormente realizar una extracción con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitar por 30 min a -20°C, con un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M y 0.7 volúmenes de isopropanol. Después de recuperar la pastilla por centrifugación a 10,000 rpm, esta fue lavada con etanol al 80% y resuspendidas 20 µL de agua desionizada y disueltas a 65°C. Las muestras fueron separadas a 40 V en un gel de agarosa al 1%, durante 12 horas. El gel se incubó en HCl 0.5 M por 15 min, NaCl 0.6 M/NaOH 0.5 M por 45 min y posteriormente se neutralizó en Tris 0.5 M, pH 7.5/NaCl 1.5 M.

Para la transferencia se empleó una membrana de Nylon (Hybond-N+ Amercham Pharmacia Biotech) que fue equilibrada en agua y posteriormente en buffer de transferencia (SSC 6X, que se preparó a partir de SSC 20X, que contiene NaCl, 3 M; citrato de sodio, 0.3 M, pH 7.0). La transferencia se realizó durante toda la noche en la modalidad “down blot”, y para ello se colocaron sobre la superficie de trabajo los componentes en el siguiente orden: papel absorbente de 20x20 cm (suficiente para tener una altura de 10 cm), 3 hojas de papel Whatman 3M, tiras de parafilm (que delimitan la zona de transferencia), membrana de nylon, gel, 3 hojas de papel Whatman 3M previamente embebido en SSC 10X, vidrio de 6 mm y una pesa de 500 g (Sambrook y col, 1989).

Posteriormente la membrana se lavó en SSC 6X, fue colocada sobre papel Whatman 3M y se expuso a luz UV (120, 000 µJ, en equipo Spectrolinker XL-1500 UV Crosslinker) a fin de fijar los ácidos nucleicos. La membrana fue sellada dentro de una bolsa de plástico y almacenada a 4°C hasta que se realizó la hibridación.

Se generó una sonda específica para LTB partiendo de un producto de PCR del gen LTB previamente obtenido en la caracterización de transformantes (ver sección 4.5.2.2). Se empleó el kit Dig High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se añadieron 4 µL de la mezcla de reacción

(Dig-High Prime, vial 1) a 1 μg del producto de PCR contenido en 16 μL de agua (previamente desnaturalizado en baño en ebullición por 10 min y enfriado en hielo) y se incubó a 37° C durante toda la noche. Después, la reacción fue detenida con 2 μL de EDTA 0.2 M, pH 8. La concentración esperada para la sonda fue de 125 ng/ μL .

Dicha sonda se empleó para la hibridación de la membrana durante 12 h a 42°C en el buffer Dig Easy Hyb. Posteriormente fue lavada una vez en el buffer de lavado primario (SSC 2X, SDS 0.1%) por 10 min a temperatura ambiente y dos veces con el buffer de lavado secundario (SSC 0.5 X, SDS 0.1%) por 15 min a 68°C.

Finalmente, para revelar la reacción de hibridación, la membrana se equilibró en el buffer de lavado de ácido maléico (ácido maléico, 0.1 M; NaCl, 0.15 M, pH 7.5; Tween 20, 0.3%) por 10 min y después en 50 mL de la solución de bloqueo (dilución 1:10 del vial 6 en buffer de ácido maléico, el cual contiene ácido maléico, 0.1 M; NaCl, 0.15 M, pH 7.5) por 30 min. Después, la membrana ahora fue incubada en 10 mL de la solución que contenía el anticuerpo (diluido 1:10,000 en solución de bloqueo) por 30 min. Posteriormente la membrana se lavó dos veces con el buffer de lavado a temperatura ambiente por 20 min, para después equilibrarla por 5 min en 10 mL de buffer de detección (Tris, 0.1 M; NaCl, 0.1 M, pH 9.5). La membrana se colocó en una bolsa de plástico, la cual se selló y se añadió el reactivo de detección (CSPD ready to use, 1 mL por cada 100 cm^2 de membrana), se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se retiró el líquido de la bolsa. La detección de la señal luminiscente se realizó en un fotodocumentador UVP chemisystem (UVP, Inc) por 1 h.

4.5.4 Determinación de transcritos por RT-PCR

Se aisló ARN total del material a analizar usando el método de TRIZOL (Invitrogene) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se emplearon 500 ng de ARN total para generar cDNA con el kit Taqman reverse transcription (Applied Biosystems). Como control de carga se empleó un fragmento de la β -actina que fue amplificado con los oligonucleótidos: sentido 5'-AACTGGGATGACATGGAGAA-3'/antisentido 5'-ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA-3', los cuales fueron diseñados originalmente para amplificar actina de maíz. La amplificación por PCR se realizó como se describe en el apartado 4.5.2.2 de esta sección.

4.5.5 Inmunoensayo enzimático (ELISA)

4.5.5.1 Extracción de proteína total soluble

Las extracciones de proteína se realizaron con 250 mg de tejido de plantas adultas, que fue molido en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y resuspendido en 500 μ L de buffer de extracción (PBS, PMSF 0.1% y leupeptina 10 μ g/ μ L). El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976). Se colocaron 10 μ L de la solución problema en tubos de ensayo, se añadió 1.0 mL del reactivo de Bradford (solucion B) y se midió la absorbancia a 595 nm (ver apéndice I). Se empleó albúmina de suero bovino como estándar (5-20 ng/ μ L).

4.5.5.2 Protocolo de ELISA

Se siguió un protocolo basado en la unión al gangliósido GM1 (Cárdenas y Clements, 1993). Para cada etapa se realizó una incubación de 1 h, para posteriormente realizar tres lavados con 300 μ L de PBST [PBS (NaCl, 100 mM; Na₂HPO₄, 10 mM; KH₂PO₄, 3 mM; pH 7.2); Tween 20, 0.05%]. Las placas fueron sensibilizadas con 1.5 μ g de GM1 disuelto en buffer de carbonatos (Na₂CO₃, 15 mM; NaHCO₃, 35 mM, pH 9.6) a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con PBST adicionado con 5% de leche descremada. Después fueron aplicados 20 μ g de proteína total soluble y se incubó a 37°C. Posteriormente los pozos se incubaron a 37°C en presencia del anticuerpo policlonal de conejo anti-LTB (1:1,500) y en seguida con el anti-anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ig de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1:10,000).

Por último, se agregó *p*-nitrofenilfosfato (1 mg/mL) como sustrato disuelto en el buffer de fosfatasa alcalina (Tris, 0.1 M, pH 9.5; MgCl₂, 0.05 M; NaCl, 0.1 M) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas BIO-RAD modelo 550, empleando el software Microplate Manager 5.1. En cada ensayo se incluyó una curva estándar de la proteína LTB pura (5-20 ng), un blanco de reactivos y un extracto de una planta no transformada.

4.5.6 Western blot

Se obtuvieron extractos de proteína total como se describe en la sección 4.5.5.1. Se emplearon muestras de 60 µg de proteína total que fueron previamente desnaturalizadas por 5 min en baño de agua hirviendo. Las muestras fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida (ver apéndice J) y posteriormente el gel se sometió a un protocolo de transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) empleando un tanque de transferencia Transblot (BIORAD).

Para ello, se equilibraron previamente el gel, la membrana, las fibras de empaque y 2 hojas de papel 3M en el buffer de transferencia (Tris, 25 mM; glicina 192 mM; metanol, 20%; SDS 0.1%) por 5 min. Posteriormente se ensambló el sistema de transferencia de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La transferencia se llevó a cabo a 4°C por dos horas a 60V. Después, la membrana fue lavada con PBST por 15 min y posteriormente bloqueada con PBST conteniendo leche descremada al 2% durante 1 h. Después de lavar con PBST por 15 min, se incubó con el anticuerpo primario de conejo anti-LTB (diluido 1:1,500 en PBST) durante toda la noche y se lavó nuevamente con PBST. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (diluido en PBST, 1:1000) por 1 h a temperatura ambiente y fue lavada con PBST.

La detección se llevó a cabo con el sustrato para peroxidasa SuperSignal West Dura substrate (Pierce); para ello se mezclaron 1 mL de la solución A con 1 mL de la solución B y la solución resultante se añadió a la membrana dentro de una bolsa de plástico, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se detectó la señal luminiscente en un fotodocumentador UVP chemisystem (UVP, Inc) exponiendo por 20 min.

4.6 Ensayos de inmunización

4.6.1 Preparación del material vegetal

Para las pruebas inmunológicas se emplearon raíces de plantas adultas de la Línea 1 (L1) y tipo silvestre (WT). Este material fue congelado en nitrógeno líquido y liofilizado en un equipo LABCONCO. Una vez completada la liofilización, el material se trituró y se sometió a cuantificación de LTB como se describe en la sección 4.5.5.2 de este apartado.

4.6.2 Inmunización

Estos experimentos se realizaron bajo la supervisión de la Dra. Leticia Moreno Fierros. En todos los experimentos fueron empleados ratones Balb/c de 12-14 semanas obtenidos en la unidad de biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Cada grupo contenía 10 animales a los cuales se administraron tres dosis a los días 0, 7 y 14. Los ratones se mantuvieron en ayuno el día previo a la inmunización. Los tratamientos consistieron en la administración por vía oral de: 10 µg de LTB recombinante pura (grupo rLTB), 430 mg de material de zanahoria transgénica de la línea L1 conteniendo 10 µg de LTB (grupo cLTB) y 430 mg de material de zanahorias tipo silvestre (cWT). Al día 21 se sacrificaron cinco ratones de cada grupo para la colección de suero y de lavados intestinales (ver Figura 7A). Los 5 ratones remanentes de cada grupo fueron retados con toxina de cólera (CT).

4.6.3 Ensayo de protección contra toxina de cólera

Se siguió el modelo de asas intestinales selladas, que fue desarrollado para medir la protección contra la actividad de enterotoxinas en ratón (Richardson et al., 1984). Al día 21, se administraron 10 µg de CT (disuelta en 500 µL de NaHCO₃ al 10%) a cada grupo de ratones (n = 5) por la vía intragástrica. Adicionalmente, dos grupos de ratones tratados con zanahorias silvestres fueron retados con CT o sólo el vehículo (500 µL de NaHCO₃ 10%). Seis horas después los animales fueron pesados, sacrificados y se extrajo el intestino delgado para registrar su peso (ver Figura 7B). La acumulación de fluido (mg de intestino)/(g de peso corporal) fue calculada con la fórmula $FA = G/(B-G) \times 1000$, donde G es el peso del intestino mas fluido en gramos y B es el peso corporal en gramos.

4.6.4 Colección de muestras

Los ratones fueron anestesiados con éter y se obtuvo suero de la sangre que se extrajo por punción cardíaca. Los intestinos delgado y grueso fueron extraídos y fueron lavados con 3 mL de medio RPMI frío. El material eluido fue resuspendido y se añadieron 250 µL de *p*-hidroximercuriobenzoato 10 mM (disuelto en Tris, 150 mM) para inhibir la actividad de cisteín-proteinasas.

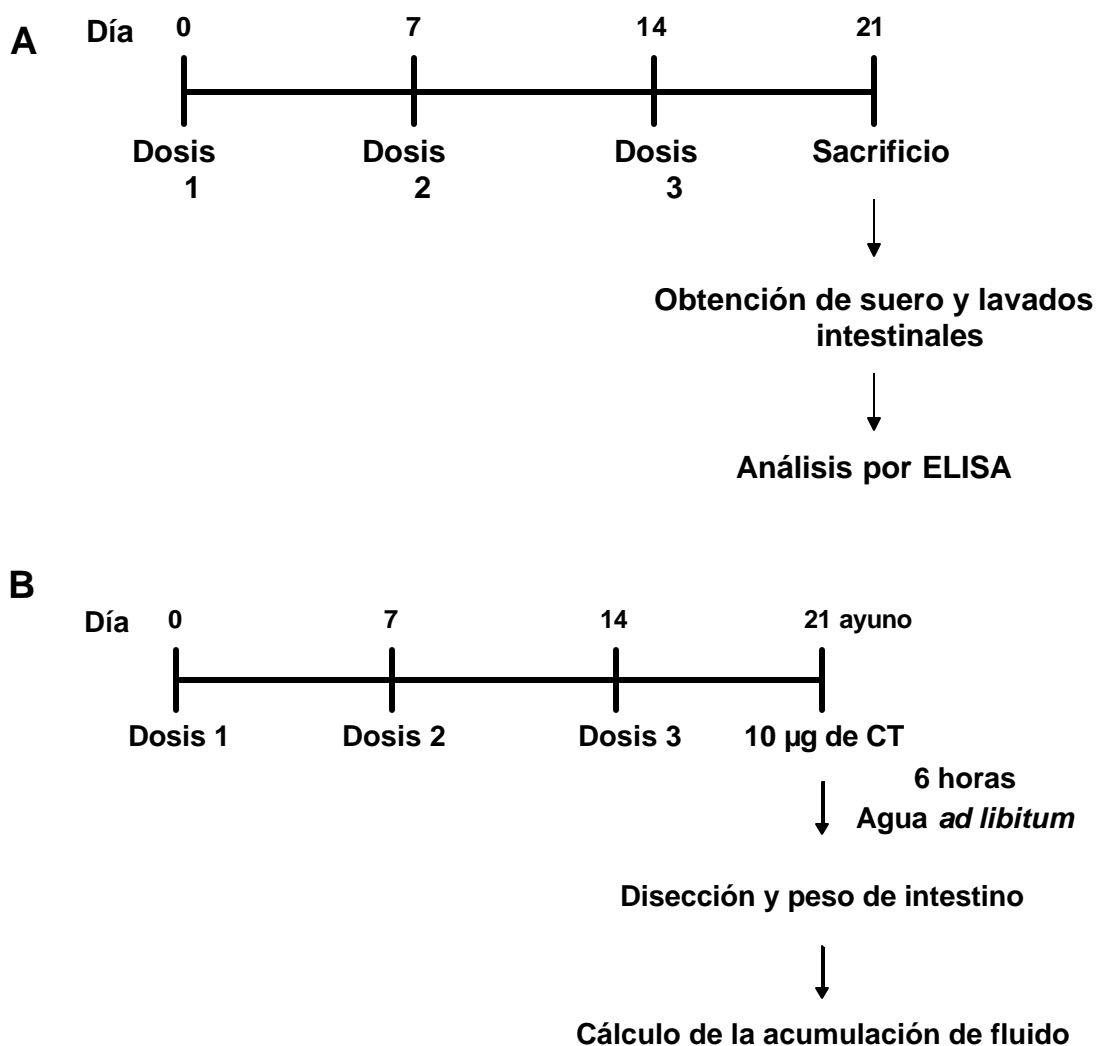


Figura 7. Esquemas de inmunización y de reto con toxina del cólera. **A.** Esquema de inmunización con LTB derivada de zanahoria y LTB bacteriana pura. Se administraron tres dosis semanales equivalentes a 10 µg de LTB. Al día 21, una semana después de la tercera dosis, los ratones se sacrificaron para la colección de muestras. **B.** Esquema del ensayo de protección contra toxina de cólera. Una semana después del esquema de inmunización, se administró una dosis intragástrica de 10 µg de toxina de cólera a los ratones en ayuno. Seis horas después, los animales fueron sacrificados para extraer el intestino delgado y estimar la acumulación de fluido.

Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm a 4°C por 10 min y los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta el análisis de contenido de anticuerpos.

4.6.5 Determinación de niveles de anticuerpos por ELISA

Los niveles de anticuerpos anti-LTB en suero y fluidos intestinales fueron determinados por un ensayo tipo ELISA. Después de cada incubación las placas fueron lavadas con PBST. Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas durante toda la noche a 4°C con buffer de carbonatos conteniendo LTB (5 µg/mL). Después, se bloquearon con leche descremada al 5% disuelta en PBST. Las muestras de suero fueron diluidas 1:50 en PBST, en tanto que los fluidos intestinales fueron diluidos 1:2.

Las muestras se cargaron en las placas y fueron incubadas toda la noche a 4°C. De acuerdo al análisis se añadieron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (Pierce, Rockford, IL), anti-IgA de ratón (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) o anti-IgG1 o IgG2a biotinilado (Zymed). Las placas se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Aquellas incubadas con anticuerpos biotinilados, para el análisis de subclases de IgG, fueron lavadas con PBST, se añadió estreptavidina conjugada a peroxidasa y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Finalmente, las placas fueron incubadas 15 min con solución de sustrato (o-fenilendiamina, 0.5 mg/ml; H₂O₂, 0.01%; buffer de citratos, 50 mM, pH 5.2) y la reacción fue detenida con 25 µL de H₂SO₄ 2.5 M para registrar la absorbancia a 492 nm (A_{492}) en un lector de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA).

4.6.6 Análisis estadísticos

Los resultados del experimento de reto con CT y de la medición de niveles de anticuerpos fueron contrastados mediante un análisis de varianza. Se consideraron significativos valores de $P < 0.05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Construcciones genéticas

5.1.1 Clonación del gen sintético de LTB en el vector pBI121

A fin de contar con un cassette de expresión funcional en plantas para el gen LTBs, se realizó su clonación en el vector binario pBI121. Para alcanzar este objetivo fue necesario realizar una subclonación intermedia empleando el vector pGEM-T, a fin de contar con los sitios apropiados (*Bam* HI/*Sac* I). Para ello, el gen LTBs fue liberado del vector PCR4 TOPO por digestión con *Nco* I/*Spe* I. Este fue purificado y ligado al vector pGEM-T. Se obtuvieron numerosas clonas candidatas, las cuales fueron analizadas por digestión con las enzimas *Bam* HI/*Sac* I.

La Figura 8 (carril 2) muestra el perfil de restricción de una clona positiva. Se eligió una de ellas para purificar el fragmento de interés y realizar la ligación al plásmido pBI121. Éste fue previamente tratado con las mismas enzimas, liberando el gen GUS (Figura 8, carril 4). Después de la ligación de los fragmentos de interés, se analizó el perfil de restricción (*Bam* HI/*Sac* I) de las clonas resultantes. La Figura 8 (carril 5) muestra el perfil de una de las clonas positivas para este análisis.

5.1.2 Construcción y clonación del gen LTB-ST

La estrategia para construir la fusión LTB-ST se basó en la amplificación por PCR del extremo 5' del gen LTB y su posterior clonación en el vector pCRScript-ST (sintetizado por GenArt), que contenía la parte faltante del extremo 3' del ORF de LTB, el linker y el ORF de ST. La Figura 9 muestra la clona positiva para esta fusión, liberada con las enzimas *Nco* I/*Sac* I (carril 3). Para la clonación en pBI121, este fragmento fue ligado al 5'TEV UTR tratado con *Eco* RI-*Klenow*/*Nco* I y al vector pBI121 digerido previamente con *Sma* I/*Sac* I (carriles 2 y 4, respectivamente). El análisis de clonas se llevó a cabo por digestión con *Hind* III/*Eco* RI, esperando la liberación de un fragmento de 1,700 pb para la construcción deseada. Como se muestra en la Figura 9, cuatro clonas presentaron el perfil esperado.

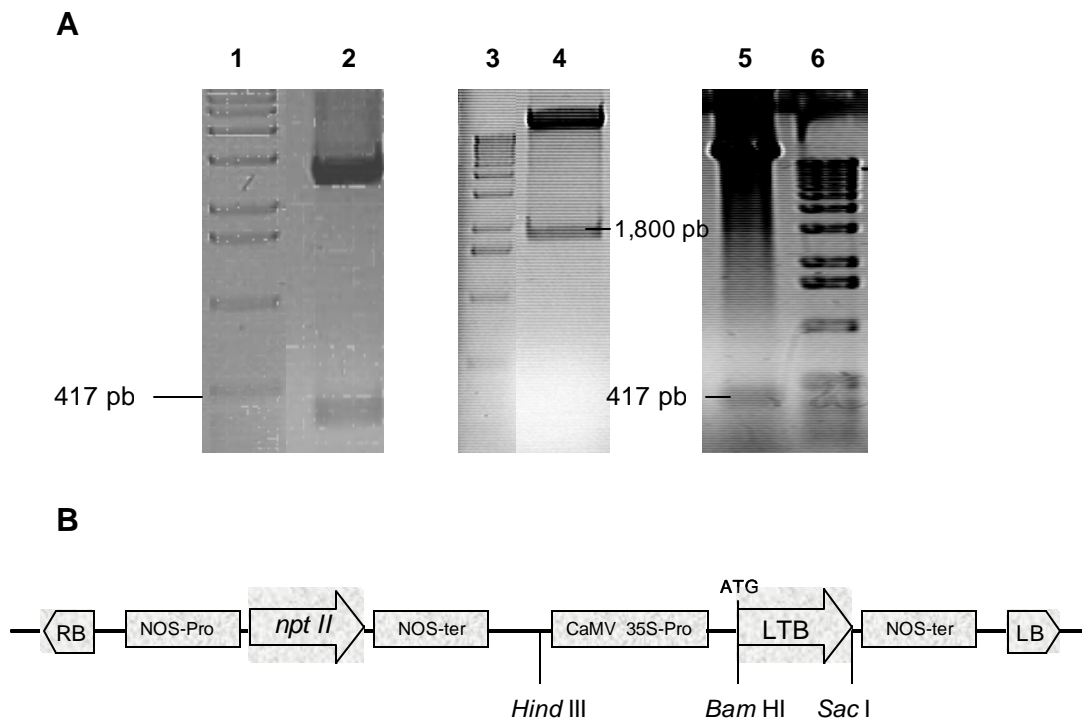


Figura 8 A. Proceso de clonación del gen LTBs en el vector binario pBI121. **A.** Carriles: 1, 3 y 6, marcador de peso molecular (1 Kb); 2, vector pGEM-T digerido con *Bam* HI/*Sac* I, liberando el gen LTBs; 4, vector pBI121 digerido con *Bam* HI/*Sac* I liberando el fragmento de GUS de 1,800 pb; 4, clona pBI-LTB positiva, digerida con *Bam* HI/*Sac* I, liberando una banda de 417 pb. **B.** Estructura del T-DNA empleado para la expresión del gen LTBs. La transcripción es controlada por el promotor CaMV 35S. El T-DNA también incluye el gen de la neomicina fosfotransferasa (*npt II*) bajo el promotor de la nopalina sintasa (NOS-Pro). El terminador de la nopalina sintasa media la poliadenilación en ambos cassettes.

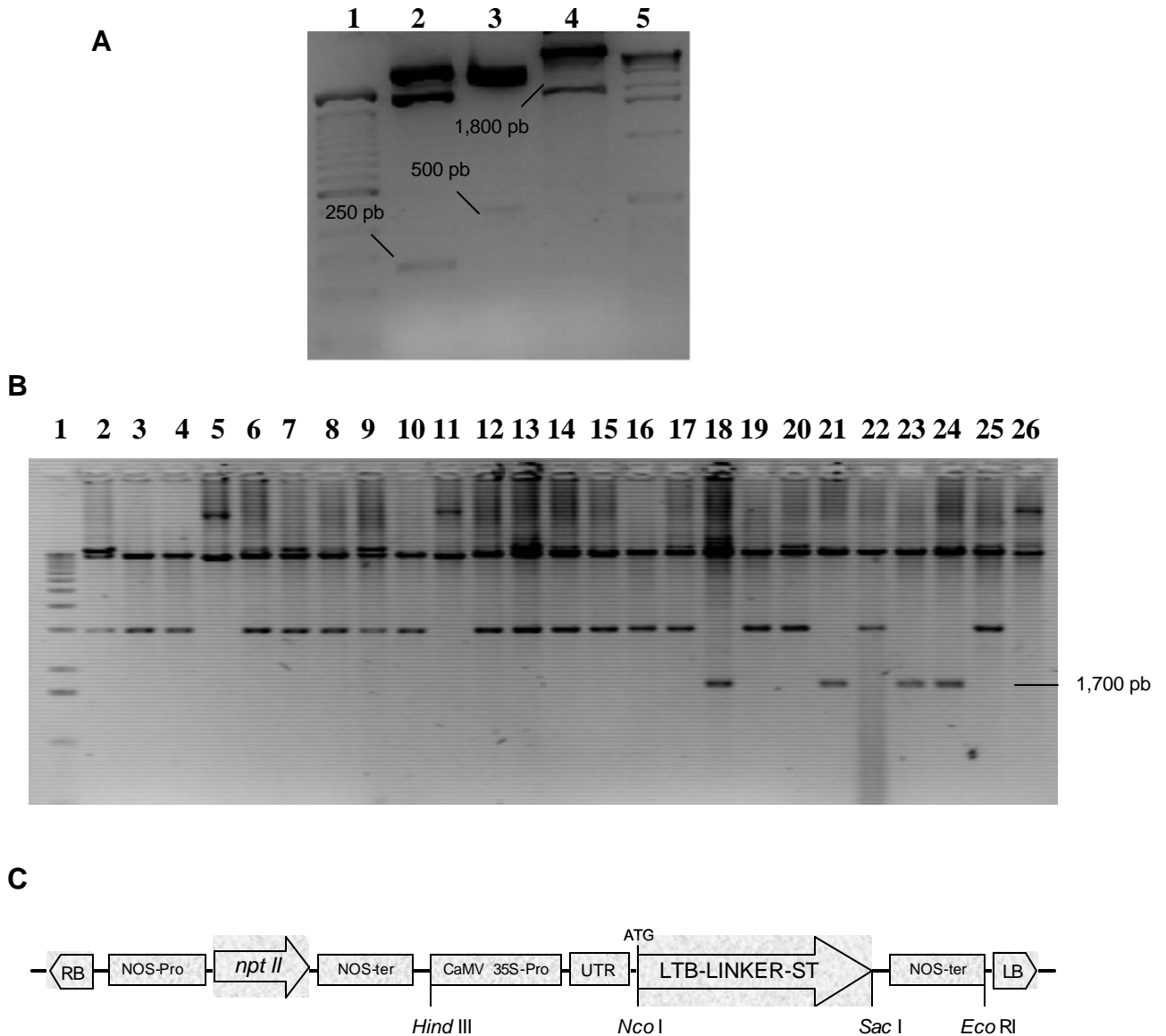


Figura 9. Proceso de construcción y clonación de la fusión LTB-ST en el vector binario pBI121. **A.** Carriles: 1, marcador de peso molecular (100 pb); 2, pTRL0027 tratado con *Eco* RI-Klenow, liberando el fragmento de 250 pb que contiene el 5'TEV, posteriormente digerido con *Nco* I; 3, pLTB-ST digerido con *Nco* I/*Sac* I, liberando la fusión LTB-ST de 500 pb; 4, pBI121 digerido con *Sma* I/*Sac* I, liberando el gen reportero *uidA* de 1,800 pb; 5, marcador de peso molecular (1 Kb). **B.** Carriles: 1, marcador de peso molecular (1 Kb); 2-26 posibles clonas pBI-LTB-ST digeridas con *Hind* III/*Eco* RI, liberando el fragmento esperado de 1,700 pb. **C.** Representación del T-DNA diseñado para la expresión del gen LTB-ST. Éste fue fusionado al 5'UTR de TEV (Tobacco Etch Virus) y su transcripción es regulada por el promotor CaMV35S.

5.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los vectores binarios fueron transferidos a *A. tumefaciens* empleando electroporación. Después de tres días de cultivo en medio selectivo se presentó desarrollo bacteriano, indicio de que la transformación fue exitosa. La presencia del plásmido fue confirmada realizando su purificación y análisis en un gel de agarosa, en el que se visualizó el plásmido en todos los casos (resultados no mostrados).

5.3 Estandarización del proceso de obtención de plantas transgénicas de zanahoria

El diseño de protocolos de transformación exitosos ha sido posible gracias a los avances en Biología Molecular, combinados con los métodos de cultivo *in vitro* para la regeneración de diferentes especies (Trigiano y Gray, 2000). Particularmente, para *D. carota* existen algunos protocolos reportados: Wurtele y Bulka (1989), Hardegger y Sturm (1998) y Marquet-Blouin y col. (2003). El común denominador de estos métodos es la infección con *A. tumefaciens* de explantes como cotiledones, hipocotilos o tallos, que mediante cultivo *in vitro* resultan en el desarrollo de callos que permiten la obtención de plantas completas a través de un proceso de embriogénesis somática.

5.3.1 Ensayos preliminares de transformación

Los primeros intentos de reproducir en nuestro laboratorio un método de transformación eficiente se realizaron siguiendo los protocolos de Hardegger y Sturm (1998) y Marquet-Blouin y col. (2003) (ver Tabla 3). Sin embargo, después de varias repeticiones en las que se emplearon un aproximado de 200 explantes por experimento, no se observó el desarrollo de callos en medio selectivo. Posteriormente se decidió probar las condiciones descritas por Wurtele y Bulka (1989), que sugiere la infección de callo. Tampoco se tuvo éxito bajo estas condiciones (Rosales-Mendoza, 2004). Debido a los factores que influyen en la transformación, se procedió a optimizarlos de forma individual con miras a obtener un método eficiente.

Tabla 3. Descripción de los protocolos ensayados para la transformación de zanahoria.

Protocolo	Wurtele y Bulka (1989)	Hardegger y Sturm (1998)	Marquet-Blouin y col. (2003)	Modificado
Variable				
Variedad	Danver	Nantes	cv. Senkou-Gosun	Nantes
Explante	Callos	Tallos de 1 semana	Tallos de 2 semanas	Tallos de 4 semanas
Medio de cultivo	MS ¹	MS	MS	MS/coctel 20 ²
Cepa de <i>Agrobacterium</i>	EHA101	LBA4404	LBA4404	LBA4404
Tasa de transformación observada *	0	0	0	30%

*Expresada como número de callos resistentes a kanamicina obtenidos por cada 100 explantes infectados.

¹MS, Medio de Murashige y Skoog, ver apéndice G.

²Coctel 20, ver apéndice G.

En 1992 Pawlicki y col. publicaron un estudio sobre algunos factores que tienen influencia en la tasa de transformación de zanahoria para las variedades Gold Pack, Nanco, De Chantenay, 2027H y 840217. En general, se observó que el periodo de cocultivo de 2-3 días resultó en la mayor tasa de transformación. Además, la edad de los explantes fue un factor determinante para la transformación, pues los explantes de 4 semanas de edad resultaron en una tasa de transformación promedio del 35%, lo que está en discrepancia con los protocolos que emplean explantes de 1 semana. Además, Olivera-Flores (comunicación personal), ha encontrado que la adición de una mezcla de compuestos nitrogenados y vitaminas, llamada coctel 20, resulta en un incremento significativo en la regeneración por embriogenesis somática de varias especies, incluyendo la zanahoria (Mere y Vázquez, 2003). Tomando en cuenta todo esto, realizamos ensayos que nos permitieran contar con un protocolo funcional y eficiente para la transformación de zanahoria.

5.3.2 Ensayos de regeneración

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que por tradición se emplea en los procedimientos de transformación genética de plantas, pues permite rescatar las células que han sido exitosamente transformadas, así como el desarrollo de plantas transgénicas a partir de éstas. A fin de optimizar las condiciones de regeneración de zanahoria se ensayaron dos medios de cultivo para la inducción de callos embriogénicos: CIM y MYT. Se sembraron tallos de plántulas de dos semanas en dichos medios y a las 8 semanas de incubación se evaluó el desarrollo de callos friables. Ambos medios resultaron en la formación de callo, sin embargo, solo en el medio MYT se presentaron estructuras embriogénicas globulares (Figura 10B).

Posteriormente, la regeneración de plantas completas a partir de los proembriones observados se indujo con la depleción de los niveles de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (2,4-D y BA). Esta se indujo incluyendo en el siguiente subcultivo sólo la mitad de los reguladores (2,4-D, 0.5 mg/L y BA, 0.15 mg/L) y la cuarta parte para el segundo subcultivo (2,4-D, 0.25 mg/L y BA, 0.075 mg/L), y finalmente, en un tercer subcultivo removerlos por completo.

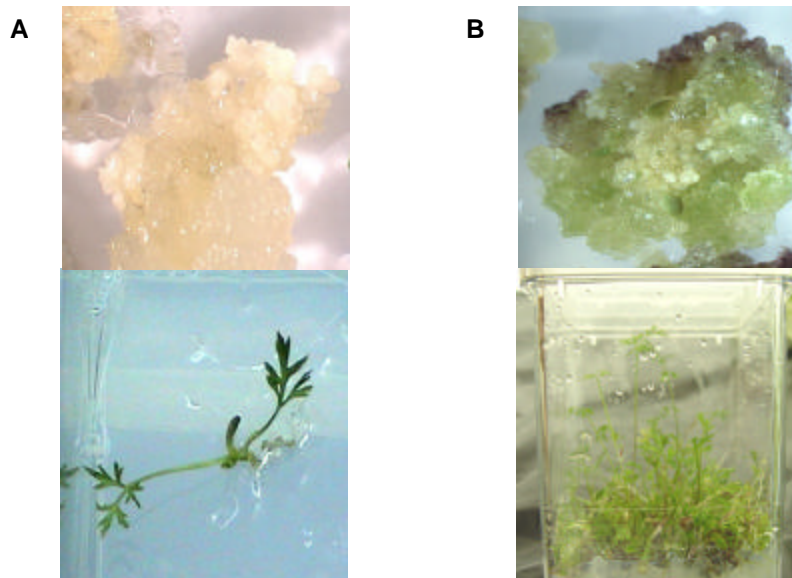


Figura 10. Efecto del medio de cultivo en la regeneración de zanahoria. Tallos de plántulas de 2 semanas de edad fueron cultivados en los medios CIM (A) o MYT (B). La embriogenesis somática fue inducida mediante la remoción de los reguladores de crecimiento del medio de cultivo.

Los embriones fueron germinados en un último subcultivo con medio sin reguladores y 15 g/L de sacarosa.

Después de la inducción de embriones, el medio CIM permitió la obtención de escasas plántulas, en tanto que el medio MYT resultó en excelentes tasas de regeneración, lo que permitió transferir exitosamente a suelo un gran número de plantas regeneradas *in vitro* (Figura 10). Estos datos son consistentes con reportes previos, dado que el medio MYT contiene una combinación de nitrógeno reducido (NH_4) y no reducido (NO_3), lo que se ha asociado a con la inducción de embriogénesis somática (Halperin y Wetherel, 1965).

5.3.3 Ensayos de transformación con el gen *uidA*

Otro paso crítico en la transformación de células vegetales es la etapa de infección del tejido. La integridad del explante al momento de la disección es determinante, pues debe permitir el acceso de la agrobacteria para realizar la infección, sin resultar en un estrés que conduzca a daño irreversible del tejido. Se decidió probar explantes de plántulas de 1 y 4 semanas de edad. Se realizaron experimentos de transformación con agrobacterias que portaban el vector pBI121. Después del cocultivo y proceso de selección, no se observó el desarrollo de callos resistentes a kanamicina en los explantes de 1 semana (Figura 11AI), evento que si fue observado en el caso de explantes de 4 semanas (Figura 11AII). Por lo tanto, para los experimentos posteriores se emplearon tallos de plántulas de 4 semanas de edad.

De los experimentos de transformación realizados con el vector pBI121, se obtuvieron 10 líneas en medio selectivo. Estas líneas fueron regeneradas y transferidas a suelo estéril para su desarrollo bajo condiciones controladas en cámara bioclimática. Se detectó la actividad de GUS mediante ensayo histológico y los resultados fueron positivos en distintos tejidos (Figura 11B). Estos resultados sugieren que el cocultivo de tallos jóvenes (1 semana) resulta en daño al tejido, lo cual no permite la proliferación exitosa de las células blanco. La tasa de transformación alcanzada bajo estas condiciones fue del 30%, valor comparable con el 35% alcanzado por Pawlicki y col. (1992).

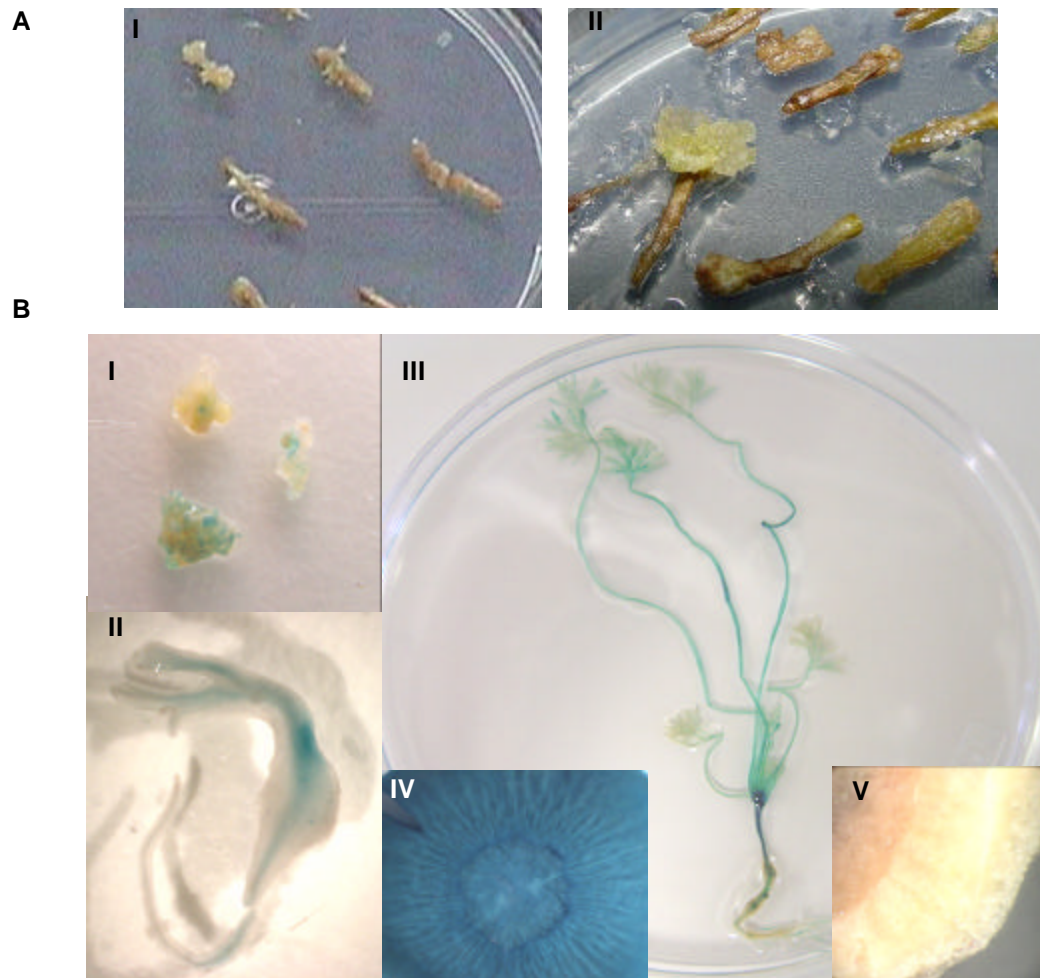


Figura 11. A. Efecto de la edad del explante en la transformación de zanahoria mediada por *Agrobacterium*. Tallos de 1 (I) o 4 (II) semanas fueron cocultivados con la agrobacteria conteniendo el vector pBI121 y posteriormente cultivados por 6 semanas en medio MYT selectivo (kanamicina, 50 mg/L). **B.** Detección histológica de GUS en tejidos de zanahoria (I), callos embriogénicos; (II), embrión somático maduro; (III), planta completa de 3 semanas; (IV), sección transversal de raíz de una planta transgénica adulta; (V), sección transversal de raíz de una planta silvestre adulta.

5.4 Obtención de transformantes para el gen LTB

El cocultivo de explantes con la cepa portadora del gen LTB se realizó bajo las condiciones optimizadas y a los dos meses obtuvimos 30 líneas independientes en medio selectivo. Seis meses después del cocultivo, 9 de esas líneas regeneraron exitosamente y fueron transferidas a suelo. En total, setenta plantas completaron su desarrollo hasta estado adulto (Figura 12).

5.5 Análisis de transformantes

5.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A fin de detectar los transgenes, en teoría transferidos durante el proceso de transformación, se realizó un análisis de PCR. Todas las líneas transformadas con el vector pBI121 mostraron la presencia de un amplicón de 600 pb correspondiente al gen *nptII*, lo cual sugiere que el T-DNA fue integrado al ADN cromosómico de las plantas de zanahoria (datos no mostrados). De las nueve líneas candidatas, todas presentaron un amplicón de 400 pb, que corresponde a la amplificación del gen LTB (Figura 13). El ADN genómico de zanahoria silvestre no presentó amplificación. Por lo tanto, estos resultados confirman la presencia del gen LTB en el genoma de la zanahoria.

5.5.2 Análisis de Southern blot

El ADN genómico de las 9 líneas de zanahoria fue sometido a restricción con la enzima *Hind* III (la cual reconoce un solo sitio de restricción en el T-DNA), separación electroforética, transferencia a membrana y a una hibridación, a fin de determinar el número de copias y el patrón de integración del transgén. La hibridación con la sonda específica para LTB (producto de PCR marcado no radiactivamente) mostró que todas las plantas tienen entre 1 y 2 copias del transgén. No se detectó señal en el ADN de zanahorias silvestres (Figura 14).



Figura 12. Aspecto de las plantas transgénicas adultas. Las plántulas regeneradas fueron transferidas a suelo y crecidas en un invernadero; se cultivaron al menos cinco plantas de cada línea para los estudios posteriores.

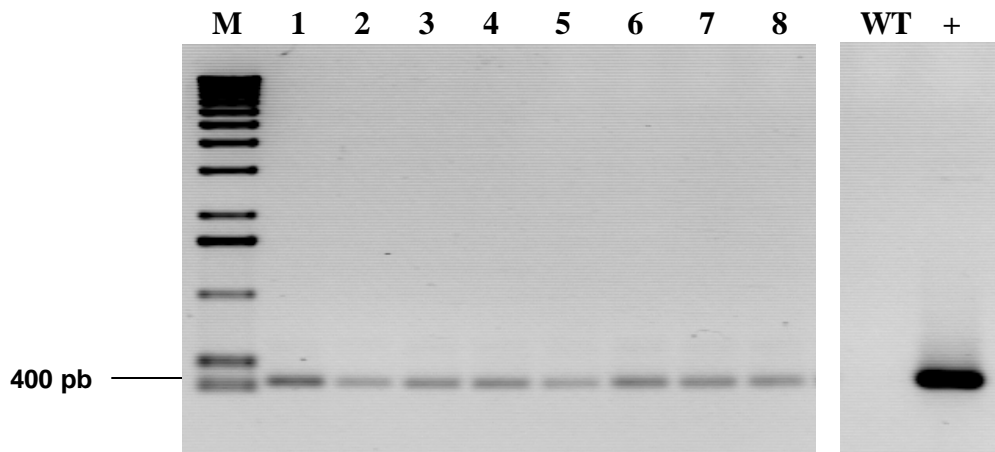


Figura 13. Detección por PCR del gen LTB en plantas de zanahoria. Se extrajo ADN total de hojas y se emplearon oligonucleotidos específicos para LTB, produciendo un amplicón de 417 pb. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1-8, ADN de plantas transformadas con pBI-LTB; WT, ADN de zanahoria silvestre; +, vector pBI-LTB.

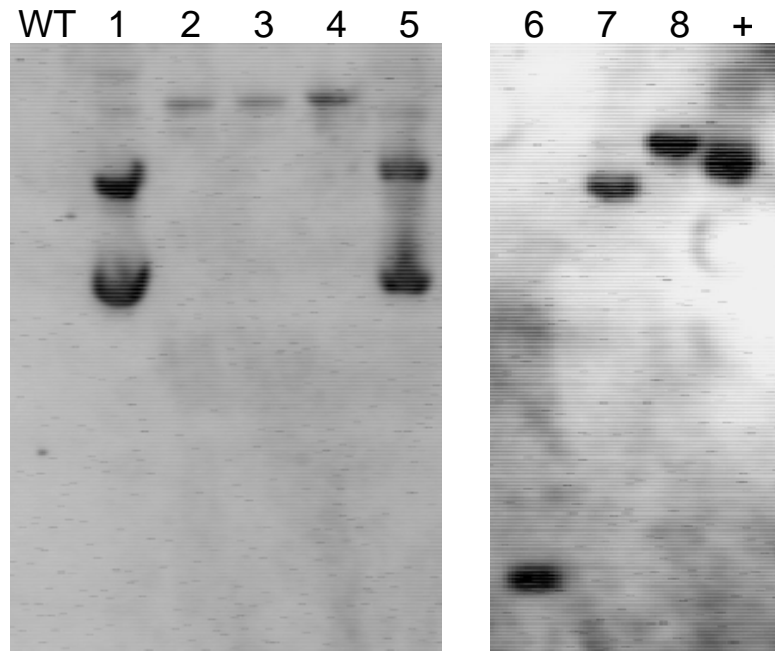


Figura 14. Análisis tipo Southern blot para confirmar el patrón de integración del gen LTB en el genoma de la zanahoria. Carriles: WT, ADN genómico de zanahoria silvestre; 1-8, plantas transgénicas, +, pBI-LTB linealizado. Los ADNs fueron digeridos con *HindIII* e hibridados con la sonda LTB (producto de PCR marcado con Digoxigenina).

5.5.3 Análisis de RT-PCR

El ARN total de las plantas transgénicas y silvestres se analizó para detectar los niveles del transcrito de LTB mediante RT-PCR. Todas las líneas transgénicas mostraron la presencia del transcrito de LTB, el cual no fue detectado en las plantas silvestres. Las unidades relativas ARNm respecto al control de carga actina, son graficadas en la Figura 15. Las líneas 1 y 3 mostraron el nivel más alto de transcrito. Dichos niveles fueron normalizados con el contenido del transcrito de la β -actina, la cual fue usada como control de carga.

5.5.4 Cuantificación de LTB

La cantidad de proteína LTB producida en raíces de plantas adultas de las zanahorias transgénicas se estimó mediante un ensayo GM1-ELISA. Las lecturas obtenidas en este ensayo se emplearon para determinar el porcentaje de LTB respecto a la proteína total soluble (%PTS) en la muestra, usando como referencia una curva estándar elaborada con LTB pura.

La línea transgénica 1, con un nivel alto de ARNm, mostró la acumulación de LTB mas alta: 0.3% PTS (Figura 15). Estos valores son un orden de magnitud superiores a los reportados por Haq y col. (1995) quienes usaron un gen nativo de LTB. Sin embargo, no se presentó una correlación directa entre los niveles de transcrito y de proteína en todas las líneas. Por ejemplo, la línea 3 presentó el nivel más alto de transcrito pero el nivel de proteína fue el más bajo y en contraste la línea 7 mostró el menor nivel de transcrito con los niveles mas altos de LTB después de línea 1. Estas observaciones pueden deberse a los diferentes sitios de inserción para cada línea y a las diferencias en el ARNm "steady state". Con base en estos resultados, la línea L1 fue empleada en los estudios posteriores.

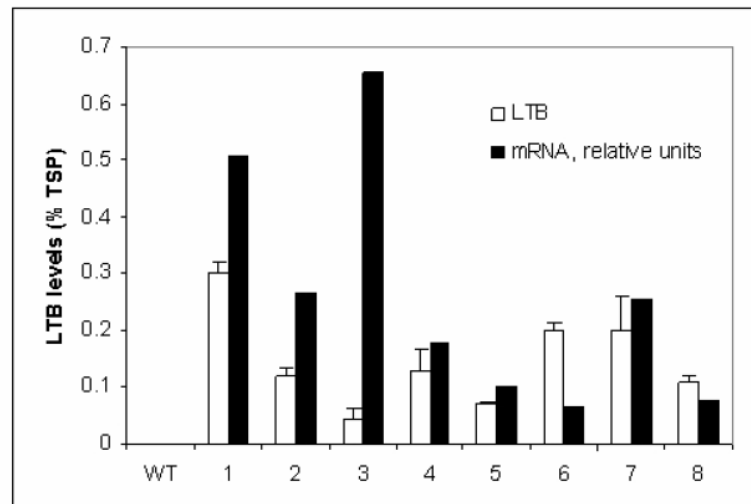


Figura 15. Cuantificación de los niveles de LTB pentamérica en plantas transgénicas de zanahoria. Se realizó un ensayo GM1-ELISA empleando anticuerpos anti-LTB, con la finalidad de medir los niveles de LTB. Se emplearon extractos de proteína total soluble (PTS) de la raíz de plantas adultas. Los niveles de LTB se grafican como porcentaje de LTB respecto a PTS; las barras de error representan la desviación estándar. Adicionalmente se realizó un análisis de RT-PCR para la estimación del nivel de transcripción de las diferentes líneas transgénicas. El ARN total fue extraído de raíces de plantas adultas. Los niveles de transcrito se muestran como unidades relativas respecto al control de carga (transcrito de β -actina). Columnas: WT, planta de zanahoria silvestre; 1-8, líneas transgénicas.

5.6 Análisis de la inmunogenicidad de LTB derivada de zanahoria

5.6.1 Contenido de LTB.

La cuantificación realizada por GM1-ELISA reveló que los niveles de LTB en L1 alcanzaron 3 µg de LTB por gramo de raíz fresca. Se cosecharon suficientes raíces de plantas adultas de esta línea, que fueron liofilizadas y nuevamente sometidas a la cuantificación de LTB. La cantidad de LTB ascendió a 23 µg por gramo de material liofilizado. Así, las dosis fueron de 430 mg, que corresponden a 10 µg de LTB. Este material fue resuspendido en 5 mL de agua destilada estéril minutos antes de la inmunización.

5.6.2 Respuesta humoral sistémica.

La inmunogenicidad de LTB fue determinada después de administrar tres dosis orales de LTB pura (rLTB), LTB derivada de zanahoria (cLTB) o zanahoria silvestre (cWT). Los niveles de anticuerpos anti-LTB séricos son mostrados en la Figura 16A. La respuesta humoral en el grupo designado como control negativo no fue significativamente diferente de aquella observada en los animales no tratados (datos no mostrados), en tanto que los animales alimentados con la zanahoria conteniendo LTB presentaron una respuesta significativamente menor que aquella inducida por la administración de rLTB ($P < 0.05$). Estos resultados indican que la LTB producida en zanahoria es inmunogénica por la ruta oral, aunque su potencia es menor que rLTB.

El análisis de subclases de IgG reveló que se indujeron anticuerpos de tipo IgG1 y IgG2a específicos para LTB en los ratones inmunizados con cLTB o rLTB, y que en ambos casos la subclase IgG1 es predominante (Figura 16B), lo cual indica que la respuesta es predominantemente de tipo humoral.

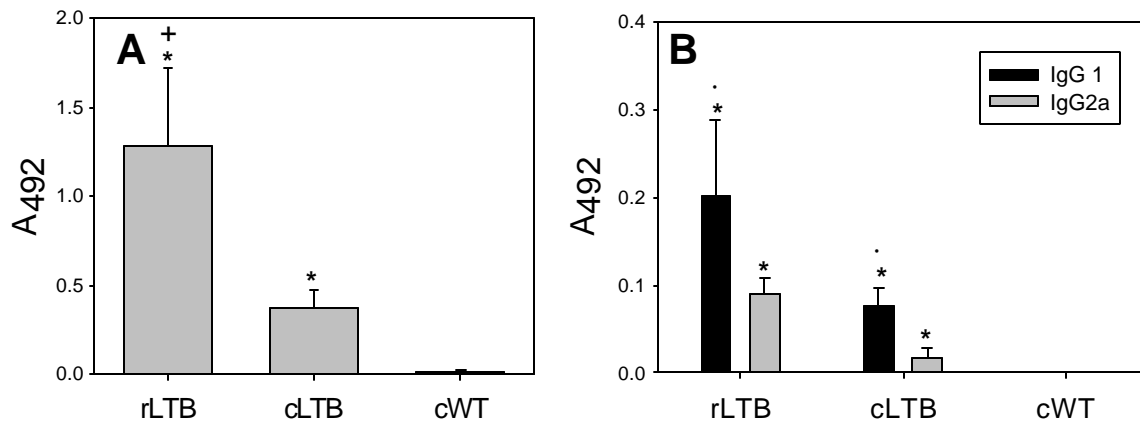


Figura 16. Respuesta humoral anti-LTB en suero. Se administraron tres dosis semanales de 10 μ g de LTB recombinante pura (rLTB) o LTB derivada de zanahoria (cLTB, de la línea 1), así como zanahoria silvestre (cWT) a ratones Balb/c por la ruta oral. Los niveles de anticuerpos anti-LTB IgG (**A**), así como IgG1 e IgG2a (**B**) fueron determinados por ELISA al día 21, en muestras de suero diluidas 1:50. Se muestran los valores de la media para la $A_{492} \pm SD$ de cada grupo experimental ($n = 5$). Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) se indican como sigue: (*) vs grupo control, cWT; (+) vs grupo inmunizado con cLTB; (?) vs subclase IgG2a.

5.6.3 Respuesta humoral en intestino

Después de la inmunización oral con cLTB, se detectaron respuestas humorales significativas de IgA anti-LTB en el intestino grueso, y la respuesta para rLTB fue significativamente mayor (Figura 17A). Adicionalmente, cLTB indujo una respuesta específica de IgG, cuya magnitud fue similar a aquella presentada en el grupo rLTB (Figura 17B). Estos resultados demuestran que cLTB es un inmunógeno de mucosas efectivo cuando es administrado por vía oral.

5.6.4 Protección contra el desafío con CT

Se reprodujo el ensayo de asa de intestino en ratón adulto para medir la actividad neutralizante de la respuesta humoral observada contra un desafío oral con CT (Figura 18). El valor medio de la acumulación de fluido (FA) en los ratones alimentados con material de zanahorias silvestres fue de 82.0 mg/g, que resultó significativamente mayor al valor medio que presentó el grupo control (52.5 mg/g, ratones naïve retados con el vehículo solamente). En contraste, el valor de FA de los ratones inmunizados con rLTB no fue significativamente diferente del control negativo y no resultó diferente del grupo tratado con dLTB. Sin embargo, el valor de FA de ratones inmunizados con cLTB fue significativamente mayor que el grupo retado solo con el vehículo.

Estos resultados indican que la inmunización oral con LTB derivada de zanahoria induce protección parcial contra CT a una magnitud que correlaciona con la respuesta de IgA anti-LTB, debido a que el grupo inmunizado con rLTB presentó altos niveles de IgA intestinal y bajos valores de FA, similares al grupo inmunizado con cLTB, aunque estos últimos presentaron valores de FA superiores al control negativo.

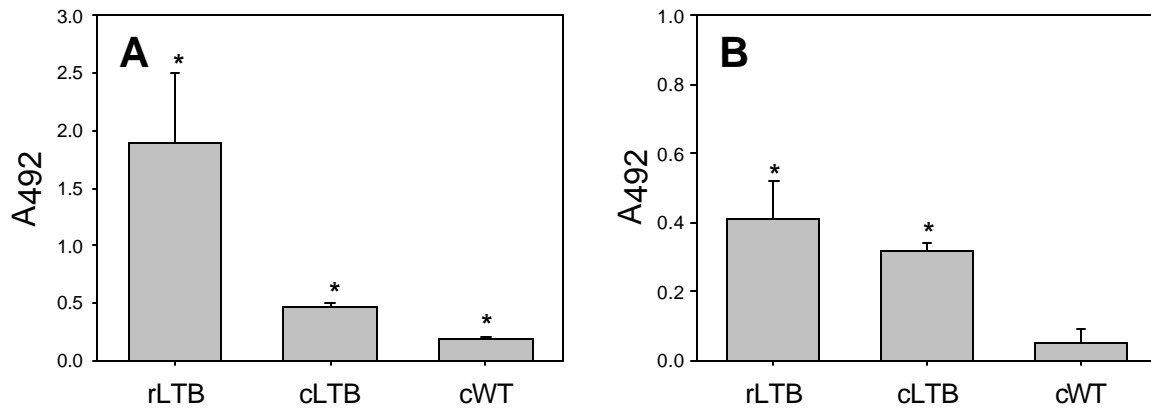


Figura 17. Respuesta humoral anti-LTB en intestino. Se administraron tres dosis semanales de 10 μ g de LTB recombinante pura (rLTB) o LTB derivada de zanahoria (cLTB, de la línea 1), así como zanahoria silvestre (cWT) a ratones Balb/c por la ruta oral. Los niveles de anticuerpos IgA (**A**), y de anticuerpos IgG (**B**) fueron determinados por ELISA al día 21 en muestras de fluido de intestino grueso diluidas 1:2. Se muestran los valores de la media para la $A_{492} \pm SD$ de cada grupo experimental ($n = 5$). Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) contra el control negativo (cWT) son indicadas con un asterisco.

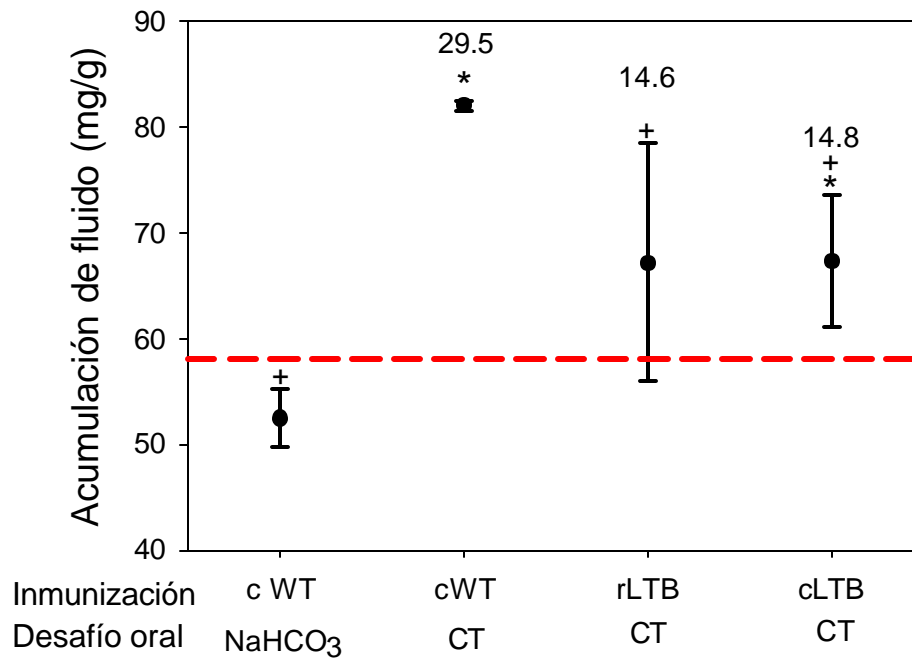


Figura 18. Protección inmune contra el desafío con toxina del cólera. Se administraron tres dosis semanales de zanahorias silvestres (cWT), LTB recombinante pura (rLTB) o LTB derivada de zanahoria (cLTB) a ratones Balb/c por la ruta oral. Al día 21, el grupo cWT recibió 500 μ l de buffer de bicarbonato (cWT NaHCO₃), mientras que los otros grupos (cWT, rLTB, cLTB) fueron desafiados con 10 μ g de toxina del cólera (CT), disuelta en el mismo volumen de buffer. Seis horas después, los ratones fueron sacrificados y los intestinos fueron disectados para determinar la acumulación de fluido (FA). Se muestra los valores de la media para FA \pm SD de cada grupo (n = 5). La línea de corte (en rojo) representa la media de FA + 2 SD del control negativo, cWT/NaHCO₃. El incremento en la media de FA respecto al control negativo se indica arriba de cada grupo. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) se indican como sigue: (*) vs grupo cWT/NaHCO₃ (control negativo), (+) vs grupo cWT/CT (control positivo).

A la fecha, son varios los grupos de investigación que han demostrado la inmunogenicidad oral de LTB producida en varios sistemas vegetales. Mason y col. (1998) demostraron esto por primera vez empleando papas que contenían entre 3.7-15.7 μg de LTB por gramo de tubérculo fresco. Ellos inmunizaron ratones con tres dosis de 20 μg o 50 μg de LTB derivada de papa, presentes en 5 g de tubérculo fresco. Aunque los animales no fueron completamente protegidos contra el desafío oral de LT, la vacunación efectuada mediante la ingestión de papas resultó en una respuesta comparable con la vacunación realizada con LTB pura producida en bacterias. Por otro lado, estudios clínicos han demostrado también la viabilidad de las plantas transgénicas como vehículo para la entrega de LTB, puesto que las papas transgénicas fueron capaces de inducir una respuesta inmune intestinal vigorosa hacia LTB en humanos (Tacket y col., 1998).

LTB ha sido expresada en maíz alcanzando hasta 350 $\mu\text{g/g}$ en granos secos pulverizados (Chikwamba y col., 2002a). Se ha reportado la inmunización de ratones con dosis de 10 μg de LTB, contenidos en 1 g de una preparación del maíz transgénico, en donde se observó una reducción en la acumulación de fluido intestinal ante el desafío oral con LT y CT (Chikwamba y col., 2002b). Este maíz productor de LTB ha resultado también inmunogénico en humanos (Tacket y col., 2004).

En el presente trabajo, la línea 1 de zanahorias transgénicas que expresan LTB alcanzó niveles de 3 μg de LTB por gramo de raíz de planta adulta (23 $\mu\text{g/g}$ de material liofilizado). Nosotros encontramos que tres dosis orales (conteniendo 10 μg de LTB derivada de zanahoria) indujeron en ratones respuestas anti-LTB a nivel sistémico y de mucosas. Sin embargo, los niveles de anticuerpos específicos IgG e IgA fueron menores que aquellos alcanzados por tres dosis de 10 μg de rLTB. Esta diferencia en potencia puede deberse a que la LTB derivada de zanahoria resulte menos biodisponible que la rLTB soluble debido a la matriz compleja del tejido vegetal. Aun así, la inmunidad alcanzada con el material de la línea L1 fue lo suficientemente alta para proteger parcialmente a los ratones contra el desafío con toxina del cólera. Estudios posteriores en los que se ensayen diferentes esquemas

de inmunización (por ejemplo, incrementando la cantidad de LTB por dosis y el número de las dosis) podría resultar en una respuesta inmune de mucosas que permita conferir una protección total contra el desafío oral con la toxina.

Nosotros concluimos que la Línea 1 de zanahorias modificadas genéticamente podría ser usada como una vacuna comestible práctica contra el cólera y la diarrea causada por ETEC, puesto que las zanahorias son un componente frecuente en la dieta que puede ser consumido crudo y tiene una vida de anaquel larga (Simon, 1984).

El trabajo a futuro deberá determinar si la línea L1 resulta inmunogénica en humanos y es capaz de inducir títulos significativos de anticuerpos a nivel sistémico y local.

5.7 Obtención y caracterización de transformantes de tabaco para el gen LTB-ST.

Después de dos meses de cultivo *in vitro*, el protocolo estándar para la transformación de hojas de tabaco nos permitió obtener 11 líneas resistentes a kanamicina (llamadas TS1-11). Los brotes generados se enraizaron exitosamente y fueron transferidos a suelo para cultivarse hasta su estado adulto y obtener la siguiente generación. Las semillas obtenidas tras la auto polinización se germinaron en medio selectivo (MS con 200 mg/L de kanamicina). Todas las líneas fueron capaces de germinar en este medio, a excepción de TS4, TS6 y TS10, que fueron descartadas. Las líneas seleccionadas se crecieron en suelo hasta el estado adulto para los análisis posteriores.

5.7.1 Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las líneas de la generación T1 mostraron la presencia de un amplicón de 380 pb correspondiente al gen LTB-ST, lo cual sugiere que el T-DNA fue integrado al ADN cromosómico de estas plantas (Figura 19). El ADN genómico de tabaco silvestre no presentó amplificación. Por lo tanto, estos resultados confirman la presencia del gen LTB-ST en el genoma del tabaco.

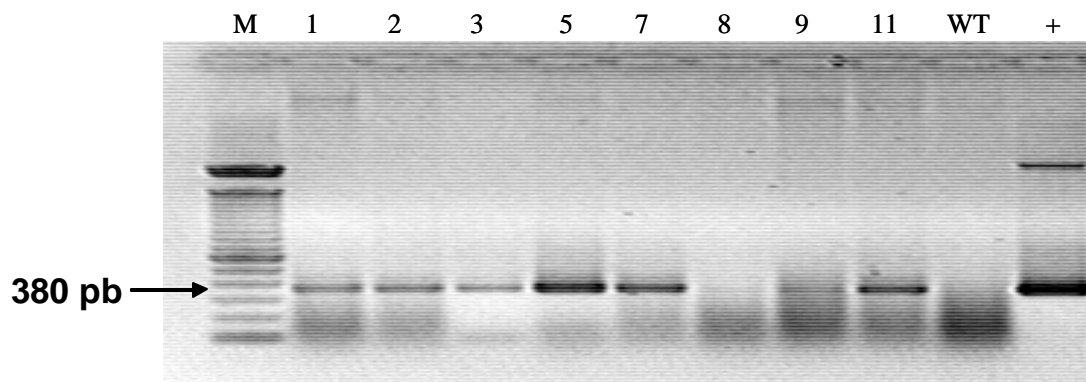


Figura 19. Detección por PCR del gen LTB-ST en plantas de tabaco. Se extrajo ADN total de hojas y el se emplearon oligonucleótidos específicos para LTB-ST, produciendo un amplicón de 380 pb. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 y 11, ADN de plantas transformadas con pBI-LTB-ST; WT, ADN de tabaco silvestre; +, vector pBI-LTB-ST.

5.7.2 Análisis de RT-PCR

El ARN total de las plantas transgénicas y silvestres se analizó para detectar los niveles del transcrito de LTB-ST mediante RT-PCR. Todas las líneas transgénicas mostraron la presencia del transcrito de LTB-ST, siendo la línea 3 la que presentó los niveles más altos de ARNm (Figura 20).

5.5.4 Cuantificación de LTB-ST

La cantidad de la proteína LTB-ST expresada en hojas de las plantas adultas de tabaco se estimó mediante un ensayo GM1-ELISA, que detecta la estructura pentamérica de LTB. Debido a que los niveles de expresión detectados fueron menores que los alcanzados para LTB en zanahoria, estos se reportan en ng de LTB por cada μg de proteína total soluble ($\text{ng}/\mu\text{g}$ PTS). La línea TS3, con el nivel más alto de ARNm, mostró la acumulación de LTB-ST más alta: $0.5 \text{ ng}/\mu\text{g}$ PTS (0.05% PTS) (Figura 20). En general en este caso se observó una correlación directa entre los niveles de transcrito y de proteína.

Adicionalmente, se realizó un ensayo tipo Western blot, con la finalidad de probar la integridad de la proteína de fusión por comparación con la movilidad de LTB. La Figura 21 muestra el resultado de este análisis. Los extractos obtenidos de la línea TS3 presentaron una banda que corresponde a la presencia de la proteína de fusión LTB-ST, ya que presenta una menor movilidad que LTB.

Estos ensayos nos permiten concluir que la proteína de fusión LTB-ST retiene la capacidad de formar pentámeros y conserva los determinantes antigénicos de LTB, lo que concuerda con lo descrito por Clements (1990) para esta proteína de fusión producida en *E. coli*. A la fecha no existen reportes de la expresión de proteínas de fusión para ST en plantas, estrategia que puede ser de gran relevancia, debido a que ST es un factor importante de virulencia en las infecciones por *V. cholerae* y ETEC.

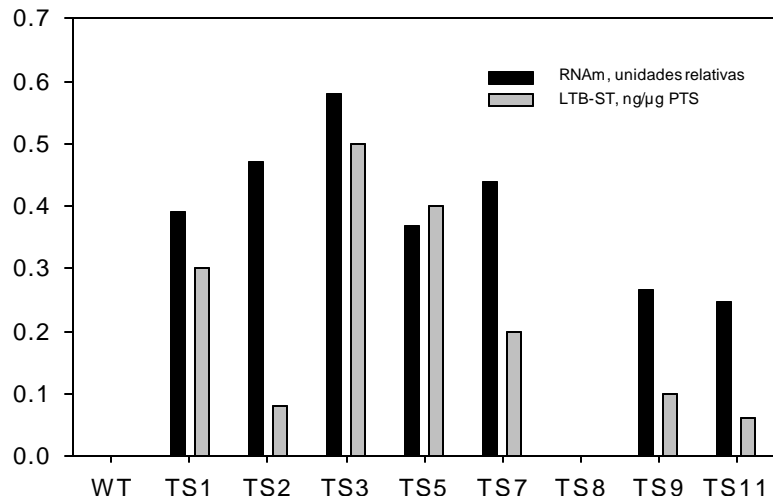


Figura 20. Cuantificación de los niveles de LTB-ST en plantas transgénicas de tabaco. Se realizó un ensayo GM1-ELISA empleando anticuerpos anti-LTB con la finalidad detectar la proteína de fusión mediante los determinantes antigénicos de LTB. Se emplearon extractos de proteína total soluble (PTS) de hojas de plantas adultas. Los niveles de LTB se grafican como ng LTB respecto a μg de PTS. Adicionalmente se realizó un análisis de RT-PCR para la estimación del nivel de transcripción de las diferentes líneas transgénicas. El transcrito de β -actina se empleó como control de carga. Se empleó ARN total de hojas de plantas adultas. Columnas: WT, planta de tabaco silvestre; TS1-TS11, líneas transgénicas. Los niveles de transcrito se muestran como unidades relativas.

rLTB WT TS3

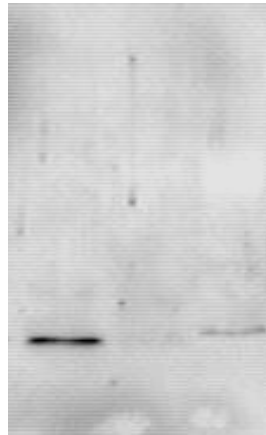


Figura 21. Detección de la proteína de fusión LTB-ST en plantas transgénicas de tabaco mediante Western blot. Se realizó un ensayo tipo Western blot empleando anticuerpos anti-LTB. Se emplearon extractos de proteína total soluble (PTS) de hojas de plantas adultas. Carriles: rLTB, LTB pura; WT, planta de tabaco silvestre; TS3, líneas transgénicas de tabaco productoras de LTB-ST. Se observa una menor movilidad para LTB-ST.

Inicialmente la idea de usar a LTB como proteína acarreadora de ST se llevó a cabo mediante entrecruzamiento químico de ambas proteínas. Esta estrategia presentaba la ventaja de producir una molécula con los determinantes antigénicos de ambas toxinas y a la vez abatir la toxicidad de ST (Klipstein y col., 1982).

Sin embargo, las desventajas de este sistema son claras: alto grado de manipulación, altos costos y la incapacidad de definir la naturaleza y el grado del entrecruzamiento en el producto final. Además, la toxicidad de estas preparaciones se vió reducida, pero no completamente eliminada. En contraste, el uso de fusiones genéticas de ambas toxinas presenta ventajas sobre los conjugados químicos, por ejemplo, estas permiten obtener antígenos con estructura precisa y homogénea y la posibilidad de administrarse por vía oral. En nuestro sistema, el uso de plantas tendría adicionalmente claras ventajas, como lo es el bajo costo y por tanto mayor accesibilidad.

El trabajo a futuro deberá determinar si la proteína LTB-ST conserva los determinantes antigénicos de ST, así como estudiar la respuesta inmune inducida en ratones y su capacidad de proteger contra la acción de ambas toxinas.

VI. CONCLUSIONES

1. Las plantas transgénicas de zanahoria transformadas con el gen sintético producen LTB en niveles de hasta 3 μg de LTB/g de raíz fresca, lo cual representa niveles un orden de magnitud superiores a los alcanzados con el gen bacteriano.
2. La proteína recombinante LTB es funcional *in vitro*.
3. La proteína recombinante LTB es inmunogénica para ratones por vía oral, en los cuales induce predominantemente una respuesta humoral.
4. La inmunización con tres dosis semanales de 10 μg /cLTB induce protección parcial contra el desafío con toxina del cólera.
5. Es posible expresar en plantas de tabaco una fusión LTB-ST a niveles de 0.5 ng/ μg PTS. Los resultados preliminares sugieren que la proteína es funcional *in vitro*.

VII. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral colocan la base para perspectivas relevantes, que incluyen:

1. Modificar el protocolo de inmunización de ratones con zanahorias productoras de LTB para tratar de alcanzar protección completa contra el reto con CT, y adicionalmente realizar el reto con LT.
2. Propagar mediante cultivo *in vitro* o por semilla la línea 1 de zanahoria productora de LTB e iniciar pruebas de fase 1 en humanos.
3. Completar la caracterización de las plantas de tabaco productoras de LTB-ST, lo que incluye determinar la presencia de los determinantes antigénicos de ST, así como su inmunogenicidad por vía oral en ratones.

VIII. APÉNDICES

A. Preparación de células competentes de *E. coli* y su transformación

Se prepararon células competentes a partir de un cultivo de *E. coli* Top 10 de 24 horas, crecido en caldo LB a 37 °C. De este preinóculo se tomaron 250 µL y se añadieron a 25 mL de caldo LB, se incubó por 90 min a 37°C con agitación de 150 rpm. El cultivo se enfrió en baño de hielo y se centrifugó 35 s a 12,000 rpm. La pastilla se lavó con 4 mL de la solución de lavado (CaCl₂, 0.1 M; glicerol, 15%), y se volvió a empacar por centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en 630 µL de solución de lavado 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 3.0 µL del ADN, se mezcló cuidadosamente y se incubaron en hielo por 15 min. Los tubos se llevaron a un baño de agua a 43°C por 1 min y se regresaron inmediatamente al hielo por 10 min. Posteriormente se añadió 1 mL de medio de cultivo LB y las células fueron recuperadas por 40 min a 37°C y 150 rpm. Después, 100 µL del cultivo se inocularon en agar LB con 50 mg/L de kanamicina o ampicilina, según el caso.

B. Aislamiento de ADN plásmidico

Se siguió el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Se partió de cultivos bacterianos crecidos toda la noche en medio LB adicionado del antibiótico apropiado. A fin de colectar las células, se tomó 1.5 mL cultivo y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min. El paquete celular se resuspendió en 150 µL de la solución I (Tris, 0.25 M, pH 8; EDTA, 10 mM; Glucosa, 10 mM), después se agregaron 300 µL de la solución II (NaOH, 0.2M; SDS, 1%) recién preparada y se mezcló por inversión 5 veces. Posteriormente se añadieron 225 µL de la solución III (Acetato de sodio, 3 M, pH 4.8), se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 min en hielo, para después centrifugar a 12,000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 30 min. Para colectar el ADN, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y la pastilla se lavó

con 300 μ L de etanol al 70%, que después de secar al aire fue resuspendida en 20 μ L de agua desionizada conteniendo 25 μ g/mL de RNAsa. El ADN se almacenó a -20°C.

C. Digestiones con enzimas de restricción

Las restricciones de ADN se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de los proveedores correspondientes. En general, se realizaron en un volumen de 20 μ L, que contenían 2 μ L del buffer apropiado 10X, aproximadamente 500 ng de ADN y 0.2 μ L de enzima (1U). Después de la incubación a 37°C o 25°C, se analizaron en geles de agarosa.

D. Análisis electroforético de ADN

Las muestras de ADN fueron separadas electroforéticamente en geles de agarosa al 1%, preparados con TAE 1X (preparado a partir de TAE 5X: Tris base, 98.8 g/L; ácido acético glacial, 22.84 mL/L; EDTA 0.5 M, 40 mL/L; pH 8). Las corridas se realizaron en una cámara de electroforesis BIORAD en solución amortiguadora buffer TAE 1X a 70V por 40 min. Finalmente los geles fueron teñidos en una solución acuosa de bromuro de etidio (1 μ g/mL), visualizados y digitalizados en un equipo UVP Chemisystem (UVP, Inc.).

E. Reacciones de ligación de ADN

Las ligaciones de fragmentos de ADN se llevaron a cabo en un volumen total de 10 μ L. Para ello se mezclaron 1 μ L de buffer 10X, vector, inserto(s), el volumen necesario de agua para completar el volumen final y 0.5 μ L de T4 ADN ligasa (200U, Biolabs). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por una hora y se empleó una alícuota de 5 μ l para transformar células competentes de *E. coli*.

F. Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Se prepararon de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col. (1991). La cepa LBA4404 se cultivó en medio de cultivo YM (extracto de levadura, 400 mg/L; manitol, 10 g/L; cloruro de sodio, 100 mg/L; sulfato de magnesio 200 mg/L; fosfato de potasio, 500 mg/L; pH 7.0). Se partió de un cultivo de la agrobacteria (5 mL) de tres días, que fue usado como

inóculo para 100 mL de medio YM, se incubó a 28°C hasta obtener una OD_{600nm} de 0.5 (aproximadamente 4 horas). Las células se colectaron mediante centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se lavaron con 40 mL de solución amortiguadora A (HEPES-KOH, 1mM, pH 7). Después de colectarlas nuevamente por centrifugación, fueron lavadas con 40 mL de solución amortiguadora B (solución amortiguadora A; glicerol, 10%) y resuspendidas en 2 mL de solución amortiguadora B. Finalmente, las bacterias se concentraron por centrifugación nuevamente, resuspendiendo en 400 µL de solución B, y fueron divididas en alícuotas de 50 µL que se almacenaron a -80°C.

G. Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo para plantas se basaron en la mezcla de sales descrita por Murashigue y Skoog (1962). Se prepararon cinco soluciones madre que contenían los distintos componentes de dicha mezcla a una concentración 100X (ver Tabla anexa). Así, para preparar 1 L de medio de cultivo se añadieron 10 mL de cada una de estas soluciones a 800 mL de agua desionizada. Después se añadieron las vitaminas MS 1000X (1 mL) o coctel 20 100X (10 mL) y reguladores de crecimiento apropiados y, a menos que se indique lo contrario, 30 g de sacarosa. Posteriormente se ajustó el pH a 5.7 con NaOH1N/HCl 1N y se aforó a 1L. Finalmente se añadieron 2 g/L de Phytigel y se esterilizó a 15 lb/pulgada² por 15 min. Cuando fue necesario, se añadieron los antibióticos apropiados antes de vaciar el medio a cajas de Petri, cuando alcanzó una temperatura aproximada de 60°C.

Composición de soluciones madre 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, a excepción de la solución I que se mantuvo a temperatura ambiente.

Composición de vitaminas MS*

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

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

Composición de coctel 20*

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Asparagina	10	10
Arginina	10	10
Ácido aspártico	7.5	7.5
Glicina	23	23
Glutamina	60	60
Ácido glutámico**	7.5	7.5
Biotina**	1	1
Ácido fólico**	1	1
Ácido nicotínico	1.5	1.5
Piridoxina	1.5	1.5
Riboflavina	0.1	0.1
Tiamina	3.0	3.0
Myo-inositol	145	145
Urea	45	45

*Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -20 °C. **Se disolvieron previamente en unas gotas de NaOH 1N. Tomado de Mere y Vázquez (2003).

Preparación de reguladores de crecimiento

Se prepararon soluciones madre de 1.0 mg/mL. Los reguladores 2,4-D y ANA se disolvieron en 1.0 mL de hidróxido de sodio 1 N, en tanto la benciladeina se disolvió en HCl 1 N. Después de aforar, las soluciones se almacenaron a -20°C.

H. Buffer de reacción para GUS*

Componente	Concentración
Fosfato monobásico de sodio	12.0 g/L
Fosfato dibásico de sodio	14.2 g/L
EDTA	10.0 mM
Ferrocianuro de potasio	0.5 mM
Ferricianuro de potasio	0.5 mM
Tritón	0.1%
X-gluc (ácido 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucurónico)	2.0 mM

*Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 5 mL a -20 °C y protegidos de la luz.

I. Soluciones Bradford

Solución A

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

Solución B

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

J. Preparación de geles de acrilamida

Solución de acrilamida/bisacrilamida (30%)

Para preparar 100 mL de esta solución se disolvieron 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en agua desionizada, se aforó a 100 mL, se filtró, se desgasificó por 10 min y se almacenó a 4°C.

Gel separador 12%

Se mezclaron los distintos reactivos en el siguiente orden

Componente	Concentración
Acrilamida/Bisacrilamida (30%)	2.5 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	1.25 ml
SDS 10%	50 µl
H ₂ O desionizada	1.675 ml
Persulfato de amonio 10% (recién preparado)	50 µl
TEMED	5 µl
Volumen total	5 ml

Inmediatamente después se cargaron 3.5 mL de esta solución en el portageles de la cámara Miniprotean, añadiendo 1 mL de etanol absoluto y se esperó hasta completar la polimerización (aproximadamente 15 min).

Gel concentrador 4%

Se mezclaron los distintos reactivos en el siguiente orden

Componente	Concentración
Acrilamida/Bisacrilamida (30%)	0.665ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8	1.25ml
SDS 10%	50 µl
H ₂ O desionizada	3.05 ml
Persulfato de amonio 10% (recién preparado)	25 µl
TEMED	5 µl
Volumen total	5 ml

Inmediatamente después se cargaron 1.5 mL de esta solución sobre el gel separador previamente polimerizado, se colocó el peine y se esperó hasta completar la polimerización (aproximadamente 15 min).

Electroforesis

Después de completar la polimerización de los geles, estos fueron ensamblados en una cámara Miniprotean. Finalmente se cargaron las muestras previamente desnaturalizadas en presencia de amortiguador de carga 1X y la corrida se llevó a cabo a 40 mA durante aproximadamente 3 h empleando amortiguador TGS 1X (Tris, pH 8.3, 3 g/L; Glicina, 14.4 g/L; SDS, 1 g/L).

K. Procedencia de reactivos

Proveedor	Reactivos
Invitrogen, EUA	<i>Escherichia coli</i> TOP 10, oligonucleótidos, Taq ADN polimerasa Pfx Platinum, Taq ADN polimerasa, Trizol, medio LB, marcador 1 Kb.
Sigma Chemical Co, EUA	Kanamicina, Tween 20, Tris, NaCl, EDTA, β-Mercaptoetanol, PVP, CTAB, acetato de sodio, acetato de amonio, citrato de sodio, ácido maléico, PMSF, leupeptina, gangliósido GM1, p-nitrofenilfosfato, p-hidroximercuribenzoato, carbonato de sodio, o-fenilendiamina, peróxido de hidrogeno, alcohol isoamílico, bromuro de etidio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, glicerol, glucosa, toxina del cólera, medio RPMI, anticuerpos de ratón anti-Ig de conejo/fosfatasa alcalina, manitol, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, HEPES, phytigel, nitrato de amonio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de cobre, cloruro de calcio, yoduro de potasio, cloruro de cobalto, fosfato de potasio monobásico, ácido bórico, molibdato de sodio dihidratado, sulfato ferroso heptahidratado, urea, myo inositol, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, glicina, ferrocianuro de potasio, ferricianuro de potasio, triton, azul de coomassie, acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio, TEMED, albúmina de suero bovino, PicoGreen.
New England Biolabs, EUA	Enzimas de restricción, T4 ADN ligasa.
Promega, EUA	pGEM T easy, dNTPs, bromuro de etidio.
Qiagen, EUA	QUIAEXII Kit.
Phytotechnology Laboratorios, EUA	Sacarosa, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, benciladenina, ácido naftalenacético, asparagina, arginina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, biotina, ácido fólico, riboflavina, X-gluc.
Uniroyal Chemical Co, EUA	Terrazole.
USB, EUA	Fenol, SDS, agarosa, extracto de levadura.
JT Baker, EUA	Cloroformo, etanol, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, hidróxido de potasio, isopropanol, ácido acético, ácido fosfórico.
GI, México	Cefotaxima
Agdia, México	PBS, PBST, leche descremada.
Roche, Alemania	Kit Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, RNAsa.
Applied Biosystems, EUA	Kit Taqman reverse transcription system
PIERCE, EUA	SuperSignal West Dura substrate, anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón
Zymed Laboratorios, EUA	Anticuerpos de cabra anti-IgA de ratón, anticuerpos anti-IgG1 o IgG2a biotinilados.
Biogénesis, EUA	Anticuerpos de conejo anti-LTB

L. Equipo

- Agitador orbital de mesa con plataforma Daigger modelo MX2139E
- Autoclave eléctrica Sterilmatic modelo STM-E tipo C
- Balanza analítica eléctrica Scientech modelo SA210D
- Balanza granataria Ohaus modelo 1400
- Baño María digital Fisher Scientific modelo Isotemp 1025
- Cámara bioclimática Lumistell modelo Mac-510
- Cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD modelo minisub-cell GT
- Cámara fotográfica Sony Cyber Shot modelo DSCF717
- Campana de extracción de humos Fisher Alder modelo CS línea 2000
- Campana de flujo laminar Fisher Alder
- Centrífuga refrigerada Kendro modelo Hareus Biofuge fresco
- Centrífuga Sorvall modelo RC 5C Plus
- Congelador Nieto modelo CVC15
- Cuarto de incubación de cultivos vegetales Lumistell
- Electroporador BTX modelo ECM 630
- Entrecruzador de ácidos nucleicos Spectronic Corporation modelo XL-1500
- Espectrofotómetro Beckman modelo DU 530
- Fluorómetro TECAN modelo Genios
- Fotodocumentador de geles UVP modelo EpiChemi3 Darkroom
- Fuente de poder Termo EC modelo EC105
- Homogenizador de tejidos Wheaton modelo 903475
- Horno de microondas LG modelo MS-217XQE
- Incubadora shaker New Brunswick Scientific modelo 12400
- Lector de microplacas BIO-RAD modelo 550
- Microcentrífuga Eppendorf modelo mini Spin
- Placa de calentamiento Corning modelo PC420
- Potenciómetro Corning modelo 430
- Refrigerador Torrey modelo R-14
- Termociclador Techne modelo Touchene Gradient
- Termomezclador R Eppendorf modelo 22331
- Untracongelador Nuair modelo UN-6613A35
- Vortex Fischer Scientific modelo Genie – 2

IX. ANEXOS

En esta sección se incluyen los trabajos, publicados o en proceso, generados en esta tesis doctoral, así como los proyectos adicionales realizados.

9.1 Expresión de la subunidad B de la toxina termolábil de *Escherichia coli* enterotoxigénica en zanahoria (*Daucus carota* L.)

Resumen

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

Artículo aceptado en *Plant Cell Reports* (2007)

Dear Dr/Prof. Ángel Gabriel Alpuche-Solís,

Here are the proofs of your article.

- You can submit your corrections **online** or by **fax**.
- For **online** submission please insert your corrections in the online correction form. Always indicate the line number to which the correction refers.
- For **fax** submission, please ensure that your corrections are clearly legible. Use a fine black pen and write the correction in the margin, not too close to the edge of the page.
- Together with the proof please return the cover sheet (including the *Copyright Transfer Statement*) and the *Offprint Order Form*. They can either be scanned and sent electronically or sent by fax.
- Remember to note the journal title, article number, and your name when sending your response via e-mail, fax or regular mail.
- **Check** the metadata sheet to make sure that the header information, especially author names and the corresponding affiliations are correctly shown.
- **Check** the questions that may have arisen during copy editing and insert your answers/ corrections.
- **Check** that the text is complete and that all figures, tables and their legends are included. Also check the accuracy of special characters, equations, and electronic supplementary material if applicable. If necessary refer to the *Edited manuscript*.
- The publication of inaccurate data such as dosages and units can have serious consequences. Please take particular care that all such details are correct.
- Please **do not** make changes that involve only matters of style. We have generally introduced forms that follow the journal's style. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case, please contact the Editorial Office and return his/her consent together with the proof.
- If we do not receive your corrections within 48 hours, we will send you a reminder.

Please note


Your article will be published **Online First** approximately one week after receipt of your corrected proofs. This is the **official first publication** citable with the DOI. **Further changes are, therefore, not possible.**

After online publication, subscribers (personal/institutional) to this journal will have access to the complete article via the DOI using the URL: [http://dx.doi.org/\[DOI\]](http://dx.doi.org/[DOI]).

If you would like to know when your article has been published online, take advantage of our free alert service. For registration and further information go to: <http://www.springerlink.com>.

Due to the electronic nature of the procedure, the manuscript and the original figures will only be returned to you on special request. When you return your corrections, please inform us, if you would like to have these documents returned.

The **printed version** will follow in a forthcoming issue.

Fax to: +44 870 622 1325 (UK) or +44 870 762 8807 (UK)  **Springer**

From: Springer Correction Team

6&7, 5th Street, Radhakrishnan Salai, Chennai, Tamil Nadu, India – 600004

Re: Plant Cell Reports DOI:10.1007/s00299-007-0310-2

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

Authors: Sergio Rosales-Mendoza · RuthElena Soria-Guerra · MaríaTeresaJesús Olivera-Flores · Rubén López-Revilla · GerardoRafael Arguello-Astorga · JuanFrancisco Jiménez-Bremont · RamónFernando García-de La Cruz · JuanPablo Loyola-Rodríguez · ÁngelGabriel Alpuche-Solís

I. Permission to publish

Dear Springer Correction Team,

I have checked the proofs of my article and

- I have no corrections. The article is ready to be published without changes.
- I have a few corrections. I am enclosing the following pages:
- I have made many corrections. Enclosed is the complete article.

II. Offprint order

- Offprint order enclosed
- I do not wish to order offprints

Remarks:

Date / signature _____

III. Copyright Transfer Statement (sign only if not submitted previously)

The copyright to this article is transferred to Springer-Verlag (respective to owner if other than Springer and for U.S. government employees: to the extent transferable) effective if and when the article is accepted for publication. The author warrants that his/her contribution is original and that he/she has full power to make this grant. The author signs for and accepts responsibility for releasing this material on behalf of any and all co-authors. The copyright transfer covers the exclusive right to reproduce and distribute the article, including reprints, translations, photographic reproductions, microform, electronic form (offline, online) or any other reproductions of similar nature.

An author may self-archive an author-created version of his/her article on his/her own website and his/her institution's repository, including his/her final version; however he/she may not use the publisher's PDF version which is posted on <http://www.springerlink.com>. Furthermore, the author may only post his/her version provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The original publication is available at <http://www.springerlink.com>."

The author is requested to use the appropriate DOI for the article (go to the Linking Options in the article, then to OpenURL and use the link with the DOI). Articles disseminated via <http://www.springerlink.com> are indexed, abstracted and referenced by many abstracting and information services, bibliographic networks, subscription agencies, library networks, and consortia.

After submission of this agreement signed by the corresponding author, changes of authorship or in the order of the authors listed will not be accepted by Springer.

Date / Author's signature _____

Offprint Order Form

To determine if your journal provides free offprints, please check the journal's instructions to authors. If you do not return this order form, we assume that you do not wish to order offprints.

If you order offprints **after** the issue has gone to press, costs are much higher. Therefore, we can supply offprints only in quantities of 300 or more after this time.

For orders involving more than 500 copies, please ask the production editor for a quotation.

Please enter my order for:

Pages	1-4	1-4	5-8	5-8	9-12	9-12	13-16	13-16	17-20	17-20	21-24	21-24	25-28	25-28	29-32	29-32
Copies	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD
<input type="checkbox"/> 50	250,00	275,00	300,00	330,00	370,00	405,00	430,00	475,00	500,00	550,00	525,00	575,00	575,00	630,00	610,00	670,00
<input type="checkbox"/> 100	300,00	330,00	365,00	405,00	465,00	510,00	525,00	580,00	625,00	685,00	655,00	720,00	715,00	785,00	765,00	840,00
<input type="checkbox"/> 200	400,00	440,00	525,00	575,00	645,00	710,00	740,00	815,00	860,00	945,00	925,00	1,015,00	1,005,00	1,105,00	1,080,00	1,190,00
<input type="checkbox"/> 300	500,00	550,00	680,00	750,00	825,00	910,00	955,00	1,050,00	1,095,00	1,205,00	1,190,00	1,310,00	1,295,00	1,425,00	1,390,00	1,530,00
<input type="checkbox"/> 400	610,00	670,00	855,00	940,00	1,025,00	1,130,00	1,195,00	1,315,00	1,360,00	1,495,00	1,485,00	1,635,00	1,615,00	1,775,00	1,740,00	1,915,00
<input type="checkbox"/> 500	720,00	790,00	1,025,00	1,130,00	1,225,00	1,350,00	1,430,00	1,575,00	1,625,00	1,785,00	1,780,00	1,960,00	1,930,00	2,125,00	2,090,00	2,300,00

Please note that orders will be processed only if a credit card number has been provided. For German authors, payment by direct debit is also possible.

I wish to be charged in Euro USD

Prices include surface mail postage and handling. Customers in EU countries who are not registered for VAT should add VAT at the rate applicable in their country.

VAT registration number (EU countries only):

Please charge my credit card

Eurocard/Access/MasterCard

American Express

Visa/Barclaycard/Americard

Number (incl. check digits):

Valid until: __/__/__

Date/Signature: _____

Send receipt to

ÁngelGabriel Alpuche-Solís
 División de Biología Molecular
 Instituto Potosino de Investigación Científica y
 Tecnológica
 Camino a la Presa San José 2055
 San Luis Potosí, 78216, Mexico

For authors resident in Germany: payment by direct debit:

I authorize Springer-Verlag to debit the amount owed from my bank account at the due time.

Account no.: _____

Bank code: _____

Bank: _____

Date/Signature: _____

Send offprints to

ÁngelGabriel Alpuche-Solís
 División de Biología Molecular
 Instituto Potosino de Investigación Científica y
 Tecnológica
 Camino a la Presa San José 2055
 San Luis Potosí, 78216, Mexico

Metadata of the article that will be visualized in OnlineFirst

ArticleTitle	Expression of <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin b subunit (LTB) in carrot (<i>Daucus carota</i> L.)	
Article Sub-Title		
Journal Name	Plant Cell Reports	
Corresponding Author	Family Name	Alpuche-Solís
	Particle	
	Given Name	Ángel Gabriel
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	alpuche@ipicyt.edu.mx
Author	Family Name	Rosales-Mendoza
	Particle	
	Given Name	Sergio
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	Soria-Guerra
	Particle	
	Given Name	Ruth Elena
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	Olivera-Flores
	Particle	de
	Given Name	María Teresa Jesús
	Suffix	
	Division	Facultad de Química
	Organization	Universidad Nacional Autónoma de México
	Address	Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F., Mexico
	Email	
Author	Family Name	López-Revilla
	Particle	
	Given Name	Rubén
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	Arguello-Astorga
	Particle	
	Given Name	Gerardo Rafael
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	Jiménez-Bremont
	Particle	
	Given Name	Juan Francisco
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	García-de La Cruz
	Particle	
	Given Name	Ramón Fernando
	Suffix	
	Division	Facultad de Ciencias Químicas
	Organization	Universidad Autónoma de San Luis Potosí
	Address	Av. Dr. Manuel Nava No. 6, 78210, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	Loyola-Rodríguez
	Particle	
	Given Name	Juan Pablo
	Suffix	
	Division	Maestría en Ciencias Odontológicas
	Organization	Universidad Autónoma de San Luis Potosí
	Address	Av. Dr. Manuel Nava No. 2, 78290, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Schedule	Received	12 September 2006
	Revised	11 January 2007
	Accepted	18 January 2007
Abstract	<p>We expressed the B subunit of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin (LTB) encoded by a synthetic codon-optimized gene in carrot. An <i>Agrobacterium</i>-mediated transformation method was used. Thirty independent transgenic lines were regenerated via somatic embryogenesis after 6 months in culture and were transferred to a greenhouse. GM1-ELISA assay was used to assess LTB protein content in mature taproots. Some transgenic lines expressed LTB up to 0.3% of the total soluble protein, which is tenfold higher than the expression levels reported earlier using the native bacterial gene in plants. Immunological assay confirmed proper assembly of the pentameric complex and in vitro activity of the recombinant LTB protein, suggesting that it can be functional in prevention of diarrhea.</p>	
Keywords (separated by '-')	Diarrhea prevention - Plant based-vaccine - Synthetic gene - Expression levels - Somatic embryogenesis	
Footnote Information	Communicated by P. Lakshmanan.	

Journal 299
Article 310

Dear Author

During the process of typesetting your article, the following queries have arisen. Please check your typeset proof carefully against the queries listed below and mark the necessary changes either directly on the proof/online grid or in the 'Author's response' area provided below.

Author Query Form

Query	Details required	Author's response
1.	Please check and confirm the identification of given names and family names in author names.	
2.	Bradford (1976) in the text is changed to Bradford (1968) in order to match the reference list. Please confirm or correct the change.	
3.	Sixma et al. (1991) is not cited in the text but is given in the reference list. Please provide the citation in the text or delete the reference from the list.	
4.	Toida et al. (1997) is cited in the text but is not given in the reference list. Please provide the complete reference or delete the citation from the text.	

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

Sergio Rosales-Mendoza · Ruth Elena Soria-Guerra · María Teresa Jesús de Olivera-Flores · Rubén López-Revilla · Gerardo Rafael Arguello-Astorga · Juan Francisco Jiménez-Bremont · Ramón Fernando García-de La Cruz · Juan Pablo Loyola-Rodríguez · Ángel Gabriel Alpuche-Solís

Received: 12 September 2006 / Revised: 11 January 2007 / Accepted: 18 January 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract We expressed the B subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB) encoded by a synthetic codon-optimized gene in carrot. An *Agrobacterium*-mediated transformation method was used. Thirty independent transgenic lines were regenerated via somatic embryogenesis after 6 months in culture and were transferred to a greenhouse. GM1-ELISA assay was used to assess LTB protein content in mature taproots. Some transgenic lines expressed LTB up to 0.3% of the total soluble protein, which is tenfold higher than the expression levels reported earlier using the native bacterial gene in plants. Immunological assay confirmed proper assembly of the

pentameric complex and in vitro activity of the recombinant LTB protein, suggesting that it can be functional in prevention of diarrhea.

Keywords Diarrhea prevention · Plant based-vaccine · Synthetic gene · Expression levels · Somatic embryogenesis

Abbreviations

CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter	29
GM1	Galactosyl- <i>N</i> -acetylgalactosamyl-sialyl-galactosylglucosyl ceramide	30
LTB	B subunit of the heat-labile enterotoxin of <i>Escherichia coli</i>	31
TSP	Total soluble protein	32

Communicated by P. Lakshmanan.

S. Rosales-Mendoza · R. E. Soria-Guerra · R. López-Revilla · G. R. Arguello-Astorga · J. F. Jiménez-Bremont · Á. G. Alpuche-Solís (✉)
División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
e-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

M. T. J. de Olivera-Flores
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

R. F. García-de La Cruz
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 6, 78210 San Luis Potosí, S.L.P., Mexico

J. P. Loyola-Rodríguez
Maestría en Ciencias Odontológicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 2, 78290 San Luis Potosí, S.L.P., Mexico

Introduction

The use of molecular biology concepts and plant tissue culture techniques for expression of antigens in plants has advanced significantly over the last decade. This research aims to develop edible plant-based vaccines that elicit an immune response via the mucosal system. The oral immunogenicity of antigens expressed in diverse transgenic plants has been reported by several groups (Curtis and Cardineau 1990; Haq et al. 1995; Mason et al. 1996, 2002). Viral proteins such as the respiratory syncytial virus G protein (Balenger et al. 2000) and hepatitis B surface antigen HBsAg (Kapusta et al. 1999) have been expressed in plants and mucosal immune response tested in mice has been achieved.



9.2 La ingestión de zanahorias transgénicas que expresan la subunidad B de la toxina termolábil de *Escherichia coli* protege a ratones contra el desafío con toxina del cólera

Resumen

Las enfermedades diarreicas causadas por *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) son problemas mundiales de salud que podrían ser prevenidas con vacunas producidas en plantas que expresan la subunidad B de la toxina del cólera o de la toxina termolábil de *E. coli*. En este trabajo analizamos la inmunidad inducida en ratones Balb/c por la ingestión de tres dosis semanales de zanahorias liofilizadas conteniendo 10 µg de LTB. Tanto en suero como en intestino, los niveles de inmunoglobulinas G (IgG) e IgA específicas para LTB fueron mayores cuando se administraron 10 µg de LTB recombinante. En suero predominó la subclase IgG1 sobre la IgG2a, sugiriendo que la respuesta es mayoritariamente humoral. Después de un desafío con toxina del cólera, se observó un decremento en la acumulación de fluido intestinal tanto en los ratones inmunizados con LTB pura, como en los inmunizados con las zanahorias liofilizadas. Estos resultados demuestran que la ingestión de LTB producida en zanahoria induce inmunidad antitoxina a nivel sistémico e intestinal en ratones, y sugieren que las zanahoria productoras de LTB podrían ser usadas como una vacuna comestible efectiva contra cólera y la diarrea causada por ETEC en humanos.

Artículo enviado a *Plant Science* (2007)

1
2 **Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit**
3 **protects mice against cholera toxin challenge**
4
5

6
7 Sergio Rosales-Mendoza¹, Ruth Soria-Guerra¹, Rubén López-Revilla¹, Leticia Moreno-Fierros², and Ángel
8 Alpuche-Solís^{1*}
9

10
11 ¹División de Biología Molecular, IPICYT, Camino a la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí, Mexico,
12 and ²Inmunidad en mucosas, UBIMED, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de
13 los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, Mexico
14
15
16
17

18 ***Corresponding author**

19 Dr. Ángel Alpuche-Solís
20 División de Biología Molecular
21 IPICYT
22 Camino a la Presa San José 2055
23 78216 San Luis Potosí
24 Mexico
25 Phone +52 (444) 8 34 2000 extension 2080
26 Fax +52 (444) 8 34 2010
27 E-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

28

29 **Abstract**

30

31 Diarrheal diseases caused by *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are worldwide
32 health problems that might be prevented with vaccines based on edible plants expressing the B subunit of the
33 cholera toxin (CTB) or the *E. coli* heat labile toxin (LTB). In this work we analyzed the immunity induced in
34 Balb/c mice by ingestion of three weekly doses of transgenic carrot material containing 10 µg of recombinant
35 LTB. Anti-LTB immunoglobulin G (IgG) and IgA serum and intestinal antibody responses were higher with 10
36 µg pure LTB. Serum anti-LTB IgG1 antibodies predominated over IgG2a antibodies, suggesting that the
37 predominant response is antibody-driven. A decrease of intestinal fluid accumulation after cholera toxin
38 challenge was observed in mice immunized with either pure recombinant LTB or LTB-containing carrot
39 material. These results demonstrate that ingestion of carrot-derived LTB induces antitoxin systemic and
40 intestinal immunity in mice and suggest that transgenic carrots expressing LTB may be used as an effective
41 edible vaccine against cholera and ETEC diarrhea in humans .

42

43

44 **Key words:** cholera; ETEC; edible vaccine; protective immunity

45

46 **1. Introduction**

47 Since the pioneering works of Curtis and Cardineau [1] and Mason et al. [2], edible vaccines based on
48 genetically modified plants have become a real alternative for vaccination on a global scale. This approach is
49 based on the transformation of plants with relevant antigen-encoding genes inserted into the nuclear or
50 chloroplast genome. Fruits or tissues from these plants can be used for oral immunization as inexpensive, safe
51 and accessible vaccines [3,4].

52 The diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) has been an attractive target disease
53 for developing an edible vaccine. ETEC is a common cause of infectious diarrhea in tropical climates where
54 uncontaminated drinking water is not readily available. Most illness, in terms both of number of cases and
55 severity of symptoms, occurs in infants. Another significant population at risk is travelers who lack recent
56 exposure to ETEC [5]. The *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) is the major ETEC pathogenic factor. The LT
57 subunit B (LTB) is of special interest because its immunogenicity, adjuvant activity and lack of toxicity make it a
58 viable antigen to vaccinate against ETEC diarrhea [6,7].

59 ETEC diarrhea has much in common with cholera. Both result from the ingestion of rather large
60 inocula of gramnegative bacteria that colonize the small intestine and produce toxins causing net secretion of
61 fluid into the intestinal lumen [8]. LT structure and function are similar to those of cholera toxin (CT): both
62 contain A and B subunits whose amino acid sequences are 80% homologous and have the same mode of
63 action [9]. Due to this homology, immunization with LTB raises an antitoxin response that extends to the CTB
64 subunit, thereby providing equally strong protection against oral LT or CT challenge [10].

65 In order to express recombinant LTB in plants several researchers have used bacterial [11,2] and
66 synthetic genes [12,13]. Functional assays have shown that the recombinant LTB protein is able to form
67 pentamers that bind its natural receptor and induce mucosal and systemic immune responses when
68 administered by the oral route in mice. In addition, immunization with recombinant potato and maize have
69 shown protection against oral LT and CT challenge [4].

70 Plant species such as carrots, whose raw tissues are normally eaten by humans, are more attractive
71 to develop edible vaccines than those that have to be cooked. Our group has been able to express LTB
72 encoded by an optimized synthetic gene driven by the CaMV 35S promoter in tap roots of adult carrot plants
73 (S. Rosales-Mendoza et al., manuscript in preparation). In this work we show that ingestion of transformed
74 carrot material induces LTB-specific intestinal and systemic antibodies in mice and protects them against oral
75 CT challenge.

76

77

78 **2. Materials and Methods**

79 *2.1. LTB content in carrots*

80 Tap roots from adult plants of the transgenic carrot Line 1 expressing LTB (S. Rosales-Mendoza et al.,
81 manuscript in preparation) were used. LTB quantitation in carrot material was performed with a GM1-ELISA.
82 Briefly, 200 mg of plant material was ground in liquid nitrogen and resuspended in 1 ml of extraction buffer
83 (100 mM NaCl, 25 mM sodium phosphate pH 6.6, 0.5% v/v Triton X-100, 10 g/ml leupeptin); samples were
84 then spun at 14,000 rpm for 15 min in a microcentrifuge at 4°C and the supernatants were assayed with the

85 GM1-ELISA of Chikwamba et al. [13]. Mature transgenic and wild-type tap roots were freeze-dried and ground
86 for use in the immunization trials.

87

88 2.2. Immunization

89 In all experiments 12-to 14-week-old Balb/c mice were used. Each group contained 10 animals, to which three
90 doses were administered on days 1, 7 and 14. Mice were fasted overnight before immunization. Treatments
91 applied to each group were the following: 1) 10 µg pure recombinant LTB obtained from *E. coli* (rLTB, kindly
92 donated by Dr. John Clements, Tulane University, USA); 2) 430 mg of carrot material from the transgenic L1
93 line (containing 10 µg of carrot-derived LTB); and 3) 430 mg of wild-type-carrot material as a negative control.
94 Five mice from each group were sacrificed on day 21 to collect serum samples and intestinal content. The
95 mice remaining in each group were challenged with CT.

96

97 2.3. Cholera toxin challenge

98 The sealed intestinal loop model developed to measure protection against enterotoxin activity in mice was
99 used [14]. At day 21, 10 µg of CT (Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, MO) dissolved in 500 µl of 10%
100 NaHCO₃ was intragastrically administered to a group of mice (n = 5). Two additional groups of five mice that
101 had received wild-type-carrot material were challenged with the same intragastric dose of CT or vehicle alone
102 (500 µl of 10% NaHCO₃). Six hours after the challenge, the animals were weighed, sacrificed and their small
103 intestine was ligated, dissected and weighed. Fluid accumulation (mg of intestine)/(g of body weight) was
104 calculated with the formula $FA = G/(B-G) \times 1000$, where G is the weight of the gut plus fluid in grams and B is
105 the body weight in grams.

106

107 2.4. Sample collection

108 Serum samples were obtained from blood extracted by cardiac puncture from ether-anesthetized mice. The
109 small and large intestine were resected and 3 ml of cold RPMI medium was flushed through each intestinal
110 segment. The flushed material was mixed, and to it 250 µl of 10 mM *p*-hydroxymercuribenzoate (dissolved in
111 150 mM Tris-base) were added to inhibit cysteine-proteinase activity. Samples were centrifuged at 12,000xg at
112 4°C for 10 min, and the supernatants stored at -70°C until their antibody content was analyzed.

113

114 2.5. Anti-LTB antibody content and subclass

115 Anti-LTB antibody levels in the serum and intestinal fluid samples were determined by an indirect enzyme-
116 linked immunosorbent assay (ELISA). Plates were coated overnight at 4°C with LTB (5 µg/ml) dissolved in
117 carbonate/bicarbonate buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) and blocked with 5% fat-free milk
118 dissolved in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, pH 7.2). Serum samples were diluted 1:50
119 in PBST (0.05% v/v Tween-20 in PBS), and intestinal fluid samples were diluted 1:2. Duplicates from each
120 sample were incubated overnight at 4°C; goat antimouse anti-immunoglobulin G (IgG) (Pierce, Rockford, IL),
121 anti-IgA (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), or biotinylated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (Zymed)
122 were then added per well, and the plates were incubated for 2 h at room temperature. Plates incubated with
123 biotinylated antibodies for IgG subclass analysis were washed with PBST; conjugated horseradish peroxidase-
124 streptavidin was added to each well and the plates were incubated for 2 h at room temperature. After 15 min
125 incubation with substrate solution (0.5 mg/ml *o*-phenylenediamine, 0.01% H₂O₂, 50 mM citrate buffer, pH 5.2)

126 the enzymatic reaction was stopped with 25 μ l of 2.5 M H₂SO₄ and the absorbance at 492 nm (A_{492}) was
127 measured in a Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) microplate reader.
128

129 2.6. Statistical analysis

130 The ELISA data shown are the geometric means of values obtained per group and the error bars represent
131 standard deviations. Comparisons between absorbance readings and fluid accumulation values were
132 performed using analysis of variance. P values < 0.05 were considered significant.
133

134 3. Results

135 3.1. LTB content of plant material

136 LTB content in fresh carrot tap roots was estimated by GM1-ELISA. The analysis revealed 3 μ g of LTB per
137 gram of tuber. Plant material was ground in liquid nitrogen and freeze-dried. The doses used for oral
138 immunization were 430 mg of carrot powder containing 10 μ g of LTB.
139

140 3.2. Immunogenicity of carrot-derived LTB

141 *Serum antibody response.* LTB immunogenicity was determined after administering three intragastric doses of
142 rLTB, carrot-derived LTB or wild-type carrot. Anti-LTB serum antibody levels are shown in Fig. 1A. The
143 antibody response in control mice fed with wild-type carrot material was not significantly different from that of
144 untreated animals, whereas mice fed with LTB-containing carrot material had significantly lower serum anti-
145 LTB antibodies than those elicited by rLTB administration (P < 0.05). These findings indicate that carrot-
146 derived LTB is immunogenic by the oral route, although its potency is lower than that of pure rLTB.

147 Specific anti-LTB serum IgG1 and IgG2a antibodies were elicited in mice immunized with carrot-
148 derived LTB or rLTB, and in both cases the IgG1 ones predominated (Fig. 1B).
149

150 *Intestinal antibody responses.* After oral immunization with carrot-derived LTB, significant specific IgA antibody
151 responses were detected in the large intestine, and the response to rLTB was significantly higher (Fig. 2A). In
152 addition, carrot-derived LTB elicited a specific intestinal IgG response whose magnitude was similar to that
153 elicited by rLTB (Fig. 2B). These results demonstrate that carrot-derived LTB is an effective mucosal
154 immunogen when administered by the oral route.
155

156 3.3. Protection against CT challenge

157 The sealed intestinal adult mouse loop assay was used to assess the neutralizing activity against an oral CT
158 challenge (Fig. 3). In mice fed untransformed carrot material the mean fluid accumulation (FA) value after CT
159 challenge was 82.0 mg/g, significantly higher than that of 52.5 mg/g observed in the negative control group
160 (naive mice challenged with vehicle alone). In contrast, the mean FA value of mice immunized with rLTB was
161 not significantly different from the negative control group and was indistinguishable from the group treated with
162 carrot-derived LTB. However, the mean FA value of mice immunized with carrot-derived LTB was significantly
163 higher than that of the naive group challenged only with vehicle.

164 These findings indicate that oral immunization with carrot-derived LTB induces protection against oral
165 CT whose magnitude correlates with the intestinal anti-LTB IgA response, since the group immunized with
166 rLTB had higher IgA specific intestinal antibody levels and lower FA values than the group immunized with
167 carrot-derived LTB.

168 **4. Discussion**

169 Diarrheal diseases caused by bacteria are a leading global health problem. Among them cholera is most
170 severe but ETEC infections cause the largest number of cases [15]. An effective vaccine against cholera or
171 ETEC diarrhea should induce an immune response at the intestinal mucosa capable of conferring protection by
172 inhibiting the toxin activity. CTB and LTB are currently used for the formulation of oral vaccines because they
173 are atoxic and each induces effective immune responses against both toxins [16].

174 Major limitations for the massive application of parenteral vaccines are their high costs of production,
175 distribution and delivery. Development of stable, cold-chain-free material may have great relevance for
176 immunization against childhood and infant diarrheas, especially in developing countries, and needle-free
177 vaccine delivery has become a priority of the World Health Organization [17].

178 Several groups have demonstrated the oral immunogenicity of LTB expressed in diverse transgenic
179 plants. Mason et al. [2] first demonstrated the oral immunogenicity of potatoes containing 3.7-15.7 µg of LTB
180 per gram of fresh tuber. They immunized mice with three doses of 20 µg or 50 µg of potato-derived LTB
181 present in 5 g of fresh tuber. Although the animals were not protected completely against the oral LT
182 challenge, vaccination by potato ingestion compared favourably with pure bacterial LT oral vaccination.
183 Clinical studies also have demonstrated the feasibility of edible transgenic plants to deliver LT, since
184 transgenic potatoes induce vigorous anti-LT intestinal immune responses in humans [18].

185 LTB has been expressed in maize plants containing up to 350 µg/g of dry ground kernel [13]. An
186 immunization schedule of 10 µg LT doses contained in 1 g of germ meal made from transgenic maize has
187 been used in mice. Reduced intestinal fluid accumulation after oral LT and CT challenges has been
188 demonstrated in transgenic maize-fed mice [19]. LT-producing maize has been shown to be immunogenic
189 also in humans [20].

190 Mature tap roots of our transgenic carrot Line 1 contain 3 µg of LT per gram of fresh tuber (23 µg/g
191 of dry carrot material). In this study we found that three intragastric doses (each containing 10 µg of carrot-
192 derived LT) elicited specific systemic and mucosal antibody responses in mice, although the IgG and IgA
193 specific antibody levels were lower than those attained with three doses of 10 µg pure rLT. This difference in
194 potency may be due to the carrot-derived LT having a lower rate of mucosal delivery than soluble rLT.
195 However, the immunity attained by the transgenic carrot material was high enough to protect mice against
196 cholera toxin challenge. Future studies using different immunization schemes (e.g., increasing the amount of
197 carrot-derived LT and the number of doses) may result in mucosal immune responses leading to complete
198 protection against the oral toxin challenge.

199 We conclude that the genetically modified carrot Line 1 tested in this work may be of use as a
200 practical edible vaccine against cholera and ETEC diarrhea, since carrots are components of the diet that can
201 be consumed raw and have a long shelf life [21].

202
203

204 **Acknowledgments**

205 We wish to thank Dr. John Clements for his generous gift of pure rLT. This research was partially funded by a
206 UC Mex-US grant to RLR, as well as grant 37048-B to AAS and graduate scholarships to SRM and RSG from
207 CONACYT (Mexico).

208

209 **References**

210

- 211 1. R.I. Curtis, C.A. Cardineau, Oral immunization by transgenic plants, World Patent Application (1990) WO
212 90/02484. (<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&u=/netahhtml/search-adv.htm&r=6&p=1&f=G&l=50&d=ptxt&S1=5,686,079&OS=5,686,079&RS=5,686,079>).
- 213
- 214 2. H.S. Mason, T.A. Haq, J.D. Clements, C.J. Arntzen, Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli*
215 heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene, *Vaccine* 16 (1998) 1336-1343.
- 216 3. H. Daniell, S.J. Streatfield, K. Wycoff, Medical molecular farming: Production of antibodies,
217 biopharmaceuticals and edible vaccines in plants, *Trends Plant Sci* 6 (2001) 219-226.
- 218 4. H. Mason, H. Warzecha, T. Mor, C. Arntzen, Edible plant vaccines: applications for prophylactic and
219 therapeutic molecular medicine, *Trends in Mol Med* 8 (2002) 324-329.
- 220 5. R.E. Black, Epidemiology of diarrheal disease: implications for control by vaccines, *Vaccine* 11 (1993)
221 100-106.
- 222 6. B.W. Belisle, E.M. Twiddy, R.K. Holmes, Monoclonal antibodies with an expanded repertoire of
223 specificities and potent neutralizing activity for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, *Infect Immun* 46
224 (1984) 759-764.
- 225 7. B.D. Spangler, Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin,
226 *Microbiol Rev* 56 (1992) 622-647.
- 227 8. M.K. Wolf, Occurrence, distribution and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens,
228 and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Clin Microbiol Rev* 10 (1997) 569-584.
- 229 9. T.K. Sixma, S.E. Pronk, K.H. Kalk, E.S. Wartna, B.A. van Zanten, B. Witholt, W.G. Hol, Crystal structure of
230 a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*, *Nature (London)* 351 (1991) 371-377.
- 231 10. F.A. Klipstein, R.F. Engert, J.D. Clements, R.A. Houghten, Differences in cross-protection in rats
232 immunized with the B subunits of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin, *Infect Immun* 43
233 (1984) 811-816.
- 234 11. T.A. Haq, H.S. Mason, J.D. Clements, C.J. Arntzen, Oral immunization with a recombinant bacterial
235 antigen produced in transgenic plants, *Science* 268 (1995) 714-716.
- 236 12. S.J. Streatfield, J.M. Jilka, E.E. Hood, D.D. Turner, M.R. Bailey, J.M. Mayor, S.L. Woodard, K.K. Beifuss,
237 M.E. Horn, D.E. Delaney, I.R. Tizard, J.A. Howard, Plant-based vaccines: unique advantages, *Vaccine* 19
238 (2001) 2742-2748.
- 239 13. R. Chikwamba, J. McMurray, H. Shou, B. Frame, S.E. Pegg, P. Scott, H. Mason, K. Wang, Expression of
240 a synthetic *E. coli* heat-labile enterotoxin B sub-unit (LT-B) in maize, *Mol Breed* 10 (2002) 253-265.
- 241 14. S.H. Richardson, J.C. Giles, K.S. Kruger, Sealed adult mice: new model for enterotoxin evaluation, *Infect*
242 *Immun* 43 (1984) 482-486.
- 243 15. J.P. Nataro, J.B. Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin Microbiol Rev* 11 (1998) 142-201.
- 244 16. E.C. Boedeker, Vaccines for enterotoxigenic *Escherichia coli*: current status, *Curr Opin Gastroenterol* 21
245 (2004) 15-19.
- 246 17. World Health Organization (2005) Global immunization, Vision and strategy 2006-2015
247 (www.who.int/vaccines-documents/).
- 248 18. C.O. Tacket, H.S. Mason, G. Losonsky, J.D. Clements, M.M. Levine, C.J. Arntzen, Immunogenicity in
249 humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato, *Nat Med* 4 (1998) 607-609.

- 250 19. R. Chikwamba, J. Cunnick, D. Hathaway, J. McMurray, H. Mason, K. Wang, A functional antigen in a
251 practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT)
252 and cholera toxin (CT), *Transgenic Res* 11 (2002) 479–493, 2002.
- 253 20. C.O. Tacket, M.F. Pasetti, R. Edelman, J.A. Howard, S. Streatfield, Immunogenicity of recombinant LT-B
254 delivered orally to humans in transgenic corn, *Vaccine* 22 (2004) 4385-4389.
- 255 21. P.W. Simon, Carrot genetics, *Plant Mol Biol Rep* 2 (1984) 54-63.

FIGURE LEGENDS

256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280

Fig. 1. Anti-LTB serum antibody responses. Three weekly 10 µg-doses of pure recombinant LTB (rLTB) or carrot-derived LTB (cLTB), as well as untransformed wild-type carrot (cWT) were administered to Balb/c mice by the intragastric route. Anti-LTB IgG antibody levels (**A**), as well as IgG1 and IgG2a antibody levels (**B**) were determined by ELISA at day 21 in serum samples diluted 1:50. Mean A_{492} values \pm SD from each experimental group ($n = 5$) are shown. Statistically significant differences ($P < 0.05$) compared to the negative control (naïve) group are indicated by an asterisk.

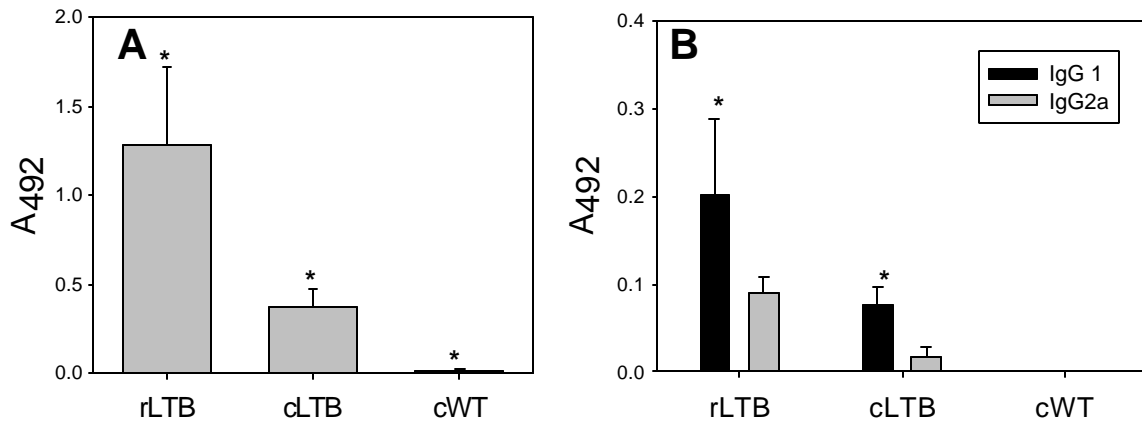
Fig. 2. Anti-LTB intestinal antibody responses. Three weekly 10 µg-doses of pure recombinant LTB (rLTB) or carrot-derived LTB (cLTB), as well as untransformed wild-type carrot (cWT) were administered to Balb/c mice by the intragastric route. Anti-LTB IgA antibody levels (**A**), and IgG antibody levels (**B**) were determined by ELISA at day 21 in fluid samples from the large intestine diluted 1:2. Mean A_{492} values \pm SD from each experimental group ($n = 5$) are shown. Statistically significant differences ($P < 0.05$) compared to the negative control (naïve) group are indicated by an asterisk.

Fig. 3. Immune protection against oral cholera toxin challenge. Three weekly doses of wild-type carrot (cWT), pure recombinant LTB (rLTB), or carrot-derived LTB (cLTB) were administered to Balb/c mice by the intragastric route. At day 21 the cWT group received 500 µl bicarbonate buffer (cWT NaHCO₃), whereas the other groups (cWT, rLTB, cLTB) were challenged with 10 µg of cholera toxin (CT) dissolved in the same buffer volume. After 6 h mice were sacrificed and their small intestine was ligated and dissected to assess fluid accumulation (FA). Mean FA values \pm SD from each group ($n = 5$) are shown. The cutoff value (Mean FA + 2 SD of the negative control group, cWT/NaHCO₃) is indicated by the discontinuous horizontal line, and the mean FA increase above it is indicated for each challenged group. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: (*) vs the cWT/NaHCO₃ group (negative control), (+) vs the cWT/CT group (positive control).

281

282 Fig. 1

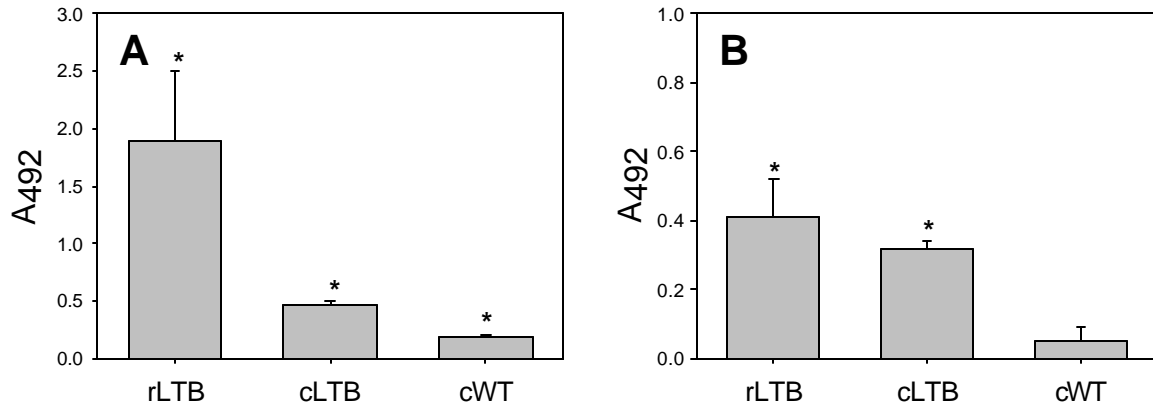
283



284

285 Fig 2.

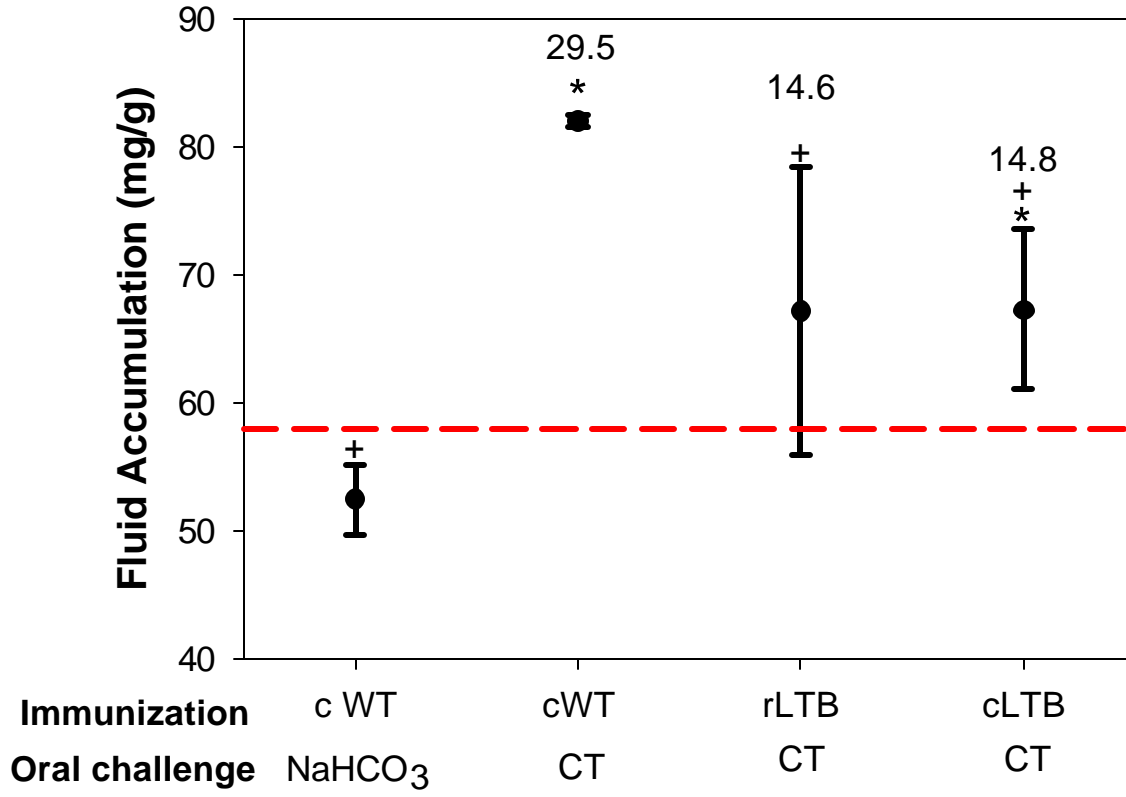
286



287 Fig. 3

288

289



9.3 Obtención de tomates transgénicos que expresan un polipéptido antigénico, que contiene epítopes de las toxinas diftérica, pertúsica y tetánica, codificado por un gen sintético.

Resumen

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

Artículo aceptado en *Plant Cell Reports* (2007)

Dear Dr/Prof. ÁngelG. Alpuche-Solís,

Here are the proofs of your article.

- You can submit your corrections **online** or by **fax**.
- For **online** submission please insert your corrections in the online correction form. Always indicate the line number to which the correction refers.
- For **fax** submission, please ensure that your corrections are clearly legible. Use a fine black pen and write the correction in the margin, not too close to the edge of the page.
- Together with the proof please return the cover sheet (including the *Copyright Transfer Statement*) and the *Offprint Order Form*. They can either be scanned and sent electronically or sent by fax.
- Remember to note the journal title, article number, and your name when sending your response via e-mail, fax or regular mail.
- **Check** the metadata sheet to make sure that the header information, especially author names and the corresponding affiliations are correctly shown.
- **Check** the questions that may have arisen during copy editing and insert your answers/ corrections.
- **Check** that the text is complete and that all figures, tables and their legends are included. Also check the accuracy of special characters, equations, and electronic supplementary material if applicable. If necessary refer to the *Edited manuscript*.
- The publication of inaccurate data such as dosages and units can have serious consequences. Please take particular care that all such details are correct.
- Please **do not** make changes that involve only matters of style. We have generally introduced forms that follow the journal's style. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case, please contact the Editorial Office and return his/her consent together with the proof.
- If we do not receive your corrections within 48 hours, we will send you a reminder.

Please note


Your article will be published **Online First** approximately one week after receipt of your corrected proofs. This is the **official first publication** citable with the DOI. **Further changes are, therefore, not possible.**

After online publication, subscribers (personal/institutional) to this journal will have access to the complete article via the DOI using the URL: [http://dx.doi.org/\[DOI\]](http://dx.doi.org/[DOI]).

If you would like to know when your article has been published online, take advantage of our free alert service. For registration and further information go to: <http://www.springerlink.com>.

Due to the electronic nature of the procedure, the manuscript and the original figures will only be returned to you on special request. When you return your corrections, please inform us, if you would like to have these documents returned.

The **printed version** will follow in a forthcoming issue.

Fax to: +44 870 622 1325 (UK) or +44 870 762 8807 (UK)  **Springer**

From: Springer Correction Team

6&7, 5th Street, Radhakrishnan Salai, Chennai, Tamil Nadu, India – 600004

Re: Plant Cell Reports DOI:10.1007/s00299-007-0306-y

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

Authors: RuthElena Soria-Guerra · Sergio Rosales-Mendoza · Crisóforo Márquez-Mercado · Rubén López-Revilla · Rosalba Castillo-Collazo · ÁngelG. Alpuche-Solís

I. Permission to publish

Dear Springer Correction Team,

I have checked the proofs of my article and

- I have no corrections. The article is ready to be published without changes.
- I have a few corrections. I am enclosing the following pages:
- I have made many corrections. Enclosed is the complete article.

II. Offprint order

- Offprint order enclosed
- I do not wish to order offprints

Remarks:

Date / signature _____

III. Copyright Transfer Statement (sign only if not submitted previously)

The copyright to this article is transferred to Springer-Verlag (respective to owner if other than Springer and for U.S. government employees: to the extent transferable) effective if and when the article is accepted for publication. The author warrants that his/her contribution is original and that he/she has full power to make this grant. The author signs for and accepts responsibility for releasing this material on behalf of any and all co-authors. The copyright transfer covers the exclusive right to reproduce and distribute the article, including reprints, translations, photographic reproductions, microform, electronic form (offline, online) or any other reproductions of similar nature.

An author may self-archive an author-created version of his/her article on his/her own website and his/her institution's repository, including his/her final version; however he/she may not use the publisher's PDF version which is posted on <http://www.springerlink.com>. Furthermore, the author may only post his/her version provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The original publication is available at <http://www.springerlink.com>."

The author is requested to use the appropriate DOI for the article (go to the Linking Options in the article, then to OpenURL and use the link with the DOI). Articles disseminated via <http://www.springerlink.com> are indexed, abstracted and referenced by many abstracting and information services, bibliographic networks, subscription agencies, library networks, and consortia.

After submission of this agreement signed by the corresponding author, changes of authorship or in the order of the authors listed will not be accepted by Springer.

Date / Author's signature _____

Offprint Order Form

To determine if your journal provides free offprints, please check the journal's instructions to authors. If you do not return this order form, we assume that you do not wish to order offprints.

If you order offprints **after** the issue has gone to press, costs are much higher. Therefore, we can supply offprints only in quantities of 300 or more after this time.

For orders involving more than 500 copies, please ask the production editor for a quotation.

Please enter my order for:

Pages	1-4	1-4	5-8	5-8	9-12	9-12	13-16	13-16	17-20	17-20	21-24	21-24	25-28	25-28	29-32	29-32
Copies	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD	EUR	USD
<input type="checkbox"/> 50	250,00	275,00	300,00	330,00	370,00	405,00	430,00	475,00	500,00	550,00	525,00	575,00	575,00	630,00	610,00	670,00
<input type="checkbox"/> 100	300,00	330,00	365,00	405,00	465,00	510,00	525,00	580,00	625,00	685,00	655,00	720,00	715,00	785,00	765,00	840,00
<input type="checkbox"/> 200	400,00	440,00	525,00	575,00	645,00	710,00	740,00	815,00	860,00	945,00	925,00	1,015,00	1,005,00	1,105,00	1,080,00	1,190,00
<input type="checkbox"/> 300	500,00	550,00	680,00	750,00	825,00	910,00	955,00	1,050,00	1,095,00	1,205,00	1,190,00	1,310,00	1,295,00	1,425,00	1,390,00	1,530,00
<input type="checkbox"/> 400	610,00	670,00	855,00	940,00	1,025,00	1,130,00	1,195,00	1,315,00	1,360,00	1,495,00	1,485,00	1,635,00	1,615,00	1,775,00	1,740,00	1,915,00
<input type="checkbox"/> 500	720,00	790,00	1,025,00	1,130,00	1,225,00	1,350,00	1,430,00	1,575,00	1,625,00	1,785,00	1,780,00	1,960,00	1,930,00	2,125,00	2,090,00	2,300,00

Please note that orders will be processed only if a credit card number has been provided. For German authors, payment by direct debit is also possible.

I wish to be charged in Euro USD

Prices include surface mail postage and handling. Customers in EU countries who are not registered for VAT should add VAT at the rate applicable in their country.

VAT registration number (EU countries only):

Please charge my credit card

- Eurocard/Access/MasterCard
- American Express
- Visa/Barclaycard/Americard

Number (incl. check digits):

Valid until: __/__/__

Date/Signature: _____

Send receipt to

ÁngelG. Alpuche-Solís
 División de Biología Molecular
 Instituto Potosino de Investigación Científica y
 Tecnológica
 Camino a la Presa San José 2055
 San Luis Potosí, 78216, Mexico

For authors resident in Germany: payment by direct debit:

I authorize Springer-Verlag to debit the amount owed from my bank account at the due time.

Account no.: _____

Bank code: _____

Bank: _____

Date/Signature: _____

Send offprints to

ÁngelG. Alpuche-Solís
 División de Biología Molecular
 Instituto Potosino de Investigación Científica y
 Tecnológica
 Camino a la Presa San José 2055
 San Luis Potosí, 78216, Mexico

Metadata of the article that will be visualized in OnlineFirst

ArticleTitle	Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene	
Article Sub-Title		
Journal Name	Plant Cell Reports	
Corresponding Author	Family Name	Alpuche-Solís
	Particle	
	Given Name	Ángel G.
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	alpuche@ipicyt.edu.mx
Author	Family Name	Soria-Guerra
	Particle	
	Given Name	Ruth Elena
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	Rosales-Mendoza
	Particle	
	Given Name	Sergio
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	Márquez-Mercado
	Particle	
	Given Name	Crisóforo
	Suffix	
	Division	Departamento de Biología Celular
	Organization	CINVESTAV-IPN
	Address	Av. IPN 2508, 07360, México, D.F., Mexico
	Division	
	Organization	FES-Cuautitlán UNAM
	Address	Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, 54700, México, Mexico
	Email	
Author	Family Name	López-Revilla
	Particle	

	Given Name	Rubén
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Author	Family Name	Castillo-Collazo
	Particle	
	Given Name	Rosalba
	Suffix	
	Division	División de Biología Molecular
	Organization	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
	Address	Camino a la Presa San José 2055, 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
	Email	
Schedule	Received	12 September 2006
	Revised	21 December 2006
	Accepted	11 January 2007
Abstract	<p>A current priority of vaccinology is the development of multicomponent vaccines that protect against several pathogens. The diphtheria–pertussis–tetanus (DPT) vaccine prevents the symptoms of three serious and often fatal diseases due to the exotoxins produced by <i>Corynebacterium diphtheriae</i>, <i>Bordetella pertussis</i> and <i>Clostridium tetani</i>. We are attempting to develop an edible DPT multicomponent vaccine in plants, based on the fusion of protective exotoxin epitopes encoded by synthetic genes. By means of <i>Agrobacterium</i> mediated transformation we generated transgenic tomatoes with a plant-optimised synthetic gene encoding a novel polypeptide containing two adjuvant and six DPT immunoprotective exotoxin epitopes joined by peptide linkers. In transformed tomato plants, integration of the synthetic DPT (sDPT) gene detected by PCR was confirmed by Southern blot, and specific transcripts of the expected molecular size were detected by RT-PCR. Expression of the putative polypeptide encoded by the sDPT gene was detected by immunoassay with specific antibodies to the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins. The sDPT gene is therefore integrated, transcribed and translated as the expected recombinant sDPT multiepitope polypeptide in transgenic tomatoes that constitute a potential edible vaccine.</p>	
Keywords (separated by '-')	Diphtheria - Whooping cough - Tetanus - Synthetic genes - Transgenic plants	
Footnote Information	Communicated by P. Lakshmanan.	

Journal: 299
Article 306

Dear Author

During the process of typesetting your article, the following queries have arisen. Please check your typeset proof carefully against the queries listed below and mark the necessary changes either directly on the proof/online grid or in the 'Author's response' area provided below.

Author Query Form

Query	Details required	Author's response
1.	Author please check reference McGarvey et al. (1995) has been given in the reference list but not cited in the text. Auhtor please cite it to the text or delete from the list.	
2.	Author please check reference Kim and McGarvey (1995) has been cited in the text but not given in the reference list. Author please provide reference details for the reference.	

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

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

Received: 12 September 2006 / Revised: 21 December 2006 / Accepted: 11 January 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract A current priority of vaccinology is the development of multicomponent vaccines that protect against several pathogens. The diphtheria–pertussis–tetanus (DPT) vaccine prevents the symptoms of three serious and often fatal diseases due to the exotoxins produced by *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* and *Clostridium tetani*. We are attempting to develop an edible DPT multicomponent vaccine in plants, based on the fusion of protective exotoxin epitopes encoded by synthetic genes. By means of *Agrobacterium* mediated transformation we generated transgenic tomatoes with a plant-optimised synthetic gene encoding a novel polypeptide containing two adjuvant and six DPT immunoprotective exotoxin epitopes joined by peptide linkers. In transformed tomato plants, integration of the synthetic DPT (sDPT) gene detected by PCR was confirmed by Southern blot, and specific transcripts of the expected molecular size were detected by RT-PCR. Expression

of the putative polypeptide encoded by the sDPT gene was detected by immunoassay with specific antibodies to the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins. The sDPT gene is therefore integrated, transcribed and translated as the expected recombinant sDPT multi-epitope polypeptide in transgenic tomatoes that constitute a potential edible vaccine.

Keywords Diphtheria · Whooping cough · Tetanus · Synthetic genes · Transgenic plants

Abbreviations

DPT	Diphtheria–pertussis–tetanus	39
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction	40
MS	Murashige and Skoog medium	41
IAA	Indole-3-acetic acid	42
NAA	Naphthalene acetic acid	43
BAP	6-Benzylaminopurine	44

Communicated by P. Lakshmanan.

R. E. Soria-Guerra · S. Rosales-Mendoza ·
R. López-Revilla · R. Castillo-Collazo ·
Á. G. Alpuche-Solís (✉)
División de Biología Molecular, Instituto Potosino de
Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa
San José 2055, 78216 San Luis Potosí, S.L.P., Mexico
e-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

C. Márquez-Mercado
Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN,
Av. IPN 2508, 07360 México, D.F., Mexico

Present Address:
C. Márquez-Mercado
FES-Cuautitlán UNAM, Km 2.5 Carretera
Cuautitlán-Teoloyucan, 54700 México, Mexico

Introduction

The diphtheria–pertussis–tetanus (DPT) vaccine, used to immunize against diphtheria, pertussis (whooping cough) and tetanus has dramatically cut down the risks of these diseases and the consequent deaths in children (Gerathy 1984; Hinman and Koplan 1984). Commercially available DPT vaccines are composed of toxoids of *Corynebacterium diphtheriae* and *Clostridium tetani*; the pertussis portion is composed of killed *Bordetella pertussis* bacteria, whose toxins are responsible for the neurological complications of the disease and the secondary effects of the vaccine (Koplan et al. 1979;

9.4 Obtención de plantas de lechuga productoras de LTB

Resumen

En este trabajo se decidió expresar un gen sintético de LTB (LTBs) en plantas de lechuga, como primer paso en el desarrollo de una vacuna comestible. Se eligió lechuga por ser un vegetal de rápido desarrollo, amplia distribución y que se consume sin ser sometido a cocción, además de que en trabajos previos de nuestro grupo de investigación se demostró que es un cultivo de rápido crecimiento *in vitro*.

La transformación genética se realizó por el método de co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*, conteniendo un vector binario pBI121 que porta el gen LTBs y un gen de selección que confiere resistencia a kanamicina en las células transformadas. Se probaron tres protocolos de transformación, los cuales difieren básicamente en la variedad de lechuga empleada, así como en las condiciones de cultivo *in vitro*.

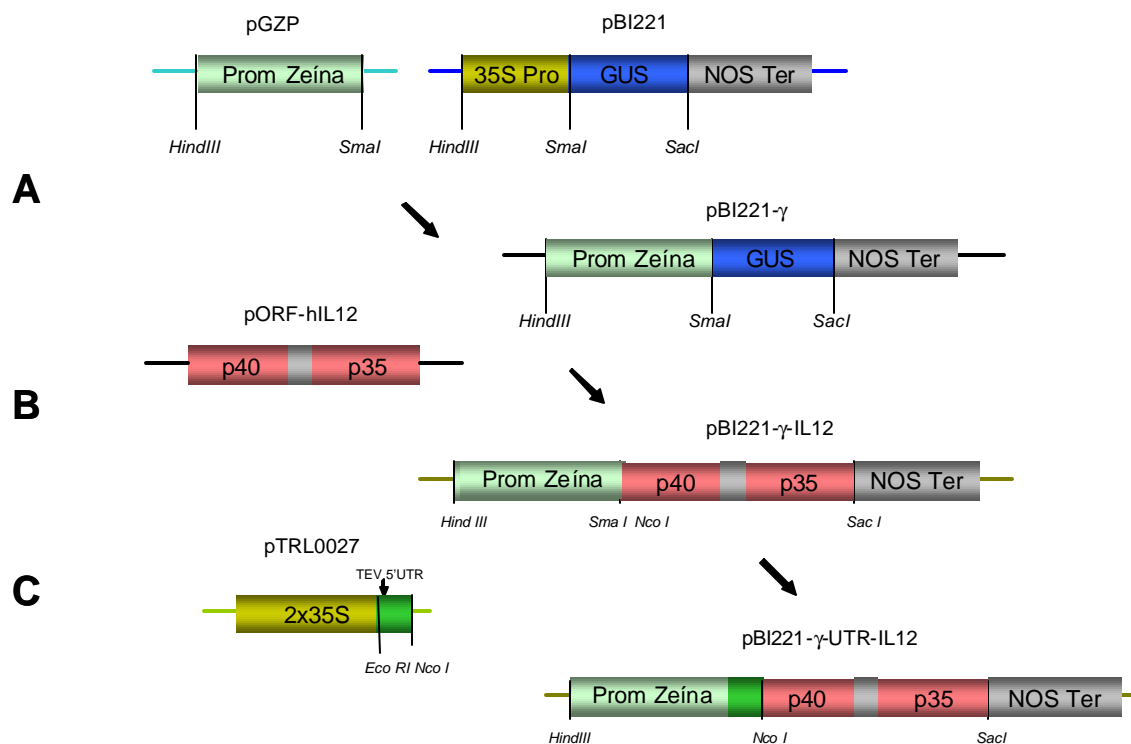
Se obtuvieron 27 líneas transgénicas que fueron regeneradas en presencia de kanamicina verificando la presencia del transgén por PCR, las cuales se transfirieron a suelo. Por otro lado mediante ensayos de ELISA se comprobó la formación del pentámero de la proteína recombinante, registrándose de 0.007-0.07% de LTB respecto a la proteína total soluble, valores mayores a 1.5 órdenes de magnitud de los reportados para genes bacterianos nativos expresados en plantas de tabaco y papa. Este es el primer reporte de expresión de LTBs en plantas de lechuga.

Artículo en preparación

9.5 Construcción de vectores para la expresión tejido-específica de IL-12 en maíz

Resumen

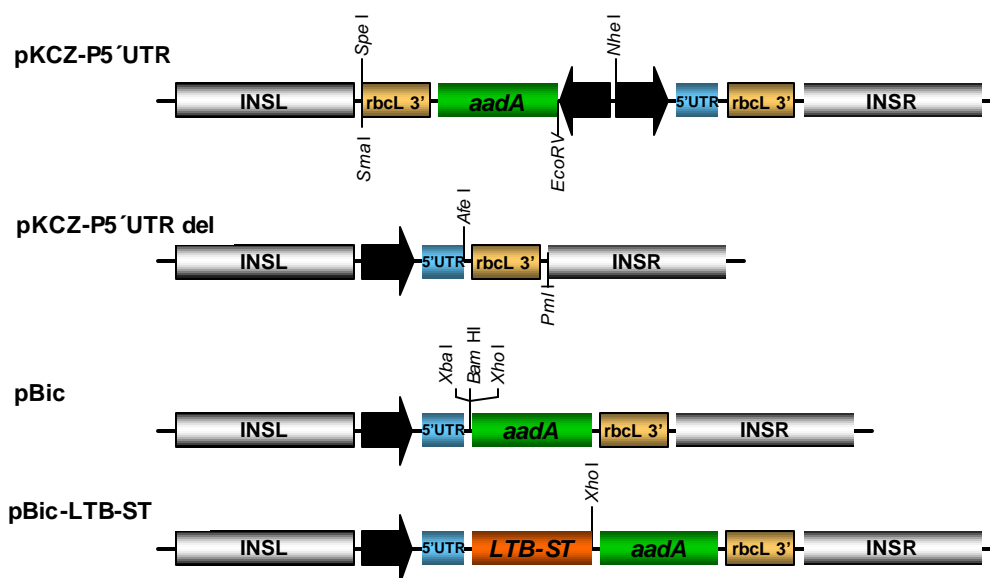
IL-12 es una glicoproteína heterodimérica compuesta de dos subunidades unidas por puentes disulfuro (p35 y p40), que tiene numerosos efectos en las células T y NK, resultando en aumento de citotoxicidad y la inducción de interferón gama. IL-12 se ha empleado en pruebas clínicas como terapia contra cáncer, así como adyuvante por sus efectos inmunomoduladores que favorecen la respuesta inmune celular. Este proyecto tuvo como meta construir vectores que permitieran expresar este fármaco de alto valor agregado en maíz, cultivo deseable por su productividad y alta acumulación de proteína en semilla. Se partió del vector pBI221, que contiene el gen reportero GUS, bajo la dirección del promotor CaMV 35S y el terminador NOS. Se emplearon técnicas estándar de ADN recombinante a fin de sustituir el promotor 35S por el promotor de la γ -zeína, específico de endospermo, y adicionar el marco de lectura para una fusión de las dos subunidades que componen la IL-12 funcional, sustituyendo al gen GUS. Finalmente el 5'UTR del virus TEV (Tobacco Etch Virus), que funciona como potenciador de la traducción, fue clonado en el extremo 5' del gen IL-12. Se verificó la integridad del cassette de expresión y de la secuencia codificante mediante secuenciación estándar. Este vector será de utilidad en proyectos futuros para obtener plantas de maíz productoras de IL-12 mediante el co-bombardío de callos embriogénicos con un vector que contenga un cassette de expresión para un agente de selección apropiado.



Construcción del vector pBI221-g-UTR-IL12. Usando el vector pBI221 se construyó un cassette de expresión específico de endospermo para maíz. El promotor constitutivo CaMV35S fue sustituido por el promotor de la γ -zeína (donado por Dr. Brian Larkins, Universidad de Arizona), mediante los sitios *HindIII/SmaI*, para originar el vector pBI221- γ (A). Se empleó un gen que codifica para una fusión p40:p35 (vector pORF-hIL12v14, Invivogene, donado por el Dr. Roberto Montes de Oca, Universidad de Nuevo León), el cual fue amplificado por PCR y clonado en los sitios *NcoI* y *SacI* del vector pBI221- γ lo que dio lugar a pBI221- γ -IL12 (B). Posteriormente fue clonado el 5'UTR del virus TEV (donado por el Dr. James Carrington, Universidad de Oregon) para obtener el vector pBI221- γ -UTR-IL12 (C).

9.6 Transformación de cloroplastos de tabaco con un gen que codifica para una fusión LTB-ST

El objetivo de este proyecto fue desarrollar la primera etapa en la obtención de una vacuna que induzca protección contra las dos toxinas producidas por ETEC, empleando la tecnología de expresión de proteínas heterólogas en cloroplastos. Esta aplicación posee ventajas sustanciales frente a los métodos tradicionales de transformación nuclear, tales como altos niveles de expresión (de hasta 15% PTS), no efectos de posición para la inserción del ADN foráneo, herencia materna del transgén y no se han encontrado fenómenos de silenciamiento en la expresión del transgén. Para ello se diseñó y sintetizó (Genaro, EUA) un gen con codones optimizados para la fusión LTB-ST, a fin de expresarla en cloroplastos de manera eficiente. El gen fue clonado en el vector pBic, construido a partir del vector pKCZ (donado por el Dr. Hans Koop, ver esquema anexo).



Construcción del vector pBic-LTB. La estrategia consistió en deletar primeramente el fragmento delimitado por los sitios *SpeI* y *NheI*, que contiene el cassette de expresión para *aadA*, para después religar el vector y obtener la construcción pKCZ-P5'UTRdel. En el siguiente paso, a partir del vector pKCZ-P5'UTR original, se liberó el fragmento *SmaI-EcoRV*, que contiene el cassette de expresión para *aadA* y fue clonado en los sitios *AfeI* y *PmlI* del vector pKCZ-P5'UTRdel, a fin de obtener el vector pBic. Finalmente, el gen LTB-ST fue clonado en los sitios *XbaI* y *XhoI* del vector pBic, para dar lugar al vector pBic-LTB-ST, que contienen un cassette bicistrónico para los genes *aadA* y LTB-ST, en donde su expresión es ta regulada por el promotor *Prrn* y la región 5'UTR del fago ?. El cassette de expresión se encuentra flanqueado por regiones del plastota de tabaco, las cuales median la recombinación homóloga que hace posible la integración sitio específica de la construcción.

La construcción pBic-LTB-ST se empleó para transformar, por medio de biobalística, hojas de plantas de tabaco cultivadas *in vitro*, de las cuales se regeneraron 68 cultivos independientes en medio selectivo. En un estudio preliminar, se eligieron 5 de ellos para realizar análisis de PCR. El ensayo resultó positivo en todos los casos para la amplificación del cassette de expresión. El trabajo futuro para este proyecto consistirá en completar dos rondas de regeneración en medio selectivo, para selección de plantas homoplastómicas, y posteriormente cuantificar y caracterizar la proteína de fusión producida en las plantas adultas.

X. REFERENCIAS

- Adachi JA, Ericsson CD y Jiang ZD (2002) Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *J Infect Dis*, 185:1681–1683.
- Adang MJ, Brody MS y Cardineau G (1993) The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIA* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol Biol*, 21:1131-1145.
- Arakawa T, Yu J y Langridge WH (1999). Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization. *Adv Exp Med Biol*, 464:161-178. (1999).
- Boedeker EC (2004) Vaccines for enterotoxigenic *Escherichia coli*: current status. *Curr Opin Gastroenterol*, 21: 15–19.
- Bouche B, Fabienne A, Marquet-Blouin BE, Yanagi CY, Steinmetz BA y Muller ACP (2003) Neutralising immunogenicity of a polyepitope antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine*, 21:2065–2072.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254
- Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G y Nestei EW (1991). Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Meth Enzymol*, 204:384-397.
- Cárdenas L y Clements JD (1993) Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect Immun*, 61: 4629-4636.
- Chikwamba R, McMurray J, Shou H, Frame B, Pegg SE, Scott P, Mason H y Wang K (2002a) Expression of a synthetic *E. coli* heat-labile enterotoxin B sub-unit (LT-B) in maize. *Mol Breed*, 10:253-265.
- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H y Wang K (2002b) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against
-

-
- Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res*, 11:479–493.
- Clements JD, Lyon FL, Lowe KL, Farrand AL, y El-Morshidy S (1986) Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella enteritidis* containing a recombinant plasmid which codes for production of the B subunit of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. *Infect Immun*, 53:685-692.
- Clements JD (1990) Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* producing heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Infect Immun*, 58:1159-1166.
- Curtis RI y Cardineau CA (1990) Oral immunization by transgenic plants. World Patent Application, WO 90/02484. (<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&u=/netahtml/search-adv.htm&r=6&p=1&f=G&l=50&d=ptxt&S1=5,686,079&OS=5,686,079&RS=5,686,079>).
- Daniell H, Streatfield SJ y Wycoff K (2001) Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*, 6:219-226.
- DuPont HL, Formal SB, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Sheahan DG, LaBrec EH y Kalas JP (1971) Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N Engl J Med*, 285:1–9.
- DuPont HL y Khan FM (1994) Travelers' Diarrhea: Epidemiology, Microbiology, Prevention, and Therapy. *J Travel Med*, 1:84-93.
- DuPont H. Traveler's diarrhea. En: *Infection of the Gastrointestinal Tract*. Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, eds. New York: Raven Press, 1995:299–310.
- Elsinghorst EA (2002) Enterotoxigenic *Escherichia coli*. En *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Elsevier Science, pp155–187.
- Gill M y King CA (1975) The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates. *J Biol Chem*, 250:6424-6432.
- Halperin W y Wetherell DR (1965) Ammonium requirement for embryo-genesis *in vitro*. *Nature*, 205:519–520.
-

-
-
- Haq TA, Mason HS, Clements JD y Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 268:714-716.
- Hardegger M y Sturm A (1998) Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.). *Mol Breed*, 4:119-127.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD y Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 268: 714-716.
- Hole CC (1996) Carrots. En: Photoassimilate distribution in Plants and Crops. Zamski E, Schaffer AA (eds), pp. 671–690. Marcel Dekker, New York.
- Horsch RB, Fry JE y Hoffmann NL (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227:1229–1231.
- Jefferson RA, Kavanagh TA y Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusions marker in higher plants. *EMBO J*, 6:3901-3907.
- Klipstein FA, Engert RF y Clements JD (1982) Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and heatlabile enterotoxins that protects against *Escherichia coli* producing either enterotoxin. *Infect Immun*, 37:550-557.
- Klipstein FA, Engert RF, Clements JD y Houghten RA (1984) Differences in cross-protection in rats immunized with the B subunits of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Infect Immun*, 43:811–816.
- Koprowski H y Yusibov V (2001) The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*, 19:2735-2741.
- Levine MM (1983) Travellers' diarrhoea: prospects for successful immunoprophylaxis. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 84:121-134.
- Long K, Vasquez-Garibay E, Mathewson J, de la Cabada J, DuPont MD (1999) The impact of infant feeding patterns on infection and diarrheal disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 41.
- Ma JKC, Barros E, Bock R, Christou P, Dale PJ, Dix PJ, Fischer R, Irwin J, Mahoney R, Pezzotti M, Schillberg S, Sparrow P, Stoger E y Twyman RM (2005) Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep*, 6:593–599.
-
-

-
-
- Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A y Muller CP (2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota L.*)- derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol*, 51:459-469.
- Mathers JC (2006) Plant foods for human health: research challenges. *Proc Nutr Soc*, 65:198-203.
- Mere-Villanueva G y Vazquez-Alejandro V (2003) Bombardeo de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota L.*) y su regeneración con la proteína G del virus de la rabia. Tesis de licenciatura, UNAM.
- Mason HS, Haq TA, Clements JD y Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*, 16:1336-1343.
- Mason H, Warzecha H, Mor T y Arntzen C (2002) Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends in Mol Med*, 8:324-329.
- Michiels A, Van den EW, Tucker B, Van Riet L y Van Laerea A (2003) Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal Biochem*, 315:85–89.
- Munro S y Pelham HRB (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48:899–907.
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15:473-479.
- Nataro JP y Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11:142-201.
- Pawlicki N, Sangwan RS y Sangwan-Norreel BS (1992) Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota L.*), *Plant Cell Tiss Org Cul*, 31:129-139.
- Peltola H, Siitonen A, Kyronseppa H, Simula I, Mattila L, Oksanen P, Kataja MJ y Cadoz M (1991) Prevention of travellers' diarrhoea by oral B-subunit/whole-cell cholera vaccine. *Lancet*, 338:1285-1289.
- Rice J, Ainley WM y Shewen P (2005) Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. *Anim Health Res Rev*, 6:199-209.
- Richardson SH, Giles JC y Kruger KS (1984) Sealed adult mice: new model for enterotoxin evaluation. *Infect Immun*, 43:482-486.
-
-

-
-
- Riddel A y Pollard AJ (2003) Tropical disease vaccines. *Expert Rev Vacc*, 2:105-112.
- Rosales-Mendoza S (2004) Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in carrot (*Daucus carota* L.). Tesis de Maestría, UASLP.
- Sack DA, Freij L y Holmgren J (1991) Swedish agency for research cooperation with developing countries. Prospects for public health benefits in developing countries from new vaccines against enteric infections. *J Infect Dis*, 163: 503-506.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sato T y Shimonishi Y (2004) Structural features of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin that activates membrane-associated guanylyl cyclase. *J Peptide Res*, 63:200–206.
- Savarino SJ y Bourgeois AL (1993) Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. *Epidemiology of diarrhoeal diseases in developed countries*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87:7-11.
- Simon PW (1984) Carrot genetics. *Plant Mol Biol Rep*, 2:54-63.
- Simmons CP, Ghaem-Magami M, Petrovska L, Lopes L, Chain BM, Williams NA y Dougan G (2001) Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scand J Immunol*, 53:218-226.
- Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, Wartna ES, van Zanten BA, Witholt B y Hol WG (1991) Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature*, 351:371–377.
- Snider DP (1995) The mucosal adjuvant activities of ADP-ribosylating bacterial enterotoxins. *Crit Rev Immunol*, 15:317–348.
- Spangler BD (1992) Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev*, 56:622–647.
- Steinsland H, Valentiner-Branth P y Perch M (2002) Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections and diarrhea in a cohort of young children in Guinea-Bissau. *J Infect Dis*, 186:1740–1747.
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodard SL, Beifuss KK, Horn ME, Delaney DE, Tizard IR y Howard JA (2001) Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*, 19:2742-2748.
-
-

-
-
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM y Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med*, 4:607-609.
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM y Arntzen CJ (2000) Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis*, 182:302-305.
- Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA y Streatfield S (2004) Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine*, 22:4385-4389.
- Todd EC (1997) Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. *World Health Stat Q*, 50:30-50.
- Trigiano RN y Gray DJ (2002) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, CRC Press, 2ª Edición.
- Valentiner-Branth P, Steinsland H y Fischer TK (2003) Cohort study of Guinean children: incidence, pathogenicity, conferred protection, and attributable risk for enteropathogens during the first 2 years of life. *J Clin Microbiol*, 41:4238–4245.
- WHO, World Health Organization (2005) Global immunization. Vision and strategy 2006-2015. <http://www.who.int/vaccines-documents/>.
- Wolf MK (1997) Occurrence, distribution and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 10:569-584.
- Wurtele ES y Bulka K (1989) A simple, efficient method for the *Agrobacterium*- mediated transformation of carrot callus cells. *Plant Science*, 61:253-262.
- Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowski H (2002) Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*, 20:3155-3164.
-
-