Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas de alfalfa transgénicas: su utilización como inmunógenos experimentales

Dus Santos, María José

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Dus Santos, María José. (2001). Expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas de alfalfa transgénicas: su utilización como inmunógenos experimentales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3402_DusSantos.pdf

Cita tipo Chicago:
Dus Santos, María José. "Expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas de alfalfa transgénicas: su utilización como inmunógenos experimentales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3402_DusSantos.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN PLANTAS DE ALFALFA TRANSGÉNICAS: SU UTILIZACIÓN COMO INMUNÓGENOS EXPERIMENTALES

María José Dus Santos

Director de tesis: Dr. Manuel V. Borca
Director Asistente de tesis: Dra. Consuelo Carrillo García

Buenos Aires
2001

51.3402
3402

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

EXPRESSION OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS ANTIGENS IN ALFALFA TRANSGENIC PLANTS: ITS USE AS EXPERIMENTAL IMMUNOGENS

María José Dus Santos

Director: Dr. Manuel V. Borca
Assistant Director: Dr. Consuelo Carrillo García

Buenos Aires
2001

Tesis doctoral de
María José Dus Santos
para optar al grado de Doctor
por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
de la UBA
Buenos Aires, 2001

El presente trabajo de Tesis Doctoral titulado "Expresión de antígenos del Virus de la Fiebre Aftosa en plantas de alfalfa transgénicas: su utilización como inmunógenos experimentales" ha sido realizado en el Instituto de Virología e Instituto de Genética del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Castelar, bajo la Dirección de los Dres. Manuel V. Borca y Consuelo Carrillo García.

V° B°	V° B°	V° B°
Dr. Manuel V. Borca	Dra. Consuelo Carrillo García	María José Dus Santos

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Manuel Borca por haberme confiado este proyecto, por su impecable dirección, su calidad profesional, su dedicación y constante apoyo, sin todo lo cual no hubiera podido realizarse este trabajo.

A la Dra. Consuelo Carrillo por todo lo que me ha enseñado, por su tenacidad y sus valiosos consejos.

Al Dr. Andrés Wigdorovitz, Andy, por su colaboración constante y sincera plasmada en muchas partes de esta tesis; por todos los momentos compartidos y muy especialmente por su amistad.

A la Dra. Karina Trono, Kari, por sus múltiples consejos, su ayuda incondicional y por las divertidas charlas extra-lab que compartimos.

A María de los Angeles por su ayuda técnica.

A Cristina Gomez por estar siempre dispuesta a colaborar y por cuidar mis plantitas.

A Mariana Puntel por su ayuda fuera de hora y por las cábalas compartidas.

A los Dres. Raúl Ríos y Pascual Franzzone por haberme permitido trabajar en su grupo.

A Guido por su ayuda sin objeciones en los mapeos y secuencias.

A todos mis compañeros de trabajo por su apoyo e interés en este trabajo.

RESUMEN

El uso de plantas transgénicas como sistema de expresión de antígenos relevantes ha sido ampliamente evaluado dada la posibilidad de utilizar plantas modificadas genéticamente para la producción de vacunas.

Las vacunas a base de plantas serían más baratas y más fáciles de elaborar en grandes cantidades. Estas vacunas se podrían producir en países en desarrollo sin necesidad de instalaciones sofisticadas y costosas como las que se necesitan en la actualidad. Por otra parte, estas vacunas eliminarían el riesgo de virus contaminantes que existe en las vacunas producidas en líneas celulares de mamíferos ya que los posibles virus de plantas contaminantes no constituyen un peligro potencial ni para el hombre ni para los animales. Adicionalmente, las plantas transgénicas que expresen antígenos en sus tejidos comestibles podrían ser usadas como sistemas de producción de vacunas de administración oral.

Hasta el momento, la mayoría de los antígenos expresados consisten en péptidos, proteínas únicas ó estructuras muy simples. Sin embargo, la producción de antígenos vacunales en sistemas heterólogos requiere, en muchos casos, la expresión de estructuras antigénicas complejas.

El Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) produce una de las enfermedades más temidas del ganado debido a su amplia distribución geográfica y por ser altamente contagiosa.

La vacuna utilizada actualmente es polivalente y a virus inactivado. El progreso en la producción de vacunas antiaftosas está dirigido hacia el logro de vacunas de elaboración más fácil y económica y que eviten la manipulación de grandes cantidades de virus.

Una alternativa a las vacunas convencionales es la preparación de cápsides vacías expresando y procesando la poliproteína precursora en un sistema de expresión heterólogo. Se han obtenido cápsides vacías conformacionalmente correctas de los serotipos A, O y C del VFA utilizando sistemas de expresión en *E. Coli*, baculovirus o virus vaccinia.

Los resultados obtenidos hasta ahora al expresar cápsides vacías del VFA en sistemas heterólogos, con relación a la conservación de epitopes protectivos, las convierten en antígenos candidatos para la formulación de vacunas. Sin embargo, aún no

se ha logrado un método de expresión masiva de un inmunógeno eficaz como para ser utilizado a campo, ya que los sistemas desarrollados hasta ahora resultan costosos y poco aplicables a nivel industrial.

Como primer objetivo de este trabajo de tesis se propuso producir plantas de alfalfa transgénicas conteniendo el gen que codifica para la poliproteína P1 precursora de las proteínas estructurales del VFA. Las construcciones utilizadas involucran únicamente a P1 ó a P1 junto con la proteasa 3C. La presencia del gen foráneo se detectó, en las plantas transgénicas, por PCR y su actividad transcripcional específica por RT-PCR y Northern blot. Fue posible visualizar por microscopía electrónica estructuras que por su tamaño y morfología podrían corresponder a cápsides vacías del VFA. La inmunogenicidad de los productos expresados fue evaluada en el modelo murino. Ratones adultos inmunizados intraperitonealmente desarrollaron una respuesta de anticuerpos detectada por su reactividad, en ELISA, frente a un péptido sintético que representa la zona más inmunogénica de VP1 y partículas virales completas; y, en Western blot, frente a las proteínas estructurales del virus nativo. Además, estos animales desarrollaron anticuerpos neutralizantes y resultaron completamente protegidos frente al desafío con virus infeccioso. Estos resultados demuestran la factibilidad de expresar antígenos altamente complejos en plantas transgénicas y su utilización como efectivos inmunógenos experimentales.

Los resultados obtenidos por nuestro y otros grupos de investigación demuestran la factibilidad de la utilización de plantas transgénicas como fuente de producción de antígenos vacunales. Sin embargo, uno de los principales problemas que posee este sistema de expresión es que los niveles de proteína expresada en las plantas transgénicas son relativamente escasos como para extrapolar su uso a una vacuna de aplicabilidad real.

De modo que, el desarrollo de estrategias que generen una mayor concentración de la proteína recombinante es sumamente importante, especialmente cuando se desea utilizar los extractos de planta sin ningún proceso de enriquecimiento y/o purificación posterior. Dado que la inserción del transgen en el genoma vegetal es al azar, es altamente probable que los niveles de su expresión varíen entre los individuos producidos. Una alternativa posible, entonces, consiste en poder identificar aquellos individuos que

presentan niveles excepcionalmente altos de la proteína foránea. Sin embargo, la identificación de aquellas plantas que expresen cantidades significativas de antígeno por métodos inmunológicos es un proceso lento y labioroso.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, y como segunda parte de este trabajo de tesis, hemos desarrollado una metodología que nos permite evaluar un gran número de individuos y seleccionar de un modo fácil y rápido aquéllos que presentan mayores niveles de expresión de la proteína recombinante. Esta metodología se basa en la expresión de un gen de interés fusionado a un gen reportero, codificante para la enzima β-Glucuronidasa (β-GUS), cuya presencia puede ser detectada cuantitativamente por colorimetría. A fin de evaluar el sistema de selección propuesto, utilizamos como antígeno un péptido que comprende los residuos 135 a 160 de la proteína VP1 del VFA para generar la proteína de fusión con la enzima β-GUS. Las plantas transgénicas obtenidas fueron primeramente evaluadas por su actividad enzimática de β-GUS. Fue posible detectar por Western blot la proteína de fusión en aquellas plantas que presentaron mayores niveles de β-GUS. Las plantas seleccionadas expresaron 0.5-1 μg/mg de proteína soluble total. El péptido p135-160 expresado como proteína de fusión conservó sus características inmunogénicas ya que ratones inmunizados parenteralmente con una vacuna elaborada con extracto foliar desarrollaron una respuesta de anticuerpos específicos detectada por su reactividad en ELISA frente a p135-160, partículas virales completas y en Western blot frente a VP1. Además, se detectaron anticuerpos neutralizantes que resultaron protectores frente al desafío con virus infeccioso.

Estos resultados demuestran la posibilidad de utilizar una metodología simple para detectar las plantas que expresan altos niveles del péptido recombinante, el cual conserva sus propiedades antigénicas e inmunogénicas al ser expresado como proteína de fusión.

SUMMARY

The use of transgenic plants as a system for expressing recombinant antigens has already been widely evaluated and constitutes a feasible methodology for vaccine production. Plant based vaccines would be less expensive and easier to be produced in large scale. These vaccines could be produced in undeveloped countries without requiring sophisticated facilities, as they are currently needed. On the other hand, the use of these vaccines would eliminate the risk of contaminating viruses present in mammalian cellular lines since the plant contaminating viruses do not constitute an actual risk for animals or humans. Additionally, edible transgenic plants expressing antigens in their tissues could be used as oral vaccines. Up to now, most antigens expressed in plants are peptides, unique proteins or very simple structures. Nevertheless, production of vaccine antigens in heterologous systems often require the expression of complex antigenic structures.

Foot and mouth disease virus is the causal agent of a worldwide distributed highly contagious disease of cattle. The currently used vaccine is based in the utilization of polyvalent inactivated virus. In general, progress in the process of FMDV vaccine production are pointed toward the development of simpler and cheaper protocols involving the use of lower amount of virulent viruses. An alternative to the conventional FMDV vaccines are those containing recombinant virus empty capsids after the expression of the precursor polyprotein. In the past, it has been possible to obtain empty capsids of serotypes O, A and C using as expression systems *E. coli*, baculovirus and vaccinia virus. Although the products resulted immunogenically efficient, the methodologies for producing them are not suitable to be used at the industrial level.

The first objective of this thesis was the production of transgenic plants of alfalfa containing the gene encoding for the polyprotein P1, which is the precursor of all structural FMDV proteins. The transgenic constructs used contained either just P1 nor P1 along with the 3C gene. The presence of the foreign gene in the recombinant plants was detected by PCR and their transcriptional activity analyzed by RT-PCR and Northen blot. Additionally, it was possible to demonstrate, by electron microscopy, the presence of structures with a size and shape resembling those of the FMDV empty capsides.

The immunogenicity of the obtained products was evaluated in mice. Intraperitoneally immunized adult mice presented a FMDV antibody response detected by its activity, in ELISA,

against a synthetic peptide representing the major immunogenic area of VP1, and against complete virus particles, and in Western blot, against all the FMDV structural proteins. Additionally, these animals developed a significant neutralizing antibody response and protection when experimentally challenged with the virulent virus. These results demonstrated the feasibility of expressing highly complex structures in transgenic plants and its use as effective experimental immunogens.

As stated earlier, results obtained by us and other research groups demonstrated the potential feasibility of using transgenic plants as a source of antigen for vaccine production. Nevertheless, the main problem presented by this approach resides in the relatively low concentration of the recombinant protein in the plant tissues, which hampers its possible utilization at the industrial scale. Thus, the development of strategies which allow the production of transgenic plants expressing high levels of recombinant protein would substantially modify the expectations on the utilization of this system in the future, specially in those cases where no further steps toward the enrichment or purification of the recombinant product will be needed.

Due to the fact that the insertion of the transgene in the plant genome is a random process, it is expected the development of individuals presenting very different expression levels of the recombinant protein. An interesting approach could be the identification of those individuals presenting exceptionally high levels of the foreign protein. Nevertheless, the identification of those individuals, using immunological approaches, is usually a laborious and slow process.

Focusing in this particular problem, the second part of this thesis deals with the development of a methodology that allows us to evaluate a significant number of individuals and select, in an easy and quick way, those presenting the highest levels of expression of the foreign protein. The methodology is based in the expression of the gene of interest as a fusion protein along with a reporter gene which encodes for the enzyme β-Glucuronidase (β-Gus), which could be quantitatively detect by a colorimetric test. In order to evaluate this methodology, we selected as antigen a peptide which represent the amino acid residues at position 135 to 160 of the structural FMDV protein VP1. This peptide was expressed as a fusion protein along with β-Gus. The obtained transgenic plants were first evaluated based in their β-Gus activity. Among those presenting the highest enzymatic activity it was possible to detect, by Western blot, the presence of the FMDV epitope. The selected plants expressed a

concentration of the recombinant protein between 0.5 to 1 mg/g of the total soluble protein extracted for the plant tissue. The peptide 135-160 appears as conserving its native immunogenic characteristic since adult mice parenterally immunized with a vaccine prepared with the foliar extracts developed a specific FMDV antibody response detected in ELISA, against the p135-160 synthetic peptide, and complete virus particles, and against native VP1 in Western blot. Additionally, the sera of these animals showed significant neutralizing antibodies titers and the mice resulted protected against the experimental challenge with infectious virus. These results demonstrate the feasibility of using this simple methodology to detect transgenic plants expressing high levels of recombinant peptide, which completely conserves its antigenic and immunogenic properties when expressed as a fusion protein.

ABREVIETURAS

Ac	anticuerpo
AcN	anticuerpo neutralizante
AcM	anticuerpo monoclonal
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADN-T	ADN de transferencia
AlMV	Virus del mosaico de la alfalfa
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
β-GUS	β-glucuronidasa
CaMV	Virus del mosaico del coliflor
CPMV	Virus del mosaico del garbanzo
dNTPs	deoxinucleótidos
ddNTPs	di-deoxinucleótidos
DIRL	dosis infecciosas ratón lactante
DO	densidad óptica
DS	desvío estandar
ECL	*enhaced chemiluminescence*
HBsAg	antígeno de superficie del virus de hepatitis B
HBV	Virus de hepatits B
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
im	intra muscular
ip	intra peritoneal
ISN	Índice seroneutralizante
KDa	kilo Dalton
Kpb	kilo pares de bases
LB	*left border*
LT	entertoxina termolábil de *E. coli*
LT-B	subunidad de unión de LT

NOS	Nopalina sintetasa
NPT II	Neomicina fosfotransferasa II
nt	nucleótido
O1C	O1 Campos
O1K	O1 Kaufbeuren
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PVX	Virus X de la papa
RB	*right border*
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcripción reversa
TC	toxina colérica
Ti	inductor de tumor
TEV	*tomato etch virus*
TGEV	Virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo
TMV	Virus del mosaico del tabaco
U	unidad/es
VFA	Virus de la Fiebre Aftosa

INDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Vacunas frente a virus animales 1

1.1.1. Estrategias alternativas a la vacunación convencional 2

1.2. Expresión de antígenos vacunales en plantas 3

1.2.1. Expresión de proteínas foráneas utilizando virus de plantas como vectores 4

1.2.2. Expresión de proteínas foráneas mediante *Agrobacterium tumefaciens* 6

1.2.3. Vacunas orales producidas en plantas y respuesta inmune en mucosas 10

1.3. Virus de la Fiebre Aftosa 11

1.3.1. Características generales de los Picornavirus 11

1.3.2. Características generales del Virus de la Fiebre Aftosa 12

1.3.3. Estructura de la cápside 12

1.3.4. Características del virión 13

1.3.5. Genoma 16

1.3.6. Procesamiento de la poliproteína 17

1.3.7. Características antigénicas del VFA 19

1.3.8. Respuesta inmune frente al VFA 20

1.4. La Fiebre Aftosa 23

1.4.1. Definición 23

1.4.2. Síntomas clínicos producidos por el VFA, su transmisión 23

1.4.3. Vacunas frente al VFA 24

2. JUSTIFICACIÓN 29

3. OBJETIVOS 31

4. MATERIALES Y METODOS 32

4.1. Técnicas de clonado empleadas 32

4.1.1. Ligación 32

4.1.2. Transformación 32

4.1.3. Caracterización de los clones positivos 33

4.1.3.1. Mapeo de restricción 33

4.1.3.2. Obtención de ADN plasmídico en maxipreparaciones 33

4.1.3.3. Secuenciación 34

4.2. Clonado de P1.2A y P1.2A-2B-3C en los vectores de expresión en plantas 35

4.2.1. Plásmidos 35

4.2.2. Obtención de los vectores pROK II^{md} y pROK III^{md} 37

4.2.3. Estrategia de clonado 38

4.2.4. Secuenciación de P1.2A y P1.2A-2B-3C 40

4.3. Clonado del gen que codifica para la proteína de fusión p135-160-β GUS 41

4.3.1. Plásmidos 41

4.3.2. Estrategia de clonado 42

4.3.3. Secuenciación del gen p135-160 43

4.4. Obtención de plantas de alfalfa transgénicas 44

4.4.1. Alfalfa 44

4.4.2. *Agrobacterium tumefaciens* 44

4.4.3. Transformación de *A. tumefaciens* 44

4.4.4. Transformación de alfalfa 45

4.4.4.1. Generación de embriones 46

4.4.4.2. Transformación de embriones y pecíolos 47

4.5. Detección de genes recombinantes en el genoma de las plantas transgénicas por PCR

4.5.1. Extracción de ADN

4.5.2. PCR

4.6. Detección de la actividad transcripcional en las plantas transgénicas

4.6.1. Extracción de ARN

4.6.2. RT-PCR

4.6.2.1. Southern blot

4.6.3. Northern blot

4.7. Análisis de la actividad β-GUS en las plantas transgénicas

4.7.1. Ensayo histoquímico

4.7.2. Cuantificación de la actividad β GUS

4.8. Western blot para detectar la expresión de p135-160

4.9. Microscopía electrónica

4.10. Formulación de las vacunas

4.11. Inmunización de ratones

4.12. Detección de anticuerpos específicos en los animales inmunizados con las plantas transgénicas

4.12.1. ELISA para la detección de anticuerpos anti-p135-160

4.12.2. ELISA para la detección de anticuerpos contra partículas virales completas

4.12.3. Western blot para la detección de anticuerpos específicos para las proteínas esturcturales del VFA

4.12.4. Seroneutralización en ratón lactante

4.13. Ensayo de protección

5. RESULTADOS 59

CAPITULO I: Expresión de cápsides vacías del VFA en plantas de alfalfa transgénicas

5.1. Clonado de P1.2A y P1.2A–2B-3C en los plásmidos de expresión en plantas 59

5.1.1. Obtención de pROK II- P1.2A y pROK III- P1.2A 59

5.1.2. Obtención de pROK II^{md}- P1.2A-2B-3C y pROK III^{md}- P1.2A-2B-3C 60

5.1.3. Secuenciación de las construcciones 62

5.2. Obtención de plantas de alfalfa transgénicas 65

5.2.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* 65

5.2.2. Transformación de alfalfa 65

5.2.3. Detección de los genes deseados en plantas de alfalfa transgénicas 66

5.2.4. Detección de la actividad transcripcional en las plantas de alfalfa transformadas 70

5.3. Evaluación de la respuesta inmune inducida en ratones inmunizados intraperitonealmente con los extractos vegetales de las plantas transgénicas 76

5.4. Detección de la actividad transcripcional en la planta pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C (A) 82

5.5. Microscopía electrónica de hojas de alfalfa transformada con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C (A) 83

5.6. Respuesta inmune inducida en ratones vacunados con extracto de la planta pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C (A) 84

5.6.1. Respuesta de anticuerpos 84

5.6.2. Respuesta de anticuerpos neutralizantes 86

5.6.3. Protección de los ratones inmunizados frente al desafío viral 87

CAPITULO II: Expresión de epitopes inmunodominantes del VFA como proteína de fusión con la enzima β-glucuronidasa.

5.7. Clonado de la secuencia de p135-160 como proteína de fusión con β-GUS **89**

5.8. Obtención de plantas de alfalfa transgénicas **90**

5.8.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* 90

5.8.2. Transformación de alfalfa 91

5.8.3. Detección del gen recombinante en las plantas transgénicas 91

5.8.4. Cuantificación de la actividad β-GUS en las plantas transgénicas 92

5.8.5. Detección de la actividad β GUS 94

5.8.6. Detección de p135-160 en las plantas transgénicas seleccionadas 96

5.8.7. Estabilidad de la expresión de la proteína de fusión 97

5.9. Respuesta inmune inducida por la inmunización parenteral con extracto de planta expresando p135-160 **99**

5.9.1. Respuesta de anticuerpos 99

5.9.2. Seroneutralización 100

5.9.3. Protección de ratones inmunizados frente al desafío viral 101

6. DISCUSIÓN **102**

7. CONCLUSIONES **113**

8. BIBLIOGRAFÍA **115**

1. INTRODUCCION

1.1. Vacunas frente a virus animales

La vacunación es el medio más eficaz de prevención de enfermedades infecciosas. La vacuna ideal debería ser segura, económica, termoestable y contener epitopes protectivos para múltiples patógenos; además debería ser administrada preferentemente en una única dosis oral. Aunque no existe aún una vacuna que posea todas estas características, las vacunas en uso han tenido un gran éxito en reducir la morbilidad y mortalidad asociada con muchas infecciones y en algunos casos en la erradicación total del patógeno.

Las vacunas que se emplean actualmente frente a virus animales pueden dividirse en tres categorías: inactivadas, atenuadas y recombinantes. A pesar de los espectaculares resultados obtenidos, muchas de las vacunas convencionales presentan problemas que limitan su utilización efectiva. Así, las vacunas inactivadas y atenuadas suelen requerir refrigeración para su almacenamiento, lo cual constituye un serio problema en regiones poco desarrolladas; además, existe la posibilidad de contaminación de otros patógenos durante su producción. Las vacunas atenuadas, cuya efectividad es en general alta y producen inmunidad duradera, están sometidas al riesgo de reversión del virus atenuado a formas virulentas. Las vacunas inactivadas presentan a su vez el riesgo de inactivación incompleta del virus y las dificultades que involucran su producción a partir del crecimiento a gran escala del patógeno infeccioso, lo cual encarece el proceso e introduce el riesgo de escape viral en las plantas de producción.

Los avances conseguidos durante las últimas décadas en el conocimiento de la estructura y propiedades biológicas de muchos sistemas virales, junto con la disponibilidad de vectores para la amplificación de proteínas foráneas, han hecho posible el inicio de una nueva era en el diseño de vacunas, en la que los inmunógenos son elegidos y sintetizados de manera de excluir la manipulación de virus vivo.

1.1.1. Estrategias alternativas a la vacunación convencional

El conocimiento de la estructura del genoma de muchos virus, junto con la posibilidad de modificarla, está permitiendo la obtención de cepas virales atenuadas, por inactivación de genes esenciales para la patogénesis. Estos virus modificados genéticamente conservan su capacidad de estimular una respuesta inmune y pueden ser usados como una vacuna viva excluyendo el riesgo de reversión a formas virulentas. Ejemplos que ilustran esta estrategia son los casos de los virus Aujesky y Herpes Bovino I donde, delecionanado genes en forma específica se obtienen cepas virales establemente atenuadas.

El uso de vectores virales para la expresión de antígenos vacunales se basa en la presentación del antígeno recombinante en el contexto de una infección viral, de modo que el sistema inmune responde al antígeno como si se tratara de un inmunógeno vivo y desarrolla entonces una inmunidad celular y humoral contra el correspondiente patógeno .

La elaboración de vacunas a subunidades involucra la expresión de genes codificantes para proteínas que contienen los determinantes antigénicos críticos del agente infeccioso en un sistema heterólogo. El uso de una proteína purificada como inmunógeno hace que esta vacuna sea estable y segura; sin embargo, la producción y purificación de la proteína en gran escala suele ser muy costosa.

La expresión eficiente de proteínas virales en bacterias está limitada por la incapacidad de los sistemas bacterianos de glicosilar adecuadamente los polipéptidos producidos.

El sistema de expresión en levaduras ha sido usado extensivamente para expresar genes eucariotas. Las células de levadura son capaces de realizar las mismas modificaciones postraduccionales que las células animales y se posee un amplio conocimiento de sus características genéticas y fisiológicas. Esto ha permitido utilizarlas para el desarrollo de la vacuna para el virus de la hepatitis B. Esta vacuna a subunidades contiene el antígeno B de superficie del virus, siendo actualmente la única vacuna comercial disponible (Mc Aller y col., 1984).

El virus de la nucleopolihedrosis (baculovirus) es un virus de insecto que reúne condiciones idóneas para ser utilizado como vector de expresión de proteínas eucarióticas. La expresión de proteínas virales bajo el control del promotor del gen de la

polihedrina, permite expresar tales proteínas con gran eficiencia y correctamente modificadas post-traduccionalmente. La expresión en larvas de insecto tiene la ventaja adicional de no requerir condiciones de esterilidad para su producción.

Las vacunas peptídicas se basan en la utilización de péptidos que representan epitopes inmunodominantes. Estas vacunas, además de ser estables y seguras, evitarían la inoculación de aquellas partes de la proteína que no tienen relevancia inmunológica. Sin embargo, existen varias limitaciones para su uso: la conformación de los epitopes B es sumamente importante y muchas veces no es suficiente la utilización de un único epitope para inducir la respuesta inmune deseada.

El uso de vectores de ADN ó ARN, como alternativa a la inmunización con patógenos vivos ó atenuados, es una nueva estrategia aún en desarrollo. Las vacunas de ADN están compuestas por un plásmido circular cerrado y purificado que codifica una proteína antigénica (Ulmer y col., 1993; Davis y col., 1993; Wang y col., 1993). La inoculación directa de un plásmido de ADN conteniendo los marcos de lectura con las apropiadas señales de control de la transcripción y traducción eucariotas, permite la síntesis *in vivo* de una proteína con la conformación y modificaciones postraduccionales idénticas a la producida durante una infección normal.

1.2. Plantas transgénicas para la expresión de antígenos vacunales

Desde tiempos muy remotos se han utilizado las plantas como fuente de compuestos medicinales que han sido de gran utilidad desde el punto de vista sanitario. Hoy en día la mayor parte de estos compuestos son sintetizados en el laboratorio mediante procesos menos costosos. No obstante, nuevos desarrollos en biotecnología han vuelto a hacer pensar en las plantas como productos de utilidad terapeútica o preventiva. Recientemente, varios grupos de investigación han propuesto, a través de sus resultados, la posibilidad de usar plantas modificadas genéticamente para la producción de vacunas frente a caries, cólera, diarreas bacterianas y hepatitis (Arntzen y col., 1994; Haq y col., 1995).

Las vacunas producidas en plantas serían mas baratas que las producidas en la actualidad y más fáciles de producir en grandes cantidades que las obtenidas en células animales ó levaduras. Estas vacunas se podrían producir en países subdesarrollados sin

necesidad de instalaciones sofisticadas y costosas como las que se necesitan en la actualidad . Por otra parte, estas vacunas eliminarían el riesgo de virus contaminantes que existe en las vacunas producidas en líneas celulares de mamíferos y los posibles virus de plantas contaminantes no constituyen un peligro potencial ni para el hombre ni para los animales.

Adicionalmente, las plantas transgénicas que expresen antígenos en sus tejidos comestibles podrían ser usadas como sistemas de producción de vacunas orales a muy bajo costo (Arntzen y col., 1994), de modo que la inmunización frente a determinados patógenos se podría realizar mediante una "vacuna comestible".

1.2.1. Expresión de proteínas foráneas utilizando virus de plantas como vectores

La transferencia de genes a plantas se puede realizar por métodos directos, vectores virales y vectores bacterianos.

Los métodos directos incluyen cocultivo con ADN, electroporación, biolístico, microinyección, fibras de siliconas y siliconas.

Los virus vegetales son vectores atractivos para la introducción de genes en plantas. Su principal ventaja radica en que están evolutivamente adaptados para expresar sus proteínas virales en la planta infectada. Se pueden construir genes quiméricos fusionando un fragmento de ADN que codifica para un epitope determinado a un gen de la cápside del virus de planta. El virus recombinante se utiliza para infectar plantas de modo que la replicación y propagación del mismo permiten la expresión transitoria de la proteína quimérica. Las partículas virales que expresan el epitope foráneo en su superficie se purifican a partir de las plantas infectadas.

El virus del mosaico del tabaco (TMV) ha sido el primer virus empleado para este sistema de expresión (Turpen y col., 1995; Fitchen y col., 1995), observándose que los epitopes expresados en la proteína de la cápside de este virus eran capaces de inducir anticuerpos específicos en ratones. Recientemente, Wigdorovitz y col. (1999) expresaron la proteína estructural VP1 del Virus de la Fiebre Aftosa (VFA). Dicha proteína fue sintetizada en cantidades comparables tanto en hojas inoculadas con ARN viral como en hojas infectadas sistémicamente. Además, VP1 conservó las características antigénicas e inmunogénicas de la proteína nativa y la inmunización de animales con esta VP1

recombinante generó una respuesta inmune protectora frente al desafío con VFA infeccioso.

El virus del mosaico del garbanzo (CPMV) se ha utilizado ampliamente para expresar epitopes extraños en la superficie de su cápside. Una limitante de este sistema es que el tamaño del péptido a insertar no puede superar los 40 aminoácidos de longitud. Los resultados obtenidos de la expresión de epitopes de VFA (Usha y col., 1993), Rinovirus Humano 14 (HRV-14) y Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1) (Porta y col., 1994 y 1996) demuestran la factibilidad de este sistema para la presentación de secuencias peptídicas foráneas. Se ha expresado también un epitope de la proteína VP2 del Virus de la Enteritis del Visón, el cual es compartido con el Parvovirus Canino y el Virus de la Panleucopenia Felina. La inmunización de visones con quimeras expresando el epitope foráneo protegió a los animales de la aparición de signos clínicos de la enfermedad. El CPMV también ha sido utilizado para expresar epitopes bacterianos. En esta línea, partículas de CPMV conteniendo un epitope de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* generaron, en un modelo experimental, anticuerpos opsonizantes y protección frente al desafío con el agente infeccioso (Brennan y col., 1999 a y b). A su vez, se ha expresado un péptido de la proteína de unión a fibronectina de *Staphylococcus aureus* en la superficie del CPMV. Los resultados demuestran que CPMV constituye un carrier eficiente de péptidos foráneos al sistema inmune de mucosas generando respuesta de anticuerpos en suero y mucosas luego de inmunizar por la vía intranasal.

El virus del mosaico de la alfalfa (AlMV) permite introducir secuencias peptídicas largas; además, el extremo N-terminal de la proteína de la cápside del virus está localizado en la superficie de la partícula viral, con lo que no interfiere en el ensamble del virus. Utilizando este sistema se han expresado con éxito epitopes del virus de la rabia y del HIV-1 (Yusibov y col., 1997).

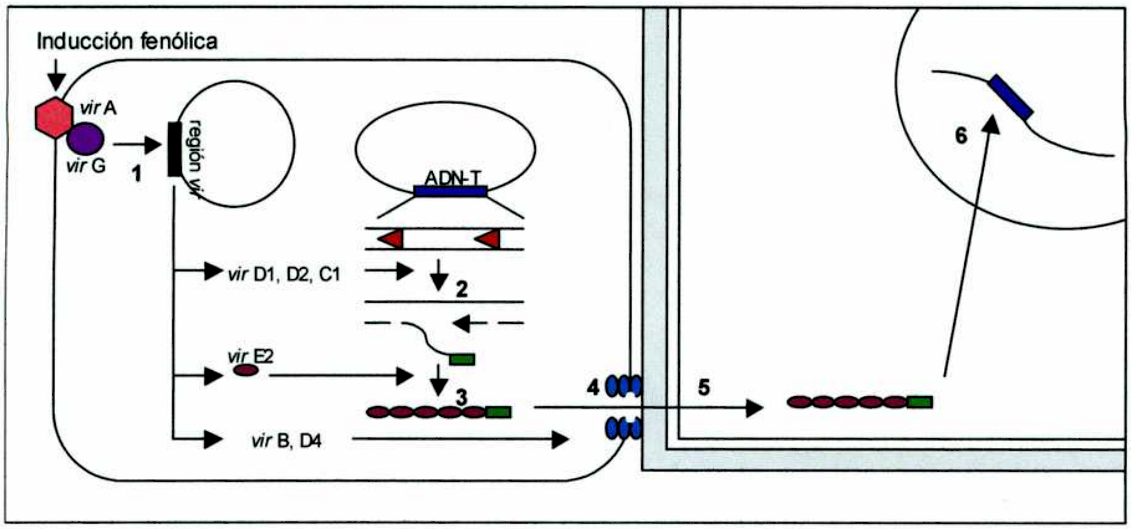
Recientemente, se ha expresado la proteína VP6 de Rotavirus Bovino utilizando vectores del virus X de la papa (PVX) (O´Brien y col., 2000). La misma, al ser expresada como proteína libre, se ensambló formando láminas paracristalinas. En cambio, la expresión de VP6 como proteína de fusión con la proteína de cubierta de PVX generó bastones flexibles cuya superficie estaba cubierta por VP6 y produjo, además, partículas icosaédricas producto del clivaje proteolítico de la proteína de fusión.

1.2.2. Expresión de proteínas foráneas mediante *Agrobacterium tumefaciens*

El sistema de transferencia de genes utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* es el más utilizado para introducir ADN foráneo en plantas. Durante la infección por *A. tumefaciens*, un segmento de ADN llamado ADN-T (ADN de transferencia) es transferido desde la bacteria a la célula vegetal (Figura 1) (Zupan y Zambryski, 1995; Komari y Kubo, 1999). El procesamiento y transferencia del ADN-T están mediados por productos de por lo menos seis operones denominados *virA, virB, virC, virD, virE* y *virG*, codificados en la región de virulencia (vir) del plásmido Ti (*tumor inducing*), los cuales pueden actuar en *trans*. El ADN-T contiene el gen de interés asociado a secuencias regulatorias y un gen marcador de selección que en general codifica para la resistencia a un antibiótico.

Este ADN-T está delimitado por secuencias repetidas directas de 25 pares de bases (pb) denominadas bordes izquierdo y derecho (LB y RB respectivamente), las cuales constituyen elementos en *cis* necesarios para la transferencia del mismo. El control de la expresión está mediado por los productos de los genes *virA* y *virG* (Winans, 1992), mientras que el ADN-T y las secuencias LB y RB se encuentran en otro plásmido. Las señales inductoras de los genes *vir* (compuestos fenólicos liberados a través de la herida de la planta), son primeramente reconocidos por la proteína *virA* la cual fosforila a *virG*. *VirG* activada es un factor de transcripción que activa la expresión de los genes de virulencia. Luego de la inducción de los genes *vir*, los productos *virD1/D2* y *virC1* clivan la hebra superior de cada borde generando una cadena simple del ADN-T. *VirD2* permanece unida al extremo 5´de la cadena de ADN-T la cual es librada del plásmido y recubierta por *virE2* formando el complejo T. Las proteínas *virB* y *virD4* forman un canal entre la bacteria

Figura 1: Esquema de la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*



1: inducción de los genes *vir*; 2: producción de la hebra T por *vir* D1/D/2/C1; 3: formación del complejo T por unión cooperativa de vir E2; 4: salida del complejo T de *A. tumefaciens*; 5: entrada del complejo T a la célula vegetal; 6: integración del ADN-T en el genoma vegetal.

y la célula vegetal a través del cual pasa el complejo T. En el citoplasma vegetal, el complejo T es guiado al núcleo por señales de localización nuclear. La integración del ADN-T en el cromosoma vegetal ocurre por recombinación ilegítima siendo el sitio de integración azaroso. El gen de interés es, entonces, establemente integrado en el cromosoma nuclear de modo que las plantas resultantes expresan el antígeno foráneo en todos ó algunos de los tejidos vegetales. Las plantas así obtenidas pueden ser usadas para la extracción y purificación del antígeno ó como alimento directo.

Uno de los ejemplos más notorios de aplicación de esta tecnología para la expresión de antígenos es la producción del antígeno de superficie del virus de Hepatitis B (HBsAg). La infección del virus de la hepatitis B (HBV) es probablemente la causa más importante de viremia persistente en humanos existiendo actualmente mas de dos billiones de personas infectadas (World Health Organization). La vacuna comercial de HBV, que consiste en el HBsAg recombinante expresado y purificado en levadura, ha resultado segura y eficaz. Sin embargo, su alto costo impide la adopción de la misma en países en vía de desarrollo, donde la infección con HBV es un serio problema sanitario.

Por estos motivos es que resulta necesario el desarrollo de una vacuna económica que permita su aplicación masiva. El HBsAg ha sido primeramente expresado en plantas de tabaco; el antígeno obtenido presentó propiedades físicas, químicas y antigénicas (Mason y col., 1992) similares tanto al HBsAg natural como al producido en levadura. Además, el HBsAg conservó los epitopes B y T al ser expresado en plantas de tabaco transgénicas (Thanavala y col., 1995). Recientemente, Richter y col. (2000) han expresado el HBsAg en papa transgénica observándose que, ratones alimentados con tubérculos desarrollaron una respuesta inmune primaria que fue ampliamente potenciada luego de recibir una única dosis intraperitoneal subinmunogénica con la vacuna comercial.

Las enfermedades diarreicas causan cerca de diez millones de muertes por año en países subdesarrollados, afectando principalmente a niños. La enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigénica, toxina causante de diarrea aguda, es una proteína multimérica que es estructural, funcional y antigénicamente similar a la toxina colérica (TC). Haq y col. (1995) han obtenido plantas de tabaco y papa transgénicas que expresan la subunidad de unión de LT (LT-B). En ambas especies el péptido foráneo se unió a su ligando natural e indujo en ratones inmunizados oralmente IgG e IgA que neutralizaron la enterotoxina. Asimismo, Mason y col. (1998) diseñaron un gen sintético, optimizado para la expresión en plantas, codificando la ET-B de *E. Coli*. La expresión de este gen en papa generó una mayor cantidad de proteína en hojas y tubérculos que la producida por el gen nativo. Ratones inmunizados oralmente con estas papas produjeron IgG e IgA específicos y resultaron parcialmente protegidos frente al desafío con LT. En un estudio realizado con once voluntarios que ingirieron papa conteniendo LT-B, se pudo observar que el sistema inmune humano respondió a tal inmunización oral desarrollando una respuesta sistémica y en mucosas (Tacket y col., 1998). A su vez, se ha expresado la subunidad B de la TC en papa transgénica (Arakawa y col., 1998a). La inmunización oral de ratones con estas plantas generó Ac séricos e intestinales específicos y redujo sustancialmente la acumulación de fluido diarreico en intestino delgado luego de inyectar intraileal mente la TC.

El virus Norwalk, miembro de la familia Caliciviridae, causa gastroenteritis aguda en humanos (Jiang y col., 1990; Kapikian y col., 1996). Se ha logrado la expresión de cápsides vacías de este virus en tabaco y papa; ambas construcciones administradas oralmente fueron capaces de inducir en ratones una respuesta inmune específica contra

el antígeno (Mason y col., 1996).

Nuestro grupo ha expresado la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa en *Arabidopsis thaliana*. Con estas plantas transgénicas se inmunizaron parenteralmente ratones los cuales produjeron anticuerpos séricos específicos y resultaron protegidos frente al desafío con virus vivo (Carrillo y col., 1997). A su vez, esta proteína fue expresada en plantas de alfalfa. Ratones inmunizados oral y parenteralmente con estas plantas desarrollaron una respuesta inmune específica y protectiva frente al desafío viral (Wigdorovitz y col., 1999). La proteína VP1 del virus de la Fiebre Aftosa se ha expresado también en plantas de papa transgénicas. Los resultados obtenidos indican que dichas plantas también podrían utilizarse como inmunógenos orales y parenterales (Carrillo y col., 2001)

Se han expresado, también, en plantas transgénicas antígenos glicosilados demostrando que es posible reproducir esta modificación post-traduccional en la célula vegetal. Así, se ha obtenido la glicoprtoeína S del Virus de la Gastroenteritis Transmisible del Cerdo (TGEV) (Gomez y col. 1998 y 2000 y Tuboly y col. 2000), la proteína G del virus de la rabia (McGarvey y col., 1995) y la glicoproteína B de citomegalovirus (Tackaberry y col., 1999). La glicosilación en las células vegetales no es exactamente igual que en las células de mamíferos. Los complejos de glicanos de las plantas son generalmente más pequeños debido a la ausencia de ácido siálico. Sin embargo, para los casos descriptos, se han conservado los epitopes que involucran sitios glicosilados.

La elección de la especie vegetal para evaluar la producción de antígenos recombinantes se basa en la conveniencia y necesidad de evaluar de forma rápida las construcciones genéticas. Las plantas de tabaco han sido muy utilizadas pero, debido a la presencia de altos niveles de alcaloides en las hojas, los estudios en animales solo pueden ser llevados a cabo luego de una sustancial purificación de los antígenos expresados en estas plantas. Por ello, se comenzaron a utilizar sistemas alternativos como la papa. Esta decisión se basó principalmente en la posibilidad de administrar oralmente los tubérculos sin dificultad y en que la producción de los mismos requiere unos pocos meses. El problema que presenta este sistema, es que los tubérculos deben ser cocinados para su ingestión por humanos, lo cual podría causar la desnaturalización de la proteína, reduciendo ó eliminando su capacidad de inducir inmunidad. Esta dificultad sería subsanada mediante la ingestión de alimentos que se pudieran consumir crudos, como es

caso del sistema de transformación en banana que se esta desarrollando. En el área veterinaria, las plantas forrajeras utilizadas para el pastoreo constituyen un blanco óptimo para desarrollar vacunas animales a base de plantas transgénicas. En particular, en Argentina, la alfalfa constituye una de las principales fuentes de forraje para la obtención de carne, leche y lana y además es un elemento fundamental para el mantenimiento y recuperación de la productividad de los suelos. Los últimos datos muestran una superficie cultivada de 4,9 millones de hectáreas en la región pampeana, la cual constituye la principal área de producción de alfalfa en el país. No obstante, la alfalfa constituye una forrajera que se adapta en casi todo el país (Hijano y col.).

1.2.3 Vacunas orales producidas en plantas y respuesta inmune en mucosas

Muchos agentes infecciosos colonizan o invaden membranas epiteliales; éstos incluyen bacterias y virus que se transmiten en comida o agua contaminada o por contacto sexual. Las vacunas que sean efectivas contra estas infecciones deberían estimular el sistema inmune de mucosas a fin de producir IgA secretoria en superficies de mucosa tales como el epitelio intestinal y respiratorio. En general, la respuesta inmune en mucosa es más efectiva cuando la inmunización se realiza por vía oral que parenteralmente. En comparación con la vía intraperitoneal, la inmunización oral requiere una mayor masa de antígeno para generar una respuesta inmune. El reconocimiento del antígeno por las células M es el primer paso para la inducción de una respuesta inmune en mucosas. Estas células se ubican en tejidos linfoides de las mucosas tales como las placas de Peyer. Así, las células M vehiculizan el antígeno a los tejidos adyacentes donde las células presentadoras de antígeno procesan y presentan el antígeno, activando, con ayuda de las células T helper, a células B.

Las vacunas a subunidades producidas en sistemas de expresión celulares son factibles para la inmunización oral, pero los costos y la tecnología necesaria para su producción a gran escala dificultan su uso. En cambio, plantas transgénicas que expresen el antígeno en sus tejidos comestibles podrían ser usadas como un sistema económico de producción y distribución de vacunas orales, de modo que la inmunización se realizaría simplemente a través del consumo de las plantas. Los antígenos expresados en plantas serían capaces de sobrevivir el transporte a través del estómago ya que la pared celular

de las células vegetales proporciona protección frente a las secreciones gástricas. De modo que, cuando esta barrera finalmente se rompe en el intestino, las células gradualmente liberan el antígeno, el cual sería captado por las células M.

Los resultados reportados demuestran que resulta factible la inmunización oral con plantas expresando antígenos foráneos tanto virales como bacterianos, los cuales poseen la capacidad de inducir una respuesta inmune de mucosas específica (Haq y col., 1995; Mason y col., 1996 y 1998; Arakawa y col., 1998 a y b; Wigdorovitz y col., 1999; Richter y col., 2000).

1.3. Virus de la Fiebre Aftosa

1.3.1. Características generales de los Picornavirus

La familia Picornaviridae incluye a virus con genoma ARN (+) infeccioso de cadena simple, pequeños, poliédricos y sin envoltura, que se caracterizan por ser importantes patógenos para el hombre y numerosos animales de interés ganadero.

Esta familia de virus se divide en cuatro géneros y un grupo no clasificado (Cooper y col., 1978; Mattheus, 1983):

* enterovirus: poliomelitis, hepatitis A, cocksakie, echovirus en humanos, enterovirus en animales y poliovirus en ratón;
* rinovirus: rinovirus humanos y bovinos;
* cardiovirus: mengovirus y el virus de la encefalomiocarditis;
* aphtovirus: virus de la fiebre aftosa;
* no clasificados: rinovirus equino y virus de insectos.

Como propiedades generales de los Picornavirus se destacan:

1- Cápside viral compuesta por 60 copias de cada una de las proteínas virales estructurales. Estas proteínas poseen una estructura tridimensional que se encuentra muy conservada en todos los miembros de la familia (Acharya y col., 1989).

2- Genoma consistente en una única molécula de ARN (+), infeccioso tanto *in vivo* como *in vitro* (Alexander y col., 1958; Colter y col., 1957).

3- Traducción del ARN viral en una poliproteína cuyo procesamiento, producido en varias etapas, da lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Kitamura y col.,

1981; Grubman y col., 1984).

4- Replicación del ARN incluyendo síntesis de una cadena de ARN (-) complementaria al ARN viral, a través de un intermediario replicativo que puede ser aislado de células infectadas. El complejo de replicación está asociado a la membrana celular e incluye a la polimerasa viral y al ARN que es utilizado como templado (Semler y col., 1981; Grubman y col., 1984).

1.3.2. Características generales del Virus de la Fiebre Aftosa

El virus de la fiebre aftosa (VFA) es el único miembro del género aphtovirus dentro de la familia Picornaviridae. Existen 7 tipos serológicos determinados por la técnica de fijación de complemento: A, O, C, South african territories (SAT)1, SAT2, SAT3 y Asia1; y más de 67 subtipos incluidos en estos 7 tipos (Bachrach, 1977). A su vez, cada subtipo agrupa a cientos de cepas.

El VFA consiste en una cápside desnuda de 25-30 nm de diámetro. Tiene un peso molecular de aproximadamente $7x10^6$ daltons y contiene un genoma de cerca de 8500 nucleótidos (nt) (Bachrach, 1977). Su composición química es de un 30% ARN y un 69 % proteínas (Ruckert, 1985). Además, presenta un amplio rango de hospedadores.

1.3.3. Estructura de la cápside

La cápside viral está compuesta por 60 copias de cada una de 4 proteínas designadas VP1, VP2, VP3 y VP4 (Cooper y col., 1978) producidas por clivaje post-traduccional de un precursor común (Sangar y col., 1979). Estas proteínas también se denominan: 1A, 1B, 1C y 1D respectivamente (Rueckert and Wimmer, 1984). Además, contiene 2 proteínas minoritarias (1-2 copias por virión): VP0 (precursora de VP2 y VP4) y 3D (polimerasa viral). Las principales funciones de la cápside viral son: a) proteger al ácido nucleico encapsidado de la degradación, b) interactuar con receptores celulares específicos, c) empaquetar selectivamente el genoma recientemente sintetizado y d) facilitar su eventual salida.

La estructura tridimensional de la cápside del VFA de los serotipos O y C fue determinada por la técnica de difracción de rayos X del virus cristalizado (Fox y col., 1987;

Achayra y col., 1989; Lea y col., 1994). Tanto VP1 como VP2 y VP3 se hallan parcialmente expuestas, mientras que VP4 es totalmente interna (Boothroyd y col., 1989) y está miristilada en el extremo N-terminal (Chow y col., 1987) (Figura 2).

A pesar de las diferencias en la secuencia primaria, VP1, VP2 y VP3 adoptan una misma configuración espacial denominada "barril β". Esta estructura consiste en ocho cadenas con estructura secundaria de lámina β (B-H), ubicadas unas sobre otras, en forma antiparalela, y conectadas entre sí por bucles o *loops* que sobresalen de la superficie. Las paredes del barril están formadas por dos conjuntos de cuatro láminas β (CHEF en la parte posterior y BIDG en el frente), las cuales están unidas por *loops* (BC, HI, DE, FG) adquiriendo una configuración que se asemeja a la proa (prow) de un barco. Estas cadenas β forman las paredes del barril (Figura 3).

La subunidad biológica o protómero corresponde a una molécula de VP1 asociada a una de VP2 y a otra de VP3 pertenecientes al área triangular adyacente, adquiriendo en conjunto una forma similar a un "barrilete". Los protómeros, a su vez, se agrupan en pentámeros que son la principal de las estructuras en que se disocia la partícula viral completa al ser expuesta a pH menores a 5 (Fry y col.,1990). Doce de estos pentámeros son los que se asocian para conformar la estructura icosaédrica que presenta el virión (Figura 4).

1.3.4. Características del virión

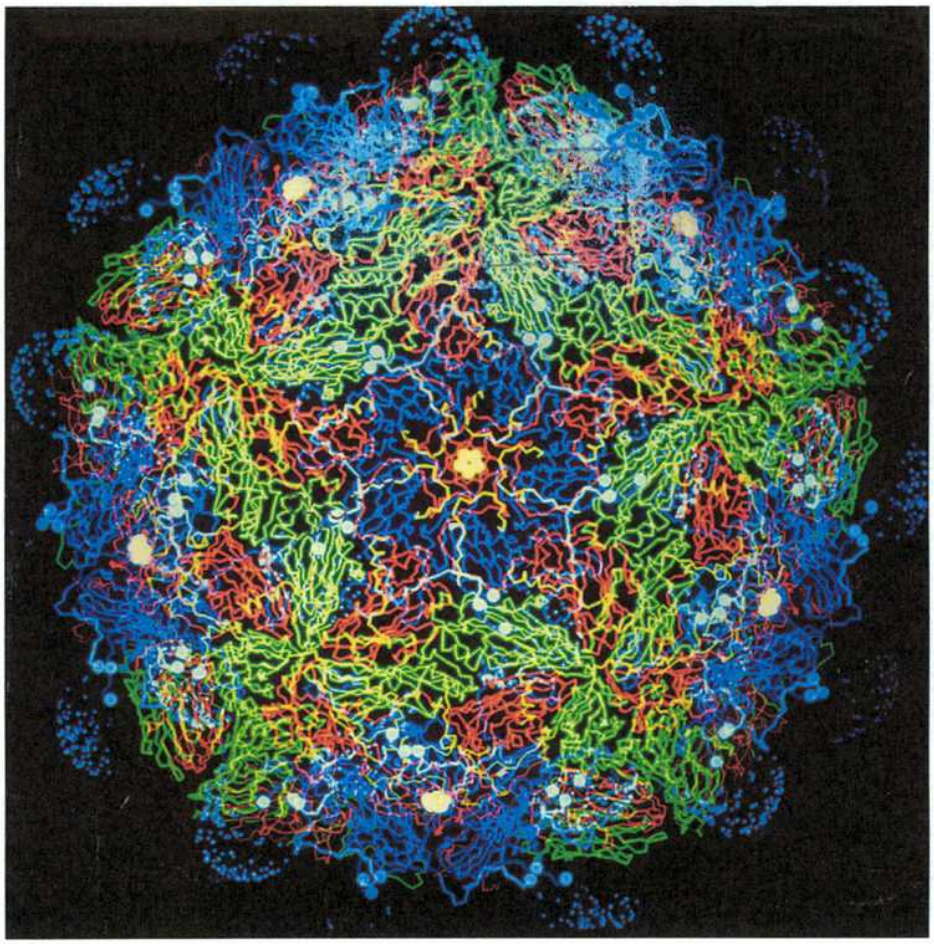
El virión intacto tiene un coeficiente de sedimentación de 146 Svedvergs (partículas 146 S). La partícula 146 S es fácilmente disociable por tratamiento a pH < 5.5 en subunidades virales 12 S (Rueckert y col., 1985), que corresponden a pentámeros de VP1, VP2 y VP3, y un precipitado insoluble que contiene a VP4.

Existe además otro tipo de partícula viral, con un coeficiente de sedimentación de 75 S, que corresponde a la procápside (cápside vacía) la cual contiene VP1, VP3 y VP0 pero no contiene ARN (Van der Wonde y col., 1972).

La proteína VP1 posee los determinantes antigénicos principales del VFA y está involucrada en el reconocimiento del receptor en la célula blanco (Fox y col., 1989). La hipótesis del "cañón" propone que el sitio de unión a la célula se encuentra en una depresión, ocultándolo del sistema inmune; el VFA, en cambio, no se ajusta al modelo

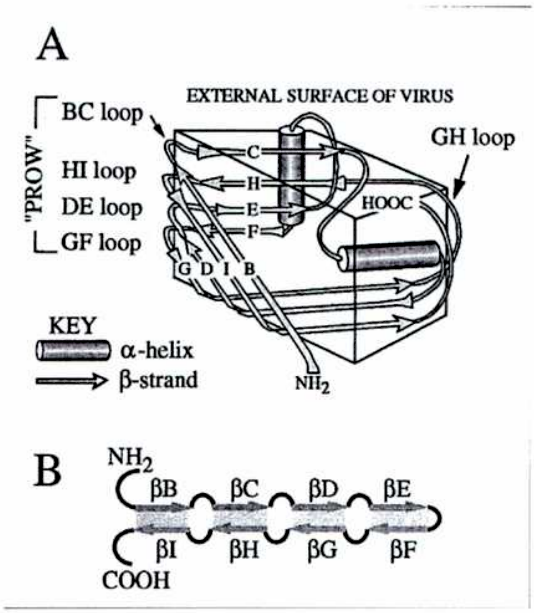
propuesto para otros picornavirus, sino que en este virus, la porción más inmunogénica de la cápside forma una protusión desordenada (loop) en la superficie del virión (Fox y col., 1989).

Figura 2: Representación de la estructura, a nivel atómico, de la cápside del VFA O1K



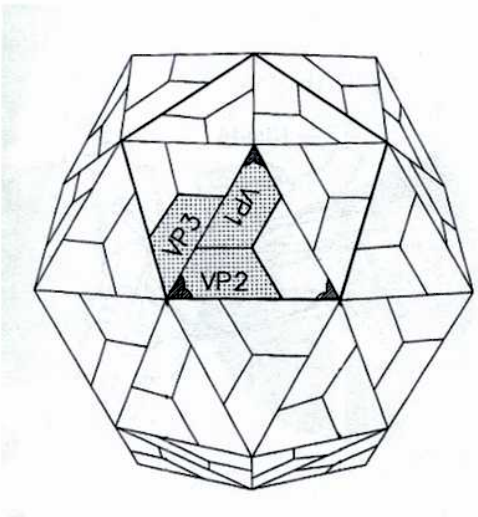
En color azul se muestran los residuos de la proteína VP1, en verde los de VP2 y en rojo los de VP3. Las zonas punteadas en color azul y situadas en la superficie del virión corresponden a los residuos 133-158 de VP1 (Acharya y col., 1989)

Figura 3: Plegamiento de las proteínas VP1, VP2 y VP3



En el panel A se muestran las ocho láminas β (B-H) conectadas por *loops*. En el panel B es una representación topológica del plegamiento (Fields, Fundamental Vuirology, 3º ed)

Figura 4: Esquema de la cápside del VFA



1.3.5. Genoma

El VFA presenta un ARN positivo de unos 8450 nt de longitud, cuya masa molecular es aproximadamente de 2.8 x 10^6 daltons. La región 5´no traducida es excepcionalmente extensa, conteniendo alrededor de 1300 nt de longitud. El ARN presenta una pequeña proteína, VPg (3B), covalentemente unida a su extremo 5' (Lee y col., 1977, Golini y col., 1978); la misma aparece como 3 especies distintas 3B1 (23 aminoácidos), 3B2 y 3B3 (24 aminoácidos cada una) (Figura 5).

La primer zona de esta región extracistrónica se denomina fragmento S, la cual involucra aproximadamente las primeras 400 bases desde el extremo 5´.

La segunda región está constituída por un tracto de residuos cisteína (poli C) (Harris y Brown, 1976), cuya longitud es variable (entre 100 y 200 residuos) dependiendo de la cepa viral, aislamiento u hospedador (Costa Giomi y col., 1984).

La tercer zona contiene la región L (de aproximadamente 800 bases) ubicada entre el poliC y el primer triplete (AUG) de iniciación. Dentro de esta región hay, además, una secuencia IRES que comprende 435 bases inmediatamente río arriba del codón de iniciación; esta secuencia posee una fuerte estructura secundaria y está implicada en el reconocimiento por parte de los ribosomas de la secuencia codificante del ARN viral (Belsham y Brangwyn, 1990; Khun y col. 1990).

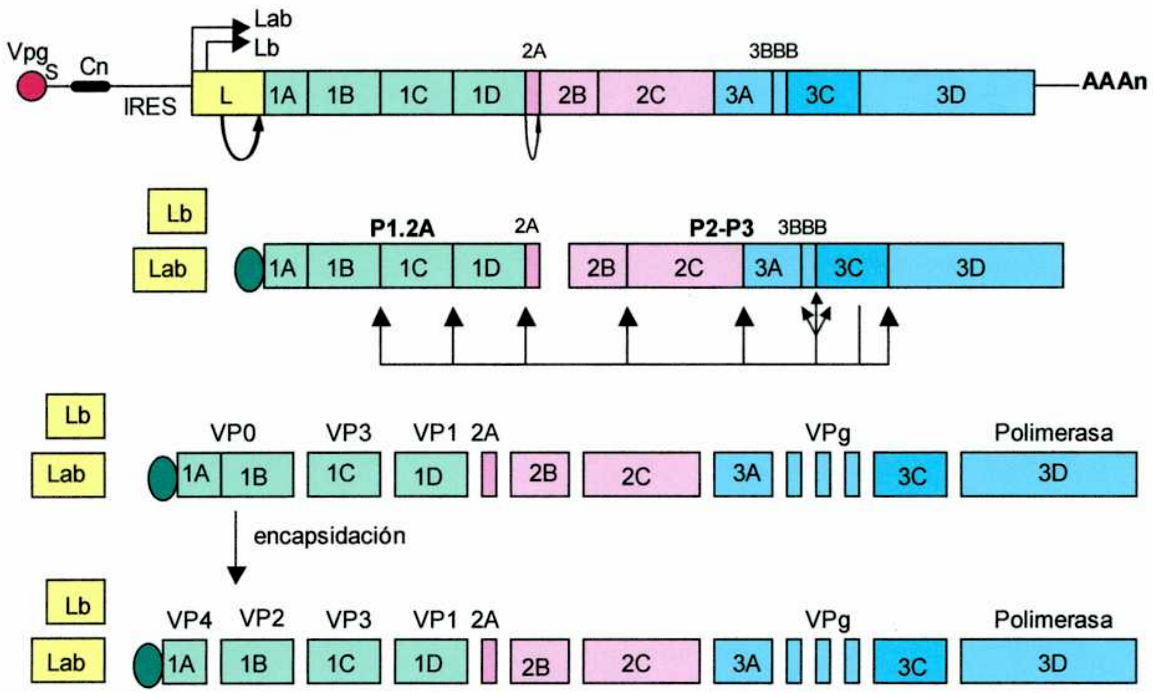
La mayor parte del genoma viral consiste en un único marco de lectura abierto de 6996 nt, que es iniciado a partir de un IRES ubicado a 1100 bases del extremo 5´ y que codifica para una poliproteína de 2332 aminoácidos para el tipo O (Forss y col. 1984). La traducción del mismo comienza en dos codones de iniciación distanciados entre sí 84 nucleótidos y que originan dos proteínas líderes (Lab y Lb) (Rueckert y Wimmer, 1984). Análisis de secuencias nucleotídicas han revelado que estos dos codones de iniciación están presentes en los siete serotipos del VFA. A su vez, Lb (la menor de las dos proteínas) es la especie mayormente sintetizada en células infectadas y en sistema libre de células (Strebel y Beck, 1986).

El producto de P1.2A es precursor de las proteínas de la cápside, mientras que P2 y P3 son precursores de proteínas no estructurales.

La "región 3' no codificante" posiblemente es relevante en la iniciación de la síntesis de ARN negativo. En el extremo 3´ se encuentra una secuencia de poli A de 89

bases de longitud (Bachrach, 1977; Sangar, 1979).

Figura 5: Representación esquemática de la expresión del genoma del VFA



1.3.6. Procesamiento de la poliproteína

Existen al menos cuatro tipos de procesamientos proteicos involucrados en la conversión de la poliproteína precursora a polipéptidos maduros. El genoma del VFA codifica para tres proteínas distintas involucradas en tal procesamiento: leader (L), 3C y el péptido 2A; el cuarto clivaje, que genera a 1A y 1B, ocurre durante la encapsidación del ARN viral.

La proteína L cataliza su propio clivaje (en cis o trans) de la poliproteína naciente y éste es el primer procesamiento que ocurre (Srtebel y Beck, 1986). Tanto la proteína

completa (Lab) como su versión truncada (Lb) son capaces de clivar la unión L/P1 en *trans* (Medina y col, 1993). La proteasa L tiene dos funciones conocidas: a) el clivaje autocatalítico del extremo N-terminal de la poliproteína y b) el clivaje de la subunidad p220 del factor de iniciación de la traducción eucariótica 4F, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas dependientes de cap, sin afectar la sintesis de proteínas virales, la cual puede ocurrir en presencia de p220 clivado (Devanney y col., 1988). Sin embargo, la proteasa L no es necesaria para que el virus inhiba la síntesis de proteínas de la célula hospedadora (Piccone y col., 1995).

El clivaje entre P1 y P2 ocurre en el extremo carboxi-terminal de 2A y es realizado por el mismo péptido 2A de 16 aminoácidos. Este clivaje, que ocurre únicamente en *cis*, es rápido y no requiere de L ó 3C.

El procesamiento de P1.2A es llevado a cabo por la proteasa 3C. Esta enzima pertenece a la familia de tio-proteasas y presenta gran similitud con serina-proteasas celulares; además, su actividad requiere de la presencia de cisteína en el sitio activo (Grubman y col., 1995). La proteasa 3C cliva también la histona 3, lo cual contribuiría a la inhibición de la transcripción celular (Falk y col., 1990). Esta proteasa cliva secuencialmente las uniones VP3/VP1, VP0/VP3, VP1/2A y para generar VP1, VP3 y VP0 (VP2 + VP4); y es además responsable del procesamiento de P2 y P3 (Vakharia y col., 1987). La proteasa 3C puede actuar en *trans* y reconoce como sitios posibles de clivaje Gln/Gly, Glu/Gly, Gln/Thr, Glu/Thr, Cys/Asn y Leu/Asn.

El clivaje entre VP2 y VP4 es autocatalítico y ocurre en las etapas finales de la morfogénesis del virión. Este clivaje ligado a la encapsidación tendría dos funciones. Por un lado, la estabilización del virión maduro ya que los nuevos extremos generados (VP2 y VP4) interaccionan reforzando las conexiones entre estructuras pentaméricas (Fry y col., 1990). Además se ha visto que la inhibición de este clivaje está asociado a pérdida de infectividad (Lee y col., 1993), indicando que el clivaje de VP0 es crucial para la infección.

La poliproteína precursora sufre, además, otro tipo de modificación post-traduccional, la cual involucra el bloqueo de la glicina terminal por miristilación (Chow y col, 1987). Tanto VP4 como sus precursores VP0 y P1 son modificados co-traduccionalmente luego de la eliminación de la formil-metionina, mediante una unión amida de ácido mirístico a la glicina amino terminal. El posible consenso para la miristilación sería GXXS/T, el cual también se ha encontrado en otras proteínas virales y

celulares (Belshman y col., 1991). La miristilación contribuye a la estabilización de los pentámeros y también actuaría como sitio de anclaje para mantener altas concentraciones de estructuras subvirales (protómeros y pentámeros) en las zonas de la membrana donde ocurriera el ensamble de la cápside (Belsham, 1993). El procesamiento de la poliproteína precursora de las proteínas estructurales sería un evento independiente de esta modificación (Belsham y col., 1991); en cambio, la estabilidad de la cápside es afectada negativamente en ausencia de miristilación.

1.3.7. Características antigénicas del VFA

Bachrach y colaboradores (1975) presentaron la primera evidencia sobre la efectividad del VP1 en inducir una respuesta inmune protectora en cerdos y cobayos. Más tarde también se demostró la protección conferida por VP1 del virus A12 en bovinos y cobayos (Bachrach y col. 1982); sin embargo, VP1 aislada del VFA tipo O1 confería poca ó nula protección frente al desafío viral (Moloen y col. 1986).

Basados en estudios de secuenciación de variantes antigénicas que escapan a la neutralización ejercida por anticuerpos monoclonales (AcM) neutralizantes, como así también en ensayos de competencia de la reactividad con AcM entre virus y péptidos sintéticos que mimetizan segmentos de la partícula viral, se han identificado sitios antigénicos en los serotipos A (Thomas y col., 1988; Baxt y col., 1989; Saiz y col., 1991), O (Xie y col., 1987; Kitson y col., 1990; Oarry y col., 1985 y 1989) y C (Mateu y col., 1989 y 1990; Lea y col., 1994) del VFA, los cuales se hallan distribuídos en tres de las cuatro proteínas estructurales.

Los epitopes virales lineales se hallan localizados en la mitad carboxiterminal de VP1, ya que fragmentos de esta zona obtenidos por diferentes métodos (clivaje con agentes químicos o péptidos sintéticos) también inducen AcN (Pfaff y col., 1982; DiMarchi y col., 1986; Zamorano y col., 1994).

En particular, se ha identificado un estrecho segmento dentro de VP1, comprendido entre los residuos aminoacídicos 140-160 (loop GH) que constituye el sitio A y que contiene los epitopes más importantes en la inducción de anticuerpos neutralizantes (Ptaff y col., 1982; Bittle y col., 1982; Winther y col., 1986; Doel y col., 1988). En el extremo carboxi terminal de VP1 se halla otro sitio antigénico (sitio C) que

incluye los últimos catorce aminoácidos de la proteína (residuos 200-213). Si bien en el serotipo C este sitio es independiente del sitio A, en el serotipo O el sitio C forma con el sitio A un solo sitio discontinuo llamado sitio Y. Estudios de cristalografía y difracción de rayos X han revelado que este sitio se encuentra en un loop, denominado GH, protuyente y móvil (Achayra y col., 1989; Lea y col., 1994).

Se ha determinado, además, la existencia de otros sitios antigénicas sobre las proteínas VP2 y VP3 (Thomas y col., 1988; Baxt y col., 1989; Kitson y col., 1990). En los serotipos A, O y C se encuentra un sitio formado por parte de la proteína VP2 (loop BC formado por los aminoácidos 70-80) y de VP3 (knob βB formado por los residuos 58-61). En el serotipo O, el loop EF de la proteína VP2 (aminoácidos 131-134), también participa de este sitio antigénico.

En el serotipo O se ha identificado otro sitio antigénico en el loop BC de VP1 (aminoácidos 43-48) llamado sitio III. Asimismo, se ha encontrado que algunas sustituciones en este sitio pueden alterar la antigenicidad del sitio A (Parry y col., 1990). En el serotipo A un sitio equivalente a este sería el hallado en el loop HI.

La producción de AcN en respuesta a la infección por VFA requiere de la cooperación de células B y T. En suero de ratones infectados experimentalmente fue posible encontrar IgG específicas correspondientes a una respuesta T-independiente (IgG3) y T-dependiente (IgG1 e IgG2a) (Collen y col., 1989). Además, las células B primadas de estos ratones fueron incapaces de producir Ac específicos en ausencia de células T primadas ó citoquinas secretadas por células T. Estudios de mapeo epitópico utilizando péptidos sintéticos han permitido identificar epitopes T presentes en las regiones VP1 21-40 (Collen y Doel, 1991), VP1 97-116, VP1 116-213, VP2 54-72 y VP3 99-110 (Collen, 1991). Algunos de estos epitopes se encuentran adyacentes a sitios antigénicos; así, la región VP1 21-40 está adyacente al sitio III y la zona VP2 54-72 se ubica dentro del loop BC de VP2.

1.3.8. Respuesta inmune frente al VFA

La infección por el VFA induce una respuesta celular y humoral en el hospedador siendo el elemento más importante de la respuesta la producción de AcN específicos contra las proteínas estructurales del virus (Van Bekkum, 1969).

Los mecanismos por los cuales los AcN cumplen su función aún no están claros. Se cree que los AcN afectan los antirreceptores virales ya sea por unión a ellos o por impedimento estérico, imposibilitando entonces la adsorción del virión a la célula. En este caso la eliminación del virus sería llevada a cabo a través de la formación de complejos inmunes entre los Acs y las partículas virales, los cuales serían rápidamente eliminados de la circulación (Outlaw y col., 1980; Baxt y col., 1984). Las células del sistema reticuloendotelial juegan un rol importante en la defensa frente a la infección con VFA ya que sólo con la presencia de un sistema fagocítico activo se logra una eficiente respuesta inmune protectora frente al virus (Mc Cullough y col., 1986 y 1988). Esto explicaría porque bajos niveles de anticuerpos pueden llegar a ser efectivos en la protección del animal frente al VFA. La potenciación de la fagocitosis debida a la opsonización del virus por anticuerpos sería el principal efector de la generación de protección. Los anticuerpos neutralizantes tendrían, entonces, un rol preponderante a altas concentraciones, en las cuales se inhibiría la capacidad infectiva del virus (McCullough y col., 1992).

Estudios en torno al papel de las células T en la respuesta inmune al VFA, en animales de experimentación como cobayos (Knudsen y col., 1979; Francis y col., 1985) y ratones (Piatti y col., 1991) sugieren que el sistema T cumple un papel importante en los mecanismos de defensa contra el VFA, particularmente en el establecimiento de memoria inmunológica. Sin embargo resulta evidente que los linfocitos T no son necesarios en el mecanismo intrínseco de la eliminación viral ya que la transferencia de células B obtenidas de ratones infectados son suficientes para eliminar animales receptores previamente inmunodeprimidos e infectados (Borca y col., 1986).

En bovinos, utilizando ensayos *in vitro*, es posible detectar la aparición de AcN a los 3 o 4 (d.p.i) coincidiendo con el inicio de la viremia (Francis, y col. 1983). Estas primeras inmunoglobulinas producidas son IgM e IgA y, tienen su pico máximo entre los 10 y 15 días y desaparecen alrededor del día 40 (Brown y col., 1964, Abu y col., 1981). Días después de la aparición de las IgM e IgA aparece en el suero la IgG que, a los 21 días, se constituye en el tipo predominante. La capacidad de neutralización *in vitro* de la fracción IgG es cuantitativamente baja en un principio y aumenta con el tiempo hasta representar, a los 60 días, el total de la actividad neutralizante (Mulcahy y col. 1990). Las IgG producidas son de duración variable de acuerdo al sistema de inmunización usado. La inmunidad conferida por la inmunización con vacunas no otorga los mismos niveles y

duración de la protección que la infección activa (Schudel, y col., 1993).

El desarrollo de la respuesta humoral coincide con la eliminación de las lesiones, terminación de la viremia y reducción de la excreción viral. En los bovinos se ha descrito que los títulos de AcN duran por más de 4 años luego de la aparición de la infección (Sadir y col., 1988; Lopez, y col., 1990). La inmunidad adquirida luego de la infección está fuertemente restringida al serotipo infectante y por lo tanto no protege contra la infección con otros serotipos.

El estudio de la respuesta inmune al VFA en bovinos ha sido limitado debido a la imposibilidad de trabajar con animales endocriados, el conocimiento incompleto de su sistema inmune, su excesivo costo, así como la virtual imposibilidad de realizar estudios de mecanismos de acción *in vivo*.

Por el contrario, el ratón ha sido utilizado como modelo experimental para el estudio de la respuesta inmune hacia muchos tipos de virus debido especialmente al exhaustivo conocimiento que se posee sobre su sistema inmune. Los ratones adultos no son susceptibles a la infección natural con VFA sin embargo pueden ser experimentalmente infectados (Subak-Sharpe, 1961; Subak y col., 1962). Luego de la inoculación intraperitoneal (i.p.) de un alto número de partículas virales, los ratones manifiestan una infección subclínica que involucra replicación viral, principalmente en células pancreáticas, acompañada de una viremia durante 72 horas post-infección (Fernandez y col., 1986). A partir del momento en que se detecta un aumento significativo de AcN, se observa una rápida disminución del virus en sangre y órganos hasta su desaparición total, de modo que a los 4-5 días post infección no se detecta persistencia viral en varios órganos (Lopez y col., 1990). En ratones inmunosuprimidos por irradiación o quimioterapia se observa correlación entre la falta de AcN y la prolongación de la viremia. Por el contrario, cuando estos animales son reconstituidos con células inmunocompetentes provenientes de ratones inmunizados con virus activo se observa simultaneamente la eliminación de la viremia y la aparición de AcN (Borca y col., 1984 y 1986).

1.4. La Fiebre Aftosa

1.4.1. Definición

La FA es una enfermedad aguda, febril y altamente contagiosa, que afecta principalmente a animales de pezuña hundida (Bachrach, 1968; Sangar, 1979; Pereira, 1981). Es una de las enfermedades más temidas del ganado debido a su amplia distribución geográfica y por ser altamente contagiosa.

1.4.2 Síntomas clínicos producidos por el VFA, su transmisión

El VFA es el agente causal de la FA, enfermedad que afecta con mayor frecuencia a bovinos y porcinos, pero su rango de posibles hospedadores naturales puede abarcar a variedades caprinas, ovinas y decenas de especies silvestres.

Dependiendo de la especie animal y la cepa viral la severidad de los síntomas clínicos va desde un porcentaje variable de mortandad en bovinos y porcinos jóvenes (Bachrach, 1968) hasta infecciones prácticamente asintomáticas en ovejas y cabras (Burrows, 1968; Pay 1988). Cada especie antes mencionada cumple un rol diferente en el mantenimiento y diseminación de la enfermedad. Mientras que el ganado bovino actuaría como principal diseminador, las especies ovinas cumplirían su papel en el manteniemiento (Sellers y Parker, 1969), los porcinos funcionarían como hospedadores amplificadores (Sellers, 1971) y otras especies como llamas, antílopes, ciervos y jabalíes, entre otros, tendrían importancia por el hecho de poder portar y transmitir el virus a los animales domésticos.

La Fiebre Aftosa posee las características de un enfermedad febril de curso agudo acompañada por la aparición de vesículas epiteliales de ocurrencia variable conteniendo virus infeccioso, que usualmente suelen afectar la boca, las pezuñas, el rumen y las mamas. La aparición de estas vesículas puede complicarse con la ocurrencia de infecciones bacterianas y hacen dificultosa la alimentación y traslado del animal (Shahan, 1962). Los casos fatales se circunscriben a individuos jóvenes, en especial de bovinos y porcinos, los cuales pueden desarrollar cuadros de miocarditis con determinadas cepas virales.

El virus se transmite entre los animales por diversos mecanismos, entre ellos se encuentra el contacto directo, especialmente durante la fase febril temprana cuando el virus se encuentra en la mayoría de los órganos, secreciones y excreciones (Burrows, 1968, Cottral y col., 1968). Durante la infección natural, la puerta de entrada mas común es el tracto respiratorio superior (Mc Vicar and Sutmoller, 1976; Burrows y col., 1981). Las especies porcinas parecen más susceptibles que otras a la infección por el tracto digestivo mientras que las lesiones en la piel pueden también constituir una vía de acceso para el virus. En todos los casos muy pocas unidades infecciosas son suficientes para iniciar el proceso infectivo, una de las razones de la gran facilidad de contagio.

Dentro de las dos a cuatro horas después de la infección se puede aislar virus de las secreciones del tracto respiratorio superior, siendo los sitios de replicacion primarios la orofaringe y los tejidos linfoides asociados (Burrows, 1981). De la viremia resultante, se establecen los sitios de replicación secundarios en los tejidos de predilección: epitelio podal, epitelio lingual, glándula mamaria y otros órganos internos (Prato Murphy y col., 1994). Los AcN circulantes aparecen luego de la infección mientras que el virus desaparece del torrente sanguíneo, pero no necesariamente de los tejidos. A pesar de que la secreción de virus se produce ya desde la incubación temprana de la enfermedad con pocos o nulos signos clínicos, es luego de la replicación secundaria que se produce la mayor diseminación de partículas virales (Scott y col., 1986).

Una característica del VFA es que puede dar lugar a infecciones persistentes. Este estado se reconoce por el aislamiento del virus en cultivos celulares a partir de muestras del fluido esófago-faríngeo por largos períodos (Burrows y col., 1966), así como por la prevalencia de Acs contra antígenos asociados a infección (McVicar y Sutmoller, 1970). Aunque el rol epidemiológico de estos animales portadores no ha sido totalmente probado, se ha postulado que ellos pueden estar involucrados en los cambios antigénicos del virus, llevando a la aparición de nuevas variantes virales en el campo.

1.4.3. Vacunas frente al VFA

La vacuna utilizada actualmente es polivalente y a virus inactivado (Barteling y Vreeswijk, 1991) y aunque ha sido eficaz en el control y erradicación de la enfermedad, en países donde la FA no ha sido erradicada, la vacunación masiva de los animales es

indispensable; y aún en los lugares donde la FA no está presente, es necesario contar una estrategia eficiente de vacunación en caso de ocurrir un brote de la misma. Ejemplos de esto último lo constituyen los brotes de Taiwan (1997) y recientemente Gran Bretaña y Argentina (2000-2001). La producción de vacunas antiaftosa a virus inactivado presentan el riesgo de inactivación incompleta del virus y de escape viral en las plantas de producción. El progreso en la producción de vacunas antiaftosa está dirigido hacia el logro de vacunas más eficientes en cuanto a la inmunidad conferida, más estables, sin efectos colaterales adversos y de elaboración más fácil y económica. En la última década se realizaron importantes progresos en la construcción de "vacunas de nueva generación" (vacunas a virus vivo modificado, vacunas recombinantes y vacunas a péptidos sintéticos). Estudios con Ac monoclonales, mutantes resistentes a neutralización y cristalografía de rayos X sugieren que los sitios inmunogénicos importantes de VFA involucran epitopes conformacionales, algunos de los cuales incluyen regiones de mas de una proteína estructural (Xie y col., 1987; Baxt y col., 1989). La región de VP1 correspondiente a los aminoácidos 140 a 160 es altamente variable y contiene los principales determinantes antigénicos. Vacunas basadas en péptidos que representan la región carboxi-terminal de VP1 indujeron Ac neutralizantes y protegieron a bovinos y cerdos frente al desafío con virus vivo (Bittle y col., 1982; Ptaff y col., 1982; Di Marchi, 1986; Morgan, 1990). Sin embargo, estos resultados sólo se logran con grandes cantidades de inmunógeno. Rweyemamu y col. (1979) mostraron que cápsides vacías del VFA serotipo A son tan inmunogénicas como viriones en cobayos. Además, cápsides vacías aisladas de células infectadas tienen las mismas propiedades antigénicas y neutralizantes que las partículas virales (Rweyemamu y col., 1979; Grubman y col., 1985). Por otro lado, utilizando sistemas de traducción libre de células y empleando ARN del VFA ó transcriptos subgenómicos se obtienen estructuras complejas idénticas a cápsides vacías aisladas de células infectadas en cuanto a la composición proteica y habilidad de unir anticuerpos específicos y células susceptibles (Grubman y col., 1984, 1985; Clarke y Sangar, 1988). Por lo anteriormente expuesto, una alternativa a las vacunas convencionales o a las basadas en péptidos es la preparación de cápsides vacías expresando y procesando la poliproteína precursora en un sistema de expresión heterólogo. Las cápsides vacías conservan los epitopes B (Rowlands y col, 1975; Rweyemamu y col., 1979; Doel y Chong, 1982; Grubman y col., 1985) y T identificados en

bovinos (Collen y col., 1990, 1991) y cerdos (Roosien y col., 1990; Saiz y col., 1992). Entonces, las cápsides vacías inducirían una respuesta protectiva similar a la inducida por virus inactivado. Se ha expresado la poliproteína precursora de las proteínas estructurales de los serotipos A, O y C utilizando sistemas de expresión en *E. Coli*, baculovirus, virus vaccinia, adenovirus y ADN desnudo. La expresión en *E. Coli* de la poliproteína junto con la proteasa 3C resulta en un correcto procesamiento de dicho precursor con la formación de cápsides vacías (Lewis y col., 1991), las cuales reaccionaron con anticuerpos monoclonales que reconocen la estructura 12S. Sin embargo, el ensamble de las cápsides vacías en el sistema bacteriano resultó ser un proceso ineficiente. Esto podría deberse a la ausencia de miristilación en VP0, puesto que las bacterias no son capaces de realizar tal modificación post-traduccional, o bien, a un efecto tóxico de la proteasa 3C. Estas cápsides parcialmente ensambladas indujeron AcN en cobayos y cerdos y, en estos últimos, protección parcial frente al desafío viral. Por otro lado, P1.2A en ausencia de 3C no es procesada en este sistema bacteriano (Lewis y col., 1991; Grubman y col., 1993). Este producto no procesado es incapaz de inducir AcN en cobayos y cerdos y, en consecuencia, no genera protección.

La expresión de la poliproteína precursora en ausencia de 3C en el locus de la polihedrina de baculovirus resultó en la síntesis de un producto no procesado y por lo tanto ausencia de las proteínas estructurales (Roosien y col., 1990; Lewis y col., 1991). Sin embargo, P1 expresada en este sistema adopta una conformación tal que permite su reconocimiento por AcN que reconocen epitopes continuos y discontinuos (Saiz y col., 1994) y, además, es capaz de inducir una respuesta de AcN, en cobayos, baja pero detectable (Roosien y col., 1990; Lewis y col., 1991). La expresión de P1 junto con 3C resulta en un correcto procesamiento de la poliproteína precursora y formación de cápsides vacías detectadas por sedimentación en gradiente de sacarosa. Sin embargo, la eficiencia de formación de cápsides vacías fue baja no pudiendo detectarlas por microscopía electrónica (Roosien y col., 1990).

El sistema de expresión empleando virus vaccinia recombinante también ha sido utilizado para la obtención de cápsides vacías. La expresión de P1.2A con 3C permitió un correcto procesamiento de P1 (Belsham y col., 1990; Abrams y col., 1995) y la obtención de cápsides vacías que sedimentan como estructuras de 70S en gradiente de sacarosa y se visualizan en microscopía electrónica como partículas de 30 nm de diámetro (Abrams y

col., 1995) En este sistema, sin embargo, las proteasas 3C y L tienen un efecto tóxico sobre las células (Abrams y col., 1995). Por otro lado, se observó que la modificación de un único aminoácido en la secuencia consenso de miristilación impide el ensamble de cápsides vacías aunque se generan las proteínas estructurales. (Belsham y col., 1990; Abrams y col., 1995). Sanz Parra (1998) expresaron P1 en ausencia de 3C y observaron que, si bien P1 no es procesada, es capaz de adoptar una conformación similar a la adoptada por las proteínas estructurales al formar la cápside. Este precursor, al ser inoculado en cobayos, no indujo AcN detectables. En cambio, generó una respuesta de células T CD4+ y CD8+ específica. Los autores adjudican esta ausencia de respuesta humoral a las características de la infección por virus vaccinia, en la cual el antígeno no tendría una correcta presentación a células B ó habría poco antígeno extracelular disponible para ser captado por las células presentadoras de antígeno.

El sistema de expresión mediante adenovirus recombinante también ha sido evaluado para la producción de cápsides vacías. La infección de células susceptibles con adenovirus conteniendo la región codificante de P1.2A–3C permitió el procesamiento proteolítico de la poliproteína; en cambio al utilizar una proteasa conteniendo una mutación puntal que inhibe su actividad, no se observaron clivajes internos en P1. Con estos adenovirus recombinantes se inocularon ratones y sólo los animales que recibieron adenovirus conteniendo 3C nativa fueron capaces de desarrollar una respuesta de anticuerpos neutralizantes. En cerdos, la inoculación de adenovirus conteniendo P1.2A y 3C nativa indujo AcN y un alto grado de protección frente al desafío viral (Mayr y col., 1999). Por otro lado, Sanz-Parra y col. (1999 a y b) han utilizado adenovirus recombinante conteniendo únicamente el gen de P1 para inmunizar cerdos y bovinos y evaluar el grado de protección inducido por la vacunación. En ambos casos no detectaron respuesta de AcN; sin embargo, los animales fueron capaces de desarrollar una respuesta de células T y resultaron parcialmente protegidos frente al desafío con virus vivo. Una explicación posible para este resultado estaría dad por la localización intracelular del antígeno, la cual limitaría el reconocimiento del mismo por las células B circulantes y estaría, entonces, induciendo una respuesta de células T restricta a MHC I (independiente de conformación). Esta respuesta inmune celular sería la mediadora de la protección adquirida por los animales inmunizados (Sanz-Parra y col., 1999 a y b).

La inmunización con ADN desnudo ha sido recientemente evaluada como sistema

de expresión de cápsides vacías del VFA para el desarrollo de vacunas experimentales. Ratones inoculados con un plásmido codificando para P1 y 3C desarrollaron AcN, mientras que la inmunización con el plásmido conteniendo sólo P1 fue incapaz de inducir tal respuesta (Chinsangaram y col., 1998; Beard y col., 1999). Además, cerdos inoculados con una construcción conteniendo el genoma completo del VFA pero con el sitio de unión a células susceptibles mutado, desarrollaron un mayor nivel de anticuerpos neutralizantes y los animales resultaron parcialmente protegidos frente al desafío viral (Beard y col., 1999).

Los resultados obtenidos hasta ahora al expresar la poliproteína precursora de las proteínas estructurales del VFA en sistemas heterólogos, en relación a la conservación de epitopes protectivos, las convierten en antígenos candidatos para la formulación de vacunas. Sin embargo, aún no se ha logrado un método de expresión masiva de un inmunógeno eficaz como para ser utilizado a campo ya que los sistemas desarrollados hasta ahora resultan costosos y poco aplicables a nivel industrial.

2. JUSTIFICACION

Desde la descripción original de esta metodología por Mason y col., el uso de plantas transgénicas para la producción de antígenos relevantes ha sido ampliamente evaluada por diversos grupos de investigación. Tal como se describió en la Introducción, la expresión de antígenos vacunales en plantas transgénicas presenta varias ventajas con respecto a los sistemas de expresión heterólogos actualmente en uso. Este sistema de expresión constituye, entonces, una alternativa prometedora para la expresión de proteínas heterólogas y la factibilidad de su uso ha sido reportada para diversos sistemas virales y bacterianos.

Sin embargo, la mayoría de los antígenos expresados hasta el momento constituyen epitopes lineales ó estructuras muy simples. El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y la cápside del virus Norwalk constituyen los únicos ejemplos de estructuras con un cierto grado de complejidad expresadas establemente en plantas. Es de esperar que el uso de plantas transgénicas como fuente de antígenos vacunales eficientes inmunológicamente requiera, en mucho casos, la producción de estructuras complejas.

Los resultados obtenidos hasta ahora al expresar cápsides vacías del VFA en sistemas heterólogos, con relación a la conservación de epitopes protectivos, las convierten en antígenos candidatos para la formulación de vacunas. Sin embargo, aún no se ha logrado expresar en forma masiva y eficiente cápsides virales vacías, puesto que los sistemas en uso son costosos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se propuso expresar la poliproteína precursora de las proteínas estructurales del VFA en alfalfa transgénica y evaluar su efectividad como inmunógeno en un modelo experimental.

Aunque los resultados obtenidos por nuestro y otros grupos de investigación indican la factibilidad de utilizar plantas modificadas genéticamente como fuente de antígenos, uno de los principales problemas del sistema es que los niveles de proteína expresada en las plantas transgénicas son relativamente escasos. De modo que el desarrollo de estrategias que generen una mayor producción de proteína recombinante es sumamente importante, especialmente cuando se desea utilizar los extractos de planta sin

ningún proceso de enriquecimiento y/o purificación. Existen distintos niveles que podrían ser optimizados para lograr una eficiente expresión de la proteína foránea en plantas. Entre ellos se encuentra el uso de promotores fuertes constitutivos, enhancers transcripcionales y traduccionales y señales de poliadenilación adecuadas. Se ha reportado, además, que la modificación de la secuencia nucleotídica del gen de interés adaptándola al uso de codones de plantas, puede incrementar en gran medida la expresión de la proteína recombinante.

Dado que la inserción del transgen en el genoma vegetal es al azar es altamente probable que los niveles de su expresión varíen entre los individuos producidos. Una alternativa posible, entonces, consiste en poder identificar aquellos individuos que presentan niveles excepcionalmente altos de la proteína recombinante. Sin embargo, la identificación de aquellas plantas que expresen cantidades significativas de antígeno por métodos inmunológicos es muy laboriosa y lenta.

Por lo anteriormente expuesto, consideramos de gran importancia el contar con una estrategia que nos permita la obtención de plantas transgénicas expresando altos niveles de la proteína recombinante.

De modo que, como segunda parte de este trabajo de tesis doctoral, se propuso desarrollar una metodología que permita la selección rápida y eficaz de las plantas que expresan los mayores niveles de antígeno. La misma se basa en la expresión de un epitope de interés fusionado a un gen reportero que, en nuestro caso, es el que codifica para la enzima β-glucuronidasa. El epitope elegido fue la región comprendida entre los residuos 135 y 160 de la proteína VP1 del VFA. La presencia del gen reportero permitiría seleccionar por un simple ensayo de actividad enzimática aquellas plantas con mayor expresión de la enzima. De este modo, se esperaba que los mayores niveles de actividad enzimática se correspondieran con una mayor producción del péptido de interés. Se pretendió, además, evaluar la antigenicidad e inmunogenicidad de tal péptido al ser expresado como proteína de fusión.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Producir plantas de alfalfa transgénica conteniendo el gen que codifica para la poliproteína precursora de las proteínas estructurales del VFA, a fin de poder ser utilizadas como vacunas experimentales.

3.2. Obtener plantas de alfalfa transgénicas que expresen epitopes inmunodominantes del VFA, como proteína de fusión con la enzima β-glucuronidasa, a fin de ser utilizadas como inmunógenos en modelos experimentales.

Para lograr ambos objetivos fue necesario:

a) realizar el clonado de los genes virales correspondientes en los plásmidos de transformación de plantas;

b) obtener las plantas transgénicas conteniendo los genes deseados;

c) seleccionar las plantas que expresen los mayores niveles de proteína recombinante;

d) evaluar la presencia del antígeno de interés en las plantas seleccionadas;

d) inmunizar ratones, por la vía parenteral, con extractos de las plantas transgénicas seleccionadas y analizar la respuesta inmune inducida por la vacunación;

e) evaluar la protección de los animales inmunizados frente al desafío con virus virulento.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Técnicas de clonado empleadas

4.1.1. Ligación

Todas las ligaciones se realizaron, a 4°C durante 16 horas, en un volumen final de 10 µl bajo las siguientes condiciones: 5 µl de buffer de ligación (60 mM Tris pH 7.8, 20 mM Cl_2Mg, 20 mM ditiotritol, 1 mM ATP; 10% polietilenglicol (PEG), 3 U T4 ADN Ligasa (Promega) y cantidades adecuadas para cada caso de vector e inserto.

4.1.2. Transformación

Para las transformaciones de *E. Coli* realizadas en este trabajo, se utilizaron bacterias de la cepa DH5α , las cuales fueron hechas competentes empleando el método de cloruro de calcio (Sambrook, 1.82).

Las bacterias competentes fueron transformadas con los distintos productos de ligación utilizando el método de shock térmico. Para ello, se incubaron en hielo 30 µl de las bacterias competentes (10^6 bacterias transformantes /µg de ADN superenrollado) con 1 µl de la reacción de ligación durante 30 minutos. Luego, la reacción se incubó en un baño de agua a 42°C durante 90 segundos y se enfrió en hielo durante 2 minutos. Las bacterias transformadas se recuperaron en 1 ml de medio líquido LB (1% bacto triptona, 0.5 % bacto extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7) durante 1 hora en agitación y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 100 µl de medio LB. Las bacterias se sembraron en placas de Petri con medio LB agar (LB con 15 g/l bactoagar) conteniendo el antibiótico correspondiente (Ampicilina 50 µg/ml ó Kanamicina 50 µg/ml). En las transformaciones con los vectores pGEM-T Easy y pUC19 se incorporó a las placas IPTG (0.1 mg/ml) y X-Gal (0.2 mg/ml). En todos los casos las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

4.1.3. Caracterización de los clones positivos

Los clones a analizar fueron crecidos, durante toda la noche a 37°C en agitación, en 3 ml de medio LB con selección. A partir de estos cultivos se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico empleando el método de lisis por hervido. Para ello, se centrifugó 1 ml del cultivo durante 2 minutos a 14.000 rpm y el pellet resultante se resuspendió en 400 µl de una solución STET-Sacarosa (8% sacarosa, 5% Tritón X-100, 50mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, pH 8) con el agregado de lisozima (1µg/ml). Se hirvió durante 2 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó con un volumen igual de isopropanol por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos, a temperatura ambiente. El pellet de ADN se secó por centrifugación en vacío a 65 °C y se resuspendió en 20 µl de solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) conteniendo la enzima ARNasa (0.1 mg/ml).

4.1.3.1. Mapeo de restricción

La selección de los clones recombinantes se realizó digiriendo los ADN obtenidos con la/s enzima/s de restricción apropiadamente elegida/s. Las digestiones enzimáticas se realizaron, durante 2 horas a 37°C, en un volumen final de 20 µl donde se hicieron reaccionar 5 µl de ADN de la minipreparación con 5 U de la enzima en el buffer adecuado.

La reacción enzimática fue analizada en un gel de agarosa en solución TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) teñido con bromuro de etidio.

Se determinó el tamaño de las bandas resultantes de la digestión enzimática por comparación con un marcador de peso molecular.

4.1.3.2. Obtención de ADN plasmídico en maxipreparaciones

Los clones positivos fueron crecidos en 500 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente a 37°C en agitación, durante toda la noche; posteriormente, estos cultivos fueron utilizados para realizar maxipreparaciones de ADN plasmídico empleando el método de purificación por PEG (Sambrock, 1.40). Brevemente, se centrifugaron los

cultivos a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en un rotor de ángulo fijo (Sorvall R65-C, rotor GS-3), se resuspendió el pellet en 10 ml de solución STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Se resuspendió el pellet en solución GTE (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) y se agregó la enzima lisozima (1 mg/ml). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 10 ml de solución 1% SDS y 0.2 N NaOH. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 10 ml de solución 5 mM acetato de potasio, 11.5% ácido acético. Se agitó enérgicamente por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó en las mismas condiciones que se utilizaron anteriormente y se filtró el sobrenadante por gasa estéril. Se agregó 1 volumen de isopropanol, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente en un rotor de ángulo fijo (Sorvall R65-C, rotor SS34). El pellet se lavó con etanol 70%, se secó a 65°C y se resuspendió en 500 µl de TE conteniendo ARNasa (20 µg/ml). Se agregó 1 volumen de una solución 1.6 M NaCl y 13% PEG 8.000. Después de mezclar, se centrifugó a 14.000 rpm en microcentrífuga durante 5 minutos a 4°C y se resuspendió el pellet en 500 µl de TE. Se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 (Ambion) y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó a la fase acuosa resultante 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y se dejó 30 minutos a -70°C. Se precipitó centrifugando a 14.000 rpm durante 20 minutos; se lavó luego el pellet con etanol 70%, se secó por centrifugación con vacío a 65°C y finalmente se resuspendió en solución TE. Se determinó la absorbancia a 260 nm de longitud de onda y se calculó la concentración de la preparación de ADN. La positividad de estos clones fue comprobada por múltiples digestiones con endonucleasas de restricción.

Los clones recombinantes se conservaron congelando las bacterias transformadas en crecimiento exponencial a -70°C en 50% de glicerol.

4.1.3.3. Secuenciación

La secuenciación de las construcciones se realizó por extensión y terminación de cadenas por el método de di-deoxinucleótidos (ddNTPs), utilizando el kit fmol DNA

Sequencing System (Promega). Cada reacción de secuencia se preparó en un volumen final de 17 μl con 3 μg de ADN plasmídico, 50 mM de Tris-HCl pH 9, 2 mM de MgCl, 5 U Taq ADN polimerasa, 200 ng de cada oligonucleótido, 1.5 pmol de α ^{35}S-ATP (Dupont) y fue dividida en 4 tubos con 20 μM de cada una de las mezclas de ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). La reacción se realizó en un termociclador automático durante 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 51°C y 1 minuto a 72°C, y fue precedida por un período de desnaturalización de 3 minutos a 94°C. Se frenó la reacción de amplificación con el agregado de 3 μl de solución de frenado (10 mM NaOH, 95% formamida, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xilene-cianol). Las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 99°C y se corrieron en geles de poliacrilamida 6% y 42% de urea, en buffer TBE (0.1 M ácido bórico, 0.1 M Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA) a 65 W de potencia constante. Los geles se secaron a 80°C, con vacío, durante 30 minutos y se expusieron en películas radiográficas durante 16 horas como mínimo.

4.2. Clonado de P1.2A y P1.2A-2B-3C en los vectores de expresión en plantas

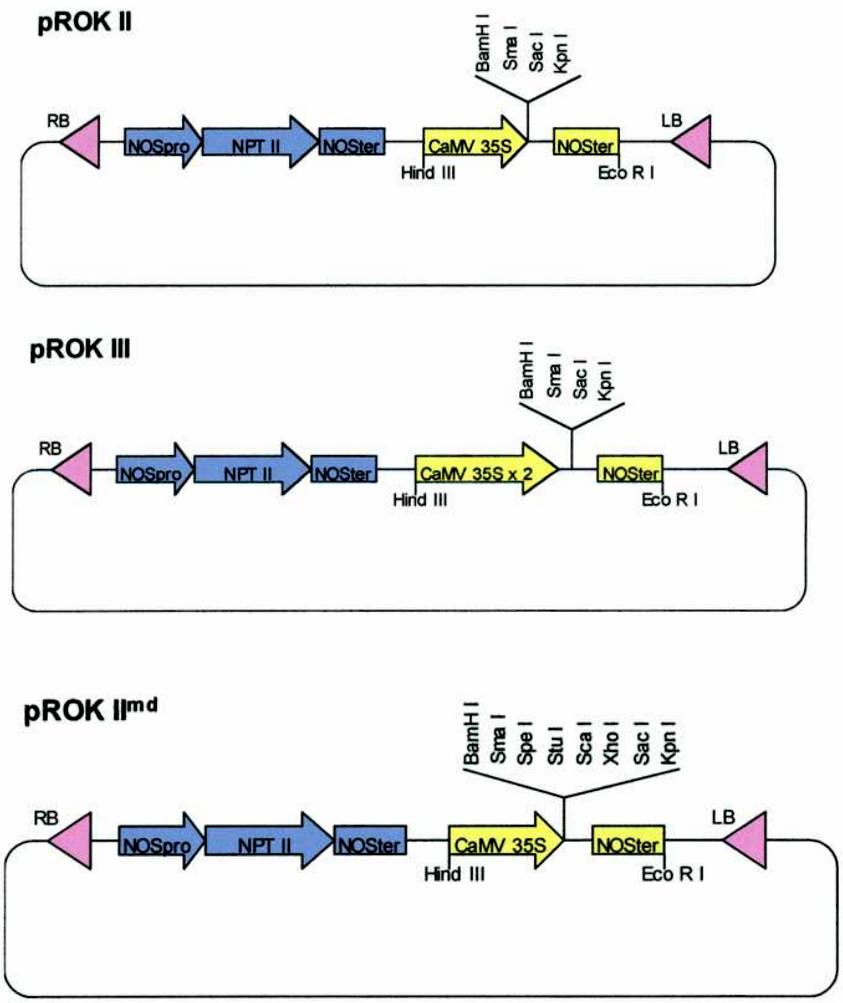
4.2.1. Plásmidos

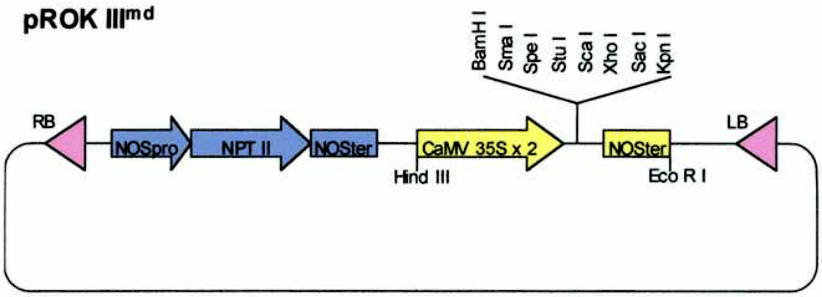
Para el clonado de los productos de amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se utilizó el plásmido pGEM-T Easy (Promega). Este vector permite el clonado directo de productos de PCR, ya que en ambos extremos 3′ del sitio de inserción se le han adicionado timidinas. El sitio de clonado múltiple del plásmido se encuentra dentro de la región codificante del α-péptido de la enzima β-galactosidasa. Esto permite una selección rápida por ausencia de color de los clones recombinantes.

El armado de la construcción P1.2A-2B-3C se realizó sobre el plásmido pUC19 (Biolabs). El sitio de clonado múltiple de este vector interrumpe la región codificante del gen de la enzima β-galactosidasa, lo cual permite la selección de los clones recombinantes por ausencia de coloración azul.

Para la transferencia de genes a alfalfa mediante *Agrobacterium tumafaciens*, se utilizaron los vectores binarios pROK II, pROK III, pROK II^{md} y pROK III^{md} (Figura 1). El pROK II es un plásmido derivado del vector binario pBIN 19 por inserción de un fragmento

Hind III-Eco RI (800 bp) que contiene un elemento promotor-terminador. El promotor constitutivo CaMV 35S del virus del mosaico de la coliflor, que da lugar a la iniciación de la transcripción, está separado del terminador del gen de la nopalina sintetasa (NOS, 260 bp) por cuatro sitios únicos de clonación. El pROK III es un plásmido que difiere del pROK II únicamente en la presencia de un promotor 35S modificado, conteniendo dos copias de un enhancer transcripcional. Los plásmidos pROK II^{md} y pROKIII^{md}, que fueron desarrollados en nuestro laboratorio, derivan de los vectores pROK II y pROK III respectivamente, a los cuales se les ha ampliado el sitio de clonado múltiple mediante la incorporación de cuatro sitios de restricción únicos adicionales.



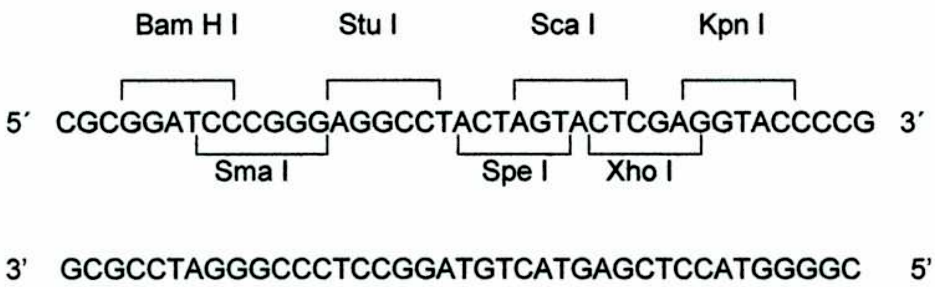


4.2.2. Obtención de los vectores pROK II^{md} y pROK III^{md}

Para generar los vectores pROK II^{md} y pROK III^{md}, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos conteniendo los sitios de restricción *StuI*, *SpeI*, *ScaI* y *XhoI* (Figura 6). Los mismos se hibridaron incubándolos en las siguientes condiciones: 10 minutos a 98° C, 30 segundos a 94 °C, 5 minutos a 55°C, 5 minutos a 21°C y 5 minutos a 4°C.

El fragmento de ADN obtenido y los plásmidos pROK II y pROK III fueron digeridos con las enzimas *BamHI* y *KpnI* . Se realizó la ligación del fragmento conteniendo los nuevos sitios de restricción y los vectores pROK II y pROK III utilizando 150 ng de ADN plasmídico y 625 ng, 50 ng, 12.5 ng ó 1.5 ng de ADN de oligonucleótido.

<u>Figura 6</u>: Oligonucleótidos diseñados para ampliar el sitio de clonado múltiple de los plásmidos pROK II/III



4.2.3. Estrategia de clonado

Se amplificaron mediante la técnica de PCR los siguientes genes: P1.2A, un fragmento de 2B, 3B, 3C y un fragmento pequeño de 3D. Como molde, se empleó ADN complementario (ADNc) oportunamente obtenido a partir de ARN del virus O1 Campos (O1C). Las reacciones de PCR fueron realizadas en 50 μl conteniendo 300 ng de ADNc, 50 μM de cada dNTP, 100 ng de cada primer, 5 U de Taq Polimerasa Amplitaq (Perkin-Elmer) y la concentración de $MgCl_2$ óptima para cada reacción. Los primers utilizados para cada amplificación se detallan a continuación:

<u>Primers empleados para amplificar los genes a clonar:</u>

i) para amplificar P1.2A y clonar en pROK II y pROK III:

Sac I

5′ CTC GAG CTC **ATG** GGG GCT GGA CAA TCC AG 3′ (posición 1-15 de VP4)

5′ GAC GAG CTC **TTA** CCC AGG GTT GGA CTC GAC 3′ (posición 31-48 de 2A)

Sac I

ii) para obtener P1.2A-2B-3C y clonar en pUC 19 se realizaron 3 amplificaciones:

ii.1) P1.2A

Eco RI Stu I

5′ TGA ATT CAA AGG CCT **ATG** GGG GCT GCA CAA TCC 3′ (posición 1-18 de VP4)

5′ GAC TCT AGA GGG CCC AGG GTT GGA CTC GAC 3′ (posición 31-48 de 2A)

Xba I Apa I

ii.2) un fragmento de 2B

```
                    Apa I
5´ TCC AAC CCT GGG CCC TTC TTT TTC        3´   (posición 1-12 de 2B)
5´ GAT TCT AGA GTA CCA GGG TTT GGC        3´   (posición 169-184 de 2B)
       Xba I
```

ii.3) 3B, 3C y un fragmento de 3D

```
        Xba I
5´ GAA TCT AGA TAC GCC GGA CCA CTC        3´   (posición 7-21 de 3B)
5´ TGC AAG CTT ACT AGT CTA CAT CAT CAC GTG AAC GCG CTC 3´
       Hind III  Spe I                         (posición 31-48 de 3D)
```

Se realizó la ligación de 500 ng de los fragmentos de amplificación con 50 ng del plásmido pGEM-T Easy; luego de transformar bacterias competentes, se seleccionaron los clones positivos por mapeo de restricción según lo descripto previamente. Los vectores resultantes se denominaron: pGEM-P1.2A, pGEM-P1.2A (P1-3C), pGEM-2B y pGEM-3C.

Para la construcción que incluye únicamente el gen de P1.2A, el plásmido pGEM-P1.2A se digirió con la enzima de restricción *SacI* y tras su separación electroforética en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Biorad) al 1 % se escindió la banda correspondiente a P1.2A. La agarosa fue digerida enzimáticamente con la enzima agarasa (Promega) en una concentración de 1U/200 µl de agarosa fundida, durante 30 minutos a 47° C. Para purificar el ADN se realizó una extracción fenólica y una precipitación con etanol. Se ligaron 500 ng del ADN obtenido con 200 ng de pROK II y pROK III digeridos con *SacI*. Se transformaron bacterias competentes y se seleccionaron los clones positivos por mapeo de restricción.

Para el armado de la construcción P1.2A-2B-3C, se digirió el plásmido pGEM-P1.2A (P1-3C) con las enzimas de restricción *EcoRI* y *ApaI*, se purificó de gel de agarosa el fragmento correspondiente y se ligaron 500 ng del mismo con 100 ng del vector pUC19. Luego de transformar bacterias y seleccionar los clones positivos se obtuvo el plásmido

pUC-P1.2A. A partir del vector pGEM-2B digerido con *ApaI* y *XbaI* se purificó en gel de agarosa el fragmento correspondiente al gen 2B y se clonó en las mismas condiciones que se usaron anteriormente en pUC-P1.2A, generando el plásmido pUC-P1.2A-2B. El fragmento conteniendo 3B, 3C y una porción de 3D fue obtenido por digestión de pGEM-3C con las enzimas *XbaI* y *HindIII* y posterior elución de gel de agarosa como se describió anteriormente. El fragmento correspondiente a 3C fue clonado en pUC-P1.2A-2B (siguiendo los mismos protocolos que para los anteriores clonados) generando el pásmido pUC-P1.2A-2B-3C. Finalmente, la construcción completa (P1.2A-2B-3C) fue purificada de gel de agarosa, luego de digerir enzimáticamente en los sitios *StuI* y *SpeI*, y se ligaron 500 ng de dicho inserto con 200 ng de pROK II^{md} ó pROK III^{md} digeridos con las mismas enzimas. Luego de transformar bacterias competentes y seleccionar los clones positivos, se obtuvieron los plásmidos denominados pROK II^{md} -P1.2A-2B-3C y pROK III^{md} -P1.2A-2B-3C.

4.2.4. Secuenciación de P1.2A y P1.2A-2B-3C

Para confirmar la identidad de las construcciones obtenidas, se secuenciaron completamente los cassettes P1.2A y P1.2A-2B-3C. Los primers diseñados para tal fin se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Primers utilizados para secuenciar las construcciones

primer	sentido	ubicación	secuencia (5' a 3')
P1a	reverso	357-380 de VP4	ATCTTCAGCTGTTGCGTACCCGTA
P1b	directo	357-380 de VP4	TACGGGTACGCAACAGCTGAAGAT
P1.4	reverso	278-299 de VP2	ATATGCATACGAGTCAGTCAGG
P1c	directo	502-525 de VP2	ACGACCAGTACAAGGTTCACAAGC
P1d	directo	258-281 de VP3	TCAAACACCTTCCTCGCAGGTCTT
P1.3	directo	401-421 de VP3	GACACCTGAGGCGGCCGCGCA
P1e	directo	618-641 de VP3	AAAGACTTTGAGCTAAGGCTGCCG
P1.3C (2)	reverso	31 de 2A a 3 de 2B	GACTCTAGAGGGCCCAGGGTTGGACTCGAC

P1.3C (3)	directo	37 de 2A a 12 de 2B	TCCAACCCTGGGCCCTTCTTTTTC
P1.3C (4)	reverso	169-183 de 2B	GATTCTAGAGTACCAGGGTTTGGC
P1.3C (5)	directo	7-21 de 3B1	GAATCTAGATACGCCGGACCACTC
3Ca	directo	55 de 3B3 a 7 de 3C	ACCTGATTGTCACTGAGAGTGGTG
3Cb	directo	369-392 de 3C	GTCGGGAGACTGATTTTCTCTGGT

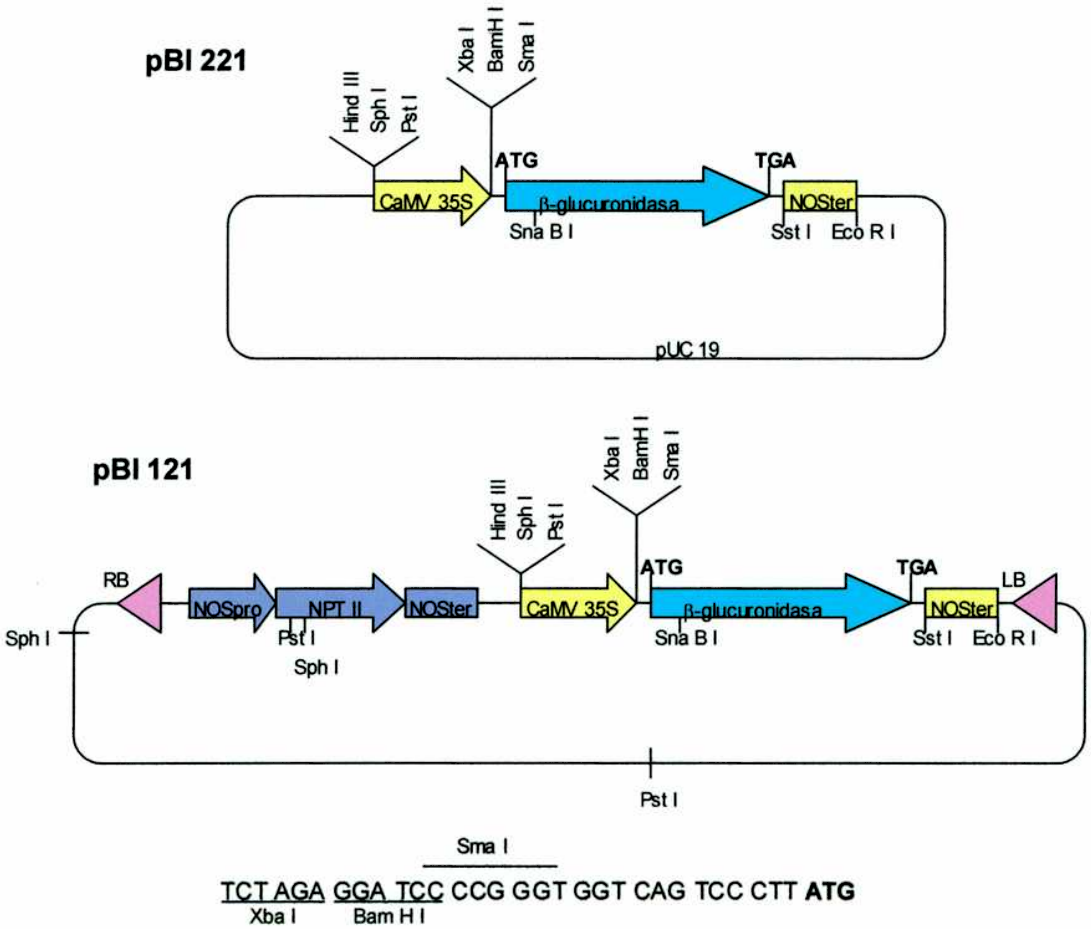
4.3. Clonado del gen que codifica para la proteína de fusión p135-160-β GUS

4.3.1. Plásmidos

Para clonar el fragmento que codifica para la región que se encuentra entre los residuos 135 y 160 de la proteína VP1 se utilizaron los plásmidos pBI 221 (Clontech) y pBI 121 (Clontech) (Figura 3). El pBI 221 es un vector de 5.6 kpb derivado del pUC 19 por inserción de un fragmento *Hind III-Eco RI* de 3 kpb. El mismo contiene el elemento promotor/enhancer 35S CaMV, un sitio de clonado múltiple formado por los sitios *Xba I*, *Bam HI* y *SmaI*, la secuencia completa del gen *gus A* y el elemento terminador NOS.

El pBI 121 es un vector binario de 13 kpb que contiene el mismo cassette *Hind III-Eco RI* de 3 kpb presente en el vector pBI 221. Este plásmido, además, contiene el gen neomicina fosfotransferasa II (NPT II) que confiere resistencia a Kanamicina. El fragmento *Hind III-Eco RI* de 3 kpb y el gen NPT II constituyen el ADN-T y se encuentran flanqueados por las secuencias denominadas bordes derecho e izquierdo (RB y LB) necesarias para la transferencia de dicho ADN-T al genoma vegetal por el sistema de *Agrobacterium tumefaciens*.

Figura 7: Esquema de los plásmidos pBI 221 y pBI 121



4.3.2. Estrategia de clonado

La secuencia de 96 pb (p135-160), que codifica la zona comprendida entre las posiciones 135 y 160 del gen de la proteína VP1 del VFA O1C, fue obtenida por hibridización de oligonucleótidos sintéticos. La secuencia de la cadena positiva es la siguiente:

Xba I *Bam HI*

5′ TTCAGTCTAGAGGATCCATGAGATCTCTAGAAACGCTGTTCCTAACGTT

AGAGGAGATCTTCAGGTTCTTGCTCAAAAGGTTGCTAGAACTCTTCCTGGA

Bam HI

TCCCCGGGTGGTT 3′

Sma I

Esta secuencia contiene, en el extremo 5′el codón ATG y los sitios de restricción para *Xba I* y *Bam HI* y en el extremo 3′ los sitios de restricción para *Bam HI* y *Sma I*. Además, la secuencia nativa del gen fue adaptada al uso de codones de plantas (Wada, K. y col., 1990). Los oligonucleótidos sintéticos fueron hibridados calentándolos a 98° C durante 10 minutos y dejándolos, luego, alcanzar temperatura ambiente. El fragmento de ADN doble cadena así obtenido fue digerido con las enzimas *XbaI* y *SmaI* para ser clonado en el plásmido pBI 221. Para ello, se ligaron 500 ng del fragmento de 96 pb con 100 ng de pBI 221 digerido con las mismas enzimas. Se transformaron bacterias competentes y se seleccionaron clones positivos según fue descrito previamente. El plásmido obtenido (pBI 221-p135-160-β-GUS) codifica para una proteína de fusión conteniendo en el extremo 5′ la secuencia del p135-160 seguido por el gen de β-GUS. Finalmente, el pBI 221-p135-160-β-GUS fue digerido con las enzimas *Hind III* y *Eco RI* y el fragmento de 3.1 kpb resultante fue purificado en gel de agarosa; asimismo, se digirió el plásmido pBI 121 con las mismas enzimas y se purificó en gel de agarosa el fragmento de 10 kpb (el cual contiene todo el vector menos el fragmento *Hind III-Eco RI* de 3 kpb). Se ligaron 500 ng del fragmento de 3.1 kpb con 200 ng del vector escindido de 10 kpb. Luego de transformar bacterias competentes y seleccionar clones positivos, se obtuvo el vector binario pBI 121-p135-160-β GUS.

4.3.3. Secuenciación del gen p135-160

A fin de confirmar la identidad de la construcción obtenida, se secuenció el gen p135-160 según el protocolo descripto en 4.1.3.3. El primer utilizado para tal fin se detalla

a continuación:

GUSseq (antisense, de la posición 134 a la 103 de β GUS)

5′ AATTGCCCGGCTTTCTTGTAACGCGCTTTCCCA 3′

4.4. Obtención de plantas de alfalfa transgénicas

4.4.1. Alfalfa

Se utilizaron los genotipos de alta regeneración C23 y C24 de alfalfa cultivados en el invernadero del Instituto de Genética, CICA, INTA-Castelar.

4.4.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de alfalfa mediante cocultivos con *A. tumefaciens*, se utilizó la cepa LBA 4404 (Gibco BRL). Esta cepa contiene un plásmido Ti modificado (pAL 4404) el cual posee únicamente la región *vir* y *ori* del plásmido Ti original y el gen que confiere resistencia a Streptomicina. En el genoma bacteriano se encuentra el gen que otorga resistencia a Rifampicina.

4.4.3. Transformación de *A. tumefaciens*:

La preparación de bacterias electrocompetentes se realizó por sucesivos lavados en glicerol al 10% (Shen Wen-jun and Forde, B.) La introducción del ADN plasmídico en las células competentes se realizó por electroporación. Para ello, se colocaron 40 μl de bacterias electrocompetentes en una cubeta enfriada de 0.2 cm (Bio-rad) y se electroporaron con 10 ng de ADN bajo un campo eléctrico de 12.5 kV/cm, una capacitancia de 25 μF y una resistencia de 400 Ω en paralelo con la muestra utilizando un electroporador Gene Pulser (Bio-rad). Las células se recuperaron en 1 ml de medio YMB (10 g/l manitol, 0.4 g/l extracto de levadura, 0.1 g/l ClNa, 0.2 g/l $MgSO_4.7H2O$, 0.5 g/l K_2HPO_4, pH 7) durante 4 horas a 29°C en agitación y luego se plaquearon 100 μl en

medio Min A-agar (10,5 g/l fosfato dipotásico, 4,5 g/l fosfato monopotásico, 1 g/l sulfato de amonio, 0,5 g/l citrato de sodio; 0,2 g/l sulfato de magnesio, 2 g/l glucosa, 15g/l bactoagar). Las placas se incubaron 72 horas a 29°C.

Dos ó tres clones se crecieron en 5ml de medio líquido Min A suplementado con Rifampicina (100 mg/l), Streptomicina (300 mg/l) y Kanamicina (100 mg/l), por 24 horas a 29°C; las células se centrifugaron a 14.000 rpm durante 1 minuto y se resuspendieron en buffer TE-Tritón 1%. Las bacterias se hirvieron durante 10 minutos y luego se microcentrifugaron por 2 minutos. Se utilizaron 10 µl de cada muestra para llevar a cabo una reacción de PCR a fin de comprobar la presencia del transgen. Dicha reacción se realizó en 50 µl conteniendo, además, 50 µM de cada dNTP; 100 ng de cada primer, 3 mM de $MgCl_2$ y 5U Taq Polimerasa Amplitaq (Perkin-Elmer). Para detectar P1.2A y P1.2A-2B-3C, se realizaron 35 ciclos de amplificación de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 ½ minutos a 72°C; precedidos por un período de desnaturalización de 5 minutos a 94°C y finalizados con un período de extensión de 7 minutos a 72°C. Los primers utilizados, que amplifican la secuencia correspondiente a VP1, son los siguientes: primer de ida 5′ AATGGAATTCCTATGGGCGAGTCAGCG 3′; primer de vuelta: 5′ CTACGTCGACTACTTGAGAAGGTCAAA 3′. Para detectar el gen p135-160 se realizaron 25 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, precedidos por un período de desnaturalización de 3 minutos a 95°C y finalizados con un período de extensión de 5 minutos a 72°C. Los primers utilizados, que amplifican la secuencia de p135-160, son los siguientes: primer de ida: 5′ TTCAGTCTAGAGGATCCATGAGATAC
TCTAGAA 3′; primer de vuelta: 5′ GAACCACCCGGGGATCCA 3′.

Los productos de amplificación fueron analizados en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en solución TAE e identificados de acuerdo a su tamaño por comparación con el marcador de peso molecular.

4.4.4. Transformación de alfalfa

El sistema experimental que se utilizó para obtener alfalfa transgénica es el cocultivo de explantes vegetales (pecíolos ó embriones) con *A. tumefaciens*.

4.4.4.1. Generación de embriones

Los embriones se generaron por desdiferenciación de pecíolos, es decir, a partir del pecíolo se indujo la formación del callo y a partir de los callos se obtuvieron los embriones, todo ello en base a la utilización de diferentes medios de cultivo.

Brevemente, se utilizaron los pecíolos ubicados en el extremo de la rama, los cuales fueron lavados en 100 ml de lavandina comercial al 2% con 100 µl de Tritón X-100. Se agitaron 30 minutos a 1.200 rpm a temperatura ambiente, se filtraron y se lavaron con agua destilada. Para la inducción de callo se sembraron los pecíolos en medio SHK.

Medio de inducción de callo (SHK), pH 5,8:

6 g/l agar, 20 g/l sacarosa, 0,2 mg/l kinetina, 2 mg/l 2,4 D (diclorofenoxiacético), 4,35 g/l sulfato dipotásico, 50 µg/ml kanamicina, 300 mg/l bacteriostático, macronutrientes (6 g/l fosfato de amonio, 50 g/l nitrato de potasio, 4 g/l cloruro de calcio y 8 g/l sulfato de magnesio), micronutrientes (20 mg/l ioduro de potasio, 100 mg/l ácido bórico, 200mg/l sulfato de manganesio, 20 mg/l sulfato de zinc, 2 mg/l 2 mg/l molibdato disódico, 4 mg/l sulfato de cobre, 2 mg/l cloruro de cobalto y 500 mg/l NaFe EDTA), componentes orgánicos [aminoácidos (5,76 mg/l prolina y 1,06 mg/l tioprolina) y vitaminas (4 g/l myo-inositol, 100 mg/l acido nictónico, 10 mg/l piridoxina y 100 mg/l tiamina).

Los pecíolos fueron crecidos en este medio durante aproximadamente 30 días. En este tiempo los explantes se desdiferenciaron y se formaron los callos. Para la obtención de embriones, los callos fueron transferidos a medio Boi 2y.

Medio de inducción de embriones (Boi 2y), pH 5,8:

6 g/l agar, 2 g/l extracto de levadura, 50 g/l sacarosa, 4.35 g/l sulfato dipotásico, 50 µg/ml kanamicina, 150 mg/l bacteriostático, macronutrientes (20 g/l nitrato de amonio, 1.3 g/l cloruro de potasio, 20 g/l nitrato de potasio, 6.94 g/l nitrato de calcio, 0.7 g/l sulfato de magnesio y 6 g/l fosfato dipotásico, micronutrientes (16 mg/l ioduro de potasio, 32 mg/l ácido bórico, 88 mg/l sulfato de manganesio, 30 mg/l sulfato de zinc y 640 mg/l NaFe EDTA, componentes orgánicos [aminoácidos (40 mg/l glicina) y vitaminas (2 g/l myo-inositol, 10 mg/l acido nictónico, 2 mg/l piridoxina, 2mg/l y tiamina).

A partir de los 10-15 días, se comenzó a observar el desarrollo de embriones.

4.4.4.2. Transformación de embriones y pecíolos

Los pecíolos a transformar se lavaron de igual forma que para la generación de embriones.

Se crecieron cultivos de *A. tumefaciens* en medio Min A suplementado con Rifampicina (100 mg/l), Streptomicina (300 mg/l) y Kanamicina (100 mg/l), a 29 °C en agitación hasta una $DO_{600\ nm}$ de 0.8.

Los pecíolos ó embriones a utilizar fueron puestos en contacto, previamente lastimados con bisturí, con 2 ml del cultivo de bacterias durante 1 minuto. Se eliminó por succión el inóculo y se traspasaron los explantes a un colchón de filtros para luego ser sembrados en medio SHK con Acetosilingona (5ml/l de medio). Luego de incubar por 4 días en oscuridad a 25° C, los explantes transformados se lavaron 3 veces con medio SHK con bacteriostático (250 mg/ml Cefatoxina). Los pecíolos o embriones se sembraron en frascos con medio SHK con bacteriostático y suplementado con Kanamicina (25 µg/ml). Se incubaron en cámara con luz, a 25° C, durante 30 días aproximadamente, realizando repiques cada 10-15 días. Cuando se formaron los callos y se visualizaron embriones incipientes, los callos se transfirieron a medio Boi 2y, en el cual permanecieron por 15 días. Una vez que los embriones se hicieron notorios, se transfierieron a medio de maduración (medio Boi-2Y con 7.3 g/l de glutamina)

En este medio los embriones maduraron adquiriendo la forma típica de botella. En este estadío, se transfirieron los embriones individualmente a medio MS.

<u>Medio de inducción de raíz (MS), pH 5,8:</u>

30 g/l sacarosa, 6 g/l agar, macronutrientes (170 mg/l fosfato dipotásico, 1.9 g/l nitrato de potasio, 4.4 g/l cloruro de calcio, 3.7 g/l sulfato de magnesio y 1.65 g/l nitrato de amonio), micronutrientes (0.83 mg/l ioduro de potasio, 6.2 mg/l ácido bórico, 22.3 mg/l sulfato de manganesio, 8.6 mg/l sulfato de zinc, 0.25 mg/l molibdato disódico, 0.025 mg/l sulfato de cobre, 0.025 mg/l cloruro de cobalto y 37.3 mg/l NaFe EDTA, componentes orgánicos [aminoácidos (2 mg/l glicina) y vitaminas (100 mg/l myo-inositol, 0.5 mg/l acido nictónico, 0.5 mg/l piridoxina, 0,1 mg/l tiamina).

En este medio se desarrollaron el vástago y las raíces primarias y secundarias.

Cuando las plántulas adquirieron una raíz ramificada se transplantaron a tierra permaneciendo inicialmente en cámara húmeda bajo un gradiente de humedad (90% a humedad ambiental) durante 15 días. Finalmente, las plantas se transfirieron al invernadero.

Las plantas seleccionadas fueron propagadas por multiplicación vegetativa.

4.5. Detección de genes recombinantes en el genoma de las plantas transgénicas por PCR

4.5.1. Extracción de ADN

Se trituró 5 mg de hojas frescas en N_2 líquido y se resuspendió en 100 µl de buffer TE. Se agregó 0,3 ml de DNAzol (GIBCO BRL) y tras agitar se dejó descansar 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 0,3 ml de cloroformo, se mezcló enérgicamente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa a la cual se le agregó 1 ml de etanol 100% con 100 µl de acetato de sodio 3M pH 5,2. Se dejó descansar 10 minutos en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm por 15 minutos a 4° C. El pellet se lavó con etanol 70%, se secó por centrifugación y vacío a 65°C y se resuspendió en 40 µl de TE.

4.5.2. PCR

Las reacciones de PCR fueron realizadas en 50 µl conteniendo 5 µl de ADN de planta; 50 µM de cada dNTP; 100 ng de cada primer, 5 U de Taq Polimerasa Amplitaq (Perkin-Elmer) y la concentración de $MgCl_2$ óptima para cada reacción. Todas las reacciones fueron precedidas por un período de desnaturalización de 5 minutos a 94°C y finalizadas con un período de extensión de 5 minutos a 72°C.

Para la detección de P1 se utilizaron un par de primers, a 4 mM de $MgCl_2$, que amplifican el gen de VP1 (639 pb): primer de ida: 5´AATGGAATTCCTATGGGCGAG

TCAGCG 3′; primer de vuelta: 5′ CTACGTCGACTACTTGAGAAGGTCAAA 3′. Se realizaron 35 ciclos de amplificación de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 ½ minutos a 72°C.

El gen NPT II fue detectado usando un par de primers, a 2,5 mM de $MgCl_2$, que amplifica un fragmento de 344 pb: primer de ida: 5′ CAGACAATCGGCTGCTC TGAT 3′; primer de vuelta: 5′ TGCGATGTTTCGCTTGGTGT 3′. Se realizaron 30 ciclos de amplificación de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C.

El gen que codifica para la proteína de fusión p135-160-β GUS fue detectado mediante la amplificación de un fragmento de 100 pb que incluye la secuencia de p135-160. Para ello, se utilizó el siguiente par de primers, a una concentración 4 mM de $MgCl_2$: primer de ida 5′ TTCAGT CTAGAGGATCCATGAGATACTCTAGAA 3′; primer de vuelta: 5′ GAACCACCCGGGGATCCA 3′.

Todos los productos de amplificación fueron analizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en solución TAE e identificados de acuerdo a su tamaño por comparación con el marcador de peso molecular.

4.6. Detección de la actividad transcripcional en las plantas transgénicas

4.6.1. Extracción de ARN

Se trituraron 5 mg de hoja fresca en N_2 líquido y se resuspendieron en 200 µl de TE. Se agregó 1 ml de TRIZOL (Gibco BRL) y tras agitar se dejó descansar 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 0,2 ml de cloroformo, se agitó enérgicamente y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar a 5.000 rpm por 10 minutos se recuperó la fase acuosa y se le agregó ½ volumen de isopropanol. Se dejó descansar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos a 4° C. El pellet se lavó con etanol 70%, se secó a 65°C y se resuspendió en 50 µl de TE con 2 unidades de inhibidor de ARNasa, RNAsin (Promega).

El ADN residual fue eliminado por digestión con ADNasa libre de ARNasa, RQ1 (Promega). La reacción se realizó en un volumen final de 200µl conteniendo 15 U ADNasa, 20 µl de buffer de ADNasa (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM $MgCl_2$, 100

mM $CaCl_2$) y 20 µl de la preparación de ARN. Luego de digerir 30 minutos a temperatura ambiente, se extrajo el ARN con un volumen de fenol:cloroformo:ácido isoamílico (25:24:1) pH 5, libre de ARNasa (Ambion) y finalmente se agregó a la fase acuosa 2 volúmenes de etanol 100% y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.2. Se incubó 30 minutos a –70°C y luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet de ARN obtenido fue lavado con etanol 70%, secado a 65°C y resuspendido en 20 µl de TE con 2 U de RNAsin.

4.6.2. RT-PCR

La transcripción de los transgenes fue analizada por amplificación específica de los genes VP1 y NPT II. Para ello, se realizó una reacción de reverso-transcripción (RT) seguida por una reacción de PCR. La RT se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo 2 µg *random priming hexamers* (Promega), 0.125 mM de cada dNTP, 1 U de RNAsin y 10 unidades de enzima MMLV-RT (Promega), 5 mM ditiotritol (DTT), 5µl de ARN tratado con ADNasa en buffer RT (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1 M EDTA, 1 mM DTT, 0.01 % Nonidet P-40, 50% glicerol). La mezcla fue incubada por 45 minutos a 37°C y luego inactivada por 10 minutos a 95°C. Las reacciones de PCR fueron realizadas en 50 µl conteniendo 50 µM de cada dNTP; 100 ng de cada primer y la concentración de $MgCl_2$ óptima para cada reacción.

Se detectaron los genes VP1 y NPT II en las mismas condiciones descriptas para la detección de los genes recombinantes en el genoma vegetal.

4.6.2.1. Southern blot

Los productos de amplificación de la RT-PCR fueron corridos en gel de agarosa 1.5%; se realizó luego una transferencia alcalina por capilaridad a una membrana de nylon Zeta-Probe GT (Bio-rad) en una solución de NaOH 0.4 N, durante toda la noche. Luego de la transferencia, la membrana fue lavada en SSC 2X (17.53 g/l NaCl, 8.82 g/l citrato de sodio, pH 7), fijada a 80°C por 30 minutos y bloqueada por 90 minutos con solución de hibridación (1 mM EDTA, 0.5 M Na_2HPO_4 pH 7.2, 7% SDS) en un horno de

tubos rotantes a 65°C.

Como sonda se utilizó 50 ng de un fragmento de 639 pb correspondiente al gen de VP1. Este ADN fue desnaturalizado durante 5 minutos a 100°C y luego marcado con α-^{32}P dCTP (Dupont) utilizando el kit prime-a-gene Labeling System (Promega). Para ello, se realizó una reacción en un volumen final de 50 µl conteniendo 5 U de fragmento Klenow de ADN polimerasa, 20 µM de dATP, dTTP y dGTP, 10µg/ml de BSA, 20 µCi de α-^{32}P CTP y 5 µl de buffer (250 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM $MgCl_2$, 10mM DTT) durante 90 minutos a 25°C.

La membrana fue hibridada a 65° C durante toda la noche en solución de hibridación en presencia de la sonda marcada. La membrana fue lavada tres veces, a 65°C durante una hora, con una solución de 1 mM EDTA, 40 mM Na_2HPO_4 pH 7.2, 5% SDS y tres veces, a 65°C durante 30 minutos, con una solución de 1 mM EDTA, 40 mM Na_2HPO_4, 1% SDS. La membrana se secó a temperatura ambiente y fue expuesta en un film autorradiográfico (BioMax X-Ray film, KODAK) a -70° C.

4.6.3. Northern blot

Se desnaturalizaron, incubando durante 10 minutos a 65°C, 20 µg de ARN libre de ADN (obtenidos según lo descripto en 4.6.1.) con 16 % formaldehído y 50% formamida y se fraccionaron en gel de agarosa al 1% con buffer HEPES/EDTA (4.76 g/l HEPES, 0.372 g/l EDTA, pH 7.8). El gel fue transferido por capilaridad una membrana de nylon Zeta-Probe GT (Bio-rad) durante toda la noche, la cual fue luego fijada a 80°C por 30 minutos. Como sonda se utilizaron 50 ng de un fragmento de 639 pb correspondiente al gen de VP1, los cuales fueron marcados con α-^{32}P dCTP (Dupont) utilizando el kit prime-a-gene Labeling System (Promega). La hibridización, exposición y revelado se realizó tal como se describe en el ensayo de Southern blot. El film radiográfico fue expuesto durante 15 días.

4.7. Análisis de la actividad β-GUS en las plantas transgénicas

4.7.1. Ensayo histoquímico

Este ensayo se realizó para detectar la actividad β-GUS en distintos tejidos vegetales según lo descripto por Mendel y col. (1989). Los explantes a evaluar fueron raíz, pecíolo y hoja (todos previamente esterilizados superficialmente con lavandina al 2%) y callos. Los mismos se ubicaron en placas de 6 pocillos conteniendo buffer de reacción (0.1M PO_4 Na/K, 10 mM Na-EDTA, 5 mM K-ferricyanida, 5 mM K-ferrocyanida, 0.1% Tritón X-100, 1 mg/ml ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucurónico). Se incubó la reacción durante una noche a 37° C en oscuridad. La presencia de actividad enzimática se visualizó por la aparición de una coloración azul en los tejidos, generada por el producto insoluble que se obtiene en la reacción.

4.7.2. Cuantificación de la actividad β GUS

La actividad enzimática de β-Glucuronidasa fue cuantificada mediante un ensayo fluorimétrico siguiendo el protocolo descripto por Gallgher y col. (1992) con algunas modificaciones. Para ello, se maceraron 100 mg de hoja fresca en presencia de N_2 líquido y se resuspendió el macerado en buffer de extracción GUS (50 mM $NaHPO_4$ pH 7, 10 mM β-ME, 10 mM Na_2EDTA, 0.1% N-lauril sarcosina, 0.1% Triton X-100). Luego de centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se cuantificó la cantidad de proteína total utilizazando el kit DC Protein assay (Bio-rad). Se resuspendieron 5 μg de proteína soluble en 400 μl de buffer de extracción GUS conteniendo 4-metil-umbiliferil-β-D-glucurónido (MUG) (SIGMA) y se incubaron a 37° C. La reacción fue frenada a distintos tiempos (0, 5, 15, 30 y 60 minutos) con 0.9 ml de Na_2CO_3 0.1 M y leída en un fluorómetro (λexc: 365 nm y λemm: 460 nm). En cada ensayo se construyó una curva estándard de concentración (25, 50, 100 y 200 nM) de 4-metil-umbiliferona (MU) (SIGMA) en buffer Na_2CO_3 0.1 M. Los resultados se expresan como ng de MU producido/min/mg de proteína total. Cada muestra fue evaluada en tres ensayos independientes.

4.8. Western blot para detectar la expresión de p135-160

Los extractos de planta fueron preparados macerando 20 mg de hoja fresca en presencia de N_2 líquido; el macerado resultante se resuspendió en 200 µl de buffer carga (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM PMSF, 8 M Urea, 1% SDS, 2mM DTT, 2% β-ME), se hirvió 5 minutos y se fraccionó en SDS-PAGE 12.5% a voltaje constante (110 V). Se realizó luego una transferencia semihúmeda a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Immobilon P [Millipore]), a voltaje constante (20 V durante 60 minutos), en solución de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris base, 0.03% SDS, 20% metanol). La membrana fue bloqueada durante 2 horas a 37°C, en agitación, en solución de PBS-T (40 g/l NaCL, 1 g/l KH_2PO_4, 14.5 g/l $Na_2HPO_4.12\ H_2O$, 1 g/l KCl, 0.05 % Tween20) con leche descremada al 3% (todos los pasos siguientes se realizaron usando el mismo buffer). Luego se incubó la membrana con una dilución 1/100 de un suero anti-p135-160 producido en ratón, durante toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente, se lavó la membrana con PBS-T y se la incubó con una dilución 1/1500 de un anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (KPL) durante 1 hora a 37°C en agitación. Luego de tres lavados con PBS-T y un lavado con PBS, se incorporó el sustrato de la reacción, 50 % luminol y 50% agente oxidante (NEN), y se reveló por Enhaced Chemiluminescence (ECL) según las recomendaciones del fabricante.

Para cuantificar la expresión del antígeno de interés se realizó un western blot en el cual se corrieron distintas diluciones conocidas de VFA purificado junto con el extracto de hoja. La concentración de la proteína recombinante se estimó comparando la intensidad de banda de las distintas concentraciones de VFA con la obtenida en el extracto de la planta transgénica. Para estandarizar las condiciones de trabajo, todas las muestras de VFA fueron diluidas en una cantidad equivalente de extracto obtenido de una planta no transformada.

4.9. Microscopía electrónica

Se procesaron hojas de una planta transformada con la construcción pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C y hojas de una planta transformada con un gen no relacionado. El material

fue fijado en glutaraldehído al 2%, post-fijado en tetróxido de osmio al 2 %, deshidratado y cortado con ultramicrótomo y tinción Uranilo/Reynold's. Las muestras se observaron en Jeol 1200 EX II cpm, magnificaciones entre 10.000 y 100.000 aumentos electrónicos.

4.10. Formulación de las vacunas

Se utilizaron 10 mg de hoja fresca por animal. Se maceraron las hojas en N_2 líquido y se resuspendió el macerado en buffer PBS. La preparación de antígeno fue sonicada por 20 segundos a 40% en un SONICATOR XL (Hert systems). La vacuna fue formulada en adyuvante incompleto de Freund con 1% de Tween 40.

4.11. Inmunización de ratones

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, adultos (60-90 días de edad) criados en el Bioterio del CICVyA, INTA-Castelar. Para las inmunizaciones con las plantas transformadas con las construcciones P1.2A y P1.2A-2B-3C los animales fueron inmunizados intraperitonealmente (ip) a los 0, 15, 30, 45, 60 y 75 días. Cada animal recibió 10 mg de extracto foliar en un volumen de 250 µl de vacuna/dosis. Se inocularon grupos de 5 ratones/ planta transgénica. Además, se inmunizaron 13 ratones, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días, con la planta A (transformada con la construcción pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C). Como control se utilizó un grupo de ratones inmunizado con una vacuna elaborada a base de una planta transformada con un gen no relacionado. Se realizaron sangrías exploratorias a los 40, 70 y 85 días post-primoinmunización.

Para las inmunizaciones con las plantas transformadas con la construcción p135-160-β GUS, se inocularon 10 ratones ip a los 0, 15 y 30 días. Cada animal recibió 10 mg de extracto foliar conteniendo 5-10 µg de péptido p135-160, en un volumen de 250 µl de vacuna por dosis. Como controles se inmunizaron ratones con plantas transformadas con un gen no relacionado y con plantas transformadas con pBI121. Se realizaron sangrías exploratorias a los 25 y 40 días post-primovacunación. Todas las sangrías exploratorias se realizaron anestesiando los ratones adultos con éter y tomando la muestra de sangre por el seno retroorbital. La sangre fue recogida en tubos heparinizados que fueron centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. El plasma sobrenadante se conservó a -

20°C hasta su utilización. Los plasmas obtenidos se utilizaron para evaluar la presencia de anticuerpos específicos.

4.12. Detección de anticuerpos específicos en los animales inmunizados con las plantas transgénicas

4.12.1. ELISA para la detección de anticuerpos anti-p135-160

Se evaluó la presencia de anticuerpos específicos para un péptido sintético (p135-160) el cual comprende los residuos aminoacídicos 135-160 de la proteína VP1 del VFA (Zamorano y col., 1995).

Se sensibilizaron placas MaxiSorp (Nunc) con 15 μg/ml de p135-160 en buffer carbonato-bicarbonato pH 9.6 (1.59 g/l Na_2CO_3, 2.93 g/l $NaHCO_3$), a 4°C durante 16 horas. Luego las placas se lavaron 3 veces con PBS-T, pH 7.4 (todos los lavados siguientes se realizaron en el mismo buffer). Posteriomente se bloquearon en buffer PBS-T, 4% suero normal equino (buffer de bloqueo), durante 2 horas, en agitación, a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces para luego incorporar diluciones al medio de los sueros a testear, realizadas en buffer de bloqueo, e incubarlas 2 horas a 37°C en agitación. Después de lavar las placas 3 veces, se incubaron durante 1 hora, en agitación, a 37°C, con una dilución 1/1500 de un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (KPL). Finalmente se realizaron 5 lavados y se revelaron con el sustrato orthophenilene diamina dihydrochloride (OPD) en buffer citrato-fosfato, pH 5.2 (4.67 g/l ácido cítrico, y 3% H_2O_2. La reacción fue frenada por el agregado de H_2SO_4 2.5 N y leída a 490 nm. Los títulos de anticuerpos se expresaron como el logaritmo decimal de la inversa de la mayor dilución que tuvo una DO superior a la media + 3 DS de la DO de los sueros de animales inmunizados con plantas transformadas con un gen no relacionado.

4.12.2. ELISA para la detección de anticuerpos contra partículas virales completas

Se realizó un test de ELISA sandwich indirecto para la detección de anticuerpos anti-VFA. Se sensibilizaron placas Inmulon II (Dynatech Laboratories) con una dilución

1/300 de un suero de captura anti-VFA O1C hecho en conejo en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de una incubación de 16 horas a 4°C se lavaron las placas 3 veces con PBS-T pH 7.4 (todos los lavados se realizaron con el mismo buffer). Posteriomente se bloquearon en buffer PBS-T, 4% suero normal equino (buffer de bloqueo), durante 2 horas, en agitación, a 37°C. Para la detección de anticuerpos anti VFA las placas se incubaron por 1 hora, en agitación a 37°C, con una dilución 1/6 de un stock de VFA clarificado, en buffer de bloqueo. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces y se incubaron 2 horas a 37°C en agitación, con diluciones al medio, en buffer de bloqueo, de los sueros a testear. Luego se lavaron 3 veces y se incubaron por 1 hora a 37°C en agitación con una dilución 1/1500 de un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (KPL). Finalmente, las placas se lavaron 5 veces y se revelaron con el sustrato OPD en buffer citrato-fosfato, pH 5 y 3% H_2O_2. La reacción se frenó con el agregado de H_2SO_4 2,5 N y se leyeron las placas a 490 nm. Los títulos de anticuerpos se expresaron como el logaritmo decimal de la inversa de la mayor dilución que tuvo una DO superior a la media + 3 DS de la DO de los sueros de animales inmunizados con plantas transformadas con un gen no relacionado.

4.12.3. Western blot para la detección de anticuerpos específicos para las proteínas esturcturales del VFA

Se utilizó como antígeno 40 μg de VFA inactivado y purificado, el cual fue resuspendido en buffer de carga y hervido durante 10 minuntos. Se corrió un gel preparativo SDS-PAGE 12.5 % y se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon P [Millipore]). La membrana fue bloqueada durante toda la noche, a 4°C en agitación, con PBS-T leche descremada al 3% (todos los pasos siguientes se realizaron usando el mismo buffer). Luego se incubó la membrana con los sueros a evaluar (diluídos 1/20) por 2 horas a 37° C, en agitación. Como controles se utilizaron los siguientes anticuerpos detectores: anti-p135-160 para el reconocimiento de VP1; anti-VP2 y anti-VP3. Estos dos últimos sueros fueron producidos por inmunización de ratones con péptidos que representan epitopes lineales B y T, ubicados en las distintas proteínas estructurales (Tabla 2) (Perez Filgueira y col., 2000). Posteriormente, se lavó la membrana con PBS-T y

se la incubó con un anticuerpo monoclonal anti-especie conjugado con peroxidasa (KPL) durante 1 hora a 37° C, en agitación. Luego de tres lavados, se incorporó el sustrato de la reacción, 50 % luminol y 50% agente oxidante (NEN), y se reveló por ECL según las recomendaciones del fabricante.

Tabla 2:

péptido	VP y posición aminoacídica
2.4	VP2, 49-68
2.8	VP2, 113-132
2.9	VP2, 129-148
2.11	VP2, 163-182
2.12	VP2, 179-198
2.13	VP2, 195-214
3.6	VP3, 81-100
3.9	VP3, 129-148
3.11	VP3, 158-177
3.12	VP3, 174-193
3.13	VP3, 190-209

4.12.4. Seroneutralización en ratón lactante

El título de anticuerpos neutralizantes se determinó mediante el método de suero fijo-virus variable (Cunha y col., 1957). Se realizaron diluciones en base 10 de un stock de virus O1C de título conocido. Las diluciones de virus se mezclaron en partes iguales con plasma inactivado (por incubación durante 30 minutos a 56°C) y diluído 1/5. La mezcla se incubó por 60 minutos a 37°C y luego por 30 minutos a 4°C. Se inocularon ratones lactantes por la vía intramuscular (im) con 0.05 ml de esta mezcla. El Indice Serneutralizante (ISN), leído a las 72 horas post-inoculación, se determinó por la siguiente fórmula:

ISN = log título virus – log tílulo (plasma + virus)

Se utilizaron como controles plasmas negativo y positivo.

4.13. Ensayo de protección

Los ratones inmunizados fueron descargados con 10^4 DIRL 50% de VFA cepa O1C por la vía ip (Fernández y col., 1986). Se desafiaron con la misma dosis viral ratones no vacunados (control negativo) y se inocularon con placebo ratones vacunados (control positivo). Veinticuatro horas después fueron sangrados todos los ratones; la sangre se diluyó 1/5 en PBS pH 7.2 y se inocularon 0.05 ml de la misma por la vía im en ratones lactantes para determinar la presencia del virus. Como indicador de protección se utilizó la presencia ó ausencia de viremia determinada por la muerte ó supervivencia de los ratones lactantes luego de 7 días de observación.

5. RESULTADOS

CAPITULO I: Expresión de la poliproteína del VFA en plantas de alfalfa transgénicas

5.1. Clonado de P1.2A y P1.2A–2B-3C en los plásmidos de expresión en plantas

Con el objetivo de obtener cápsides vacías del VFA, se utilizaron dos construcciones: una de ellas, denominada P1.2A, contiene únicamente la poliproteína precursora de las proteínas estructurales y la proteasa autocatalítica 2A. La segunda construcción (P1.2A–2B-3C) involucra además de P1.2A a un fragmento de 2B (que funciona como conector), 3B y a la proteasa 3C (junto a unos pocos aminoácidos de 3D). Está reportado que la expresión de P1.2A junto a 3C, en distintos sistemas de expresión, ha permitido obtener cápsides vacías conformacionalmente correctas (Graham y col., 1990; Lewis y col., 1991; Grubman y col., 1993; Abrams y col., 1995). Además, se ha visto que la eficiencia del clivaje de P1.2A es mucho mayor cuando 3C es acompañada por un fragmento de 3D que cuando se encuentra sola (Ryan y col.,1989).

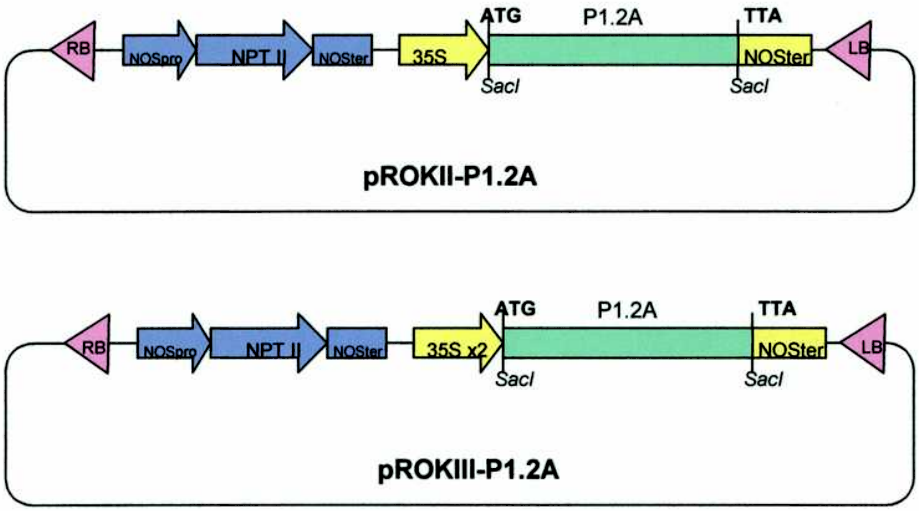
El procesamiento de la poliproteína en ausencia de 3C podría deberse a la acción de proteasas celulares o bien dicho precursor podría plegarse de forma tal de conservar los epitopes conformacionales presentes en el virión, tal como ocurre en otros sistemas de expresión (Roosien y col., 1990; Lewis y col., 1991; Saiz y col., 1994). En el caso de la construcción que incluye la proteasa 3C, esta enzima sería la encargada de realizar los clivajes para generar las proteínas estructurales, las cuales se autoensamblarían para formar cápsides vacías.

5.1.1.- Obtención de pROK II- P1.2A y pROK III- P1.2A

A partir de ADNc del VFA cepa O1Campos (O1C), disponible en nuestro laboratorio, se amplificó por PCR un fragmento de 2.256 pb correspondiente a la secuencia de P1.2A. Dicho fragmento contiene un sitio de iniciación (ATG) y un sitio de finalización (TTA) de la traducción; además presenta en ambos extremos el sitio de restricción *Sac I*. El producto de amplificación obtenido fue clonado en el plásmido

pGEM-T Easy y luego subclonado en las vectores binarios pROK II y pROK III (Figura 8).

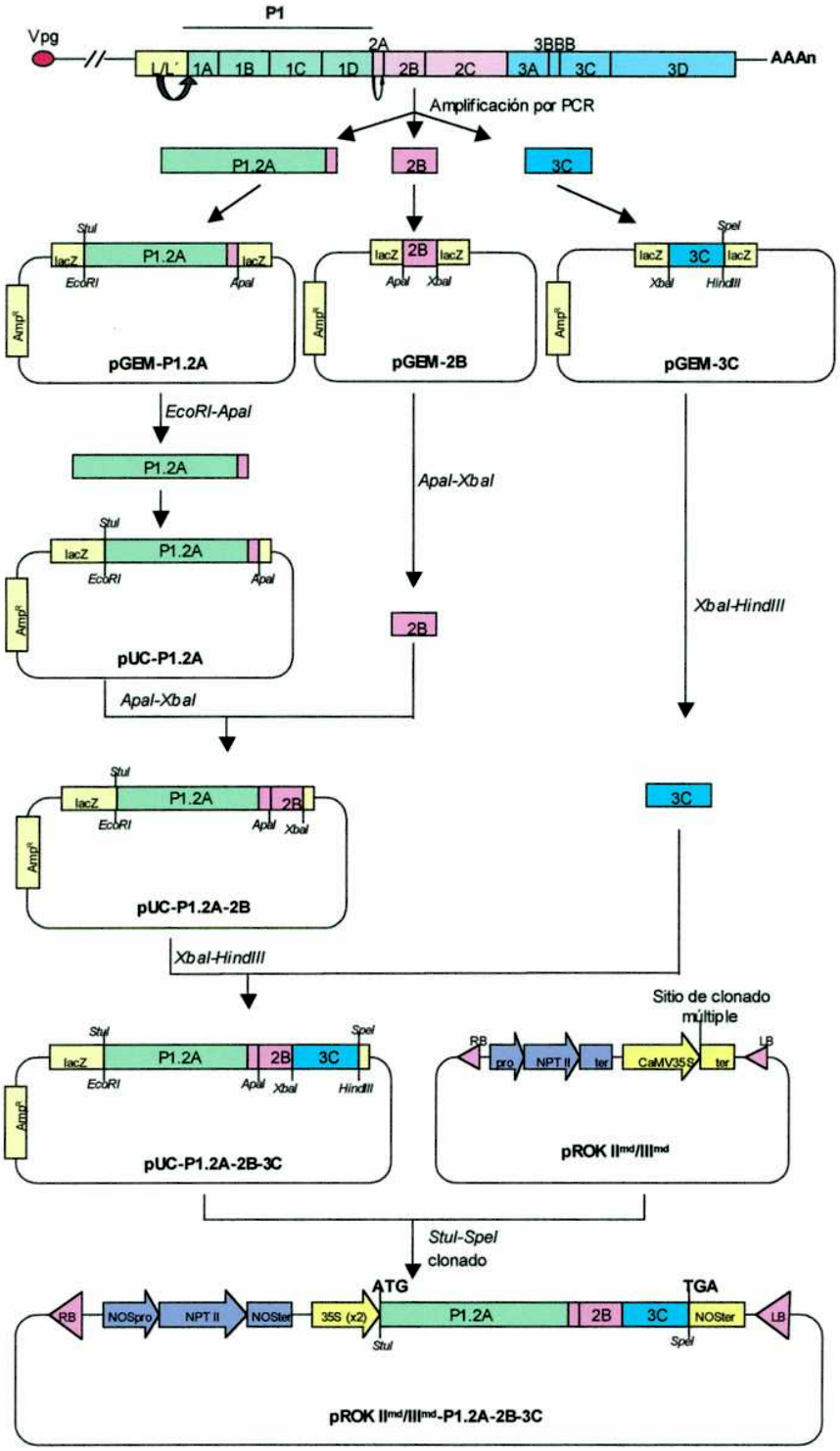
Figura 8: Esquema de los plásmidos de recombinación pROK II-P1.2A y pROK IIIP1.2A



5.1.2. Obtención de pROK II^{md}- P1.2A-2B-3C y pROK III^{md}- P1.2A-2B-3C

Los vectores de expresión pROK II y pROK III contienen en su sitio de clonaje múltiple cuatro sitios únicos de clonaje: *Bam H I*, *Sma I*, *Kpn I* y *Sac I*. Todos ellos están presentes en P1.2A, 2B ó 3C, lo cual imposibilitaba el clonaje de los genes en este plásmido. Para subsanar esta dificultad, se amplió el sitio de clonaje múltiple de estos plásmidos incorporando cuatro sitios únicos de restricción nuevos: *Stu I*, *Spe I*, *Sca I* y *Xho I*. Esta elección se hizo teniendo en cuenta los sitios ausentes tanto en pROK II y pROK III como en los genes a clonar. Se obtuvieron así los vectores binarios pROK II^{md} y pROK III^{md}.

Figura 9: Esquema del clonado de P1.2A-2B-3C en los plásmidos de recombinación en plantas.



Los genes a clonar se amplificaron por PCR a partir de ADNc del VFA O1C. El fragmento correspondiente a la secuencia de P1.2A contiene, en su extremo 5′, el sitio de iniciación de la traducción (ATG) y sitios de restricción compatibles para clonar tanto en pUC 19 como en pROK II^{md}/III^{md} (*Eco RI* y *Stu I* respectivamente). El amplificado correspondiente a la secuencia de 3C contiene, en su extremo 3′, el sitio de terminación de la traducción (TAG) y sitios de restricción que permitían clonar dicho fragmento en los plásmidos pUC 19 y pROK II^{md}/III^{md} (*Hind III* y *Spe I* respectivamente). El esquema de trabajo se muestra en la figura 9.

Los fragmentos amplificados se clonaron independientemente en pGEM-T Easy y desde allí fueron clonados secuencialmente en pUC 19 donde quedó armada la construcción completa.

El cassette conteniendo las secuencias codificantes de P1.2A, 2B y 3C fue finalmente clonado en los vectores de expresión en plantas obteniendo, así, los plásmidos pROK II^{md}- P1.2A-2B-3C y pROK III^{md}- P1.2A-2B-3C.

5.1.3. Secuenciación de las construcciones

Se secuenciaron completamente las construcciones P1.2A y P1.2A-2B-3C. Además, se verificaron los sitios de iniciación y terminación de la traducción de las construcciones en los plásmidos de recombinación en plantas a fin de confirmar la conservación del marco de lectura.

La ubicación y orientación de los primers empleados para secuenciar las construcciones se muestra en la figura 10.

Al secuenciar la construcción P1.2A-2B-3C se observó una doble inserción (TC) en el sitio de unión de 2B y 3C (proteínas no estructurales); esta mutación estaba adyacente al sitio de clonado *Xba I*. Para reparar esta inserción, se digirió el plásmido con la enzima de restricción *Xba I* y se rellenaron los extremos cohesivos resultantes utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. La extensión con el fragmento Klenow eliminó el sitio *Xba I* e incorporó cuatro nucleótidos nuevos recuperándose de este modo el marco de lectura de los genes siguientes (Figura 10). Como consecuencia, se incorporaron dos aminoácidos nuevos (leucina y alanina) en el sitio de unión de 2B y 3C.

Las secuencias completas de las construcciones P1.2A-2B-3C y P1.2A se compararon con las secuencias consenso de VFA O1C y O1K y con la de un aislado de O1C. Para la construcción que incluye unicamente el gen de P1, se observaron

cinco cambios propios de esta secuencia de los 2280 nucleótidos secuenciados (remarcados en rojo); tres de ellos generan cambio de aminoácido. En cambio, para la construcción que incluye los genes de P1.2A, 2B y 3C, se encontraron tres mutaciones puntuales (remarcadas en verde) en la secuencia nucleotídica propias de esta construcción (de 3400 bases secuenciadas), generando solo una de ellas cambio de aminoácido (Tabla 2). Estos tres últimos cambios también se encuentran en la secuencia de P1 y probablemente también estuviesen en el aislado de campo a partir del cual se obtuvo el ADNc. Las restantes mutaciones presentes únicamente en P1 pueden deberse a errores introducidos en la amplificación del gen. Es importante notar que los cambios de aminoácido detectados no involucran ningún epitope B ó T descripto. Se confirmó, mediante alineación de secuencias, que las secuencias de las construcciones utilizadas corresponden a la cepa O1C.

Figura 10: Esquema de la ubicación de los primer de secuenciación y corrección del marco de lectura

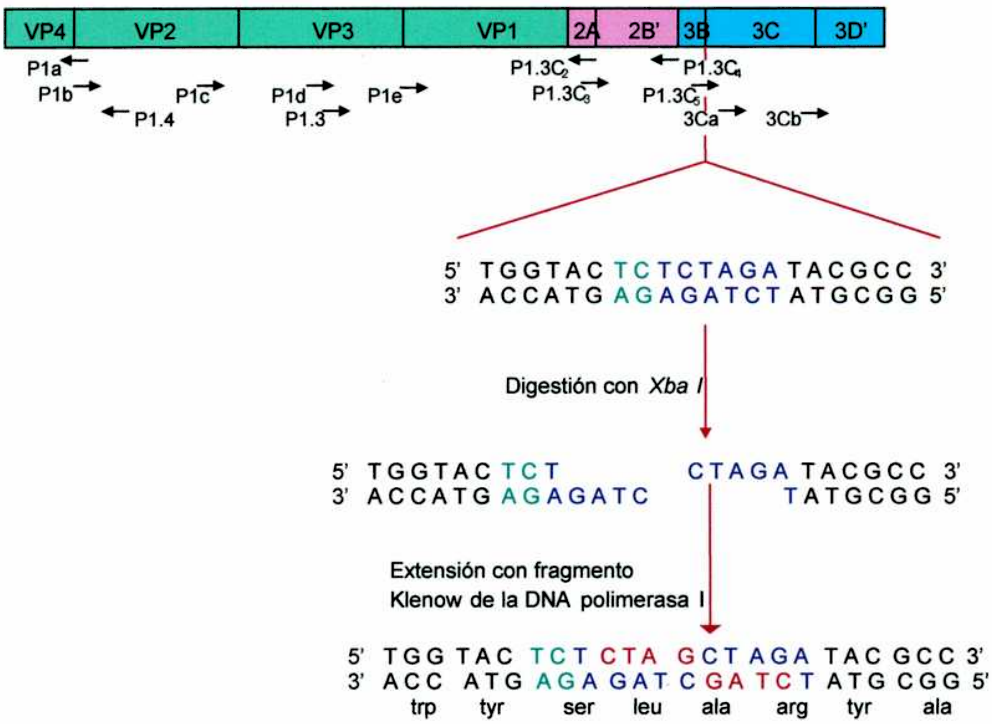


Tabla 2: Comparación de las diferencias encontradas en la secuencia de las construcciones utilizadas

mutación					posición en la poliproteína	proteína
P1[a]	P1.2A-2B-3C[a]	P1-O1C/Bra/58	O1C[c]	O1K[d]		
GCG (ala)	GCG (ala)	GCG (ala)	ACG (thr)	GCG (ala)	22	
TCT (ser)	TCT (ser)	TCT (ser)	TCA (ser)	TCG (ser)	33	VP4 (1-255)
GCA (ala)	GCA (ala)	GCA (ala)	GCA (ala)	GCC (ala)	216	
GAG (glu)	GAG (glu)	GAG (glu)	GAG (glu)	GAA (glu)	375	
TCT (ser)	TCT (ser)	TCT (ser)	TCT (ser)	TCC (ser)	402	
GAG (glu)	GAG (glu)	GAG (glu)	GAG (glu)	GAA (glu)	411	
ACC (thr)	ACC (thr)	ACT (thr)	ACC (thr)	ACT (thr)	540	VP2 (1-654)
AGC (ser)	AAC (asn)	AAC (asn)	AAC (asn)	AAC (asn)	596	
CTG (leu)	CTG (leu)	CTG (leu)	CTG (leu)	CTT (leu)	618	
TGT (cys)	TGT (cys)	TGT (cys)	TGT (cys)	TAT (tyr)	644	
GGC (gly)	GGT (gly)	GGT (gly)	GGT (gly)	GGT (gly)	955	
CGC (arg)	CGC (arg)	CGC (arg)	CGA (gln)	CGC (arg)	1076	
TTA (leu)	TTC (phe)	TTC (phe)	TTC (phe)	TTC (phe)	1080	
ACA (thr)	ACA (thr)	ACA (thr)	ACA (thr)	ACG (thr)	1113	
GAT (asp)	GAT (asp)	GAT (asp)	GAT (asp)	GAC (asp)	1143	
CAC (his)	CAC (his)	CAC (his)	CAC (his)	CAA (gln)	1164	
GCA (ala)	ACA (thr)	ACA (thr)	ACA (thr)	ACA (thr)	1204	VP3 (1-660)
CCG (pro)	CCG (pro)	CCG (pro)	CTG (leu)	CTG (leu)	1229	
GAC (asp)	GAC (asp)	GAC (asp)	GAG (glu)	GAC (asp)	1257	
GCG (ala)	GCG (ala)	GCG (ala)	CCG (pro)	GCG (ala)	1258	
TTG (leu)	TTG (leu)	TTG (leu)	TTG (leu)	TTA (leu)	1362	
TAT (tyr)	TAT (tyr)	TAT (tyr)	TAC (tyr)	TAC (tyr)	1416	
AGA (arg)	AGG (arg)	AGG (arg)	AGG (arg)	AGG (arg)	1545	
GCC (ala)	GCC (ala)	ACC (thr)	GCC (ala)	ACC (thr)	1606	
AAA (lys)	AAA (lys)	AAA (lys)	AAA (lys)	AAG (lys)	1692	
CGT (arg)	CGT (arg)	CGC (arg)	CGC (arg)	CGC (arg)	1770	
GCT (ala)	GCT (ala)	GGC (gly)	GCG (ala)	GCG (ala)	1860	VP1 (1-639)
ATG (met)	ATG (met)	TTG (leu)	TTG (leu)	TTG (leu)	1861	
ACC (thr)	ACC (thr)	ACC (thr)	ACC (thr)	ACT (thr)	1929	
AGC (ser)	AGC (ser)	AGC (ser)	AGC (ser)	AAC (asn)	1979	
GTA (val)	GTA (val)	GTA (val)	GCA (ala)	GCA (ala)	2036	

mutación			posición en
P1.2A-2B-3C[a]	P1-O1C/Bra/58	O1K[d]	2B' (1-182)
TTC (phe)	TTC (phe)	TTT (phe)	9
GAA (glu)	GAA (glu)	GAG (glu)	126
GAG (glu)	GAG (glu)	GAA (glu)	168

mutación			posición en
P1.2A-2B-3C[a]	P1-O1C/Bra/58	O1K[d]	3B2 (1-69)
GGT (gly)	GGC (gly)	GGT (gly)	15
CAG (gln)	CAG (gln)	CAA (gln)	30

mutación			posición en
P1.2A-2B-3C[a]	P1-O1C/Bra/58	O1K[d]	3B3 (1-75)
AAA (lys)	AAG (lys)	AAA (lys)	45

mutación			posición en
P1.2A-2B-3C[a]	P1-O1C/Bra/58	O1K[d]	3C (1-639)
TCG (ser)	TCG (ser)	TTG (leu)	69
ACA (thr)	ACA (thr)	ACG (thr)	81
CAC (his)	CAC (his)	CAT (his)	128
GTT (val)	GTT (val)	GGT (gly)	149
CGC (arg)	CGC (arg)	CGT (arg)	265
ATC (ile)	ATC (ile)	ATT (ile)	307
AAC (asn)	AAC (asn)	AAT (asn)	310
GGC (gly)	GGC (gly)	GGT (gly)	413

a: secuencia de las construcciones utilizadas en este trabajo; b: secuencia según Pereda y col.; C: secuencia según Jensen y Moore (1993); d: secuencia según Forss y col. (1984).

5.2. Obtención de plantas de alfalfa transgénicas

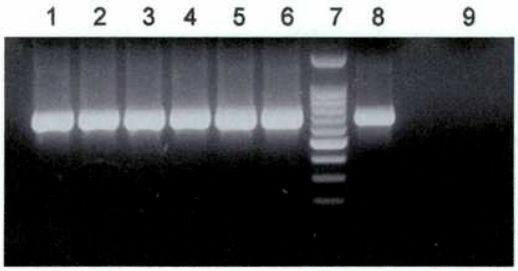
5.2.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Las bacterias fueron transformadas por electroporación con las siguientes construcciones:

- pROK II-P1.2A,
- pROK III-P1.2A,
- pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C y
- pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C.

Para confirmar la presencia de los genes deseados en las bacterias transformadas, se amplificó por PCR un fragmento de 639 pb correspondiente al gen de VP1 (Figura 11).

Figura 11: Detección del gen recombinante en *A. tumefaciens*



A partir de ADN total de *A. tumefaciens*, se realizó una PCR para amplificar un fragmento correspondiente al gen de VP1. Descripción de las líneas: PCR sobre ADN de *A. tumefaciens* transformada con (1): pROK II-P1.2A, (2): pROK III-P1.2A, (3, 4): pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C, (5, 6): pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C, (7): marcador de peso molecular, (8): PCR usando como templado el plásmido pUC-P1.2A-2B-3C, (9): control sin templado.

5.2.2. Transformación de alfalfa

La obtención de una planta transgénica requiere dos etapas imprescindibles. La primera consiste en introducir establemente un gen quimérico en las células

vegetales; la segunda fase es la generación de la planta a partir de las células transformadas.

La introducción de los genes quiméricos se realizó mediante cocultivos del explante a transformar con *A. tumefaciens*. Se realizaron veinte eventos transformacionales independientes utilizando dos tipos de explantes: embriones y pecíolos. La regeneración de una planta a partir de una célula que ha adquirido el ADN-T es la fase más crítica del proceso. Para ello se utilizan genes marcadores que favorecen el desarrollo e identificación de la células putativamente transformadas. Así, las plantas se cultivaron en un medio selectivo conteniendo Kanamicina.

Como resultado de los eventos transformacionales mencionados, se obtuvieron:

2 plantas transformadas con pROK II-P1.2A,
9 plantas transformadas con pROK III-P1.2A,
20 plantas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C y
15 plantas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C.

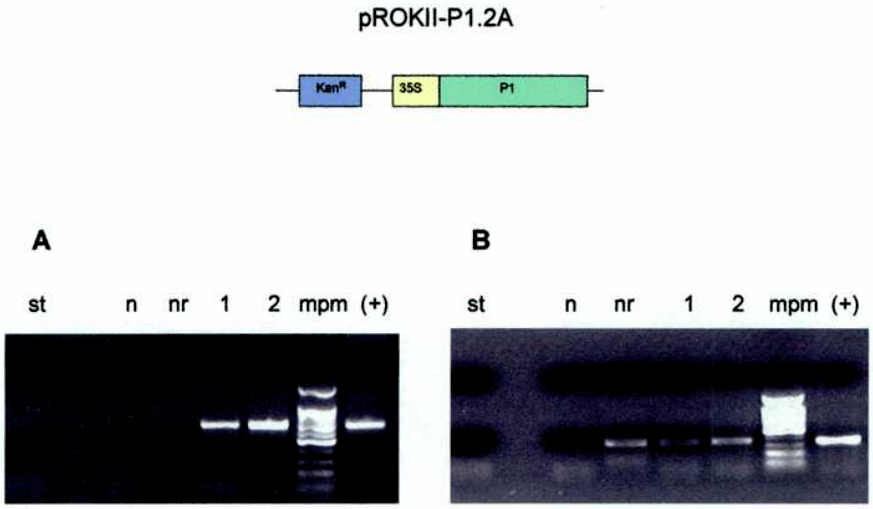
Las plantas transgénicas resistentes a Kanamicina presentaron morfología y crecimiento similar al de las plantas no transgénicas. Sin embargo, la mayoría de las plantas transformadas con pROK II-P1.2A no fueron viables en el invernadero. Si bien los embriones que surgían en la regeneración del explante desdiferenciado eran capaces de desarrollar un vástago y una raíz *in vitro*, estas plántulas no sobrevivían al crecerlas en tierra.

5.2.3. Detección de los genes deseados en plantas de alfalfa transgénicas

Se evaluó la presencia de los genes quiméricos en el genoma vegetal de las plantas transgénicas para las cuatro construcciones utilizadas. Para ello, se amplificó por PCR, a partir del ADN celular, un fragmento de 639 pb correspondiente a la secuencia completa del gen de VP1 (Figuras 13-16). Todas las plantas ensayadas resultaron positivas a la presencia de tal gen, aunque la efectividad de la reacción fue diferente entre las distintas plantas. Esto último se atribuye a que, dado que la inserción del transgen en el genoma vegetal es al azar, el gen a amplificar no está igualmente disponible. Se realizó, además, otra reacción como control que involucra la amplificación de un fragmento de 344 pb correspondiente una secuencia interna del gen de NPT II (Figura 13-16). Todas las plantas evaluadas fueron claramente positivas para la presencia de este gen.

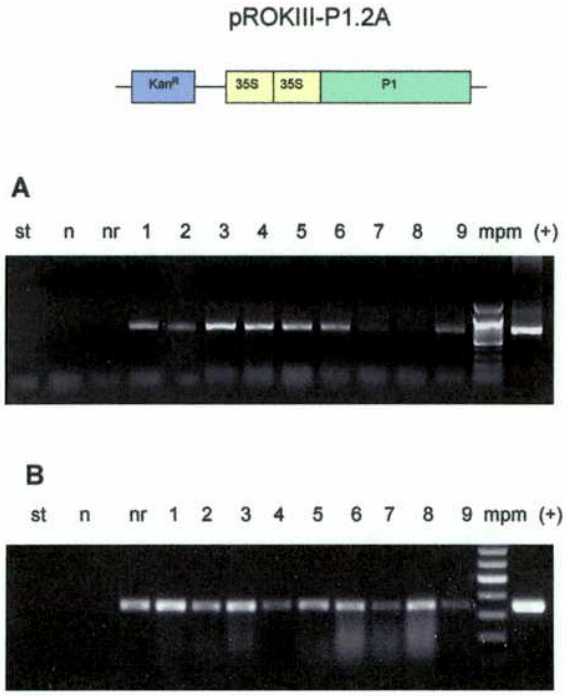
Estos resultados indican que, para los casos evaluados, la transferencia del ADN-T (conteniendo el gen que otorga resistencia a Kanamicina y los genes del VFA) al genoma vegetal utilizando el sistema de *A. tumefaciens* fue altamente eficiente.

Figura 13: Detección de los genes recombinantes en las plantas transformadas con pROK II-P1.2A



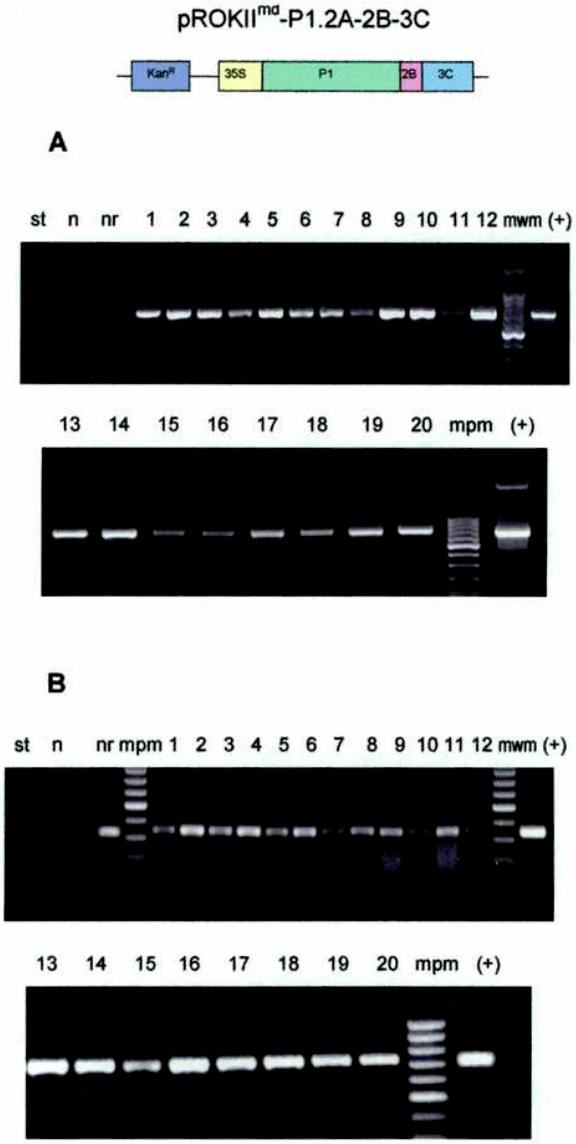
Se aisló ADN a partir de hoja fresca de alfalfa de plantas transformadas con pROK II-P1.2A y plantas control. Se realizó una PCR utilizando primers que específicamente amplifican el gen de VP1 (A) y un fragmento interno del gen NPT II (B). Descripción de las líneas: st: control sin templado; n: DNA de una planta no transformada; nr: DNA de una planta transformada con un gen no relacionado; mpm: marcador de peso molecular; 1,2: plantas transformadas con pROK II-P1.2A; (+): control positivo

<u>Figura 14</u>: Detección de los genes recombinantes en las plantas transformadas con pROK III-P1.2A



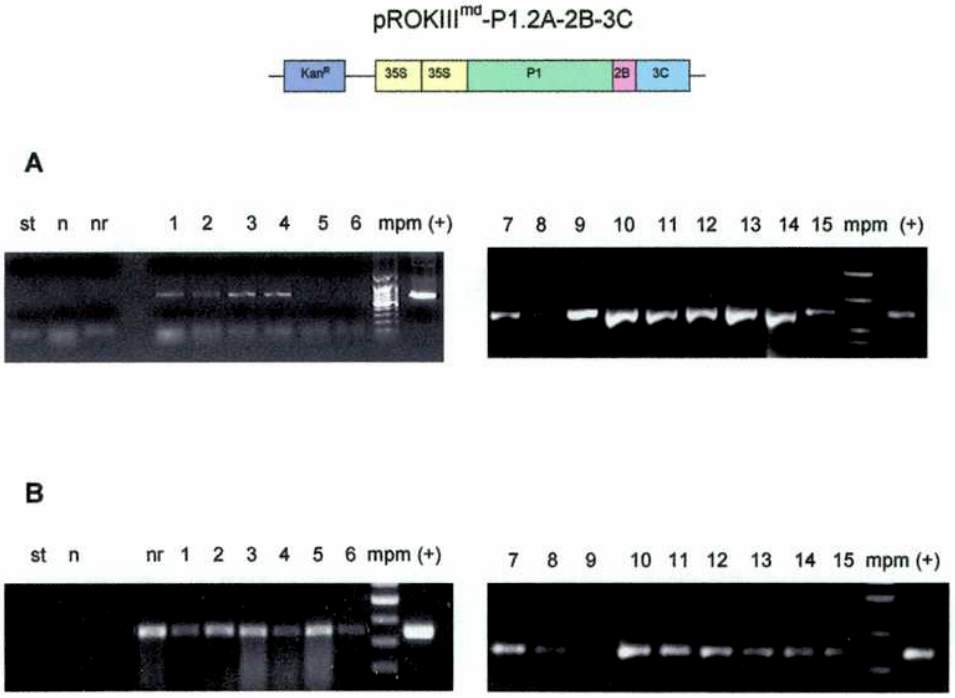
Se aisló ADN a partir de hoja fresca de alfalfa de plantas transformadas con pROK III-P1.2A y plantas control. Se realizó una PCR utilizando primers que específicamente amplifican el gen de VP1 (A) y un fragmento interno del gen NPT II (B). Descripción de las líneas: st: control sin templado; n: DNA de una planta no transformada; nr: DNA de una planta transformada con un gen no relacionado; mwm: marcador de peso molecular; 1-9: plantas transformadas con pROK III-P1.2A; (+): control positivo.

Figura 15: Detección de los genes recombinantes en las plantas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C



Se aisló ADN a partir de hoja fresca de alfalfa de plantas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C y plantas control. Se realizó una PCR utilizando primers que específicamente amplifican el gen de VP1 (A) y un fragmento interno del gen NPT II (B). Descripción de las líneas: st: control sin templado; n: DNA de una planta no transformada; nr: DNA de una planta transformada con un gen no relacionado; mwm: marcador de peso molecular; 1-20: plantas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C; (+): control positivo.

Figura 16: Detección de los genes recombinantes en las plantas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C



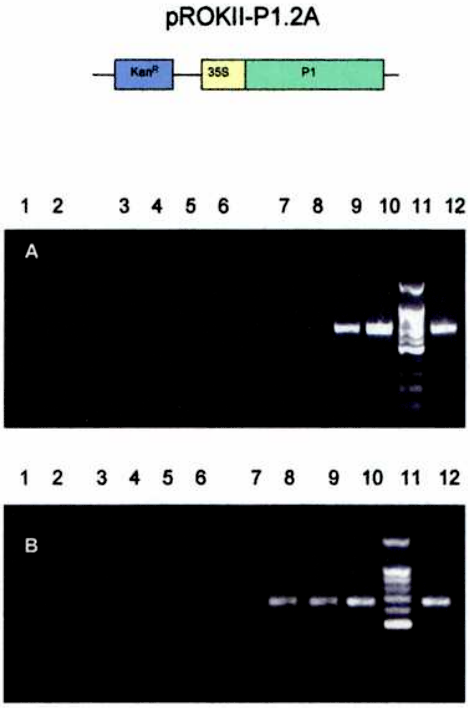
Se aisló ADN a partir de hoja fresca de alfalfa de plantas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C y plantas control. Se realizó una PCR utilizando primers que específicamente amplifican el gen de VP1 (A) y un fragmento interno del gen NPT II (B). Descripción de las líneas: st: control sin templado; n: DNA de una planta no transformada; nr: DNA de una planta transformada con un gen no relacionado; mwm: marcador de peso molecular; 1-15: plantas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C; (+): control positivo.

5.2.4. Detección de la actividad transcripcional en las plantas de alfalfa transformadas

El análisis de la transcripción específica de los genes en las plantas transformadas se realizó mediante un ensayo de RT-PCR a partir de ARN total extraído de hoja. Para detectar la presencia de ARN mensajero (ARNm) del transgen, se amplificó un fragmento de 639 pb correspondiente al gen de VP1. Todas las plantas transformadas con las construcciones pROK II-P1.2A (Figura 17), pROK III-P1.2A (Figura 18), pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C (Figura 19) y pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C (Figura

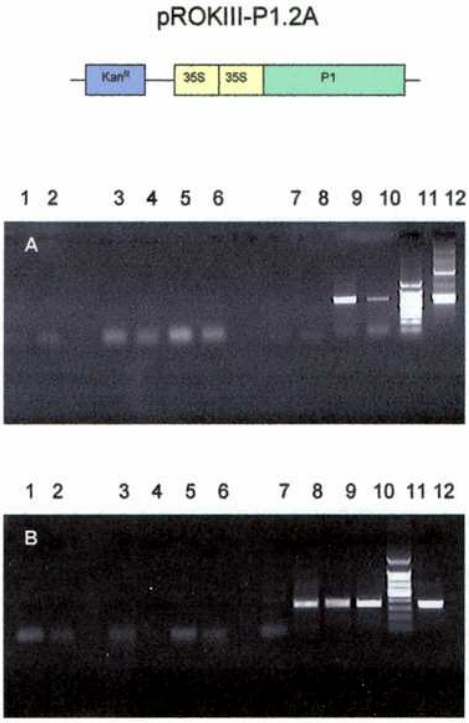
20) presentaron una activa transcripción de los genes recombinantes conteniendo la secuencia de VP1. Como control positivo de la actividad transcripcional se amplificó un fragmento interno del gen NPT II (de 344 pb), observándose actividad en todas las plantas transgénicas evaluadas. En las figuras se muestra el resultado de dos plantas representativas de cada una de las construcciones. Plantas no transformadas no presentaron actividad transcripcional para ninguno de los dos genes evaluados (línea 7, figuras 17-20) mientras que plantas transformadas con un gen no relacionado sólo mostraron transcripción del gen NPT II (línea 8, figuras 17-20). A fin de descartar la posibilidad de que la amplificación observada se deba a contaminación de ADN presente en las muestras, se realizó con las preparaciones de ARN una PCR sin incluir la reacción de RT previa. No se detectó contaminación en ninguno de los ensayos realizados de esta forma (líneas 3-6, figuras 17-20).

<u>Figura 17</u>: Detección de la actividad transcripcional en plantas transformadas con pROK II-P1.2A mediante RT-PCR



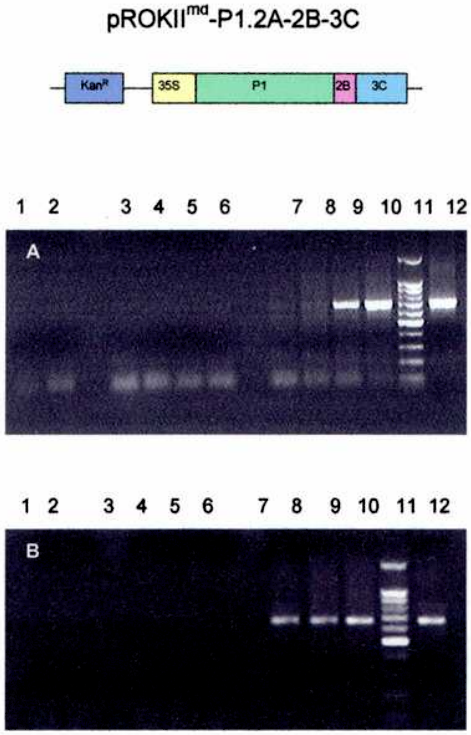
Se aisló ARN a partir de hoja fresca de alfalfa de plantas transformadas con pROK II-P1.2A y plantas control. Se realizó una RT-PCR utilizando un par de primers que amplifica un fragmento de 639 pb correspondiente al gen de VP1 (A) y un par de primers que específicamente amplifica un fragmento interno, de 344 pb, del gen NPT II (B).
Descripción de las líneas: 1: control sin templado de PCR; 2: control sin templado de RT; 3: PCR de RNA de planta normal; 4: PCR de RNA de planta transformada con un gen no relacionado; 5 y 6: PCR de RNA de plantas transformadas con la construcción correspondiente; 7: PCR de ADNc de planta normal; 8: PCR de ADNc de planta transformada con un gen no relacionado; 9 y 10: PCR de ADNc de plantas transformadas con la construcción correspondiente; 11: marcador de peso molecular; 12: control positivo.

<u>Figura 18</u>: Detección de la actividad transcripcional en plantas transformadas con pROK III-P1.2A mediante RT-PCR



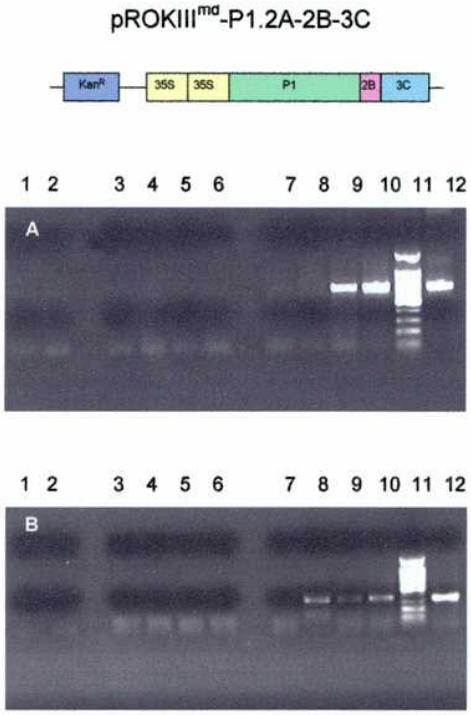
Se aisló ARN a partir de hoja fresca de alfalfa de plantas transformadas con pROK III-P1.2A y plantas control. Se realizó una RT-PCR utilizando un par de primers que amplifica un fragmento de 639 pb correspondiente al gen de VP1 (A) y un par de primers que específicamente amplifica un fragmento interno, de 344 pb, del gen NPT II (B).
Descripción de las líneas: 1: control sin templado de PCR; 2: control sin templado de RT; 3: PCR de RNA de planta normal; 4: PCR de RNA de planta transformada con un gen no relacionado; 5 y 6: PCR de RNA de plantas transformadas con la construcción correspondiente; 7: PCR de ADNc de planta normal; 8: PCR de ADNc de planta transformada con un gen no relacionado; 9 y 10: PCR de ADNc de plantas transformadas con la construcción correspondiente; 11: marcador de peso molecular; 12: control positivo.

Figura 19: Detección de la actividad transcripcional en plantas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C mediante RT-PCR



Se aisló ARN a partir de hoja fresca de alfalfa de plantas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C y plantas control. Se realizó una RT-PCR utilizando un par de primers que amplifica un fragmento de 639 pb correspondiente al gen de VP1 (A) y un par de primers que específicamente amplifica un fragmento interno, de 344 pb, del gen NPT II (B).
Descripción de las líneas: 1: control sin templado de PCR; 2: control sin templado de RT; 3: PCR de RNA de planta normal; 4: PCR de RNA de planta transformada con un gen no relacionado; 5 y 6: PCR de RNA de plantas transformadas con la construcción correspondiente; 7: PCR de ADNc de planta normal; 8: PCR de ADNc de planta transformada con un gen no relacionado; 9 y 10: PCR de ADNc de plantas transformadas con la construcción correspondiente; 11: marcador de peso molecular; 12: control positivo.

<u>Figura 20</u>: Detección de la actividad transcripcional en plantas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C mediante RT-PCR

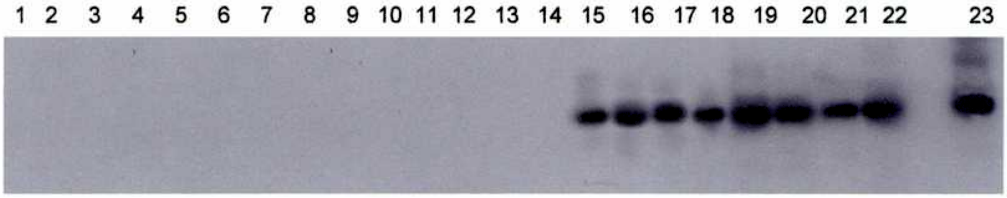


Se aisló ARN a partir de hoja fresca de alfalfa de plantas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C y plantas control. Se realizó una RT-PCR utilizando un par de primers que amplifica un fragmento de 639 pb correspondiente al gen de VP1 (A) y un par de primers que específicamente amplifica un fragmento interno, de 344 pb, del gen NPT II (B).
Descripción de las líneas: 1: control sin templado de PCR; 2: control sin templado de RT; 3: PCR de RNA de planta normal; 4: PCR de RNA de planta transformada con un gen no relacionado; 5 y 6: PCR de RNA de plantas transformadas con la construcción correspondiente; 7: PCR de ADNc de planta normal; 8: PCR de ADNc de planta transformada con un gen no relacionado; 9 y 10: PCR de ADNc de plantas transformadas con la construcción correspondiente; 11: marcador de peso molecular; 12: control positivo.

Con el objetivo de confirmar la especificidad de los productos de amplificación para el gen recombinante, se realizó un Southern blot utilizando como sonda el gen de VP1 (Figura 21). Se pudo observar que la sonda específicamente hibridó con los productos de PCR provenientes de plantas transgénicas para P1.2A y P1.2A-2B-3C, en el tamaño esperado para el gen VP1 (líneas 15-22). No se observó reactividad con

las muestras de planta normal así como con los controles negativos del ensayo (controles sin templado y de contaminación con DNA) (líneas 1-14).

Figura 21: Southern blot para corroborar la especificidad de los productos amplificados por RT-PCR



Los productos de la RT-PCR fueron transferidos a una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda constituida por el gen de VP1. Descripción de las líneas: 1: control sin templado de la reacción de PCR; 2: control sin templado de la reacción de RT; 3: PCR de ARN de planta no transformada 4: PCR de ARN de planta transformada con un gen no relacionado; 5, 6: PCR de ARN de plantas transformadas con pROK II-P1.2A; 7, 8: PCR de ARN de plantas transformadas con pROK III-P1.2A; 9, 10: PCR de ARN de plantas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C; 11, 12: PCR de ARN de plantas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C; 13: PCR de ADNc de planta no transformada; 14: PCR de ADNc de planta transformada con un gen no relacionado; 15, 16: PCR de ADNc de plantas transformadas con pROK II-P1.2A; 17, 18: PCR de ADNc de plantas transformadas con pROK III-P1.2A; 19, 20: PCR de ADNc de plantas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C; 21, 22: PCR de ADNc de plantas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C; 23: control positivo.

5.3. Evaluación de la respuesta inmune inducida en ratones inmunizados intraperitonealmente con los extractos vegetales de las plantas transgénicas

La identificación de las plantas que produjeron mayor cantidad de antígeno recombinante se realizó mediante la evaluación de la respuesta de anticuerpos inducida en ratones inmunizados con extractos de las plantas transgénicas. Esta selección se hizo de tal modo ya que la presencia de las proteínas recombinantes no pudo ser determinada directamente por la técnica de Western blot, debido probablemente a que los niveles de expresión obtenidos en las plantas transgénicas resultaron escasos. Para los ensayos de inmunización se utilizaron:

1 planta transformada con la construcción pROK II-P1.2A,

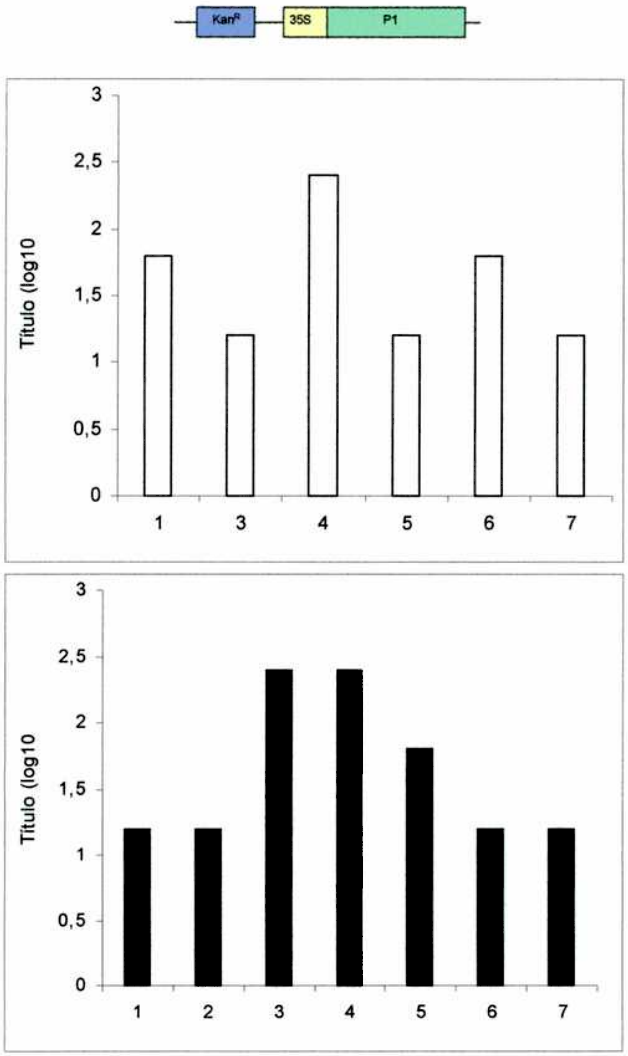
9 plantas transformadas con la construcción pROK III-P1.2A,

9 plantas transformadas con la construcción pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C,

6 plantas transformadas con la construcción pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C,
5 plantas transformadas con un gen no relacionado.

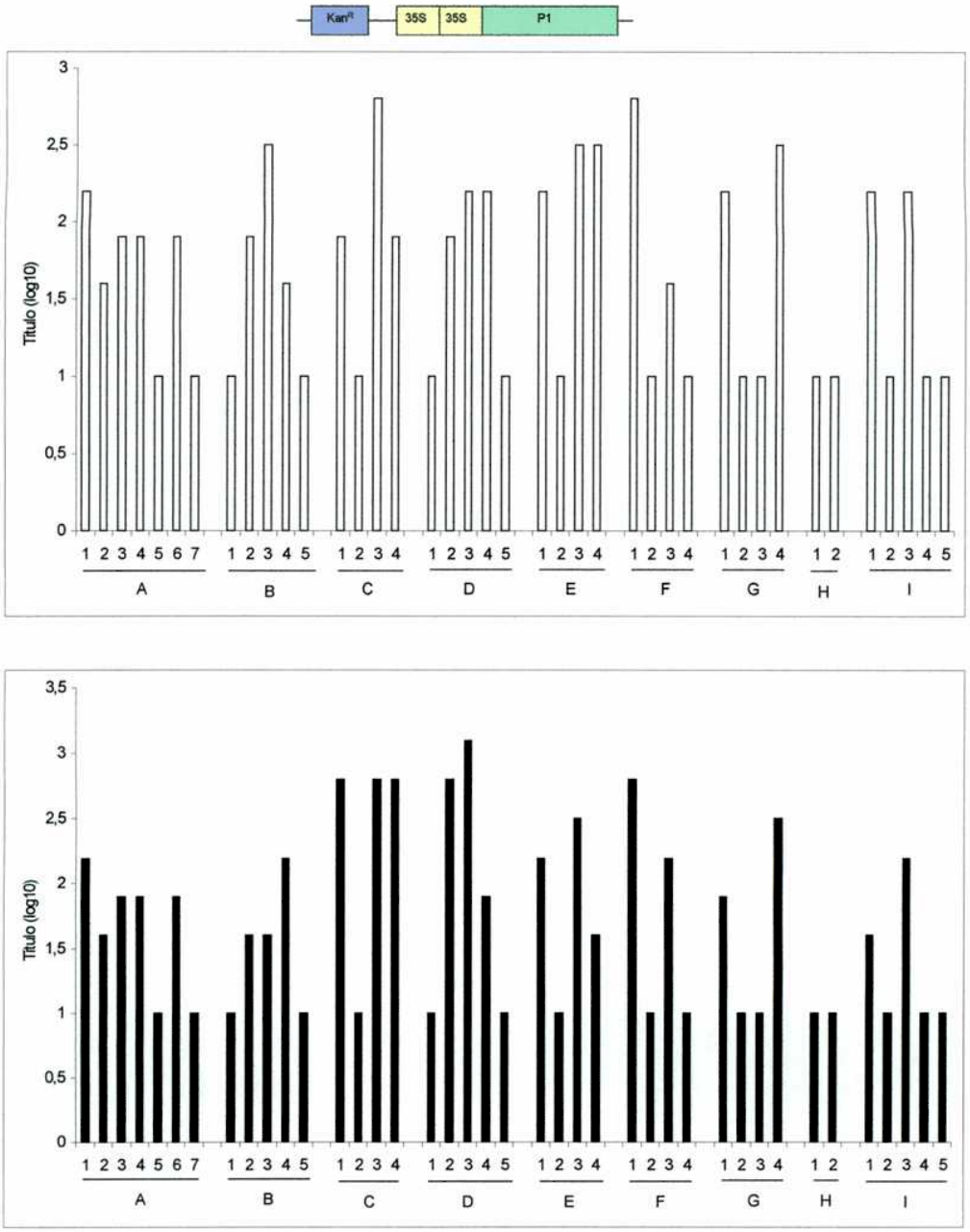
Se inmunizaron intraperitonealmente ratones adultos a los 0, 15, 30, 45, 60 y 75 días, con 10 mg de hoja fresca por animal. Diez días luego de la última inmunización se realizó una sangría exploratoria y los plasmas obtenidos se utilizaron para evaluar la presencia de anticuerpos específicos. Los ratones inmunizados con extractos de las plantas transformadas con las distintas construcciones desarrollaron una respuesta específica de anticuerpos frente a p135-160 como lo demuestra el ensayo de ELISA realizado utilizando dicho péptido como antígeno (Figuras 22-25 A). Asimismo, se analizó por ELISA la respuesta inmune específica contra partículas virales intactas. Todos los animales inmunizados con las plantas transgénicas para P1.2A-2B-3C mostraron una respuesta inmune frente al VFA inactivado (Figura 22-25 B). En los animales que recibieron la vacuna formulada con extractos de las plantas con las construcciones pROK II-P1.2A y pROK III-P1.2A, la reactividad tanto a p135-160 como al VFA fue menor. Los sueros de animales inmunizados con extractos de plantas no transformada no presentaron reactividad en ninguno de los ensayos de ELISA realizados, confirmando la especificidad de la respuesta inmune inducida por los extractos de plantas transformadas.

Figura 22: Detección de anticuerpos en ratones inmunizados con extractos de hojas de plantas transgénicas transformadas con pROK II-P1.2A



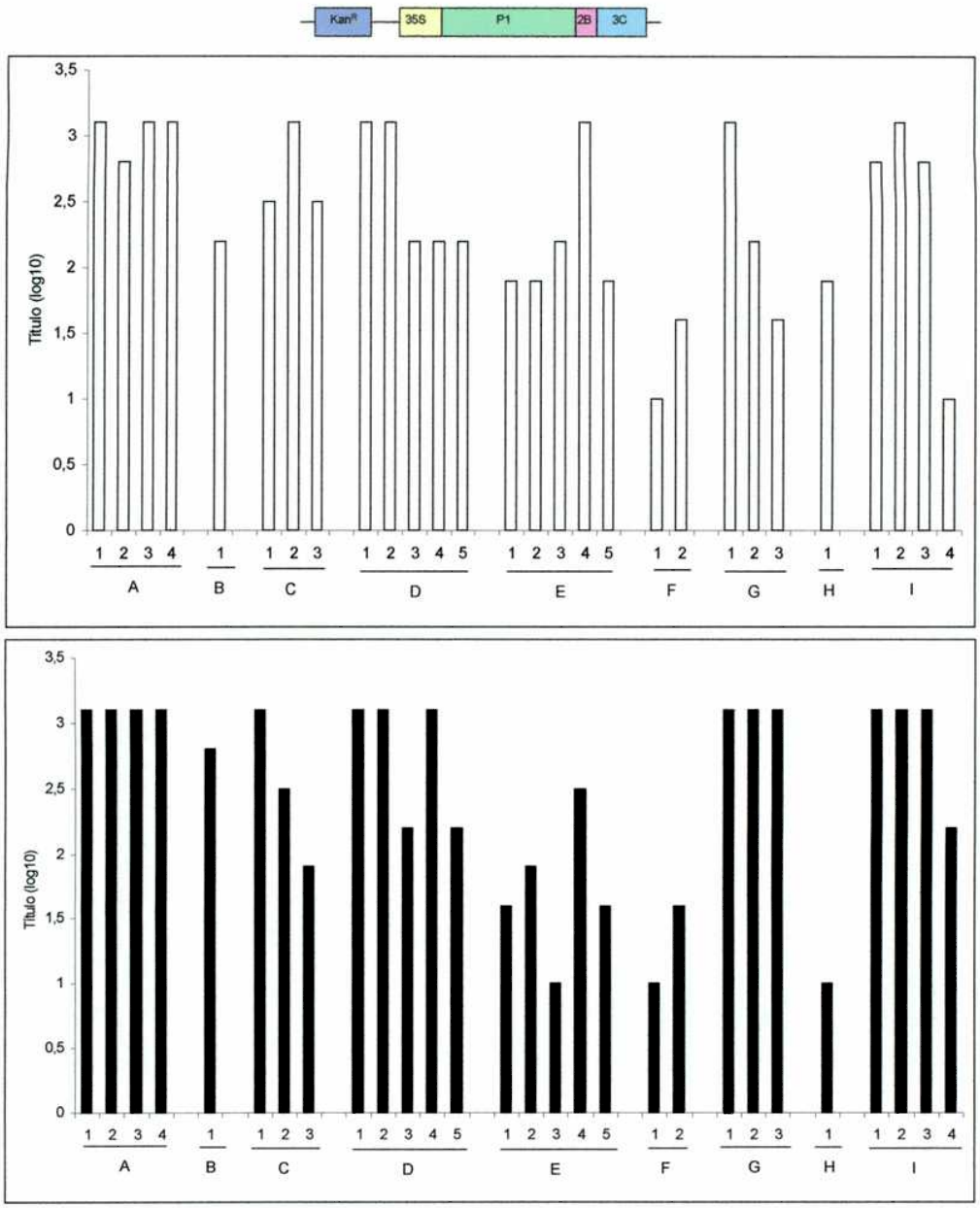
Se detectaron anticuerpos anti-p135-160 (barras blancas) y anti-partículas intactas de VFA (barras negras) mediante ensayos de ELISA. Los números indican los ratones inmunizados con la planta transgénica. Los títulos de anticuerpos se expresaron como el logaritmo decimal de la inversa de la mayor dilución que tuvo una DO superior a la media + 3 DS de la DO de los sueros de animales inmunizados con plantas transformadas con un gen no relacionado.

Figura 23: Detección de anticuerpos en ratones inmunizados con extractos de hojas de plantas transgénicas transformadas con pROK III-P1.2A



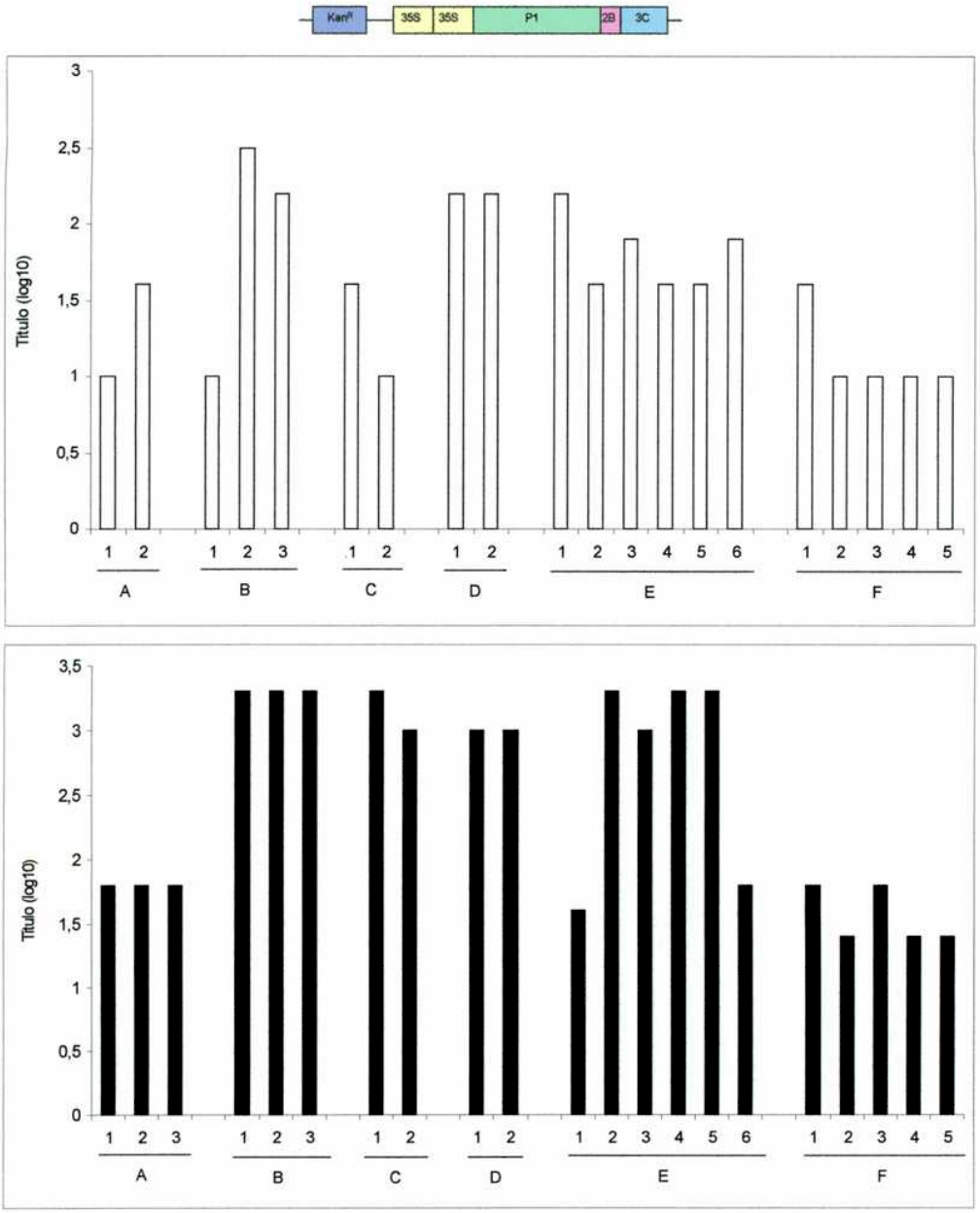
Se detectaron anticuerpos anti-p135-160 (barras blancas) y anti-partículas intactas de VFA (barras negras) mediante ensayos de ELISA. Los números corresponden a los ratones inmunizados con cada una de las plantas transgénicas (A-I). Los títulos de anticuerpos se expresaron como el logaritmo decimal de la inversa de la mayor dilución que tuvo una DO superior a la media + 3 DS de la DO de los sueros de animales inmunizados con plantas transformadas con un gen no relacionado.

Figura 24: Detección de anticuerpos en ratones inmunizados con extractos de hojas de plantas transgénicas transformadas con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C



Se detectaron anticuerpos anti-p135-160 (barras blancas) y anti-partículas intactas de VFA (barras negras) mediante ensayos de ELISA. Los números corresponden a los ratones inmunizados con cada una de las plantas transgénicas (A-I). Los títulos de anticuerpos se expresaron como el logaritmo decimal de la inversa de la mayor dilución que tuvo una DO superior a la media + 3 DS de la DO de los sueros de animales inmunizados con plantas transformadas con un gen no relacionado.

<u>Figura 25</u>: Detección de anticuerpos en ratones inmunizados con extractos de hojas de plantas transgénicas transformadas con pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C



Se detectaron anticuerpos anti-p135-160 (barras blancas) y anti-partículas intactas de VFA (barras negras) mediante ensayos de ELISA. Los números corresponden a los ratones inmunizados con cada una de las plantas transgénicas (A-F). Los títulos de anticuerpos se expresaron como el logaritmo decimal de la inversa de la mayor dilución que tuvo una DO superior a la media + 3 DS de la DO de los sueros de animales inmunizados con plantas transformadas con un gen no relacionado.

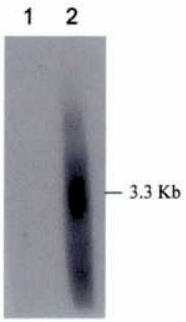
Cabe destacar que, las plantas que resultaron mas inmunogénicas (las que indujeron mayores títulos de anticuerpos), generaron una respuesta de anticuerpos más homogénea entre los individuos inmunizados que aquellas plantas que indujeron menores títulos de anticuerpos. Esto se puede apreciar en el caso de las plantas pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C, A, C, G e I y pROK III^{md}-P1.2A-2B-3C, B.

Los resultados obtenidos indican que la planta A, transformada con la construcción pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C, fue capaz de inducir la mejor respuesta de anticuerpos en los ratones inmunizados. Esta elección se realizó considerando los niveles de anticuerpos alcanzados, medidos por su reactividad en ensayos de ELISA que utilizan dos antígenos diferentes, y considerando la homogeneidad de la respuesta inducida en los animales que fueron inmunizados con la misma planta. La planta A seleccionada fue, entonces, utilizada para continuar con los estudios.

5.4. Detección de la actividad transcripcional en la planta pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C (A)

La presencia de transcriptos específicos para la poliproteína se realizó mediante un ensayo de Northern blot utilizando como sonda la secuencia del gen de VP1. Los transcriptos detectados por la sonda poseen un tamaño de aproximadamente 3.3 kpb lo cual es consistente con el tamaño esperado para los mismos (Figura 26). Este resultado indica, entonces, que el gen que contiene las secuencias codificantes de la poliproteína P1, 3B y las proteasas 2A y 3C es eficientemente transcripto en la célula vegetal.

Figura 26: Northern blot para detectar ARNm específicos



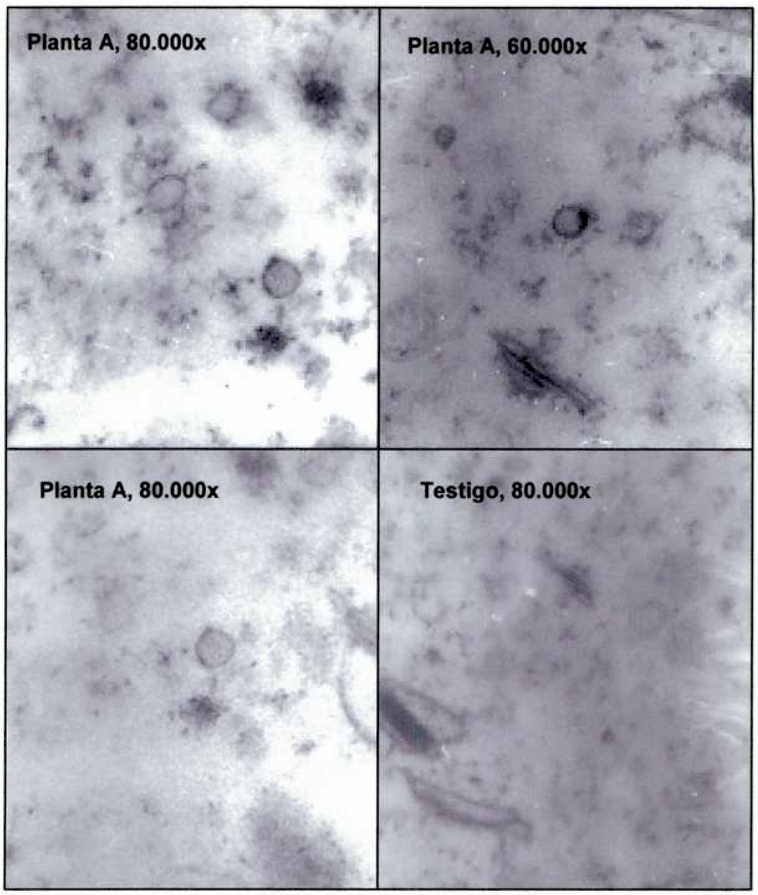
A partir de ARN total de hoja fresca se realizó un ensayo de Northern blot utilizando como sonda el gen de VP1. Descripción de las calles: 1: ARN de planta transformada con un gen no relacionado; 2: ARN de la planta A.

5.5. Microscopía electrónica de hojas de alfalfa transformada con pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C (A)

A fin de evaluar si la expresión de P1.2A-2B-3C en las plantas transgénicas estaba acompañada por un correcto procesamiento de la proteína y ensamble de cápsides vacías del VFA, se realizaron cortes de hoja de alfalfa para visualizar tales estructuras por microscopía electrónica. Para este ensayo se utilizó, entonces, la planta A transformada con la construcción pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C y, como control, se utilizaron hojas de una planta transformada con un gen no relacionado (testigo).

En la planta A se observaron partículas cuyo tamaño promedio es de 30 nm (Figura 27). Dichas partículas no se encuentran en el testigo y por su morfología y tamaño podrían corresponder a cápsides vacías de Picornavirus.

Figura 27: Microscopía electrónica



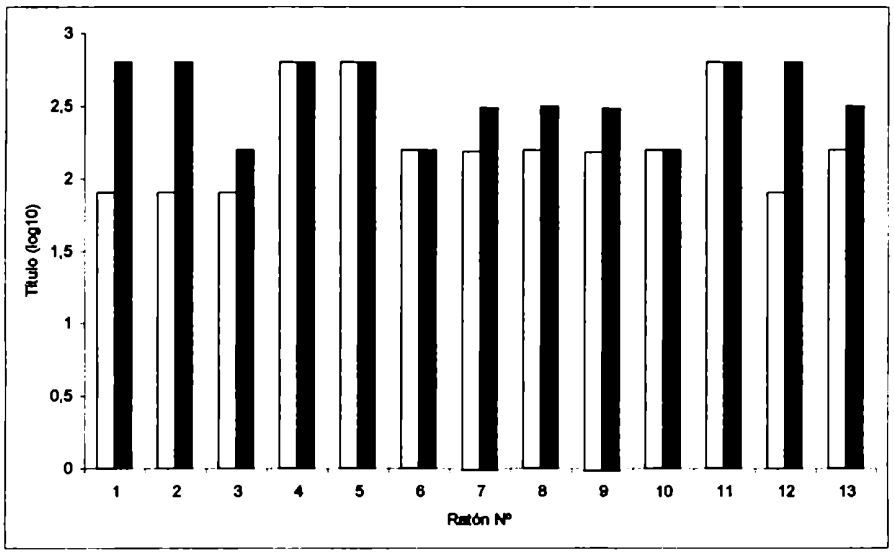
5.6. Respuesta inmune inducida en ratones vacunados con extracto de la planta pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C (A)

5.6.1. Respuesta de anticuerpos

Se evaluó la respuesta inmune inducida por la inmunización utilizando un grupo mayor de individuos (N= 13), a fin de corroborar los resultados obtenidos en los ensayos previos de inmunización. Como control, se inmunizaron animales con extracto de una planta transformada con un gen no relacionado. Los animales fueron

inmunizados con 5 dosis de la vacuna formulada con extractos de las plantas transgénicas. Se realizaron ensayos de ELISA utilizando como antígeno p135-160 y partículas completas del VFA del mismo modo que en los ensayos previos de inmunización. Los resultados demuestran que todos los animales ensayados presentan una respuesta importante y homogénea de anticuerpos frente a ambos antígenos (Figura 28).

Figura 28: Detección de anticuerpos, por ELISA, en ratones inmunizados con extractos de hojas de la planta A

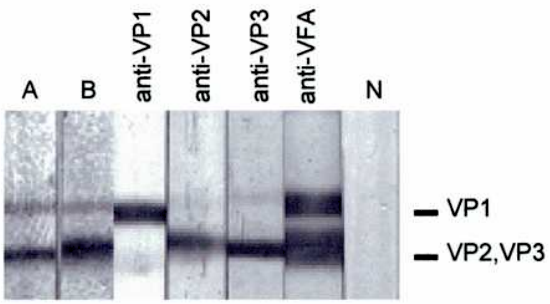


Se evaluó la presencia de anticuerpos por ELISA usando como antígeno p135-160 (barras blancas) ó partículas virales completas (barras negras). Los números corresponden a los ratones inmunizados con cada una de las plantas transgénicas (A-I). Los títulos de anticuerpos se expresaron como en las figuras 22-25.

La especificidad de la respuesta inmune inducida se confirmó mediante un Western blot en el cual se utilizó como antígeno VFA purificado. Como control, se utilizaron sueros que reconocen específicamente proteínas estructurales del VFA. Para generar estos sueros se inocularon ratones con distintos péptidos sintéticos que representan epitopes lineales descriptos en las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Los sueros que reconocen epitopes de la misma proteína estructural fueron utilizados en un pool

como reactivo para identificar la correspondiente proteína viral. Como se puede observar en la Figura 29, los sueros de los ratones inmunizados con la planta A reconocen las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, tal como lo hacen sueros de ratones infectados. El pool de sueros de animales inmunizados con una planta transformada con un gen no relacionado no mostró reactividad en el ensayo.

Figura 29: Detección de anticuerpos específicos, por Western blot, en ratones inmunizados con extractos de hojas de la planta A



Se evaluó la presencia de anticuerpos específicos por Western blot utilizando como antígeno VFA purificado e inactivado. Descripción de las calles: sueros de ratones inmunizados con la planta A (A, B); suero control de ratones para identificar las proteínas VP1, VP2 y VP3 (anti-VP1, anti-VP2 y anti-VP3, respectivamente), suero control de ratones infectados con VFA (anti-VFA); pool de sueros de animales inmunizados con una planta transformada con un gen no relacionado (N).

5.6.2. Respuesta de anticuerpos neutralizantes

Los plasmas de algunos de los animales inmunizados con la planta A fueron evaluados en su capacidad neutralizante de la replicación viral mediante un ensayo de seroneutralización en ratón lactante. Los ratones inmunizados con extractos de la planta A desarrollaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes de la actividad viral *in vivo* (Tabla 3).

Tabla 3: Detección de anticuerpos seroneutralizantes en ratones inmunizados con extractos de hojas de la planta A

Ratón Nº	ISN
1	2.2
2	2.3
3	2.1
4	2.1
5	<1.5
6	<1.5

Se emplearon plasmas de animales inmunizados con extractos foliares de la planta A (ratones Nº 1-4) y de plantas transformadas con un gen no relacionado (ratones Nº 5 y 6).

5.6.3. Protección de los ratones inmunizados frente al desafío viral

Para evaluar la efectividad de la respuesta inmune inducida por la vacunación en términos de su capacidad protectora, los ratones inmunizados fueron desafiados con VFA infeccioso. Los resultados muestran que los animales vacunados con la planta A presentaron una protección completa (100%) frente al desafío viral, mientras que ratones vacunados con un pool de otras plantas tuvieron un nivel menor de protección del 90% (Tabla 4). Los ratones inmunizados con una planta no transformada así como los ratones no inmunizados presentaron ausencia total de protección frente a la infección viral. Estos resultados indican que los epitopes neutralizantes, responsables de proteger al ratón de la infección por VFA están conservados en las proteínas expresadas en la planta transgénica.

Tabla 4:

Ratones inmunizados ip con:	Protección
Planta transformada con PROKII^{md}-P1.2A-2B-3C (A)	13/13 (100%)
Planta transformada con PROKII^{md}-P1.2A-2B-3C (pool de otras plantas)	9/10 (90%)
Planta transformada con un gen no relacionado	0/10 (0%)
Buffer	0/6 (0%)

CAPITULO II: Expresión de epitopes inmunodominantes del VFA como proteína de fusión con la enzima β-glucuronidasa.

5.7. Clonado de la secuencia de p135-160 como proteína de fusión con β-GUS

La secuencia de 96 pb (p135-160), que codifica la zona comprendida entre las posiciones 135 y 160 del gen de la proteína VP1 del VFA O1C, fue obtenida por hibridización de oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen en su extremo 5´ el codón de iniciación y el sitio de restricción *Bam H I*, y en su extremo 3´ el sitio de restricción *Sma I*. La secuencia nativa del gen fue adaptada al uso de codones de plantas con el fin de incrementar los niveles de expresión del antígeno de interés (Figura 24). Estas modificaciones involucran únicamente algunos nucleótidos de la secuencia de ADN de modo de generar los codones más frecuentemente usados por las plantas, pero no generan cambio alguno de aminoácido.

Figura 24: Modificación de la secuencia del péptido 135-160 de la proteína VP1 del VFA según el uso de codones de plantas

Secuencia aminoacídica	R	Y	S	R	N	A	V	P	N	V
Secuencia del VFA	AGG	TAC	AGC	AGA	AAT	GCT	GTG	CCC	AAC	GTG
Secuencia del oligonucleótido	AGA	TAC	TCT	AGA	AAC	GCT	GTT	CCT	AAC	GTT

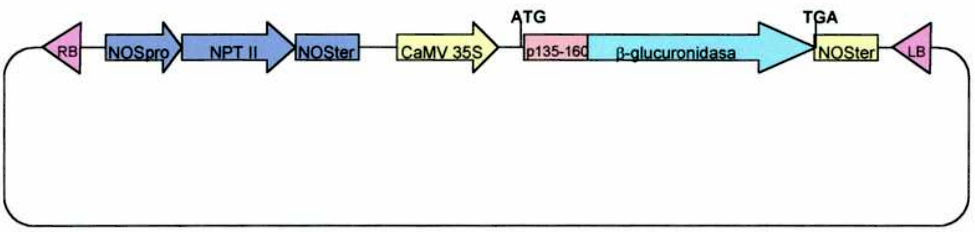
Secuencia aminoacídica	R	G	D	L	Q	V	L	A	Q	K
Secuencia del VFA	AGA	GGT	GAC	CTT	CAG	GTG	TTG	GCT	CAA	AAG
Secuencia del oligonucleótido	AGA	GGA	GAT	CTT	CAG	GTT	CTT	GCT	CAA	AAG

Secuencia aminoacídica	V	A	R	T	L	P
Secuencia del VFA	GTG	GCA	CGG	ACG	CTG	CCT
Secuencia del oligonucleótido	GTT	GCT	AGA	ACT	CTT	CCT

El fragmento p135-160 fue primeramente clonado en el plásmido pBI221 y a partir de éste se subclonó el cassette conteniendo el promotor, la secuencia de p135-160 fusionada al gen *gusA* y el terminador en el plásmido pBI121. El vector así obtenido (pBI121-p135-160-β GUS) codifica para una proteína de fusión conteniendo en el extremo 5´ el gen p135-160 seguido por la secuencia completa del gen *gusA* (Figura 25).

A fin de confirmar la conservación del marco de lectura en la proteína de fusión, se secuenció completamente el gen p135-160 y el extremo 5´ del gen *gusA*. No se encontraron cambios en las secuencias nucleotídicas analizadas.

Figura 25: Esquema del vector binario pBI121-p135-160-β GUS

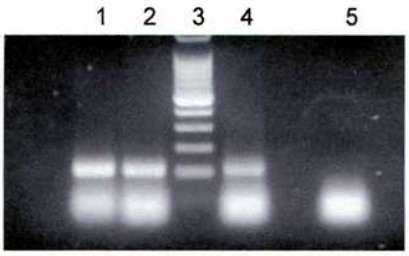


5.8. Obtención de plantas de alfalfa transgénicas

5.8.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Los plásmidos pBI121-p135-160-β GUS y pBI121 (control) fueron introducidos por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens*. Para confirmar la presencia del gen deseado en las bacterias transformadas, se amplificó por PCR un fragmento correspondiente a la secuencia de p135-160 y 20 nucleótidos del gen de β-glucuronidasa (β-GUS) (Figura 26).

Figura 26: Detección del gen recombinante en *A. tumefaciens*



A partir de ADN total de *A. tumefaciens*, se realizó una PCR para amplificar un fragmento correspondiente a la secuencia de p135-160 y 20 nucleótidos de β GUS. Descripción de las líneas: 1, 2: PCR sobre ADN de *A. tumefaciens* transformada con pBI121-p135-160-β GUS; 3: marcador de peso molecular; 4: PCR usando como templado el plásmido pBI121-p135-160-β GUS; 5: control sin templado.

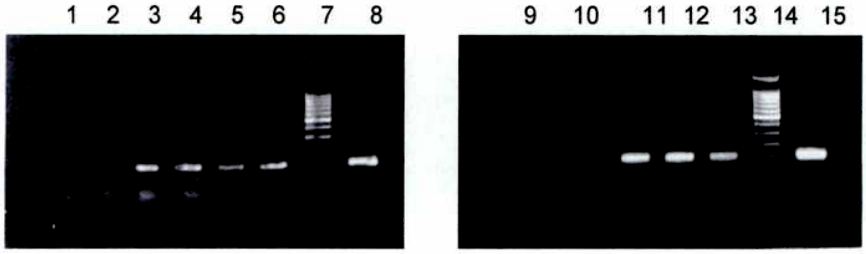
5.8.2. Transformación de alfalfa

La introducción de los transgenes se realizó mediante el cocultivo de embriones y pecíolos con *A. tumefaciens* transformada. Luego de diez transformaciones individuales, se obtuvieron 56 plantas resistentes a Kanamicina; 51 de ellas transformadas con pBI121-p135-160-β GUS y 5 transformadas con pBI121. Las plantas transgénicas presentaron igual morfología y crecimiento que las plantas no transgénicas.

5.8.3. Detección del gen recombinante en las plantas transgénicas

La presencia del gen p135-160 se detectó por PCR a partir de ADN total extraído de hoja fresca. Para ello, se amplificó un fragmento conteniendo la secuencia de p135-160 y 20 nucleótidos del gen de β-GUS. Los resultados muestran la presencia de un amplificado del tamaño esperado (aproximadamente 115 pb) en todas las plantas resistentes a Kanamicina ensayadas, y el cual esta ausente en las plantas no transformadas ó transformadas con un gen no relacionado. En la figura 27 se muestra el resultado de siete plantas representativas de la población.

Figura 27: Detección del gen p135-160 en las plantas transgénicas

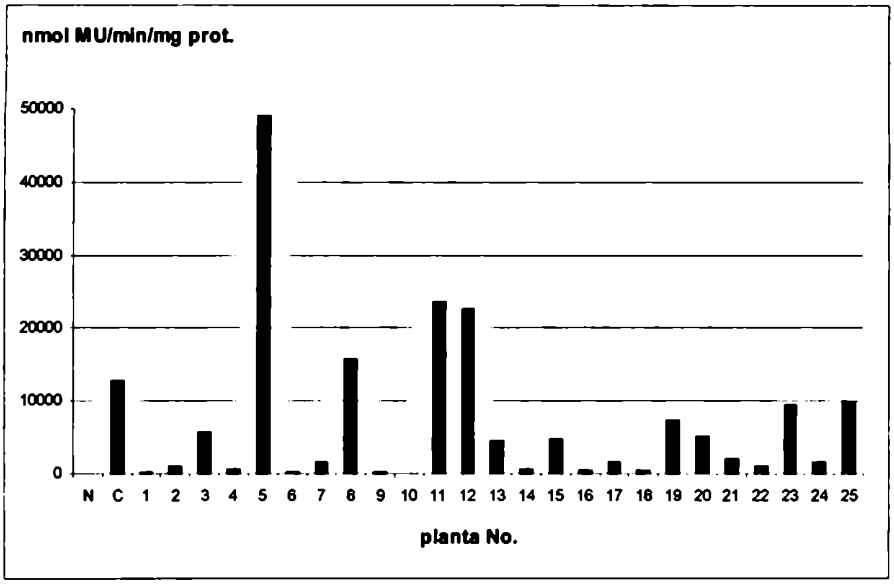


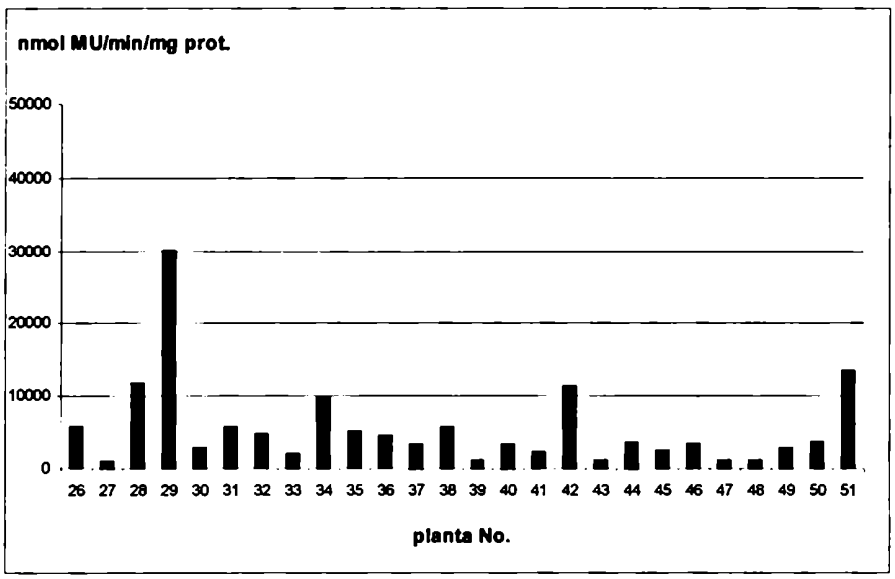
A partir de ADN total se realizó una PCR utilizando un par de primers que amplifica específicamente un fragmento de aproximadamente 115 pb que incluye al gen p135-160.
Descripción de las líneas: (1, 9): control sin templado, (2, 10): plantas de alfalfa transformada con un gen no relacionad, (3-6, 11-13): plantas de alfalfa transformadas con pBI121-p135-160-β GUS, (8, 15): control de plásmido, (7, 14): marcador de peso molecular.

5.8.4. Cuantificación de la actividad β-GUS en las plantas transgénicas

Con el objetivo de seleccionar las plantas presentando mayor nivel de expresión de p135-160-β GUS, se evaluó la actividad β-Glucuronidasa en todas las plantas resistentes a Kanamicina. Se puede observar una gran variedad en los valores de actividad enzimática entre los individuos evaluados que van desde valores basales hasta los máximos niveles alcanzados (Figura 28). Esto se debe a que la inserción del ADN-T en el genoma vegetal es al azar y por lo tanto la expresión del transgen varía en cada planta. Los resultados muestran que el 8% de las plantas presentan los niveles más elevados de actividad enzimática en relación al resto de la población. Aquellas plantas que presentaron los mayores niveles de actividad enzimática (plantas N° 5, 11, 12 y 29) fueron seleccionadas para analizar la expresión de p135-160.

Figura 28: Cuantificación de la actividad β GUS en las plantas transgénicas





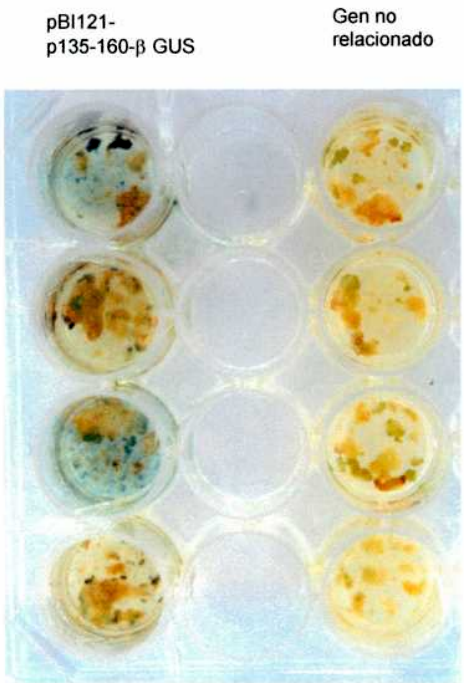
Los resultados corresponden a tres ensayos independientes.
N: planta transformada con un gen no relacionado; C: planta transformada con pBI121

5.8.5. Detección de la actividad β GUS

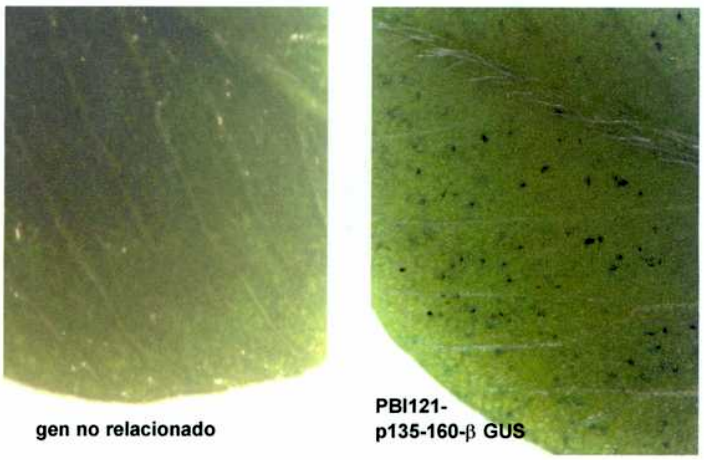
Con el objetivo de evaluar si la proteína de fusión se expresaba en la totalidad de la planta, así como en etapas temprana en la diferenciación, se evaluó la actividad de la enzima β GUS en distintas zonas del vegetal. Para ello, se realizó un ensayo histoquímico utilizando callos y hojas, pecíolos y raíces de plantas desarrolladas (plantas Nº 5, 11, 12 y 29). La actividad de la enzima se determinó por la presencia de coloración azul en los explantes evaluados. Se pudo observar una intensa coloración tanto en callos como en los explantes de la planta (Figura 29). En hojas, pecíolos y raíces pudo detectarse actividad enzimática en los distintos tejidos. No se detectó coloración en los correspondientes controles de planta transformada con un gen no relacionado.

Figura 29: Detección de la actividad β GUS

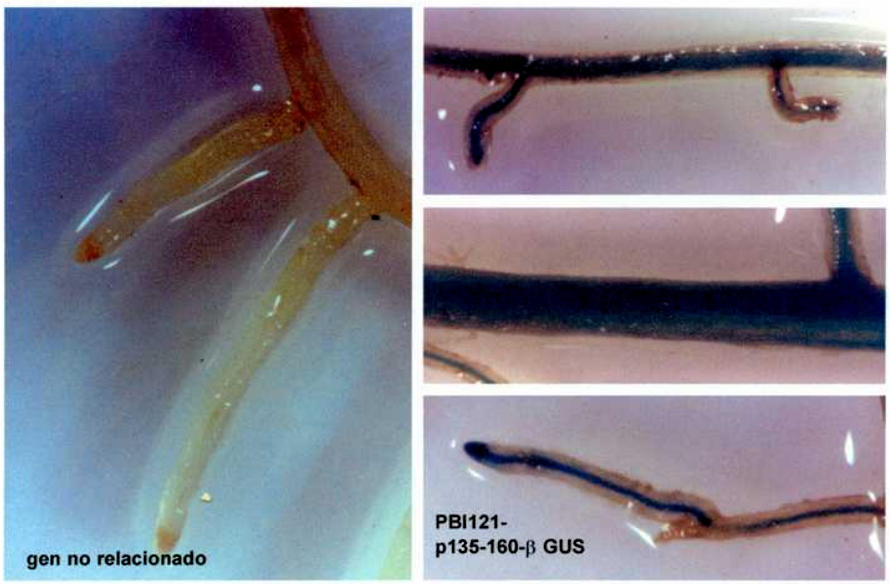
A



B



C

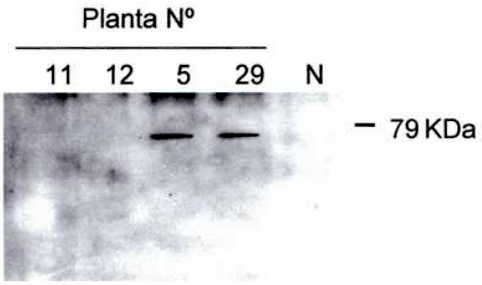


Se realizó un ensayo histoquímico para detectar la expresión de β GUS en callos (A), folíolos (B) y raíces (C) de las plantas Nº 5, 11, 12 y 29. Como control se utilizaron explantes de una planta transformada con un gen no relacionado. Se muestran fotos representativas de los resultados obtenidos en todas las plantas.

5.8.6. Detección de p135-160 en las plantas transgénicas seleccionadas

La expresión de p135-160 fue evaluada en las cuatro plantas seleccionadas. Para ello, los extractos de planta fresca fueron fraccionados en un SDS-PAGE para luego realizar un Western blot utilizando como anticuerpo detector un suero de ratón anti-p135-160. Las plantas N° 5 y 29 presentaron los mejores niveles de expresión de p135-160, lo cual es consistente con la mayor actividad enzimática observada en estas plantas. La presencia de la proteína de fusión (p135-160-β-GUS) se visualizó como una única banda del tamaño molecular esperado (aproximadamente 79 kDa) y que se encuentra ausente en la planta transformada con un gen no relacionado (Figura 30). La importancia de estos resultados radica principalmente en la detección de un antígeno foráneo a partir de un extracto crudo de planta sin ningún proceso de enriquecimiento y/o purificación. Esto estaría indicando un aumento en los niveles de expresión con respecto a otros sistemas utilizados corrientemente por nuestro y otros grupos de investigación.

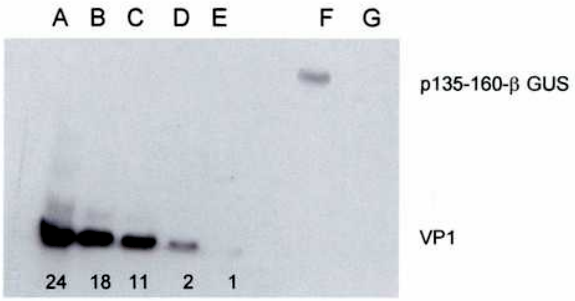
Figura 30: Detección de la expresión de p135-160



Los extractos de planta fueron fraccionados en SDS-PAGE 12.5%. A continuación se realizó un ensayo de Western blot utilizando como anticuerpo detector un suero de ratón anti-p135-160.
N: planta transformada con un gen no relacionado

La cuantificación de la expresión de p135-160 se realizó por Western blot utilizando como anticuerpo detector un suero anti-p135-160 realizado en ratón. Para ello, se corrieron extractos de la planta a analizar (planta Nº 5) juntamente con diluciones conocidas de VFA inactivado y purificado. Pudo estimarse, comparando la reactividad del extracto de planta con la de VP1, que la planta evaluada tiene una concentración de p135-160 de 0.5-1 μg/mg de proteína soluble total (Figura 31).

Figura 31: Cuantificación de la expresión de p135-160



Western blot para la cuantificación de la expresión de p135-160 por comparación de la intensidad de bandas utilizando un anticuerpo anti p135-160. Descripción de las líneas: A-E: distintas diluciones conocidas de VFA, los números debajo de las bandas indican los ng de p135-160 presentes en la correspondiente dilución de virus; F y G: 2 μg de proteína total soluble de la planta Nº 5 y de una planta transformada con un gen no relacionado, respectivamente.

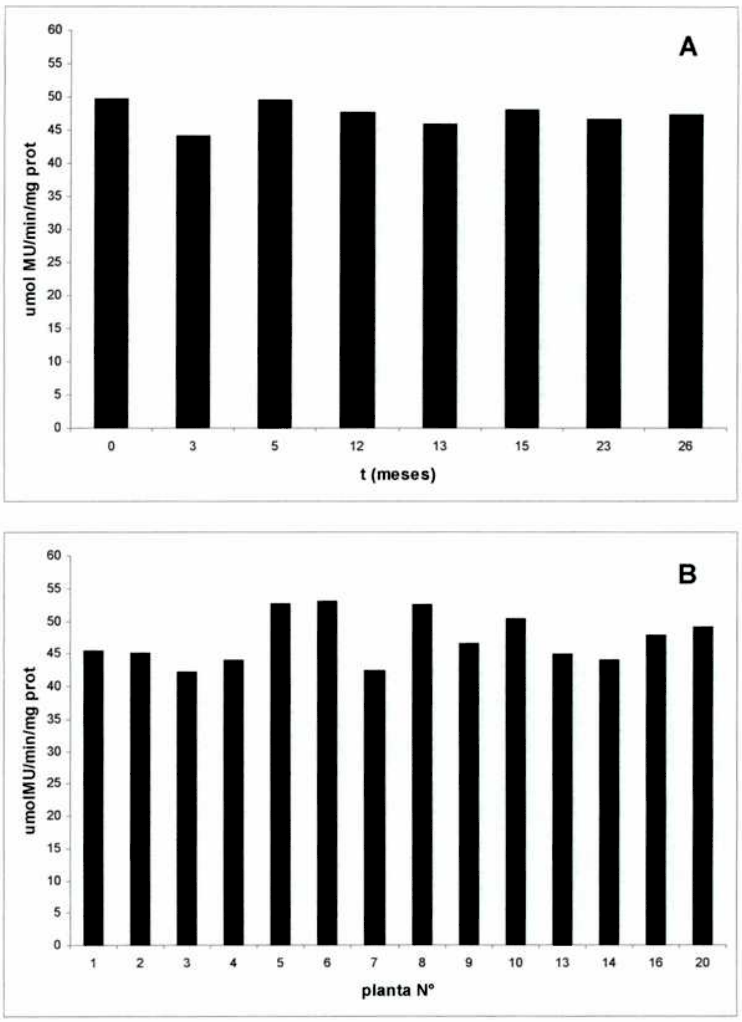
5.8.7. Estabilidad de la expresión de la proteína de fusión

Se analizó la expresión de la proteína de fusión en la planta Nº 5 a lo largo del tiempo y en diferentes plantas obtenidas por reproducción vegetativa de la misma. Todas las plantas fueron evaluadas mediante el ensayo de actividad β-GUS.

Como se puede observar en la figura 32, la expresión de p135-160-β GUS se mantuvo estable tanto a lo largo del tiempo evaluado, como en los individuos multiplicados vegetativamente. Estos resultados indican que la expresión del péptido p135-160 como proteína de fusión permanece estable en las condiciones evaluadas. Esto último se corroboró por Western blot, tanto en la planta Nº5 luego de 26 meses

como en algunas de las plantas resultantes de la multiplicación vegetativa de la misma (datos no mostrados).

Figura 32: Evaluación de la estabilidad de la expresión de p135-160-β-GUS



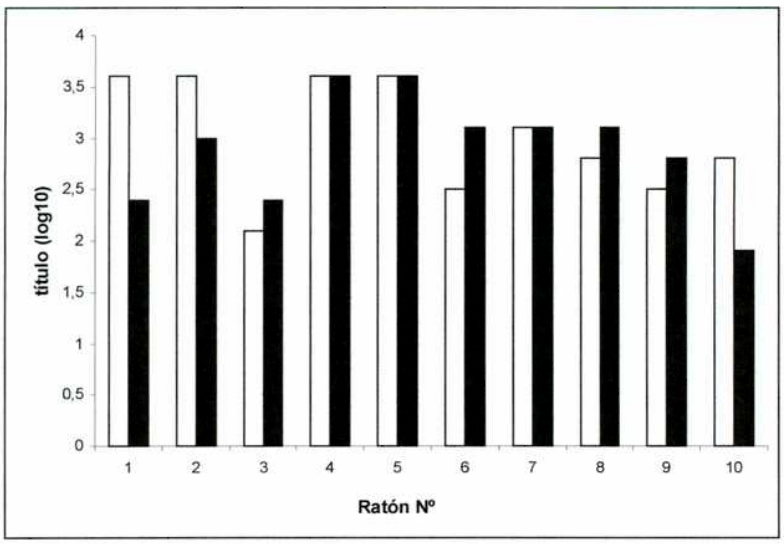
Medición de la actividad β-GUS de la planta N°5 a distintos tiempos (A) y de diferentes plantas obtenidas por multiplicación vegetativa de la planta N°5 a los doce meses (B).

5.9. Respuesta inmune inducida por la inmunización parenteral con extracto de planta expresando p135-160

5.9.1. Respuesta de anticuerpos

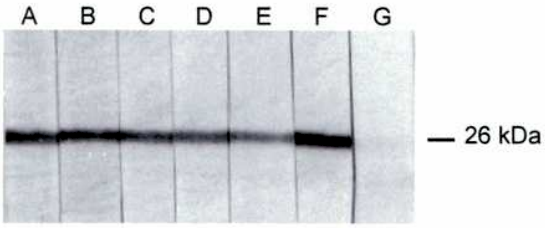
Se evaluó la capacidad inmunogénica de p135-160 expresado como proteína de fusión en plantas inmunizando ratones con una vacuna formulada utilizando extracto foliar de la planta Nº 5. Se pudo observar que, luego de 3 inmunizaciones, todos los animales desarrollaron una importante respuesta de anticuerpos, tal como lo demuestra su reactividad por ELISA tanto frente a p135-160 como frente a partículas virales completas (Figura 33). La especificidad de la respuesta inducida se confirmó por Western blot utilizando como antígeno VFA purificado e inactivado. Los resultados demuestran que el pool de sueros de ratones inmunizados con extracto de planta conteniendo p135-160-β GUS reconoció específicamente la proteína del mismo modo que el suero control anti-p135-160. No se observó reactividad en los sueros de animales inmunizados con una planta transformada con un gen no relacionado (Figura 34).

Figura 33: Detección de anticuerpos en ratones inmunizados con extractos de plantas que expresan p135-160



Se detectaron anticuerpos anti-p135-160 (barras blancas) y anti-partículas intactas de VFA (barras negras) mediante ensayos de ELISA. Los títulos se expresan como en los ensayos anteriores.

Figura 34: Detección de anticuerpos específicos por Western blot



Western blot de sueros de animales inmunizados utilizando como antígeno VFA inactivado y purificado. Descripción de las líneas: pool de sueros de ratones inmunizados con la planta Nº 5 transformada con pBI121-p135-160-β GUS (A-E); o con plantas transformadas con pBI121 (G); pool de sueros control de ratones inmunizados con p135-160 (F).

5.9.2. Seroneutralización

Se evaluó la capacidad neutralizante de los plasmas de los animales inmunizados con la planta expresando altos niveles del péptido p135-160 (planta Nº5) mediante un ensayo de seroneutralización en ratón lactante. Los ratones inmunizados con extractos foliares desarrollaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes de la actividad viral *in vivo* (Tabla 5).

Tabla 5:

Ratón Nº	ISN
1	2.1
2	2.1
3	1.8
4	1.8
5	2.1
6	1.8
7	<1.5
8	<1.5

Se emplearon plasmas de animales inmunizados con extractos foliares de la planta Nª 5 expresando p135-160-β-GUS (1-6) y de plantas transformadas pBI121 (7-8).

5.9.3. Protección de ratones inmunizados frente al desafío viral

La efectividad de la respuesta inmune inducida por la vacunación se evaluó por su capacidad de prevenir la infección luego del desafío con virus infeccioso. Los animales inmunizados con p135-160-β GUS presentaron un 100% de protección, mientras que los ratones inmunizados con plantas expresando la enzima β-glucuronidasa ó plantas transformadas con un gen no relacionado tuvieron una ausencia completa de protección (Tabla 6)

Tabla 6

Ratones inmunizados ip con:	Protección
Planta transformada con pBI121-p135-160-β-GUS	10/10 (100%)
Planta transformada con pBI121	0/10 (0%)
Planta transformada con un gen no relacionado	0/10 (0%)
Buffer	0/8 (0%)

6. DISCUSION

El uso de plantas transgénicas para la producción de antígenos inmunológicamente relevantes ha sido objeto de evaluación por diversos grupos de investigación, ya que constituyen, potencialmente, una alternativa atractiva y económica para la produccion de proteínas recombinantes. Adicionalmente, plantas transgénicas que expresen antígenos en sus tejidos comestibles podrían ser usadas como sistemas de producción de inmunógenos de administración oral (Haq y col., 1995; Mason y col., 1996 y 1998; Arakawa y col., 1998 a y b; Wigdorovitz y col., 1999; Richter y col., 2000).

Sin embargo, la mayoría de los antígenos expresados en plantas, hasta el momento, constituyen epitopes lineales ó estructuralmente simples. Así, sólo se han reportado dos estructuras con un cierto grado de complejidad expresadas establemente en plantas. Una de ellas es el HBsAg, el cual consiste en una estructura proteica embebida en una bicapa lipídica, de 22 nm de diámetro. Este antígeno fue expresado eficientemente en tabaco y presentó características antigénicas e inmunogénicas similares al HBsAg obtenido en forma rutinaria. También se ha expresado la cápside del virus Norwalk, constituída por una única proteína que se autoensambla para formar una estructura de 38 nm. La proteína de la cápside expresada en tabaco y papa formó cápsides virales, aunque en papa sólo el 50% de la proteína se encontró en forma particulada.

La expresión de antígenos estructuralmente más complejos sustentaría la posibilidad de utilizar esta metodología para la producción de inmunógenos de utilización indiustrial. Este fue, entonces, el primer tema a abordar en este trabajo de tesis; para ello, se decidió expresar la poliproteína precursora de las proteínas estructurales del VFA (P1) en plantas de alfalfa transgénicas.

Tal como se describe en la Introducción, la formación de cápsides vacías del VFA requiere el procesamiento proteolítico de P1 para originar las proteínas estructurales, las cuales se autoensamblan para formar la cápside viral. En el caso de la fiebre aftosa, la vacuna más efectiva utilizada es a virus inactivado, sin embargo, la preparación del antígeno vacunal requiere instalaciones costosas y acarrea el riesgo del escape de virus infeccioso al medio ambiente. Las cápsides vacías del virus conservan los epitopes protectores y constituyen antígenos candidatos para la elaboración de vacunas. Sin embargo, aún no se ha logrado un método que posibilite la expresión masiva de estas estructuras en una forma eficaz como para ser utilizado en la práctica, ya que los sistemas

desarrollados hasta ahora resultan costosos y poco aplicables a nivel industrial.

Un punto crítico en la metodología es la elección de la especie vegetal a ser utilizada para la expresión estable de antígenos recombinantes. Esta elección debe considerar, entre otros factores, el poder evaluar de forma rápida las construcciones genéticas generadas así como en la posiblidad de administrar oralmente las plantas transgénicas. En este aspecto, las plantas de tabaco han sido muy utilizadas en el pasado pero presentan altos niveles de alcaloides en las hojas, de modo que el antígeno debe ser purificado de las mismas antes de ser administrado oralmente. Es por ello que se han comenzado a utilizar sistemas alternativos como la papa, que aún cuando permite administrar oralmente los tubérculos sin dificultad, su uso potencial en humanos requiere la cocción del tubérculo, lo cual podría causar la desnaturalización de la proteína, reduciendo ó eliminando su capacidad de inducir inmunidad (Arakawa y col., 1998). En humanos se han utilizado papa cruda (expresando LT-B ó cápsides del virus Norwalk) y lechuga (expresando el HBsAg) para realizar ensayos de inmunización oral (Tacket y col., 1998 y 2000; Kapusta y col., 1999). En el área veterinaria, las plantas forrajeras empleadas para el pastoreo constituyen un blanco óptimo para desarrollar vacunas animales formuladas utilizando plantas transgénicas. En particular, en Argentina, la alfalfa es una de las principales fuentes de forraje para la obtención de carne, leche y lana y es, además, un elemento fundamental para el mantenimiento y recuperación de la productividad de los suelos. Es por ello que en nuestro laboratorio se ha decidido utilizar la alfalfa como vector de expresión para la produción de antígenos recombinantes.

Nuestro grupo ha expresado previamente la proteína estructuraí VP1 del VFA, la cual contiene los epitopes responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes protectores de la infección viral, como modelo para investigar la posibilidad de utilizar este sistema como fuente de antígenos. Se demostró que VP1 puede ser expresada en plantas de *Arabidopsis thaliana*, alfalfa y papa y utilizada como eficiente inmunógeno experimental en el modelo murino (Carrillo y col., 1998 y 2001; Wigdorovitz y col., 1999).

Con el objetivo de evaluar la expresión de la poliproteína P1 en alfalfa transgénica se utilizaron dos tipos de contrucciones. Una de ellas contiene el gen de P1.2A y la otra involucra, además de P1.2A, un fragmento de 2B, 3B y la proteasa 3C (junto a una pequeña porción de 3D). Estas construcciones han sido utilizadas por otros grupos para estudiar la expresión y procesamiento de P1 en diversos sistemas de expresión (Roosien y col., 1990; Lewis y col., 1991; Grubman y col., 1993; Abrams y col., 1995). En algunos de estos reportes se ha mencionado que la expresión de 3C en *E. Coli* y virus vaccinia resultó

tóxica para la célula (Lewis y col., 1991; Abrams y col., 1995). A pesar que el requerimiento de 3C aú está en discusión, se decidió trabajar con ambas construcciones. En las construcciones conteniendo 3C utilizadas en este trabajo, esta proteasa podría llevar a cabo los clivajes proteolíticos mientras que, en las construcciones que llevan únicamente P1.2A, proteasas celulares podrían realizar el procesamiento de P1, o bien P1 no procesada podría plegarse de forma tal de conservar algunos epitopes importantes en el desarrollo de inmunidad frente al VFA. Adicionalmente, tanto la poliproteína P1, como VP0 y VP1 son modificados post-traduccionalmente mediante la miristilación de la glicina terminal (Chow y col., 1987). Esta modificación no está involucrada en el procesamiento de la poliproteína (Belshman y col., 1991), pero su ausencia afecta negativamente la estabilidad de la cápside viral. En sistemas incapaces de realizar esta modificación (como *E. coli*) el ensamble de las cápsides virales resultó un proceso ineficiente (Lewis y col., 1991). Las células vegetales son capaces de realizar esta modificación post-traduccional y de hecho muchas proteínas vegetales están miristiladas (Jonson y col., 1994; Lindzen y Choi, 1995; Rommens y col., 1995; Loh y col., 1998; Ellard-Ivey y col., 1999; Ishitani y col.,2000). De modo que, en las plantas expresando la poliproteína, tanto P1 como VP0 serían correctamente modificados favoreciendo así la estabilidad de la cápside formada.

La secuenciación de las construcciones, tal como fueron obtenidas por PCR, permitió detectar una mutación (inserción de dos nucleótidos) en la secuencia de 2B (2B´) con la consecuente pérdida del marco de lectura en los genes siguientes. La recuperación del marco de lectura, tal lo explicado en la sección de Resultados, generó dos aminoácidos nuevos en 2B´: leucina y alanina. Esta incorporación no debería afectar el procesamiento de P1 puesto que se halla en una zona que funciona como conectora, la cual no está presente en ninguna de las proteínas finales. Se debe mencionar que la mayoría (ocho de un total de once) de los cambios encontrados en ambas construcciones empleadas también están presentes en un aislado de campo recientemente secuenciado (Pereda y col., datos no publicados). Adicionalmente, en la secuencia codificante de P1 de los dos tipos de construcciones utilizadas en este trabajo se encontraron tres cambios con respecto a la secuencia consenso de O1C reportada y al aislado de la misma cepa anteriormente referido. Dada la gran variabilidad que presenta el VFA, es de esperar que las mutaciones encontradas estén presentes en el aislado de campo a partir del cual se obtuvo el ADNc. Desafortunadamente, no fue posible secuenciar tal ADNc debido a la escasez de material disponible y a la imposibilidad de, bajo las actuales restricciones

impuestas por las normas de bioseguridad en nuestro país, obtener virus infeccioso en el laboratorio. En la construcción que involucra únicamente a P1, se encontraron cinco cambios únicos con respecto tanto a la secuencia consenso de O1C como al aislado anteriormente mencionado. Tres de estas mutaciones generan cambio de aminoácido: Asn por Ser en VP2; Phe por Leu y Thr por Ala en VP3. Estas sustituciones de aminoácido no afectan ningún epitope B ó T que hayan sido hasta el momento descriptos.

Las plantas de alfalfa transgénicas obtenidas luego de la transformación con la construcción que incluye a los genes de P1 y 3C presentaron igual morfología y crecimiento que plantas no transgénicas. Sin embargo, la transformación de alfalfa con el gen de P1.2A generó un número menor de individuos transgénicos. Esto fue particularmente acentuado con la construcción que contiene P1.2A bajo la dirección del promotor CaMV 35S no modificado, en la cual se generaban plántulas que morían antes de completar su desarrollo. Una causa posible para esto es que la poliproteína P1 no procesada resulte tóxica para la célula vegetal. De hecho, en sistemas de expresión heterólogos como *E. coli*, y virus vaccinia se ha reportado que 3C tiene un efecto tóxico, pero no está descrito que P1 sin procesamiento tenga un efecto adverso con el crecimiento celular.

En todas las plantas transgénicas obtenidas se detectaron por PCR los genes de la proteína estructural VP1 y un fragmento de NPT II. La eficiencia de la reacción fue diferente en las distintas plantas debido a que el ADN-T se inserta azarosamente en el genoma de la célula y por lo tanto el gen a detectar no está igualmente disponible. Del mismo modo, se corroboró la presencia de la secuencia codificante de 3C en las plantas correspondientes (datos no presentados). Estos resultados indicaron que el ADN-T fue completa y eficientemente transferido al genoma de la célula vegetal transformada.

La presencia de transcriptos específicos conteniendo las secuencias de VP1 y NPTII pudo confirmarse en todas las plantas transgénicas. Sin embargo, no fue posible detectar por Western blot los antígenos recombinantes a partir de extractos crudos de hojas. Esto se debe, probablemente, a que los niveles de expresión alcanzados en las plantas obtenidas no resultaron suficientes para permitir su detección directa por dicha técnica. Es por ello que la selección de las plantas que expresaban mayor cantidad de antígeno se realizó evaluando la respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización con extractos de las plantas transgénicas. Los plasmas de los animales inmunizados fueron evaluados luego de la tercera, quinta y sexta inmunización. En el primer caso no hubo reactividad para ninguno de los dos antígenos utilizados en los ensayos de ELISA.

Luego de la quinta inmunización, solamente los ratones vacunados con extractos de las plantas A y C, transformadas con la contrucción pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C, generaron títulos altos de anticuerpos reaccionantes tanto con el péptido p135-160 como con partículas completas del VFA. Después de haber recibido seis inmunizaciones con los extractos de plantas, todos los animales desarrollaron anticuerpos específicos. Sin embargo, la respuesta observada entre los ratones inmunizados con una determinada planta no fue homogénea, a excepción de aquellos inmunizados con la planta A.

Las plantas conteniendo las construcciones que incluyen a P1 y 3C indujeron títulos de anticuerpos más elevados que aquellas transformadas con P1 solamente. Esto puede deberse a que P1 no es procesada ó es procesada incorrecta ó parcialmente adoptando una conformación en la cual sólo algunos de los epitopes responsables de inducir inmunidad se presentan correctamente.

Con el objetivo teórico de incrementar los niveles de expresión de proteína recombinante, las construcciones empleadas para evaluar la expresión y procesamiento de la poliproteína P1 fueron expresadas en el sistema de plantas bajo la dirección de un promotor 35S modificado que incluye dos copias de un enhancer transcripcional (pROK III) ó un elemento promotor/enhancer sin modificar (pROK II). Sin embargo, se observó que los animales inmunizados con las construcciones conteniendo el doble enhancer presentaron títulos de anticuerpos similares a aquellos de ratones inmunizados con las construcciones dirigidas por el promotor sin modificar. Resultados similares fueron obtenidos paralelamente en nuestro laboratorio al expresar la proteína VP1 en plantas de papa transgénicas (Carrillo y col., 2001). Estos resultados indirectamente indican que, bajo las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio, la expresión de las proteínas recombinantes no es cualitativamente diferente cuando la construcción genética contiene un único ó un doble enhancer transcripcional. Otros autores, sin embargo, mostraron que la expresión de VP60 del virus de la diarrea hemorrágica del conejo se vio incrementada cuando estaba dirigida por un promotor 35S modificado (Castañón y col., 1999).

La planta A, transformada con la construcción pROK II^{md}-P1.2A-2B-3C, indujo los títulos de anticuerpos más elevados (con respecto a las otras plantas) y la respuesta inmune más homogénea entre los individuos inmunizados. Además, la reactividad de los plasmas fue equivalente en los dos ensayos de ELISA realizados. El análisis inmunológico permitió, entonces, seleccionar a la planta A para estudiar la expresión de la poliproteína P1.

Aunque, como se mencionó anteriormente, las proteínas estructurales del VFA no

se pudieron detectar directamente por Western blot, se observaron ARNm específicos del tamaño esperado para P1 y 3C. Además, plasmas de animales inmunizados con extractos de la planta seleccionada reaccionaron específicamente con las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 del VFA indicando que tales proteínas estaban siendo expresadas en la célula vegetal. Los resultados obtenidos muestran, entonces, que P1 y 3C son expresadas en la planta A. De confirmarse, ésto indicaría que 3C se encuentra como proteasa activa y que realiza los clivajes proteolíticos en P1 para generar las proteínas estructurales que la conforman.

En la planta seleccionada, se detectaron, por ensayos de microscopía electrónica, partículas esféricas de aproximadamente 30 nm de diámetro similares a cápsides vacías del VFA. Sin embargo, la confirmación certera de que tales estructuras corresponden a cápsides del virus aftoso estará dada por ensayos de inmuno-microscopía electrónica. Los mismos se realizarán en el Plum Island Animal Disease Center de New York.

La expresión de la poliproteína P1 en alfalfa transgénica fue capaz de inducir,en ratones inmunizados con una vacuna formulada con extractos de la planta seleccionada, una respuesta de anticuerpos neutralizantes que protegieron totalmente a los animales frente al desafío con virus infeccioso. Estos resultados indican que los productos expresados en las plantas transgénicas conservan los epitopes protectores en el modelo murino. Se ha reportado la obtención de anticuerpos neutralizantes al inmunizar cobayos ó cerdos con P1.2A y 3C expresados en *E.coli*, baculovirus y adenovirus y protección parcial frente al desafío con virus infeccioso en cerdos (Roosien y col., 1990; Lewis y col., 1991; Grubaman y col., 1993; Mayr y col., 1999), aunque, la expresión de únicamente P1 en el sistema bacteriano es incapaz de inducir anticuerpos neutralizantes en cobayos y cerdos (Lewis y col., 1991; Grubman y col., 1993). En cambio, la poliproteína, en ausencia de 3C, expresada en baculovirus adopta una conformación tal que permite presentar los epitopes responsables de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, la expresión de P1 en los sistemas de adenovirus y virus vaccinia, no fue capaz de inducir anticuerpos neutralizantes en cobayos (Sanz-Parra y col., 1998), cerdos ó bovinos (Sanz-Parra y col., 1999 a y b), aunque en estos dos ultimos se logró protección parcial frente al desafío viral.

Este trabajo constituye uno de los pocos reportes donde se evalúa la inducción de anticuerpos neutralizantes y la protección generada por la inmunización con antígenos expresados en plantas. Mason y col. (1998) obtuvieron resultados de protección parcial en ratones alimentados con papas expresando la LT-B, luego de ser desafiados con la misma

toxina. Asimismo, sueros de ratones inmunizados oralmente con la TC expresada en papa, generaron neutralización *in vitro* y protección *in vivo* frente a la inoculación de la TC. Asimismo, Tuboly y col. (2000) detectaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes en cerdos inmunizados con extractos de tabaco expresando la proteína S del TGEV. Sin embargo, este trabajo de tesis constituye el primero donde se expresa establemente un antígeno complejo, el cual puede ser utilizado como inmunógeno experimental, protegiendo a los animales inmunizados frente a la infección viral.

Como ya se mencionó en la Introducción, aunque los resultados obtenidos por nuestro y otros grupos de investigación indican la factibilidad de utilizar plantas modificadas genéticamente como fuente de antígenos, uno de los principales problemas con este sistema es que los niveles de proteína expresada en las plantas transgénicas son relativamente escasos. De modo que el desarrollo de estrategias que generen una mayor producción de proteína recombinante es sumamente importante, especialmente cuando se desea utilizar los extractos vegetales sin ningún proceso de enriquecimiento y/o purificación. Existen distintos niveles en el desarrollo de una planta transgénica que podrían ser optimizados para mejorar la expresión de la proteína foránea. Entre ellos se encuentra el uso de potentes promotores constitutivos, enhancers transcripcionales y traduccionales y señales de poliadenilación adecuadas. Así, se ha reportado que la utilización de secuencias enhancer como el leader no traducido del TEV permite incrementar alrededor de tres veces la acumulación del antígeno, debido probablemente a una iniciación de la traducción más eficiente (Mason y col., 1992 y 1996). Se ha evaluado también la utilización de secuencias 3´ alternativas, puesto que la poliadenilación afecta la estabilidad del ARNm. Ritcher y col. (2000) obeservaron un aumento en la expresión del transgén al utilizar la secuencia 3´ del gen vsp (proteína de almacenamiento vegetativa) de soja ó un elemento 3´ del gen pin II (inhibidor de proteinasa de papa). El aumento de la estabilidad y vida media de la proteína expresada constituye un punto crítico, de modo que la utilización de secuencias señalizadoras que compartimentalicen la misma en distintas organelas celulares colaboraría con una incrementada producción de proteína recombinante (Schouten y col., 1996). Así, la direccionalidad y compartamentalización de la proteína en el retículo endoplásmico pueden favorecer la acumulación de la proteína recombinante. Además, permite que las modificaciones post-traduccionales como la glicosilación sean más eficientes. La secuencia de retención microsomal SEKDEL ha sido muy utilizada con tal objetivo y se ha logrado un aumento en la cantidad de antígeno producido con respecto a construcciones carentes de tal secuencia (Haq y col., 1995).

Asimismo, se han obtenido resultados similares al utilizar péptidos de señal clivables (Ritcher y col., 2000; Tuboly y col., 2000). Del mismo modo, la fusión del antígeno a una proteína normalmente sintetizada por la célula vegetal incrementa su expresión ya sea por aumento de la traducción del ARNm ó por estabilización del antígeno (La Valle y McCoy, 1995; Hondred y col., 1999, Tuboly y col., 2000). Otra alternativa posible consiste en modificar la secuencia nucleotídica del transgén adaptándola al uso de codones de plantas (Perlak y col., 1991; Rowendal y col., 1997), así como corregir posibles motivos desestabilizantes del ARNm, lo cual ha generado una mayor producción de ARN y proteína (Mason y col., 1998; Tuboly y col., 2000). Es interesante mencionar que, aunque cada una de las estrategias descriptas permite incrementar los niveles de expresión del transgén, el uso conjunto de algunas de ellas no ha elevado en forma aditiva la producción de proteína recombinante.

Dado que la inserción del transgén en el genoma vegetal es al azar, existen variaciones cuantitativas en los niveles de su expresión entre los individuos producidos (Peach y Velten, 1991). Una alternativa posible, entonces, consiste en poder identificar aquellos individuos que presentan niveles excepcionalmente altos de la proteína recombinante. Sin embargo, la identificación de aquellas plantas que expresan cantidades significativas de antígeno por métodos inmunológicos es muy laboriosa y lenta. Como alternativa, en este trabajo de tesis se propuso la utilización de genes reporteros asociados al antígeno que se desea expresar. La presencia y concentración del antígeno, entonces, pudo medirse a partir de la actividad del gen reportero. Esta estrategia se llevó a cabo utilizando el gen *gusA* fusionado al antígeno a ser expresado. La elección de este gen se basó principalmente en que *gusA* es establemente expresado en plantas y que el ensayo para medir su actividad es simple y altamente sensible. Por lo tanto, el uso de β-GUS permitió una selección sencilla y rápida de los transformantes con alto nivel de expresión.

A fin de evaluar el sistema de selección propuesto, utilizamos como antígeno un péptido que abarca los residuos 135 a 160 de la proteína VP1 del Virus de la Fiebre Aftosa para generar la proteína de fusión con la enzima β- GUS. El péptido p135-160 fue elegido como herramienta para evaluar la utilidad de la metodología propuesta debido a que nuestro grupo posee una significativa experiencia trabajando con el mismo (Zamorano y col., 1994, 1995 y 1998).

Utilizando esta metodología, fue posible seleccionar, mediante un ensayo enzimático simple, las plantas que presentaron mayores niveles de expresión de proteína

recombinante. Consistentemente con los valores obtenidos al evaluar la actividad enzimática, las plantas que presentaron mayor actividad β- GUS (Nº 5 y 29) fueron las que mostraron mayor reactividad en el ensayo de Western blot, donde se detectó la presencia del epitope p135-160. La importancia de este resultado radica, principalmente, en que fue posible detectar el antígeno expresado en las plantas transgénicas a partir de un extracto crudo de las mismas (sin mediar ningún protocolo de enriquecimiento o semipurificación del producto recombinante), mientras que, para muchos de los casos citados en la literatura especializada, esto se logra solamente luego de laboriosos pasos de purificación (Mason y col., 1992 y 1996; Thanavala y col., 1995).

Como se describió anteriormente, la inserción del transgén en el genoma vegetal es al azar, de modo que para poder detectar las plantas que expresan los niveles más elevados de antígeno es necesario contar con una población numerosa de plantas transgénicas. Posteriormente, una vez hecha la selección, se puede obtener un número grande de plantas por multiplicación vegetativa de la planta elegida. Esto presenta la ventaja adicional de crear una población homogénea para trabajar y es por ello que, en este trabajo de tesis, todos los ensayos inmunológicos se realizaron utilizando la planta que mostró los mejores niveles de expresión (planta Nº 5).

El péptido p135-160 es expresado, en la planta de alfalfa Nº 5, en niveles altos comparado con los niveles de expresión reportados para otros antígenos en diferentes plantas transgénicas (Mason y col., 1992, 1996 y 1998; Haq y col., 1995; Tackaberry y col., 1999; Ritcher y col., 2000; Tuboly y col., 2000). Asimismo, los niveles de p135-160 β-GUS en las plantas seleccionadas son, aproximadamente 10 veces mayores que los observados en plantas de alfalfa transgénicas previamente desarrolladas por nuestro grupo, expresando otras proteínas recombinantes. Este aumento en la expresión se vio, probablemente, favorecido por las modificaciones en el uso de codones que se realizó sobre la secuencia nativa de p135-160. En concordancia con esto, los títulos de anticuerpos alcanzados por ratones inmunizados con extractos de planta fueron marcadamente superiores a los obtenidos previamente en animales que recibieron VP1 expresada en alfalfa transgénica. Además, los títulos de anticuerpos alcanzados se lograron solamente con tres inmunizaciones de los ratones con una vacuna formulada con extracto de la planta seleccionada.

La expresión de la proteína de fusión en la planta Nº 5 se mantuvo estable durante un período de veintiséis meses en el que fue estudiado. Asimismo, no se encontraron cambios en los niveles de expresión de p135-160 β-GUS al evaluar catorce individuos

obtenidos por multiplicación vegetativa de la planta N° 5. Se debe recalcar que este es el primer reporte donde se evalúa la estabilidad de la expresión de un antígeno en plantas transgénicas. Estos resultados permiten, entonces, amplificar la población de plantas expresando altos niveles de proteína fusión sin que los mismos se vean afectados, lo cual es particularmente importante al momento de pensar en realizar ensayos de inmunización *oral*. Cabe aclarar que la planta N° 5 esta siendo segregada con el fin de evaluar en la progenie resultante de la reproducción sexual la estabilidad de la proteína de fusión.

El péptido p135-160 expresado como proteína de fusión con β-GUS conservó sus características inmunogénicas ya que ratones inmunizados con extractos de planta desarrollaron una importante respuesta de anticuerpos contra p135-160, contra VP1 y contra partículas virales completas. Además, los animales desarrollaron anticuerpos neutralizantes que los protegieron frente a la descarga con virus infeccioso. Estos resultados indican que p135-160 expresado como proteína de fusión con β-GUS presenta la misma efectividad, en cuanto a la inducción de una respuesta inmune protectora, que cuando es administrado como péptido sintético (Zamorano y col., 1995).

Los resultados presentados en esta parte del trabajo de tesis demuestran que la metodología desarrollada permite evaluar de un modo rápido, eficaz y sencillo un gran número de individuos a fin de seleccionar aquellos que presentan los niveles más altos de expresión de la proteína recombinante conteniendo epitopes virales inmunodominantes.

La demostración de que antígenos vacunales pueden ser producidos en plantas en su estructura nativa e inmunogénica abre un gran número de posibilidades para la elaboración de vacunas. Los resultados aquí presentados demuestran que es possible expresar en plantas de alfalfa transgénicas un antígeno complejo como lo es la poliproteína estructural del VFA. Sin embargo los niveles de expresión alcanzados son aún escasos. Es por ello que estamos estudiando distintas estrategias que permitan incrementar la cantidad de P1 producida. Entre ellas se encuentra la utilización de enhancers traduccionales como lo es la secuencia leader del TEV (tomato etch virus) y de promotores alternativos al CaMV 35S como aquéllos especificos de tejidos de especie vegetal.

Ambos temas incluidos en este trabajo de tesis están siendo continuados en nuestro laboratorio. En relación a la poliproteína P1 junto a 3C, actualmente se ha comenzado a estudiar la eficiencia de los productos expresados en ensayos de inmunización oral. Dado que las cápsides vacías del VFA son antígenos particulados, es de esperar que generen una buena estimulación del sistema inmune de mucosas.

En cuanto a la expresión del péptido p135-160 como proteína de fusión con la enzima β-glucuronidasa, esto nos permitió contar con una metodología sencilla para obtener plantas expresando altos niveles de proteína recombinante. Una vez evaluada la factibilidad de utilización de esta metodología empleando el péptido p135-160 del VFA como modelo, resultaba interesante aplicarla a otros sistemas virales. Es por ello que, nuestro grupo, en colaboración con el laboratorio del Dr. Jose Angel Martinez Escribano del INIA de España, expresó un epitope del Parvovirus Canino fusionado a β-GUS en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos corroboran los aquí presentados demostrando la utilidad de esta metodología de trabajo. Del mismo modo, siguiendo con esta linea de trabajo, nuestro grupo expresó un epitope de Rotavirus bovino como proteína de fusión con β-GUS en plantas de alfalfa. Nuevamente, los resultados obtenidos indican que la metodología desarrollada para seleccionar las plantas expresando los niveles más altos de antígeno es aplicable tanto a otros sistemas virales como a otras especies vegetales. Esta metodología abre, entonces, importantes posibilidades para el desarrollo de vacunas peptídicas en plantas transgénicas.

7. CONCLUSIONES

CAPITULO I

Se expresó la poliproteína precursora de las proteínas estructurales del VFA y la proteasa 3C en plantas de alfalfa transgénicas.

Se observaron partículas que por su morfología y tamaño podrían corresponder a cápsides vacías del VFA.

La poliproteína expresada en las plantas transgénicas conservó sus características inmunogénicas.

La respuesta inmune inducida por la vacunación resultó totalmente protectora frente al desafío con virus infeccioso.

Se logró expresar, en plantas de alfalfa transgénicas, un antígeno multiproteico complejo y eficiente inmunológicamente.

CAPITULO II

Se generaron plantas de alfalfa transgénicas expresando altos niveles de una proteína de fusión conteniendo la enzima β-glucuronidasa y el péptido p135-160 del VFA.

La expresión de p135-160 como proteína de fusión en plantas indujo una respuesta de anticuerpos protectora frente al desafío viral.

Se ha desarrollado una metodología que permite evaluar de un modo rápido, eficaz y sencillo un gran número de individuos a fin de seleccionar aquellos que presentan los niveles más altos de expresión de la proteína recombinante.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abrams, C. C.; King, A. M. Q. y Belshman, G. J. (1995). Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *Journal of General Virology.* **76**: 3089-3098.

Abu Elzein, E. M. E. and Crowther, J. R. (1981). Detection and quantification of IgM, IgA, IgG1 and IgG2 antibodies against FMDV from bovine sera using ELISA. J. *Hyg., Camb.* **86**: 79-85.

Acharya, R.; Fry, E.; Stuart, D.; Fox, G.; Rowlands, D. J. and Brown, F. (1989). The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature.* **337**: 709-716.

Alexander, H.; Koch; G.; Mountain; I.; Sprunt, K. and Van Sanme, O. (1958). Infectivvity of ribonucleic acid of poliovirus on Hella cell monolayers. *Virology*, **5**: 172-177.

Arakawa, T., Chong, D. K. X. y Langridge, W. H. R. (1998a). Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnology.* **16**: 292-297.

Arakawa, T., Jie Yu; Chong, D. K. X.; Hough, J.; Engen, P. C. and Langridge, W. H. R. (1998b). A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnology.* **16**: 934-938.

Arntzen, C. J., Mason, H. S., Shi, J., Haq, T. A., Estes, M. K. and Clements J. D (1994). Modern approaches to new vaccines including prevention to AIDS (Brown, F., Chanock, R. M., Ginsberg, H. S., Lerner, R. A., eds). pp 339-344, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bachrach, H. (1968). Foot and mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **97**: 659.

Bachrach, H.; Morgan, D. and Moore, D.; Mc Kercher, P.D. and Polatnik, J. (1975). Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot and mouth disease virus. *J. Immunol.* **115**: 1636-1641.

Bachrach, H. (1977). Foot and mouth disease virus: properties, molecular biology and immunogenicity. In: Romberger, Betsville Symposia in Agricultural Research I. Virology in Agriculture, 3-32. Ed. Allanheld-Osmiun, Montclair, NY.

Bachrach, H.; Morgan, D.; McKercher, P.D.; Moore, D.M. and Robertson, B.H. (1982). Foot-and-mouth disease virus: immunogenicity and structure of fragments derived from capside protein VP3 and of virus containig cleaved VP3. *Vet. Microb.* **7**: 85-86.

Barteling, S. and Vreeswijk, J. (1991). Developments in foot and mouth disease vaccines. *Vaccine.* **9**: 75-88.

Baxt, B.; Morgan, D.O.; Robertson, B.H.;Timpone, C.A. (1984). Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *J. Virol.* **51** (2): 298-305.

Baxt, B.; Vakharia, V.; Moore, D.M.; Franke, A.J. and Morgan, D. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **63**: 2143-2151.

Baxt, B.; Vakharia, V.; Moore, D.M.; Franke, A.J. and Morgan, D. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **63**: 2143-2151.

Beard, C.; Ward, G.; Rieder, E.; Chinsangaram, J.; Grubman, M. J. and Mason, P. W. (1999). Development of DNA vaccines for foot and mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J. Biotech.* **20** (73): 243-249.

Belsham, G. J. and Brangwyn, J. K. (1990). A region of the 5'noncoding region of foot and mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: Involvement with the role of L protease in translational control. *J. Virol.* **84**: 5389-5395.

Belsham, G. J.; Brangwyn, J. K.; Ryan, M. D.; Abrams, C. C. and King, A. M. Q. (1990). Intracellular expression and processing of foot and mouth disease virus capsid precursors using vaccinia virus vectors: influence of the L protease. *Virology.* **176**: 524-530.

Belsham, G. J.; Abrams, C. C.; King, A. M. Q.; Roosien, J. and Vlak, J. (1991). Myristoylation of foot and mouth disease virus capsid protein precursosrs is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J. Gen. Virol.* **72**: 751-758.

Belsham, G. J. (1993). Distinctive features of foot and mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **60**: 214-260.

Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sitcliffe, J. G. and Lerner, R. A. (1982). Protection against foot-and-mputh disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature.* **298**: 30-33.

Boothroyd, J.; Highfield, P.; Cross, G.; Rowlands, D.; Lowe, P.; Brown, F. and Harris, T. (1981). Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequence in the structural protein genes. *Nature.* **290**: 800-802.

Borca, M.; Fernández, F.; Sadir, A. and Schudel, A. (1984). Reconstitution of immunosuppressed mice with mononuclear cells from donors sensitized to foot and mouth disease virus (FMDV). *Vet. Microbiol.* **10**: 1-11.

Borca, M.; Fernández, F.; Sadir, A.; Braun, M. and Schudel, A. (1986). Immune response to foot and mouth disease virus in a murine model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology.* **59**: 261-267.

Burrows, R. (1968). Excretion of foot and mouth disease virus prior to the development of lesions. *Vet. Res.* **82**: 387.

Brennan, F. R., Jones, T. D.; Gilleland, L. B.; Bellaby, T.; Xu, F.; North, P. C.; Thompson, A.; Staczek, J.; Lin, T.; Johnson, J. E.; Hamilton, W. D. O. and Gilleland, H. E., Jr. (1999a). *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiology.* **145**: 211-220.

Brennan, F. R., Gilleland, L. B.; Staczek, J.; Bendig, M. M.; Hamilton, W. D. O. and Gilleland, H. E., Jr. (1999b). A chimeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection. *Microbiology.* **145**: 2061-2067.

Brown, F. (1992). Vaccination against foot and mouth disease virus. *Vaccine.* **10**: 1022-1026.

Burrows, R. (1966). Studies on the carrier state of catle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Journal of Higiene. Cambridge*. **64**: 81-90.

Burrows, R.; Mann, J.A.; Gariand, A.J.M.; Greig, A. and Goodridge, D. (1981) The pathogenesis of natural and simulated a natural foot and mouth disease infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* **91**: 599-608.

Carrillo, C.; Wigdorovitz, A.; Oliveros, J. C.; Zamorano, P.; Sadir, A. M.; Gomez, N.; Salinas, J.; Escribano, J. M. y Borca, M. V. (1998). Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 espressed in transgenic plants. *Journal of Virology*. **72**: 1688-1690.

Carrillo, C.; Wigdorovitz, A.; Trono, K.; Dus Santos, M. J.; Castañón, S.; Sadir, A. M.; Ordas, R.; Escribano, J. M. y Borca, M. V. (2001). Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunology*. **14**: 49-57.

Castañón, S.; Marín, M. S.; Martín Alonso, J. M.; Boga, J. M.; Casais, R.; Humara, J. M.; Ordas, R. J. y parra, F. (1999). Immunization with potato plants expressing VP60 proteins protects against rabit hemorragic disease virus. *Journal of Virology*. **73**: 4452-4455.

Chinsangaram, J.; Beard, C.; Mason, P. W.; Zellner, M. K.; Ward, G. and Grubman, M. J. (1998). Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot and mouth disease virus capsid proteins. *J. Virol.* **72** (5): 4454-4457.

Chow, M.; Newman, J. F. E.; Feiman, D.; Hogle, J. M.; Rowlands, D. J. and Brown, F. (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*. **237**: 482-486.

Clarke, B. E. and Sangar, D. V. (1988). Processing and assembling of foot and mouth disease virus proteins using subgenomic RNA. *J. Gen. Virol.* **69**: 2313-2325.

Collen, T.; Pullen, L. y Doel, T. R. (1989). T- cell dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *Journal of General Virology*. **70**: 395-403.

Collen, T.; and Doel, T. R. (1990). Heterotypic recognition of foot and mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **71**: 309-315.

Collen, T.; DiMarchi, R. and Doel, T. R. (1991). A T-cell epitope in VP1 of foot and mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *Journal of Immunology*. **146**: 749-755.

Collen, T. (1991). T cell response of cattle to foot-and-mouth disease virus. PhD thesis, CNAA/AFRC Institute of Animal Health. Pirbright Laboratory, Pirbright UK

Collen, T. and Doel, T. R. (1990). Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **71**: 309-315.

Colter, J.; Bird, H. and Brown, F. (1957). Infectivity of ribonucleic acid from ahrlich ascites tumor cells infected with mengoencephalitic. *Nature*. **179**: 859-892.

Costa Giomi, M. P.; Gomes, I.; Tiraboschi, B.; Mello, P.A.; Bergmann, I. E.; Scodeller, E. A.; La Torre, J. L. (1984). Heterogeneity of polyribocytidilic acid tract in aphthovirus: biochemical and

biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different length. *J. Virol.* **51**: 799-805.

Cottral, G.; Gallunas, P. and Cox, B. (1968). Foot and mouth disease virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. *Arch. Ges. Virusforsch.* **23**: 362-377.

Cunha, R.G.; Baptista J.A. (Jr); Serrao U.M.; Torturella I; (1957). El uso de los ratones lactantes en la evaluacion de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significacion inmunologica. *Gaceta Veterinaria.* **19**(110): 243-267.

Davis, H. L.; Michel, M. L. and Whalen, R. G. (1993). DNA based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Human Molec. Genet.* **2**: 1847-1851.

Devanney, M. A.; Vakharia, V. N.; Lloyd, R. E.; Ehrenfeld, E. and Grubman, M. J. (1968) Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavaje of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* **62**: 4407-4409.

DiMarchi, R.; Brooke, G.; Gale, C.; Crackneli, V.; Doel, T. and Mowat, N. (1986). Protection of cattle against foot and mouth disease by a synthetic peptide. *Science.* 232: 639-641.

Doel, T. R. and Chong, W. K. T. (1982). Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J. Virol.* **72**: 4454-4457.

Doel, T.; Gale, C.; Brooke, G. and DiMarchi, R. (1988). Immunization against foot and mouth disease with synthetic peptides representing the C-terminal region of VP1. *J. Gen. Virol.* **69**: 2403-2406.

Ellard-Ivey, M.; Hopkins, R. B.; White, T. J. y Lomaz, T. L. (1999). Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Mol. Biol.* **39**: 199-208.

Falk , M. M.; Grigera, P. R.; Bergmann, I. E.; Zibert, A.; Multhaup, G. and Beck, E. (1990). Foot and mouth disease virus proteinase 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J. Virol.* **64**: 748-756.

Fernandez. F.; Borca, M.; Sadir, A.; Fondevila, N.; Mayo, J. and Schudel, A. (1986). Foot and mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.***12**: 15-24.

Fitchen, J.; Roger, N.; Beachy, I. And Hein, M. B. (1995). Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine*, **13** (12): 1051-1057.

Forss, S.; Steble,K.; Beck, E.; Schaller, H.(1984). Nucleotide sequence and genome organization of Foot and mouth disease virus. *Nucleic Acic. Res.* **12**: 6587-6601.

Fox, G., Stuart, D., Acharya, R.K., Fry, E., Rowlands, D. and Brown, F. (1987). Crystalization and preliminary X-ray diffraction analysis of foot-and-mouth disease virus. *J. Mol. Biol.* **196**:591-597.

Fox, G.; Parry, N.; Barnett, P.; McGinn, B.; Rowlands, D. and Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot and mouth disease virus includes the amino acid sequence R-G-D (Arginine-Glycine-Aspartic acid). *J. Gen. Virol.* **70**: 625-637.

Francis, M.; Ouldrige, E.J. and Black, L. (1983) Antibody response in bovine pharyngeal fluid following foot and mouth disease virus disease vaccination and or exposure to lives virus. *Res. Vet. Sci.* **35** (2): 206-210.

Francis, M.; Fry, C.; Rowlands, D.; Brown, F.; Bittle, J.; Houghten, R. and Lerner, R. (1985). Immunological priming with synthetic peptides of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **66**: 2347-2354.

Fry, E., Logan, D.; Acharya, R.; Fox, G.; Rowlands, D.; Brown, F.; and Stuart, D. (1990). Architecture and topology af an aphtovirus. *Seminars in Virology.* **1**: 439-451.

Gallagher, S. R. (1992). The GUS assay. En "GUS protocols: Using GUS gene as a reporter gene expression". Ed Gallagher, S. R.

Golini, F.; Nomoto, A.; Wimmer, E. (1978). The genome-linked proteins of picornavirus I. Difference in the VPgs of encephallomycarditis virus and poliovirus as evidence that genome linked proteins are virus-coded. *Virology.* **89**: 112-118.

Gómez, N.; Carrillo, C; Parra, F.; Salinas, J.; Borca, M. V. y Escribano, J. M. (1998). Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from Transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology.* **249**: 352-358.

Gomez, N.; Wigdorovitz, A., Castanon, S.; Gil, F.; Ordas, R.; Borca, M. V. and Escribano J. M. (2000). Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch Virol.* **145(8)**:1725-1732.

Grubman, M.; Roberston, B.; Morgan, D.; Moore, D. and Dowbenko, D. (1984). Biochemical map of polypeptides specified by foot and mouth disease virus. *J. Virol.* **50**: 579-586.

Grubman, M. J.; Morgan, D. O.; Kendall, J. y Baxt, B. (1985). Capsid intermediates assembled ina a foot and mouth disease virus genome RNA-programmed cell-free translation system and in infected cells. *Journal of Virology.* **56**: 120-126.

Grubman, M. J.; Lewis, S. A. y Morgan, D. O. (1993). Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine.* **11**: 825-829.

Grubman, M.J.; Zellner, M.; Bablanian, G.; Mason, P. W. and Piccone, M. E. (1995). Identification of the active-site residues of the 3C proteinase of foot-and-mouth disease virus. *Virology.* **213**(2): 581-589.

Haq, T. A., Mason, H. S., Clements J. D. and Arntzen, C. J. (1995). Oral immunization with recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science.* **268**: 714-716.

Harris, T. J. R.; Brown, F. (1976). The location of poly (c) tract in the RNA of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **33**: 493-501.

Hijano, E. H. y Navarro, A. La Alfalfa en la Aregentina. INTA Subprograma Alfalfa

Hondred, D.; Walker, J. M.; Mathews, D. E. and Vierstra, R. D. (1999). Use of ubiquitin fusions to augment protein expression in transgenic plants. *Plant Physiology.* **119**: 713-723.

Ishitani, M.; Liu, J.; Halfter, U.; Kim, C.; Shi, W. y Zhu, J. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant Cell.* Vol 12: 1667-1677.

Jensen, M. and Moore, D. (1993). Phenotypic and functional characterization of mouse attenuated and virulent variant of foot and mouth disease virus type O1Campos. *Virology.* **193 (2)**: 604-613.

Jiang, X.; Wang, M.; Graham, D. Y. and Estes, M. K. (1990). Expression self-assembly and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* **66**: 6527-6532.

Johnson, D. R.; Bhatnagar, R. S.; Knoll, L. J. y Gordon, J. I. (1994). Genetic and biochemical studies of protein N-myrisoylation. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 869-914.

Kapikian, A. Z.; Estes, M. K. and Chanok, R. M. (1996) in *Fields Virology*, eds. Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howlsy, P. M.; Chanok, R. M.; Melnick, J. L.; Monath, T. M.; Roizman, B. and Strauss, S. E. (Raven, Neuw York), pp. 783-810.

Kapusta, J.; Modelska, A.; Figlerowicz, M.; Pniewski, T.; Letellier, M.; Lisowa, O.; Yusibov, V.; Koprowski, H.; Plucienniczak, A. and Lecocki, A. (1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J.* **13 (13)**: 1796-1799.

Khun, R., Luz, N. and Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal initiation site of foot and mouth disease virus. *J. Virol.* **64**: 4625-4631.

Kitamura, N.; Sembler, B.; Rothberg, P.; Larsen, G.; Adler, C.; Dorner, A.; Emini, E.; Hanekac, R.; Lee, J.; van der Wert, S.; Anderson, C. and Winmer, E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide repression of poliovirus RNA. *Nature.* **291**:547-553.

Kitson, J. D. A.; Mc Cahon, D. and Belsham, G.J. (1990). Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology.* **179**: 26-34.

Komari, T y Kubo, T (1999) I. K. Vasil (ed), Molecular. Improvment of cereal crops, 43-82. Kluwer Academic publishers.

Knudsen, R.; Groocock, C. and Andersen, A. (1979). Immunity to foot and mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune response. *Infect. Immunol.* **24**: 787-792.

La Valle, E. R. And McCoy, J. M. (1995). Gene fusion expresión systems in *Escherichia coli. Curr. Opin. Biothecnol.* **6**: 501-506.

Lea, S.; Hernandez, J.; Blakemore, W.; Broccho, E.; Curry, S.; Domingo, E.; Fry, E.; Abu-Ghazaleh, R.; King, A.; Newman, J.; Stuart, D. and Mateu, M.G. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Stucture.* **2**: 123-139.

Lee, F. Y.; Nomoto, A.; Detjen, B. M.; Wimmer, R. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 59-63.

Lee, W.; Monroe, S. and Rueckert, R. (1993). Role of maturation cleavage in infectivity of picornavirus: activation of an infectosome. *J. Virol.* **67**: 2110-2122.

Lewis, S. A., Morgan, D. O. and Grubman, M. J. (1991). Expression, processing and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: Induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J. Virology*. **65**: 6572-6580.

Lindzen, E. y Choi, J. H. (1995). A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* **28**: 785-797.

Loh, Y. T.; Zhou, J. and Martin, G. B. (1998). The myristoylation motif of Pto is not required for disease resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 572-576.

Lopez, O.; Sadir, A.; Borca, M.; Fernández, F.; Braun, M. and Schudel, A. (1990). Immune response to foot and mouth disease virus in an experimental murine model II: Basis of persistent antibody reaction. *Vet. Immunol. Immunophathol.* **24**: 313-321.

Mason, H. S., Lam, D. M-K. and Arntzen, C. J. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 11745-11749

Mason, H. S.; Ball, J. M.; Jian-Jian Shi; Xi Jiang; Estes, M. K.y Arntzen, C. J. (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 5335-5340.

Mason, H. S.; Haq, T. A.; Clements, J. D. y Arntzen, C. J. (1998). Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*. **16**(13): 1335-1342.

Mateu, M. G.; Martínez, M. A.; Rocha, E.; Andreu, D.; Parejo, J.; Giralt, E.; Sobrino, F. and Domingo, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 5883-5887..

Mateu, M. G.; Martínez, M.A.; Capucci, L.; Andreu, D.; Giralt, E.; Sobrino, F.; Brocchi, E. and Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. Gen. Virol.* **71**: 629.

Matthews, R. E. F. (1983). Classification and nomenglature of viruses. *Intervirology*. **17**: 1-999.

Mayr, G. A.; Chinsangaram, J. and Grubman, A. J. (1999). Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*. **263**: 496-506.

Mc Cullough, K. C.; Crowther, J. R.; Butcher, R. N.; Carpenter, W. C.; Brocchi, E.; Capucci, L. y de Simone, F. (1986). Immune protection against foot-and-mouth disease virus using neutralizing and nonneutralizaing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology*, **58**: 421-428.

Mc Cullough, K. C.; Parkinson, D. y Crowther, J. R. (1988). Opsonization-enhaced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, **65**: 187-191.

Mc Cullough, K. C.; De Simone, F.; Brocchi, E.; Capucci, L.; Crowther, J. R. and Khim, U. (1992). Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.* **66** (4): 1835-1840.

Mc Garvey, P. B.; Hammond, J.; Dienelt, M. M.; Craig Hooper, D.; Zhen Fang Fu; Dietzschold, B.; Kprowski, H. and Michaels, F. H. (1995). Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology.* **13**: 1484-1487.

Mc Kersie, B. D.; Chen, Y.; de Beus, M. y bowley, S. R. (1993). Superoxide dismutase enhyaces tolerance of freesing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L). *Plant Physiology.* **103**: 1155-1163.

McVicar, J. M.; Sutmoller, P. (1970). Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.* **92**: 273-278.

McVicar, J.W. and Sutmoller, P. (1976) Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non immunized and recovered cattle after intrabasal inoculation. *J. Hyg. (Camb)* **76**: 467-481.

Medina, M.; Domingo, E.; Brangwyn, J. and Belshman, G. (1993). The two species of foot and mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology.* **194**: 355-359.

Mendel, R.; Müller, B.; Schulze, J; Kolesnikov, V. and Zelenin, A. (1989). Delivery of foreing genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theor. Appl. Genet.* **78**: 31-34.

Moloen, R. H. and Barteling, S. J. (1986). An epitope located at the C-terminus of isolated VP1 of foot-and-mouth disease virus O induces neutralizing activity but poor protection. *J. Gen. Virol.* **67**: 289-294.

Morgan, D and Moore, D. (1990). Protection of cattle and swine against foot and mouth disease with byosinthetic peptide vaccine. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 40-45.

Mulchay, G.; Gale, C.; Robertson, P.; Iylsan, S.; Dimarchi, R.D. and Doel T. (1990). Isotype responses of infected, virus vaccinated and peptide vaccinated cattle to Foot and mouth disease virus. *Vaccine.* **8** (3): 249-256.

Outlaw, M. C. and Dimmock (1991). Insights into neutralization of animals viruses gained from the study of influenza virus. *Epidemiol. Infect.* **106**: 205-220.

O´Brien, G. J., Bryant, C. J., Voogd, Ch., Greenberg, H. B., Gardner, R. C. y Bellamy, A. R. (2000). Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into viruslike particles. *Virology.* **270**: 444-453.

Parry, N. P.; Fox, G.; Rowlands, D.; Brown, F.; Fry, E.; Acharya, R.; Logan, D. and Stuart, D. (1990). Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foor and mouth disease virus. *Nature.* **347**: 569-572.

Pay, T.W.F.; Hingley, P.H.; Radlett, P.J.; Black, L. and O'Reilly, K.J. (1988) The correlation of 140 S antigen dose with the serum neutrslizing antibody response and with protection from challenge induced by FMD vaccine. Sess. Res. Group Stand Tech. Comm. Eur. Commission Cont. FMD. (lelystad, Netherlands) FAO, Rome, p. 52.

Peach, C. and Velten, J. (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol. Biol.* **17**: 49-60.

Pereda, A.; König, G.; Chimeno, S.; Borca, M.; Palma, L and Piccone, M. Full length nucleotide sequence of foot and mouth disease virus strain O1Campos. *Virus gene* (enviado).

Pereira, H.G. (1981). Foot and mouth disease. Virus disease of food animals. E.*P.J. Academic Press.* **2**: 333.

Perez-Filguelra. M.; Wigdorovitz, A.; Romera, A.; Zamorano, P.; Borca, M. And Sadir, A. (2000). Detection and characterization of functional T-cell epitopes on the structural proteins VP2, VP3 and VP4 of foot and mouth disease virus O1Campos. *Virology.* **271**: 234-239.

Piatti, P.; Berinstein, A.; López, O.; Borca, M.; Fernández, F.; Schudel, A. and Sadir, A. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot and mouth disease virus in mice. *J. Gen. Virol.* **72**: 1691-

Piccone, M.; Zellner, M.; Kumosinski, T.; Mason, P. and Grubman, M. (1995). Identification of the active site residues of the L proteinase of foot and mouth disease virus. *J. Virol.* **69** (8): 4950-4956.

Prato Murphy, M.L.; Meyer, R.F.; Mebus, C.; Schudel, A.A. and Rodriguez,M. (1994). Analysis of the sites of foot and mouth disease virus persistence in carrier state via the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* **136**: 299-307.

Prota, C.; Spall, V. E.; Loveland, J.; Johnson, J.; Barker, P. and Lomonossoff, G. P. (1994). Development of cowpea mosaic virus as a high-tielding system for the presentation of foreing peptides. *Virology.* **202**: 949-955.

Prota, C.; Spall, V. E.; Lin, T.; Johnson, J. E. and Lomonossoff, G. P. (1996). The development of cowpea mosaic virus as a potential suerce of novel vaccines. *Intervirology.* **39**: 79-84.

Ptaff, E. M.; Mussgay, H. O.; Boehm, G. E.; Schulz and Scaller, H. (1982). Antibodies against a preselected paptide recogniza and neutralize foot-and-mouth disease virus. *EMBO J.* 1: 869-874.

Ritcher, L. J.; Thanavala, Y.; Arntzen, C. J. and Mason, H. S. (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology.* **18**: 1167-1171.

Rommens, C. M.; Salmeron, J. M.; Baulcombe, D. C. and Staskawicz, B. J. (1995). Use of a gene expression system based on potato virus X to rapidly identify and characterize a tomato Ptop homolog that controls fenthion sensitivity. *Plant Cell.* **7**: 249-257.

Roosien, J., Belshman, G. J., Ryan, M. D., King, A. M. Q. and Vlak, J. M. (1990). Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insected cells using baculovirus expression vectors. *J. Gen. Virol.* **71**: 1703-1711.

Rowlands, D. J.; Sangar, D. V. and Brown, F. (1975). A comparative chemical and serological study of full and empty particles of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **60**: 376-384.

Rweyemamu, M. M.; Terry, G. y Pay, T. W. F. (1979). Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* **59**: 69-79.

Roewlands, D. J., Sangar, D. V. and Brown, F (1975). A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **26**: 227-238.

Rueckert, R. (1996). *Picornaviridae*: The viruses and their replication. En "Fundamental Virology". Ed. Fields, B.; Knipe, D. M. and Howley, P. M. Lippincott-Raven press, N.Y.

Rueckert, R. and Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J. Virol.* **50**:957-959.

Rweyemamu, M. M.; Terry, G. y Pay, T. W. F. (1979). Stability and Immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* **59**: 69-79.

Sadir, A.M.; López, O.J.;Marcovecchio, F.M., Tiraboschi, B.; Bergmann, I.; La Torre, J.L. and Schudel, A.A. (1988). Response to foot and mouse disease vaccines in newborn calves. Influence of age, calostral antibodies and adjuvants. *Epidem. Inf.* **100**: 135-144.

Saiz, J. C.; Gonzalez, M.J.; Borca, M.V.; Sobrino, F. and Moore, D.M. (1991). Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 foot-and-mouth disease virus, defined by neutralization-resistant variants. *J.Virol.* **65**: 2518-2524.

Sáiz, J. C.; Rodriguez, A.; González, M.; Alonso, F. y Sobrino, F. (1992). Heterotypic linphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvment of isolated capsid proteins. *J. Gen. Virol.* **73**: 2601-2607.

Sáiz, J. C., Cairó, J., Medina, M., Zuidema, D., Abrams, C., Belshman, G. J., Domingo, E. and Vlak, J. (1994). Unprocessed foot-and-mouth disease virus capsid precursor displays discontimuous epitopes involved in viral neutralization. *J. Virol.* **68** (7): 4557-4564.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). En "Molecular cloning: a laboratory manual". Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sangar, D. (1979) The replication of picornaviruses. J. Gen. Virol. **45**: 1-13.

Sanz-Parra, A.; Blasco, R.; Sobrino, F. and Ley, V. (1998). Análisis of the B and T cell response in guinea pigs induced with recombinant vaccinia expressing foot and mouth disease virus structural proteins. *Arch. Virol.* **143**: 389-398.

Sanz-Parra, A.; Vazquez, B.; Sobrino, F.; Cox, S. J.; Ley, V. and Salt, S. (1999a). Evidence of partial protection against foot-and-mouth disease in cattle immunized with a recombinant adenovirus vector expressing the precursor polypeptide (P1) of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J. Gen. Virol.* **80**: 671-679.

Sanz-Parra, A.; Jimenez-Clavero, M. A.; García-Briones, M. M.; Bianco, E.; Sobrino, F. and Ley, V. (1999b). Recombinant viruses expressing foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but nor humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. *Virology*, **259**: 129-134.

Schudel, A.A.; Fernandez, F.F. and Sadir, A,M. (1993). Fiebre Aftosa. Actualización. *Therios.* **21**: 105-120.

Scott, F.W.; Cottral, G.E. and Gailiunas, P. (1986). Persistence of FMDV in external lession and saliva of experimentaly infected cattle. *Am. J. Veterinary Research.* **27**: 1531-1536.

Sellers, R.F.; Parker, J. (1969). Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Higiene*, Cambridge. **67**: 671-677.

Sellers, R.F. (1971). Quantitative aspects of the spread of foot and mouth disease. *Vet. Bull.* **41**: 431.

Semler, B.; Anderson, C.; Kitamura, N; Rothkerg, P.; Wishart, W. and Wimer, E. (1981). Poliovirus replication protein: RNA sequence encoding P3-1b and the sites of proteolitic processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 3464- 3468.

Shetty, K. and McKersie, B. D. (1993). Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L). *Plant. Sci.* **88**: 185-193.

Strebel, K. and Beck, E. (1986). A second protease of foot and mouth disease virus. *J. Virol.* **58**: 893-899.

Subak-Sharpe, H. (1961). The effect of passage, history, route of inoculation, virus strain and host strain on susceptibility of adult mice to the virus of foot and mouth disease. *Arch. Ges. Virusforsch.* **3**: 373.

Subak-Sharpe, H.; Pringle, C. and Hollom, S. (1962). Factors influencing the dynamics of multipilcation of foot and mouth disease virus in adult mice. *Arch. Ges. Virusforsch.* **5**: 600.

Tackaberry, E. S.; Dudani, A. K.; Prior, F.; Tocchi, M.; Sardana, R.; Altosaar, I. and Ganz, P. R. (1999). Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine.* **17**: 3020-3029.

Tacket, C. O.; Mason, H. S.; Losonsky, G.; Clements, J. D.; Levine, M. M. y Arntzen, C. J. (1998). Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Medicine.* **4**: 607-609.

Tacket, C. O.; Mason, H. S.; Losonsky, G.; Estes, M. K.; Levine, M. M. and Arntzen, C. J. (2000). Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* **182** (1): 302-305.

Thanavala, Y. F., Yang, P., Lyons, H. S. and Arntzen, C. J. (1995). Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3358-3361.

Thomas, A.; Woortmeijer, P.; Puijk, W. and Bartelling, S. (1988). Antigenic sites on foot and mouth disease virus type A10. *J. Virol.* **62**: 2782-2789.

Tuboly, T.; Yu, W.; Bailey, A.; Degrandis, S.; Du, S.; Erickson, L. and Nagy, E. (2000). Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine.* **18**: 2023-2028.

Turpen, T. H.; Reini, S. J.; Charonenvit, I.; Hoffman, S. L.; Fallarme, V. and Grill, L. K. (1995). Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Biotechnology.* **13**: 53-57.

Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; Parker, S. E.; Rhodes, G. H.; Feigner, P. L.; Dwarki, V. J.; Gromkowski, S. H.; Deck, R. R.; DeWitt, C. M.; Friedman, A.; Hawe, L. A.; Leander, K. R.;

Martinez, D.; Perry, H. C.; Shiver, J. W.; Montgomery, D. L. and Liu, M. A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. **259**: 1745-1749.

Usha, R.; Rohll, J. B.; Spall, V. E.; Shanks, M.; Maule, A. J.; Johnson, J. E. and Lomonossoff, G. P. (1993). Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology*. **197** (1): 366-374.

Vakharia, V. N.; Devaney, J.; Wimmer, E.; Studier, F. W. and Dunn, J. J. (1987). Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus jpolyproteins expressed in a cell free system from cloned-derived transcripts. *J. Virol*. **61**: 3199-3207.

Van der Wonde, G.; Swaney, J.; and Bachrach, H. (1972). Chemical and physical properties of Fooot and Mouth disease virus: a comparison with Maus Elberfeld virus. *Biochimical and Biophysical Research Communications*. **8**: 1222-1229.

Wang, B.; Ugen, K. E.; Srikantin, V.; Agadjanyan, M. G.; Dang, K.; Rafaeli, I.; Sato, A. I.; Boyer, J.; Williams, W. V. and Weiner, D. B. (1993). Gene inoculation generates immune responses against immunodeficiency virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 4156-4160.

Wada, K.; Aoia, S.; Isuchiya, R.; Ishibashi, F.; Gojobori, T. E Ikemura, T. (1990). Codon usage tabulated from de GeneBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Research*. **18** (Suppl): 2367-2411.

Wen-Jun, S. y Forde, B. G. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Research*. **17**: 8385

Wigdorovitz, A.; Carrillo, C.; Dus Santos, M. J.; Trono, K.; Peralta, A.; Gomez. M. G.; Ríos, R. D.; Franzone, P. M.; Sadir, A. M.; Escribano, J. M. y Borca M. V. (1999). Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunized with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, **255**: 347-353.

Wigdorovitz, A.; Carrillo, C.; Dus Santos, M. J.; Trono, K.; Peralta, A.; Gomez. M. G.; Ríos, R. D.; Franzone, P. M.; Sadir, A. M.; Escribano, J. M. y Borca M. V. (2000).

Winans, S. C. (1992). Two way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interaction. *Microbiology review*, **56**: 12-31.

Winther, M.; Allen, G.; Bomford, R. and Brown, F. (1988). Bacterially expressed antigenic peptide from foot and mouth disease virus capside elicits variable immunologic response in animals. *J. Immunol*. **136**:1835.

World Health Organization (1998). The Worlk Health Report 1998. Excecutive summary: life in the 21st century-avision for all.

Xie, Q. C.; Mc Cahon, D.; Crowter, J.R.; Belsham, G.J. and Mc Cullough, K.C. (1987). Neutralization of foot and mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J.Gen. Virol*. **68**: 1637-1647.

Yu, J. and Langridge, W. (2001). A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotech*. **19**: 548-552.

Yusibov, V.; Modelska, A.; Steplewski, K.; Agadjayan, M.; Weiner, D.; Hooper, D. G. and Koprowski, H. (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc. Natl. Adad. Sci. USA*. **94**: 5784-5788.

Zamorano, P.; Wigdorovitz, A.; Chaer, M.; Fernandez, F. M.; Sadir,A. M. and Borca, M. (1994). Localization of B and T cell epitopes on a synthetic peptide containing the major immunogenic site of FMDV O1 Campos. *Virology*. **201:** 383-390.

Zamorano, P.; Wigdorovitz, A.; Pérez-Filgueira, M.; Carrillo, C.; Escribano, J. M.; Sadir, A. M.; Borca, M. V. (1995). A 10 amino-acid linear sequence of VP1 of foot and mouth disease virus (FMDV) containing B and T-cell epitopes induces protection in mice. *Virology*. **212**: 614-621.

Zamorano, P.; Wigdorovitz, A.; Pérez-Filgueira, M.; Carrillo, C.; Escribano, J. M.; Sadir, A. M.; Borca, M. V. (1998). Induction of anti foot and mouth disease virus T and B cell responses in cattle immunized with a peptide representing ten amino acids of VP1. *Vaccine*. **16**(6): 558-563.

Zupan, J. R. y Zambryski, P (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to plant cell. *Plant Physiology*, **107**: 1041-1047.