

99



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

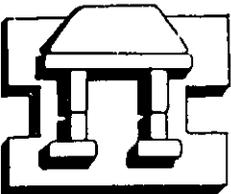
"DETECCION DE LA EXPRESION TRANSITORIA  
DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA COLERICA  
EN PROTOPLASTOS DE ZANAHORIA  
(*Daucus carota* L. VAR. NANTES)"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A  
**GERARDO PEREZ RAMIREZ**

291674

DIRECTOR DE TESIS: DR. RUBEN LOPEZ REVILLA



IZTACALA

MEXICO, D.F.

MARZO 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala**

**Tesis**

**“Detección de la expresión transitoria de la subunidad  
B de la toxina colérica en protoplastos de zanahoria  
(*Daucus carota* L. Var. Nantes)”**

**Gerardo Pérez Ramírez**

9030542-5

Generación 94-97

Santa Rita Núm. 42

Col. Molino de Santo Domingo

Del. Álvaro Obregón

C.P. 01130

Tel: 5273-1422

e-mail: [gperez@cell.cinvestav.mx](mailto:gperez@cell.cinvestav.mx)

**Director de Tesis.**

**Dr. Rubén López Revilla**

**Profesor Titular**

**Depto. Biología Celular**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 17 y bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla, Profesor Titular, Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres:

**Doña Emma Ramírez Sánchez y Don Julián Pérez Nieto**

"Gran parte de mi forma de ser es reflejo de ustedes dos, gracias por enseñarme a luchar y siempre dar la cara de frente a la vida. Este trabajo es sólo es comienzo de lo que ustedes echaron a andar"

A mis hermanos:

**María, Concepción, Lucía, Cristina, Alfredo, Jesús, Luis, José y muy especialmente a Alejandro (gracias por tanto apoyo).**

"Este trabajo tiene un poco de todos ustedes"

A mis sobrinos:

**David, Sandra, Luis, Claudia, Andrea Mayra, Ismael, Ana, Martha, Laura, Iván, Daniel, Cristian, Erika, Sebastian y Eduardo**

"Espero nunca decepcionarlos"

**A Francis.**

"No se como lo hiciste pero ahora eres una parte muy importante de mi vida, gracias por estar siempre a mi lado"

A la memoria de:

**Estefania Torres Pérez y Brayan Pérez Bustamente**

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Rubén López Revilla** por las varias enseñanzas y asesorías, la paciencia, el apoyo y confianza que me dio durante la realización de este trabajo. Gracias sobre todo por la gran motivación para seguir trabajando en esta actividad.

Al **M. en C. José Luis Sánchez Vargas** por la asesoría y confianza que me brindó durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por la oportunidad que me dio de ingresar a este proyecto.

A la **Dra. Ana Ramos** por la facilitación del equipo para el mantenimiento del cultivo celular de zanahoria.

Al **M. en C. Eduardo Valencia** por la asesoría en el desarrollo de los cultivos celulares de zanahoria.

A la **M. en C. Roxana Malpica** por toda la ayuda recibida al iniciar este trabajo.

A la **Ing. Biotec. Rocio Huerta** por la ayuda otorgada durante el montaje de la técnica de ELISA competitivo.

A los miembros del laboratorio 17 de Biología Celular **Lucia Chávez, Carlos Zarate, Leticia Neri, Alain Rodriguez, Magdalena Rodriguez, Cesárea Bermúdez, Augusto Figeroa** y **Crisoforo Mercado** por la ayuda técnica y humana recibida.

A mis amigos de Licenciatura: **Laura e Israel, Rosa Isela y Mauricio, Araceli y Jorge, Claudia y Joel, Nicolar, Yadira, Ana, Lauro, Eugenia Guadalupe y José Juan** por los muchos momentos que valieron la pena, por su amistad.

A la generación 1999-2001 del Departamento de Biología Celular de CINVESTAV: **Rubén, Miguel, Sandra, Yenia (La pandilla), Cristina Yessenia Julio, Moises, Nidia y Alejandra** por su amistad y apoyo.

## INDÍCE

<b>Dedicatorias</b>	<b>3</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>4</b>
<b>Lista de tablas y figuras</b>	<b>6</b>
<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>8</b>
<b>Justificación</b>	<b>13</b>
<b>Objetivos</b>	<b>14</b>
<b>Estrategia experimental</b>	<b>15</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>16</b>
<b>Resultados</b>	<b>27</b>
<b>Discusión</b>	<b>41</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>44</b>
<b>Referencias</b>	<b>45</b>

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados	22
Tabla 2. Actividad específica de GUS en lisados de células de zanahoria transformadas con pBI426	37
Figura 1. Genes de interés en las construcciones de los plásmidos empleados	23
Figura 2. Cinética de $\beta$ -glucuronidasa de <i>E. coli</i> K12	24
Figura 3. Curva patrón de proteínas con el método de Bradford	25
Figura 4. Curva patrón de CTX por ELISA competitivo	26
Figura 5. Células de zanahoria teñidas con diacetato de fluoresceína (FDA)	30
Figura 6. Viabilidad de las células de zanahoria después del tratamiento con PEG, electroporación o ambos	31
Figura 7. Permeabilización de las células de zanahoria tratadas con PEG, electroporación o ambos	32
Figura 8. Expresión de GFP en células de zanahoria transformadas por pCAMBIA1302 mediante tratamiento con PEG, electroporación o ambos	33
Figura 9. Células de zanahoria transformadas por pCAMBIA1302 o pCAMBIA1304 que expresan la proteína verde fluorescente (GFP)	34
Figura 10. Expresión de GFP en células de zanahoria transformadas por pCAMBIA1302 o pCAMBIA1304	35
Figura 11. Viabilidad y expresión de GFP en células de zanahoria a diferentes tiempos después haber sido transformadas por pCAMBIA1304 mediante tratamiento con PEG 12% y 0.75 kV/cm <sup>2</sup>	36
Figura 12. Actividad específica de GUS en lisados de células de zanahoria transformadas con pCAMBIA1304	38
Figura 13. Célula de zanahoria que expresa $\beta$ -glucuronidasa después de haber sido transformada por pCAMBIA1304	39
Figura 14. Expresión de $\beta$ -glucuronidasa en células de zanahoria	40

## RESUMEN

El desarrollo de la biotecnología de plantas ha abierto la posibilidad de obtener vegetales de consumo humano que expresen proteínas de interés médico y puedan ser utilizadas como vacunas comestibles. El cólera, una de las enfermedades que puede ser prevenida con vacunas comestibles, es causado por *Vibrio cholerae*. Las bacterias de esta especie colonizan el intestino humano, donde liberan la toxina colérica (CT) causante de la drástica deshidratación en los enfermos de cólera. La CT es una proteína de subunidades; la subunidad A (CTA) provoca el desequilibrio iónico e induce salida de agua de las células intestinales, mientras que la subunidad B (CTB) forma un pentámero que ancla la toxina a la membrana apical de las células intestinales. CTB es un inmunógeno muy potente que protege contra el cólera y por ello es candidato para transformar plantas con su gen (*ctxB*) y crear vacunas comestibles. En este trabajo tratamos de obtener transformantes transitorios que expresen *ctxB* en células de zanahoria como un paso preliminar al desarrollo de una vacuna comestible contra el cólera basada en zanahorias. Para lograrlo montamos y comparamos los métodos de transformación de células de zanahoria en cultivo por electroporación, polietilenglicol y una combinación de ambos, y detectamos la expresión transitoria de los genes reporteros de la proteína verde fluorescente (GFP) y  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). No hubo diferencias notables en la eficiencia de transformación con los diferentes métodos y la máxima expresión de los reporteros ocurrió entre las 24 h y las 48 h, pero los vectores usados no permitieron la expresión de niveles detectables de CTB en los lisados de células transformadas.

## INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad infecciosa que ha provocado pandemias recurrentes desde 1817. Su agente etiológico es *Vibrio cholerae* del serotipo O1. El biotipo clásico ha causado seis pandemias y el biotipo El Tor es el causante de la última pandemia (Arakawa et al. 1998; Watnick et al. 1999).

Al principio de la década de 1960, surgió la última pandemia en el suroeste de Asia, se extendió hasta el medio oriente de África y llegó a América después de 100 años de ausencia de cólera. La cepa de *V. cholerae* El Tor surgió en Perú en 1991 y se extendió a todo el continente rápidamente; hubo 100,000 casos de cólera entre 1991 y 1992 desde México hasta Perú (Arakawa et al. 1998; Michalski et al. 1993; Taylor et al. 1994).

*V. cholerae* es una especie bacteriana gram-negativa marina que se ha adaptado a ambientes estuarinos y de agua dulce (Watnick et al. 1999). Cuando es ingerida por el hombre puede infectar el intestino y liberar factores de virulencia que causan la enfermedad, caracterizada principalmente por una drástica diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza y fiebre (Sánchez et al. 1990).

La deshidratación provocada por la toxina colérica (CT) puede llegar a ocasionar la muerte (Sánchez et al. 1990). La CT tiene más de 77% de homología con la toxina termolábil de *E. coli* enteropatógena en su secuencia de aminoácidos y de nucleótidos (Connell et al. 1995). Es una proteína compleja formada por dos subunidades: una subunidad A (CTA) simple con peso molecular de 28,000 y un pentámero de subunidades B (CTB) cada una con un peso molecular de 11,600. CTA es el agente efector que causa la salida de agua en el intestino y CTB ancla la toxina en las células blanco (Sánchez et al. 1990).

CTB está arreglada como un anillo en el cual está parcialmente insertada la CTA. La interacción entre los monómeros de CTB es no covalente y muy estable. Su principal receptor es

el gangliósido GM1, al cual tiene gran afinidad (constante de disociación de  $7.3 \times 10^{-10}$ ) (Williams et al. 1999).

CTA puede ser cortada fácilmente en dos fragmentos, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, asociados por un enlace disulfuro. El fragmento A<sub>2</sub>, adaptador a la subunidad B, tiene la secuencia líder KDEL. El fragmento A<sub>1</sub> es una ADP-ribosiltransferasa que provoca el flujo de Cl<sup>-</sup> mediante ribosilación de la G<sub>sa</sub>, cuya activación debida a esta modificación permite que la adenilato ciclasa se mantenga permanentemente activa y aumente el nivel intracelular del AMPc, que a su vez activa a la proteína cinasa A (PKA) para fosforilar y abrir los canales reguladores de Cl<sup>-</sup> de la fibrosis quística. El flujo de Cl<sup>-</sup> hacia la luz del intestino conlleva a un movimiento osmótico de agua que provoca la diarrea (Williams et al. 1999)

### **Vacunas contra el cólera**

La CT por sí sola provoca una fuerte respuesta inmunitaria en ratones y tiene gran capacidad adyuvante. Cuando se administran CTA o CTB oralmente activan la inmunidad de mucosas e inducen niveles altos de IgA secretoria capaz de proteger contra la infección por *V. cholerae* o *E. coli* enterotoxigénica (Williams 1999).

Las vacunas de subunidades con CTB o CTA generan buena respuesta inmune y pueden disminuir la diarrea en enfermos de cólera que fueron inmunizados previamente con estas subunidades; sin embargo, en ellos persisten síntomas como la fiebre y el dolor abdominal ya que no hay inmunidad contra otros factores de virulencia.

A principios de la década de 1980 se generaron varias cepas de *V. cholerae* con diversos genes de virulencia deletados o inactivados como posibles cepas vacunales (Taylor et al. 1994; Michalski et al. 1993). Hasta ahora la vacuna que ha arrojado mejores resultados es la creada en 1985 de organismos completos de *V. cholerae* con los genes de CTA y CTB inactivados por la inserción de genes foráneos en el operón, complementada con CTB purificada (WC/BS por su nombre en inglés "whole cell plus B subunit"), la cual protege contra los dos biotipos de *V. cholerae* y genera una memoria de dos años, pero se dejó de aplicar porque era muy costoso obtener CTB purificada. Sin embargo, Sánchez et al. (1989) crearon un sistema para obtener CTB

recombinante en grandes cantidades para utilizarla nuevamente (vacuna WC/BSr “whole cell plus B subunit recombinant”). Esta vacuna fue probada en Perú en 1998 y 1999 y el 61% de los individuos dieron una buena respuesta inmune con dos dosis en seis semanas (Taylor et al. 2000).

### **Las plantas como vacunas comestibles**

Desde hace varios años las plantas se han utilizado como biorreactores para producir proteínas recombinantes de interés farmacéutico o vacunal (Arakawa et al. 1998). Las plantas transgénicas con tejidos comestibles que al ser consumidos provocan inmunidad contra alguna proteína de interés llevó al concepto de vacuna comestible, introducido por el grupo de Arntzen (Mason et al. 1995). Las plantas podrían abaratar la producción de vacunas en gran escala y la inmunización oral para niños y adultos sería más sencilla (Arntzen 1997, Wells 1999).

Las plantas pueden producir proteínas exógenas mediante expresión transitoria o expresión estable. Para la producción masiva se prefiere la segunda y el método más común para obtener transformantes estables es el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, aunque también puede utilizarse la introducción del ADN por biobalística o electroporación (Davey et al. 1989).

Ya se han empleado plantas transgénicas que expresan LTB termolábil o CTB como vacunas comestibles experimentales con buenos resultados en ratones y humanos (Haq et al. 1995; Tacket et al. 1998; Arakawa et al. 1998).

### **Desarrollo de vacunas comestibles**

Las primeras plantas capaces de expresar genes foráneos fueron obtenidas por Curtis et al. (1990), y luego se obtuvieron otras que expresan proteínas de *Streptococcus mutans* en las hojas del tabaco (Ma 1998). Mason (1995) demostró la expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B HBsAg en tabaco.

Dalsgaard et al. (1997) demostraron que las proteínas producidas en plantas pueden generar inmunidad en animales. Inmunizaron seis visones por vía nasal con el epítipo VP2 de

una proteína de cápside del virus de la enteritis del visón producido en las hojas de frijol y posteriormente expusieron al virus a los animales inmunizados. Solo uno de los seis visones inmunizados desarrolló diarrea.

Haq et al. (1995) obtuvieron plantas de papa y tabaco que expresan LTB. El gen correspondiente contiene una secuencia que codifica un péptido para la retención microsomal (SEKEL), y su producción fue alta (14  $\mu\text{g}$  de LTB por gramo de proteína de hojas de tabaco y 110  $\mu\text{g}$  por gramo de proteína de microtubérculos de papa). Un año después Hein et al. (1996) produjeron CTB y CTA en plantas transgénicas de tabaco. Ambos grupos comprobaron que la subunidad B se pentameriza, es reconocida por el gangliósido GM1, e induce anticuerpos específicos en ratones Balb/c inmunizados por vía oral.

Arakawa *et al.* (1998) obtuvieron papas transgénicas que expresan 30  $\mu\text{g}$  de CTB pentámerica por gramo de proteína en todos los tejidos de la planta. Inmunizaron ratones y obtuvieron sueros capaces de neutralizar la actividad de la holotoxina en ensayos *in vitro*.

Taket et al. (1998) probaron en voluntarios adultos papas transgénicas que expresan un gen de LTB que cuenta con la señal SEKEL. Las papas cocinadas mantienen el 50% de antigenicidad y los sueros de voluntarios que comieron estas papas neutralizan el efecto de la holotoxina en ensayos *in vitro*.

Los resultados descritos indican que las proteínas producidas por plantas retienen su actividad y que su calidad es comparable a las producidas en otros sistemas eucariontes como las levaduras (Hammond 1999).

La tendencia actual es desarrollar vacunas comestibles de mayor aceptación que el tabaco o las papas tales como el tomate (Mac Cormick et al. 1991) o el plátano (Honig 1997), y empresas biotecnológicas transnacionales como DuPont, Axis Genetic y ProdiGene están invirtiendo fuertemente para obtener vacunas comestibles y comercializarlas (Wells 1999).

### **Expresión transitoria**

La expresión transitoria deriva de genes que no se han integrado a los cromosomas y permite la síntesis de proteína transgénica por cierto tiempo (Rasmussen et al. 1993). El número de

moléculas de DNA que entran a las células es mucho mayor que el de las que se integran a los cromosomas, por lo que la expresión transitoria puede detectarse con menor cantidad de material vegetal transformado (Ballas et al. 1987).

Los ensayos de expresión transitoria en protoplastos vegetales permiten analizar diferentes aspectos de la transformación vegetal. Se usan para conocer la eficiencia de los promotores de virus vegetales y determinar las condiciones apropiadas para la transformación (Davey *et al.* 1989).

En este trabajo nos propusimos obtener transformantes transitorias de células de zanahoria que expresen el gen silvestre CTB. Dividimos el trabajo en tres etapas. Primero montamos y comparamos los métodos transformación por electroporación, tratamiento con polietilenglicol (PEG) y una combinación de ambos. Luego analizamos la expresión transitoria de dos genes reporteros (GFP y GUS) en células de zanahoria transformadas para comparar la eficiencia de expresión de dos vectores y dos promotores diferentes para determinar las condiciones y tiempos de expresión apropiados para la transformación. Finalmente tratamos de detectar y cuantificar la expresión transitoria de CTB en células de zanahoria transformadas.

## JUSTIFICACIÓN

1. La obtención y mantenimiento de células de zanahoria en cultivo son métodos confiables, reproducibles y bien establecidos.
2. La transformación de protoplastos de zanahoria es una de las más eficientes en el campo de la biotecnología vegetal.
3. El análisis de la expresión transitoria de genes reporteros (como GFP y GUS) permitiría establecer condiciones apropiadas para transformar células de zanahoria en cultivo a partir de las cuales podrían obtenerse vacunas comestibles en el futuro.

# OBJETIVOS

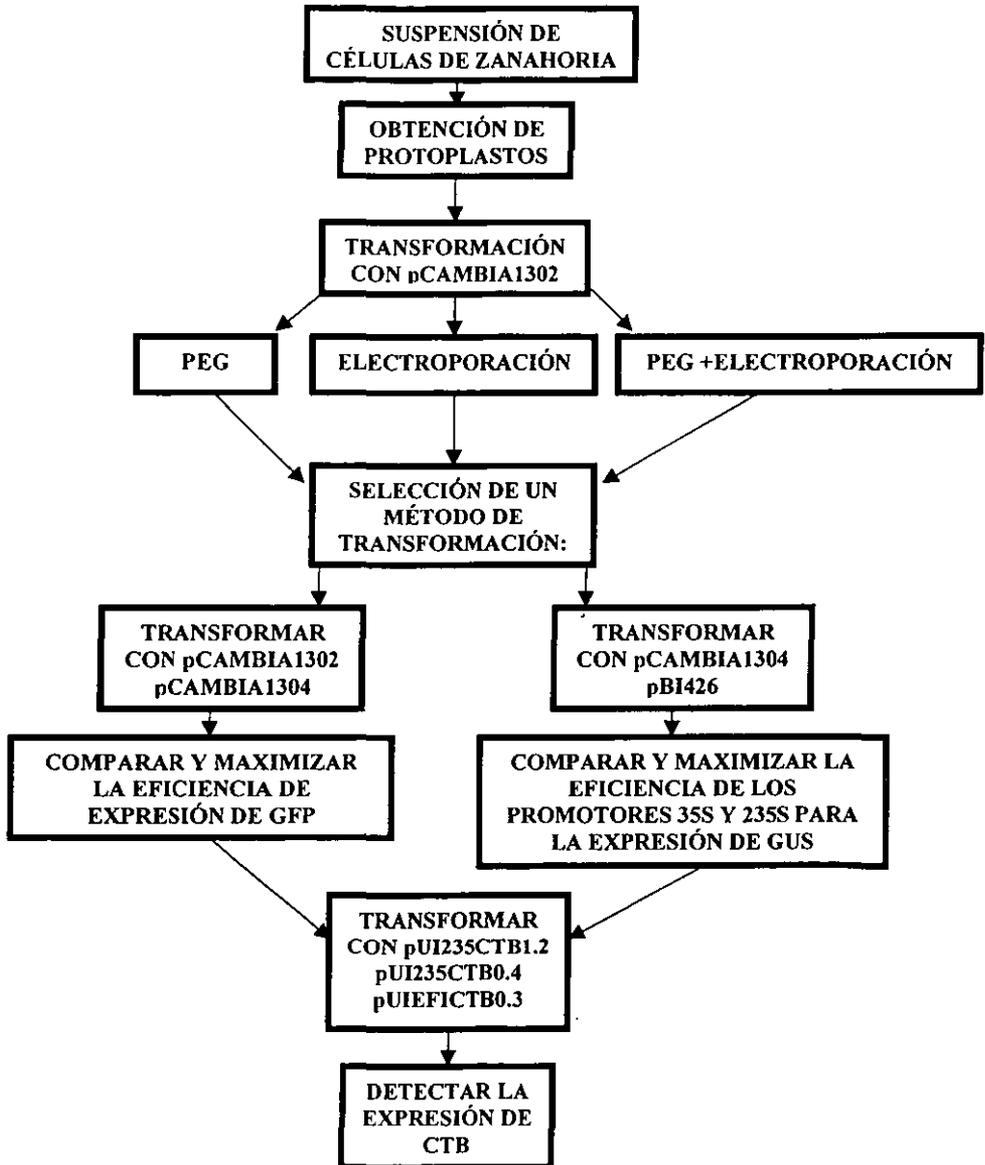
## Objetivo General

Obtener zanahorias transgénicas que expresen CTB y puedan emplearse como vacunas comestibles.

## Objetivos particulares

1. Transformar células de zanahoria con el plásmido pCAMBIA1302, portador del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como reportero, mediante tres métodos:
  - a. Polietilenglicol,
  - b. Electroporación
  - c. Una combinación de ambos.
2. Determinar la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y la proteína verde fluorescente (GFP) en células de zanahoria transformadas transitoriamente con los plásmidos pCAMBIA1302, pCAMBIA1304 y pBI426, para determinar las condiciones que permitan maximizar su expresión.
3. Transformar células de zanahoria con los plásmidos pUI235CTB1.2, pUI235CTB0.4 y pUIEFICTB0.3 que codifican la subunidad B de la toxina del cólera y detectar su expresión.

# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de zanahoria y plásmidos

Para la transformación se usaron suspensiones celulares de zanahoria de cuatro días de incubación, obtenidos de explantes de hipocotilo de plántulas de zanahoria (*Daucus carota* var. Nantes) (Nava 1995).

Los plásmidos pCAMBIA1302 y pCAMBIA1304 (Tabla 1) contienen el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como reportero; el segundo porta además el gen *uidA* que codifica  $\beta$ -glucuronidasa (GUS); ambos plásmidos regulan la expresión de los genes reporteros con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (PCaMV35S) (Fig. 1). El plásmido pBI426 (Tabla 1) porta los genes *uidA* y *nptII* en forma bicistrónica bajo el control transcripcional del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor duplicado en tándem (PCaMV235S) (Fig. 1) (Malpica 1998).

Los plásmidos usados para ensayar la expresión de CTB en células de zanahoria, pUI235CTB1.2 y pUI235CTB0.4 (Tabla 1), contienen *ctxB* fusionado con la secuencia líder de LTB y bajo el control de PCaMV235S (Fig. 1). El pUIEF10.3 (Tabla 1) contiene *ctxB* fusionado con el promotor PEF-1 $\beta$ At (Fig. 1) (Malpica 1998).

### Aislamiento y purificación de protoplastos de zanahoria

Doscientos mililitros de suspensión celular de 4 días de incubación fueron centrifugados a 70 $\times$ g. El botón celular se resuspendió en 50 ml de solución enzimática (CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, manitol 0.4 M, glucosa 0.3 M, celulasa 2%, pectinasa 1% y medio de cultivo Murashige Shock modificado

[MSm], pH 5.6) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 20 h con agitación lenta (Saunders *et al.* 1995; Malpica 1998). La suspensión celular se filtró a través de mallas finas de poliéster y el filtrado se centrifugó a 70×g por 7 min y la pastilla se resuspendió en 50 ml de solución para flotación (sacarosa 25% y MSm) (Chupeau *et al.* 1970) y los protoplastos se centrifugaron a 500×g por 20 min.

La nata de flotación se recuperó con una pipeta Pasteur en un tubo Falcon de 50 ml, se le agregaron 20 ml de solución de lavado 1 (manitol 0.6 M, medio de cultivo Gamborg B5 0.33%, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, MES 25 mM y MSm, pH 5.6) y se centrifugó a 70×g durante 7 min. La pastilla se resuspendió en 10 ml de solución de lavado 2 (manitol 0.6 M, Gamborg B5 0.33%, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, MES 25 mM y MSm, pH 5.6) y se tomaron 10 µl de suspensión celular para el cálculo de la densidad celular en el hematímetro; la densidad se ajustó a 2×10<sup>6</sup> células/ml (Bhossyani *et al.* 1989; Rasmussen *et al.* 1993).

### **Transformación por electroporación**

Se resuspendieron las células en solución de electroporación (HEPES 10 mM, manitol 0.6 M, KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM y MSm, pH5.6); a cada mililitro de suspensión se adicionaron 50 µg de DNA de esperma de salmón (DNA acarreador) y 10 µg del plásmido transformante. Se les dió un pulso eléctrico de 0.75 kV/cm<sup>2</sup> en el electroporador BRL450 (Life Technologies); los protoplastos se incubaron en cajas de cultivo, se les agregaron 2 ml de solución de cultivo (MSm con manitol 0.4 M y glucosa 0.2 M) y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente (Zaghmout *et al.* 1992; Malpica 1998).

### **Transformación con PEG**

A muestras de 1 ml de suspensión (2×10<sup>6</sup> células/ml) se les agregó 50 µg ADN acarreador, 10 µg de plásmido transformante y un volumen igual de PEG al 50% (Kung *et al.* 1993). Se mezcló bien por pipeteo y se dejó reaccionar el PEG por 30 min a temperatura ambiente; después se

agregaron alícuotas de 2 ml de solución de lavado 1 en cinco ocasiones a intervalos de 5 min para diluir el PEG y detener la reacción. Finalmente las células se centrifugaron a 70×g por 7 min, la pastilla se resuspendió en 5 ml de solución de cultivo y se mantuvo en la obscuridad a temperatura ambiente (Rasmussen et al. 1993).

### **Transformación con el tratamiento combinado**

A muestras de 1 ml de suspensión celular ( $2 \times 10^6$  células/ml) en tubos Falcon de 15 ml se agregaron 50 µg DNA acarreador y 10 µg de plásmido transformante. Después se les adicionó PEG al 50% para obtener una concentración final de 13%. Se mezcló bien y se incubó a 45°C por 10 min, al cabo de los cuales se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente las mezclas se colocaron en hielo por 5 min, se les dio un pulso eléctrico de 0.75 kV/cm<sup>2</sup> en el electroporador, se incubaron a temperatura ambiente por 5 min y finalmente se les agregaron 2 ml de solución de lavado 1 en cinco ocasiones a intervalos de 5 min para diluir el PEG y detener la reacción. Después las células se centrifugaron a 70×g por 7 min y las pastillas se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo y se dejaron en la obscuridad a temperatura ambiente (Shillito et al. 1985).

### **Permeabilidad celular**

Durante la aplicación de cada método de transformación, a un par de suspensiones de 1 ml se les agregaron 100 µl de azul de Evans, después se lavaron por centrifugación para retirar el exceso de colorante se incubaron en medio de cultivo en la obscuridad a temperatura ambiente y a las 24 h se observaron al microscopio. El porcentaje de células teñidas se consideró como un indicador de la permeabilidad que provocó cada tratamiento (Saunders *et al.* 1995).

## **Viabilidad celular**

Después de 24 h de haber sido tratadas, se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l de las suspensiones celulares transformadas, se mezclaron con 400  $\mu$ l de medio de cultivo y se les agregaron 5  $\mu$ l de FDA (0.02%). La mezcla se incubó por 3 min y se observó al microscopio de epifluorescencia (filtro excitatorio de 490 nm e inhibitorio de 515 nm). El porcentaje de células fluorescentes se consideró como un indicador de la viabilidad de la población celular (Widholm 1972).

## **Detección de GFP**

Una gota de cada suspensión celular transformada con pCAMBIA1302 o pCAMBIA1304 mediante los diferentes métodos fue observada en el microscopio de epifluorescencia (filtro excitatorio de 490 nm e inhibitorio de 460 nm), para observar la emisión de luz por la proteína verde. El porcentaje de células transformadas se calculó como el cociente resultante de dividir las células fluorescentes entre el total de células observadas (Niwa et al. 1996; Malpica 1998).

## **Actividad GUS por colorimetría**

El ensayo colorimétrico tiene una sensibilidad moderada, pero permite realizar ensayos de larga duración gracias a la estabilidad de la enzima. Se usó como control de las condiciones del ensayo (Jefferson 1989) la cinética de GUS en mezcla con lisados de *E. coli* K12 (Fig. 2).

Las células de zanahoria transformadas con pCAMBIA1304 o pBI426 fueron incubadas 24 h, 48 h y 72 h se centrifugaron a 70 $\times$ g por 7 min y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de solución de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.1 M, EDTA 0.1 mM, Tritón X-100 0.1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 25  $\mu$ g/ml, pH 7) y se lisaron por dos pulsos ultrasónicos de 20 s. Se diluyeron 1:10 en mezcla de reacción (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, p-nitrofenolglucuronido 2 mM, Tritón X-100 0.1%, pH 7) y se dejaron incubar hasta 96 h a 37°C (Jefferson 1987) A intervalos de 24 h se tomaron una alícuotas de 100

μl se colocaron los pozos en una placa de ELISA y las reacciones se detuvieron con 40 μl de 2-amino, 2-metil propanediol 2.5 M y se leyeron a 415 nm.

### **Contenido de proteínas**

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), con una curva patrón de seroalbúmina de bovino (BSA, 1 mg/ml) (Fig. 3).

### **Detección de GUS por tinción con X-Glu**

Las células de zanahoria transformadas con pCAMBIA1304 o con pBI426 e incubadas por 24 h y 48 h se centrifugaron y se resuspendieron en de reacción (glutaraldehído 25%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M, Tris 50 mM, X-Glu 1 mM pH 7) (Jefferson 1987; Rasmussen et al. 1993) se incubaron 24 horas y se observaron al microscopio de luz transmitida para determinar el porcentaje de células azules que reaccionaron con el sustrato.

### **Detección de CTB**

Una placa de ELISA con 150 ng de CTX inmovilizados por pozo se lavó tres veces con 200 μl de solución de lavado (caseína 0.3% disuelta en PBS-Tween 20 1%) por pozo. Posteriormente se agregó caseína (100 μl por pozo) por 1 h a temperatura ambiente para bloquear la placa.

Ciento cincuenta μl de cada una de las diluciones seriadas al doble de una solución madre de CTX (1 mg/ml) se mezclaron con el mismo volumen de una solución de anticuerpos de ratón antiCTX (1:2000) y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Los pozos de la placa se lavaron tres veces con 200 μl solución de lavado (caseína 0.3% disuelta en PBS-Tween 20 1%) por pozo y después se agregaron 100 μl las diferentes mezclas de CTX y antiCTX a pozos diferentes y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Después se lavaron (200 μl por pozo) tres

veces con solución de lavado y se agregó el anticuerpo conjugado de chivo antirratón (1:2000) en solución de lavado (100  $\mu$ l por pozo) y se dejaron 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron tres veces los pozos con solución de lavado, se agregó (100  $\mu$ l por pozo) la solución de reacción (4.5 mM FDA, 3.45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se incubó 1 h en penumbra y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Las placas se leyeron en un lector de ELISA a 492 nm.

Tabla 1. Plásmidos utilizados (ver diagrama en la Fig. 1)

Plásmido	Características
<b>pCAMBIA1302<sup>a</sup></b>	Genes de la proteína verde fluorescente ( <i>gfp</i> ) y de resistencia a higromicina y a kanamicina regulados por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (PCaMV35S).
<b>pCAMBIA1304<sup>a</sup></b>	Genes <i>gfp</i> y de $\beta$ -glucuronidasa ( <i>uidA</i> ) arreglados de forma bicistrónica. Genes de neomicina fosfotransferasa ( <i>nptII</i> ) y de resistencia a kanamicina. Todos regulados por PCaMV35S.
<b>pBI426<sup>b</sup></b>	pUC18 con PCaMV235S y el potenciador $\Omega$ del virus del mosaico del tabaco como reguladores de los genes <i>uidA-nptII</i> .
<b>pUI235CTB1.2<sup>b</sup></b>	pUI235 con <i>nptII</i> y la secuencia codificante de CTB con la secuencia no traducida 3' de CTX y la del péptido líder de LTB, controlados por PCaMV235S (PCaMV35S duplicado en tándem).
<b>pUI235CTB0.4<sup>b</sup></b>	PUI235 con <i>nptII</i> y la secuencia de CTB del péptido líder de LTB, bajo el control del promotor PCaMV235S.
<b>pUIEFICTB0.3<sup>b</sup></b>	pUIEFI-5.1 con el promotor del gen <i>eEf-1<math>\beta</math></i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (PeEF-1 $\beta$ At) para regular <i>nptII</i> y la secuencia de CTB.

<sup>a</sup>Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture

<sup>b</sup>Malpica 1998

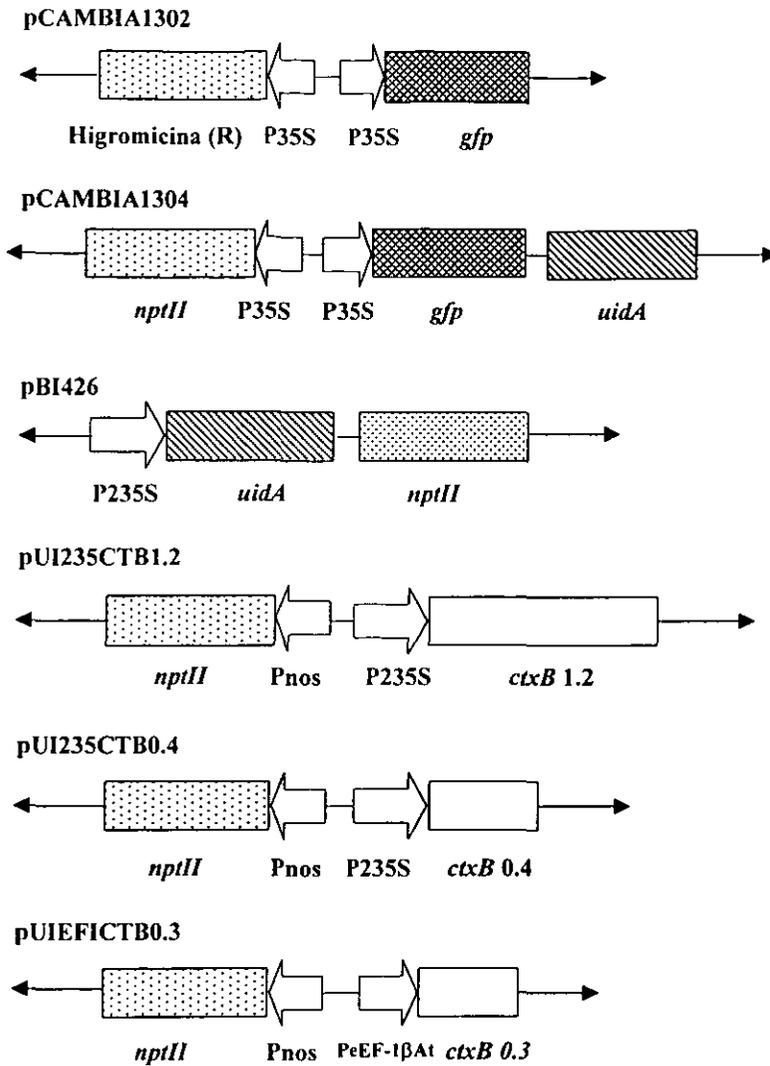
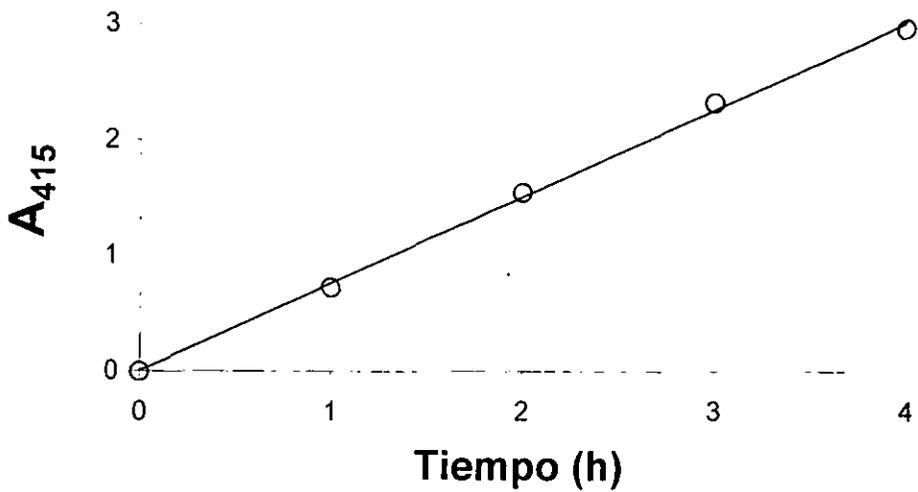


Fig. 1. Genes de interés en las construcciones de los plásmidos empleados.



**Fig. 2.** Cinética de  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli* K12. Las células de un cultivo de toda la noche se lavaron y se lisaron por sonicación. El lisado se añadió a la mezcla de reacción. La actividad enzimática se determinó cada hora en un lector de ELISA con un filtro de 415 nm.

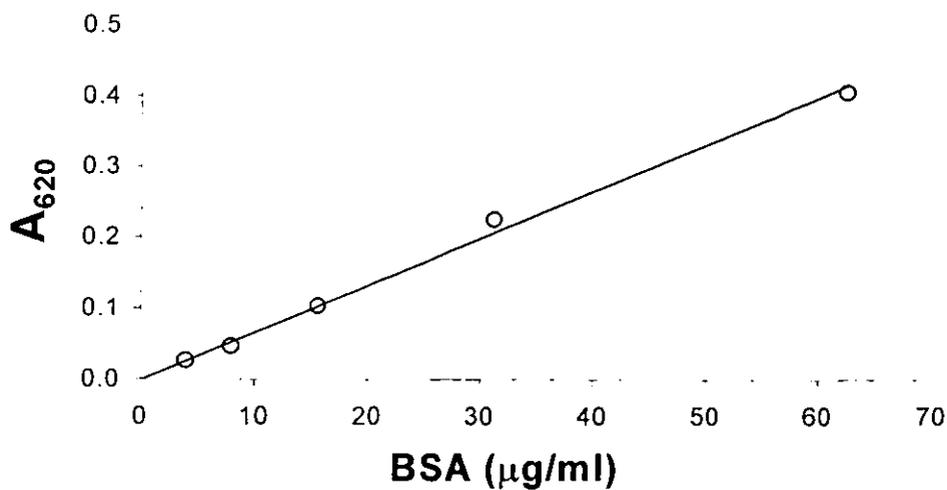
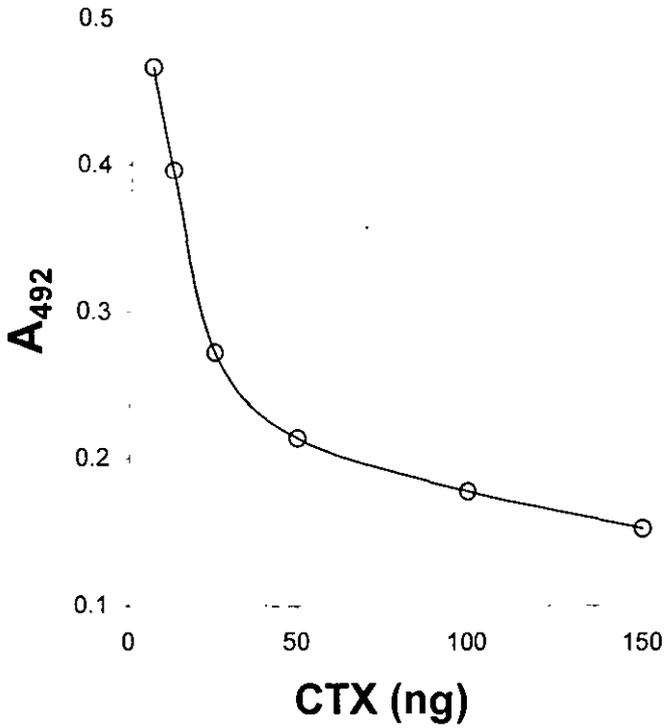


Fig. 3. Curva patrón de proteínas con el método de Bradford. Se obtuvo con diluciones seriadas al doble de una solución madre de BSA (1 mg/ml).



**Fig. 4.** Curva patrón de CTX por ELISA competitivo. Diluciones seriadas al doble de una solución madre de CTX (400 ng/100  $\mu$ l) fueron mezcladas con un volumen igual de anticuerpos antiCTX (1:200) por 10 min. Luego se colocaron 100  $\mu$ l de cada mezcla con 150 ng de CTX inmovilizados y el ensayo se reveló con FDA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

# RESULTADOS

## Comparación de tres métodos de transformación

Comparé los siguientes métodos de transformación por pCAMBIA1302 (vector que permite expresar GFP bajo control del promotor PCaMV235): 1) polietilenglicol (PEG) 25%, 2) electroporación  $0.75\text{kV}/\text{cm}^2$  y 3) una combinación de los anteriores (polietilenglicol 12% más electroporación  $0.75\text{kV}/\text{cm}^2$ ). Con cada método determiné la proporción de células viables, permeabilizadas y transformadas.

El porcentaje de células viables fue similar (Fig. 6), pero hubo diferencias en el porcentaje de células permeabilizadas; la electroporación dio el más bajo con 24% (contra 63.5% y 59.9% del método con PEG y del combinado, respectivamente) (Fig. 7), pero la expresión de GFP fue similar con los tres métodos (Fig. 9).

Con estos resultados decidimos comparar la eficiencia de expresión de GFP mediada por dos plásmidos similares, pCAMBIA1302 y pCAMBIA1304.

## Eficiencia de la expresión con pCAMBIA1302 y pCAMBIA1304

Muestras de células de zanahoria tratadas con pCAMBIA1302 o pCAMBIA1304 fueron observadas en el microscopio de fluorescencia 24 h después de haber sido transformadas con el método combinado (Fig. 8).

La proporción de células que expresaban GFP con pCAMBIA1304 (21.2%) fue un poco más del doble que con pCAMBIA1302 (9%) (Fig. 10).

Concluí que pCAMBIA1304 es más efectivo para expresar GFP en células de zanahoria que pCAMBIA1302 y decidí usar pCAMBIA1304 para determinar el tiempo de la expresión máxima de GFP en células de zanahoria.

### **Viabilidad y expresión máxima de GFP en células transformadas**

Era importante saber cuándo se recuperaba la viabilidad de las células transformadas y cuándo era mayor la expresión del reportero para luego tratar de maximizarla con los plásmidos que contienen el gen de CTB pero no un reportero observable como el de GFP.

La viabilidad de las células tratadas con pCAMBIA1304 se recuperó de 69.9% a las 24 h a 90% a las 48 h; la expresión de GFP también fue máxima a las 48 h con una proporción del 25% y se mantuvo hasta las 72 h (Fig. 11).

Concluí que la recuperación de la viabilidad y la máxima expresión de GFP ocurre a las 48 h después del tratamiento.

### **Expresión de $\beta$ -glucuronidasa (GUS)**

Los plásmidos que contienen el gen de CTB regulan su transcripción con el promotor PCaMV235S duplicado en tándem, más potente que el promotor simple PCaMV35S. Para ver si se cumplía esta predicción, comparé la expresión de GUS bajo el control de ambos promotores. Para ello usé pCAMBIA1304 y pBI426 porque el primero tiene el promotor simple mientras que el segundo tiene el promotor doble. Analicé la expresión de GUS por colorimetría y por tinción con X-Glu de las células transformadas.

Los lisados de células de zanahoria a las 24 h de haber sido tratadas con pBI426 tuvieron actividad de GUS confiable sólo después de 90 h de incubación, y la actividad específica fue de 0.110 y 0.085  $A_{415}/\text{mg}$  de proteína/h en dos experimentos independientes (Fig. 12). Estos valores fueron 18.3 y 14.2 veces más altos que los de lisados de células de zanahoria no transformadas (0.006  $A_{415}/\text{mg}$  de proteína/h) (Tabla 2).

El análisis de la expresión de GUS en células de zanahoria transformadas con pBI426 y teñidas con X-Glu mostró 43% de células positivas a las 24 h (Fig. 13), mientras que solamente se tiñó el 24.5% de las células transformadas con pCAMBIA1304 y las proporciones disminuyeron a 19% y 17.8% a las 48 h, respectivamente (Fig. 14).

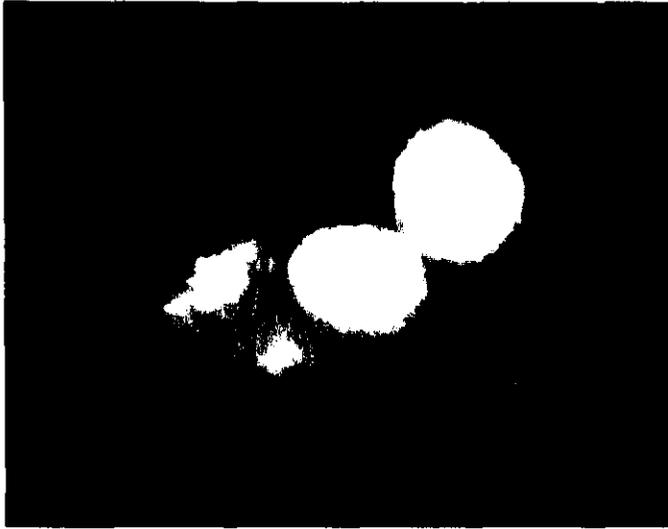
En conclusión, el promotor doble PCaMV235S fue más potente que el promotor simple para la expresión de GUS en células de zanahoria. Por otra parte, la tinción celular fue más sensible pero menos duradera que la colorimetría para detectar la expresión de GUS en las mismas células de zanahoria transformantes.

Los resultados de estos experimentos exploratorios para maximizar la expresión de GFP y GUS, decidimos analizar la expresión de CTB en células de zanahoria 24 h y 48 h después de haber sido transformadas.

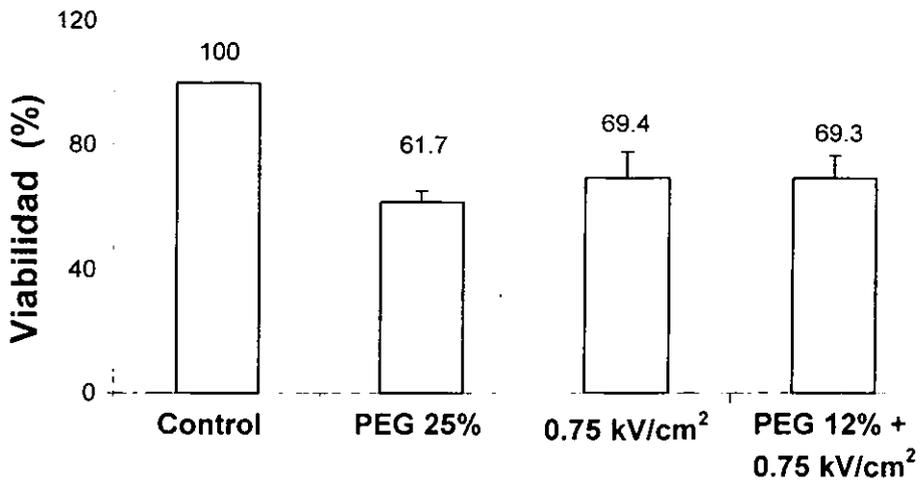
### **Expresión de CTB**

Mediante un método de ELISA competitivo muy sensible, ya que permite detectar un mínimo de 6 ng de CTB, analicé la expresión de CTB en lisados de células de zanahoria que fueron tratadas 24 y 48 h antes con pUI235CTB1.2 (el cual contiene el gen *ctxB* fusionado a la secuencia no traducida 3' de CTX y a la del péptido líder de LTB, y controlado por PCaMV235), con pUI235CTB0.4 (*ctxB* fusionado a la secuencia del péptido líder de LTB controlado por PCaMV235S), o con pUIEFICTB0.3 (*ctxB* controlado por PeEF-1 $\beta$ ).

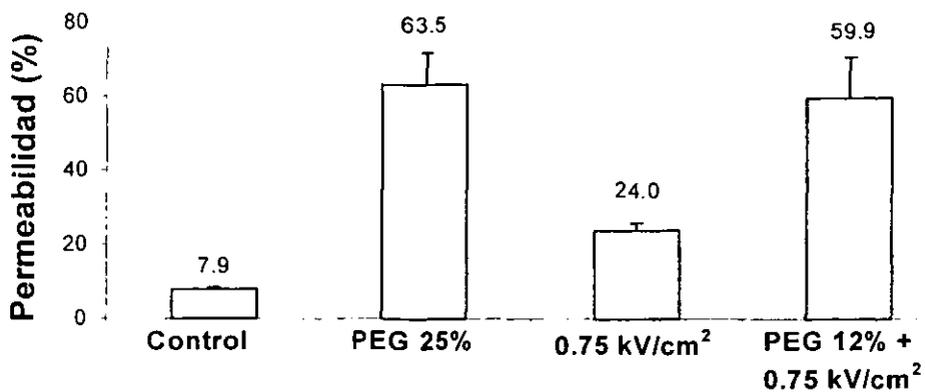
Los lisados de células que fueron transformadas con los tres plásmidos no expresaron niveles detectables de CTB.



**Fig. 5.** Células de zanahoria teñidas con diacetato de fluoresceína (FDA). La observación de las células se hizo en el microscopio de fluorescencia, con lámpara de mercurio, filtro excitador de 490 nm y filtro inhibidor de 515 nm.



**Fig. 6.** Viabilidad de las células de zanahoria después del tratamiento con PEG, electroporación o ambos. La viabilidad es expresada como el porcentaje de células que fluorescieron después de ser tratadas con FDA. Los valores de los controles en cada ensayo fueron respectivamente 79%, 69.2% y 72.5% (normalizados al 100%).



**Fig. 7.** Permeabilización de las células de zanahoria tratadas con PEG, electroporación o ambos. Se agregaron 100  $\mu$ l de azul de Evans a una suspensión de 1 ml ( $2 \times 10^6$  células/ml) durante cada tratamiento de transformación; las células se lavaron por centrifugación y se dejaron 24 h en la oscuridad, al cabo de las cuales se observaron con el microscopio de luz transmitida. El porcentaje de células teñidas indica el grado de permeabilización.

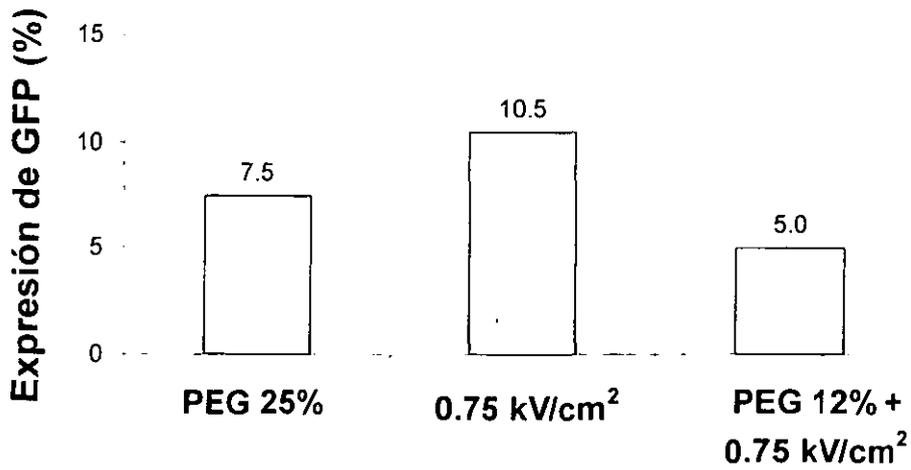


Fig. 8. Expresión de GFP en células de zanahoria transformadas por pCAMBIA1302 mediante tratamiento con PEG, electroporación o ambos. El porcentaje de células zanahoria que expresaban GFP se determinó a las 24 h, como en la figura anterior.

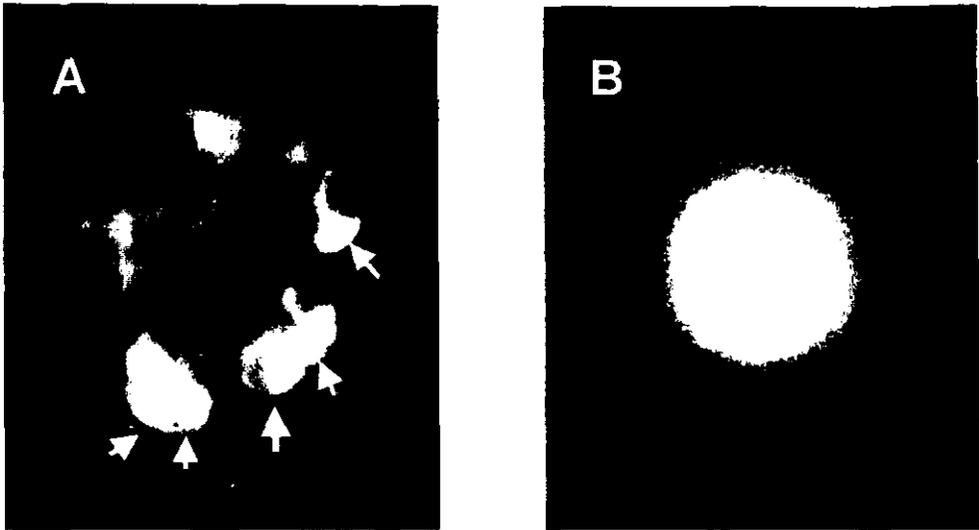
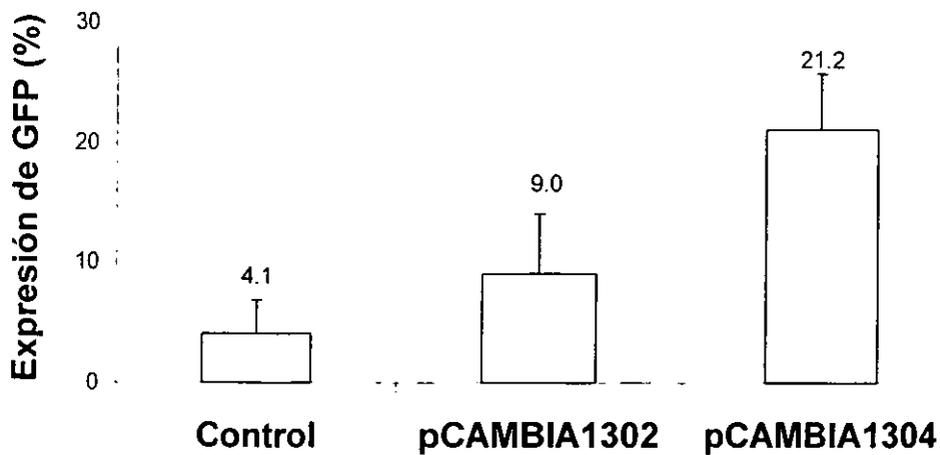
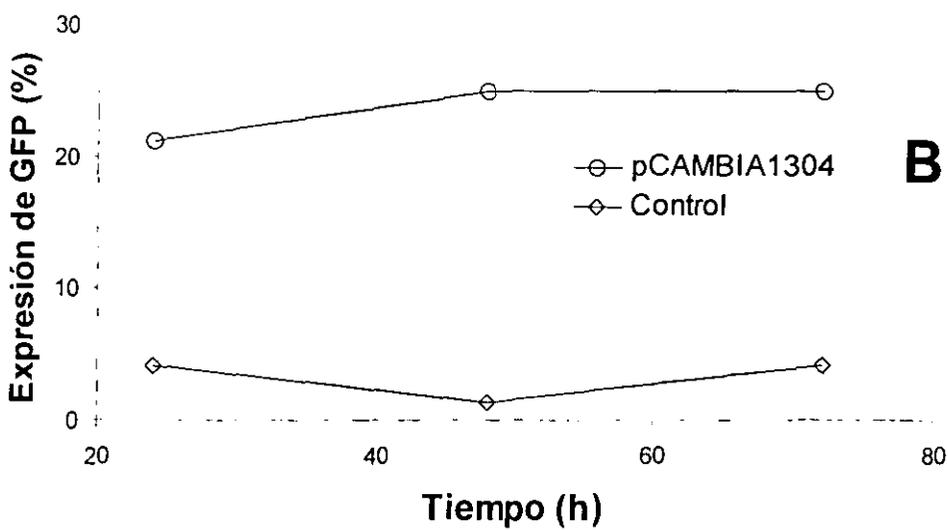
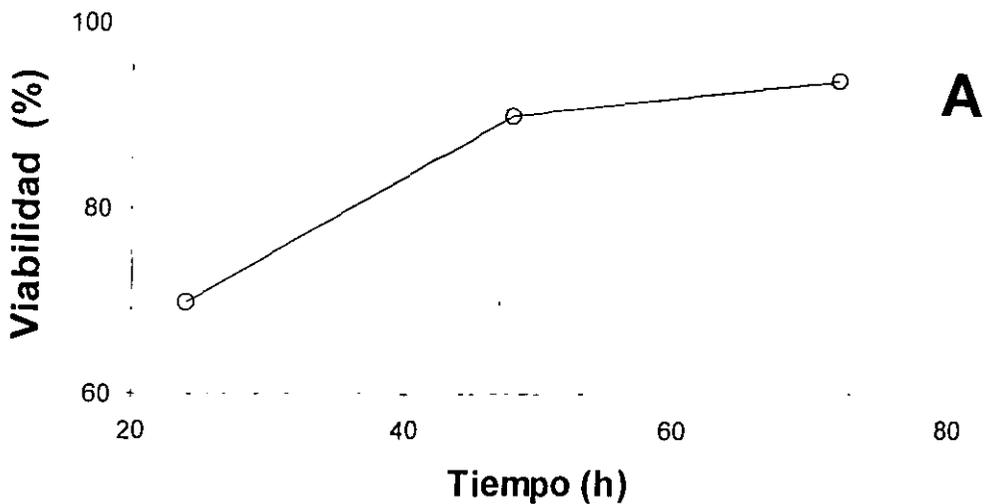


Fig. 9. Células de zanahoria transformadas por pCAMBIA1302 o pCAMBIA1304 que expresan la proteína verde fluorescente (GFP). (A) Grupo de células de zanahoria transformadas con pCAMBIA1302 que expresan GFP observadas con el objetivo 20x. (B) Célula de zanahoria transformada por pCAMBIA1304 observada con el objetivo 40x.



**Fig. 10.** Expresión de GFP en células de zanahoria transformadas por pCAMBIA1302 o pCAMBIA1304. Las células fueron tratadas con PEG 12% y  $0.75 \text{ kV/cm}^2$  y transformadas con el plásmido pCAMBIA1302 o pCAMBIA1304. El porcentaje de células fluorescentes se determinó igual que en la figura 9.



**Fig. 11.** Viabilidad y expresión de GFP en células de zanahoria a diferentes tiempos después haber sido transformadas por pCambia1304 mediante tratamiento con PEG 12% y 0.75 kV/cm<sup>2</sup>. (A) Viabilidad de las células determinada con FDA a las 24, 48 y 72 h. (B) Expresión de GFP.

Tabla 2. Actividad específica de GUS en lisados de células de zanahoria transformadas con pBI426

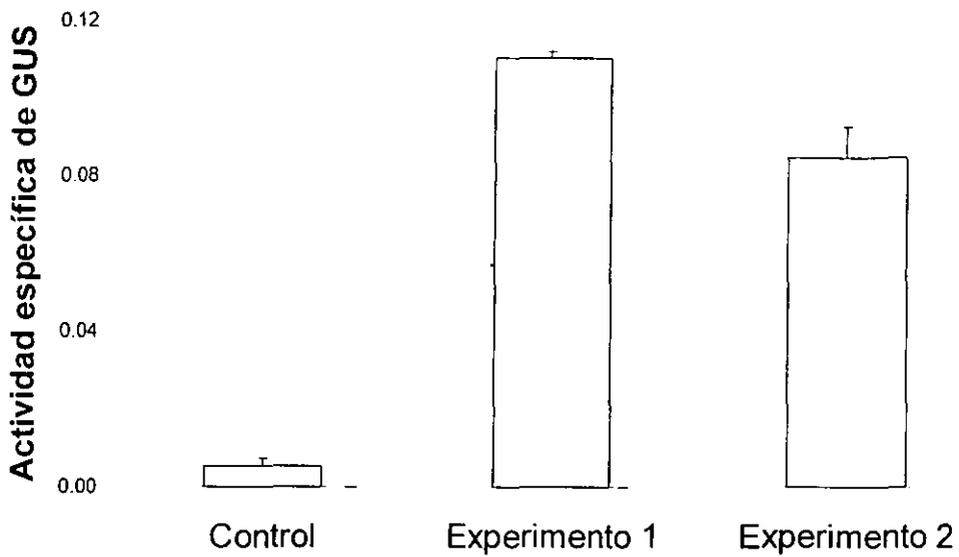
Lisado	$\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$	AE		
		$A_{415}^a$	Absoluta <sup>b</sup>	Relativa
Control <sup>c</sup>	26.0	0.013	0.006	(1.0)
Experimento 1 <sup>d</sup>	19.8	0.198	0.110	18.3
Experimento 2 <sup>d</sup>	18.1	0.139	0.085	14.2

<sup>a</sup>Con 90 h de incubación

<sup>b</sup> $A_{415}/\text{mg}$  de proteína/h

<sup>c</sup>Células de zanahoria no transformadas

<sup>d</sup>Células de zanahoria transformadas



**Fig. 12.** Actividad específica de GUS en lisados de células de zanahoria transformadas con pCAMBIA1304. Las células se lisaron 24 h después de haber sido transformadas y se incubaron 90 h en la mezcla de reacción.



**Fig. 13.** Célula de zanahoria que expresa  $\beta$ -glucuronidasa después de haber sido transformada por pCAMBIA1304. Veinticuatro horas después de ser transformadas, las células se mezclaron con X-Glu y se incubaron 24 h más.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

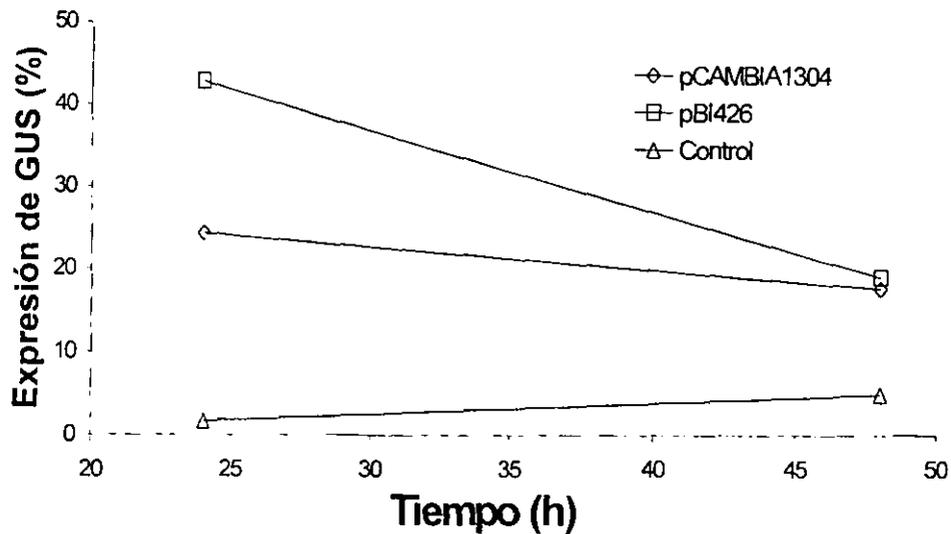


Fig. 14. Expresión de  $\beta$ -glucuronidasa en células de zanahoria. El porcentaje de células teñidas con X-Glu se obtuvo mediante observación en el microscopio de transmisión de muestras que fueron transformadas 24 y 48 h antes con pCAMBIA1304 o pBI426.

# DISCUSIÓN

## **Comparación de los métodos de transformación**

La expresión transitoria en plantas se utiliza para analizar la eficacia de la transformación por diversos vehículos y promotores y para asegurar la expresión de genes sintéticos antes de tratar de obtener transformantes estables (Ballas et al. 1987).

Saunders et al. (1995) demostraron en células de zanahoria la correlación de la viabilidad y la permeabilidad ocasionada por la electroporación con la frecuencia de obtención de transformantes estables, y propusieron medir la viabilidad y la permeabilidad para optimizar las condiciones de transformación y comparar diferentes métodos de transformación. Por otra parte, la electroporación es tres veces más efectiva para transformar células vegetales que el tratamiento con PEG (Davey et al. 1996), y la combinación de ambos métodos aumenta mil veces la proporción de transformantes estables (Shillito et al. 1985). Sin embargo, cuando nosotros analizamos la expresión transitoria de GFP en células de zanahoria estas predicciones no se cumplieron y la viabilidad después de cada tratamiento fue similar (Fig. 6), mientras que la permeabilidad de las células tratadas por electroporación fue casi tres veces menor que la provocada por PEG 25% ó PEG 12% más electroporación (Fig. 7). Aunque esperábamos que el porcentaje de células que expresaban GFP fuera menor con la electroporación, la proporción fue igual con los tres métodos (Fig. 8).

Como de cualquier manera se acepta que el método de transformación más eficiente es el combinado, decidí seguir usando éste para los experimentos subsiguientes.

## **Eficiencia de expresión de dos vectores similares**

Plásmidos similares deberían tener eficiencias similares de expresión, pero al comparar la expresión de GFP en células de zanahoria transformadas con pCAMBIA1302 o pCAMBIA1304 (ambos tienen GFP bajo control del PCaMV35S) obtuve el doble de células que expresan GFP en muestras transformadas con pCAMBIA1304 (Fig. 10), por lo que decidí usar este plásmido para intentar maximizar la expresión de GFP.

### **Viabilidad y expresión máxima de GFP en las células transformadas**

La máxima recuperación de la viabilidad (90%) (Fig. 11A) y la mayor expresión de GFP en células transformadas con pCAMBIA1304 ocurrieron a las 48 h después del tratamiento (Fig. 11B). Estos resultados son aceptables porque la máxima expresión transitoria de GFP en células vegetales ocurre generalmente entre las 24 y 48 h después de ser transformadas (Saunders et al. 1995; Davey et al. 1989).

### **Expresión de GUS**

El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (PCaMV35S) es reconocido como un promotor fuerte, apropiado para transformar células vegetales (Töper et al. 1989). Cuando este promotor se duplica en tándem (PCaMV235S) la segunda copia funciona como un potenciador transcripcional que aumenta hasta diez veces el nivel de expresión (Malpica 1998).

Cuando comparé la expresión de GUS por colorimetría en lisados de células de zanahoria que habían sido transformadas 24 h antes con pCAMBIA1304 (que contiene el promotor 35S), con los lisados de células transformadas con pBI426 (que contiene el promotor 235S), sólo obtuve actividad confiable en los segundos (Tabla 2). El método colorimétrico es menos sensible que la tinción de células, pero las condiciones en las que tratamos los lisados garantizan que GUS se mantiene por largos períodos (Jefferson, 1986); por eso pudimos hacer los experimentos dejando los lisados hasta 96 h (Fig. 12). Rasmussen et al. (1993) determinaron con un método fluorométrico que la máxima expresión de GUS en células de zanahoria ocurre 72 h después de la transformación; estos datos pueden deberse a la mayor sensibilidad del método que ellos usaron.

Malpica (1998) utilizó el mismo plásmido y las mismas condiciones que nosotros para analizar la expresión de GUS en lisados de células de zanahoria transformadas por electroporación y no encontró actividad de GUS. La detección de la actividad de GUS por nosotros en células tratadas con el método combinado manifiesta una mayor eficiencia de transformación que la obtenida por Malpica (1998).

Mediante la tinción celular con X-Glu (Fig. 13) también observamos que la máxima expresión de GUS ocurrió a las 24 h, y que las muestras transformadas con pB1426 tenían una mayor proporción de células que expresaban GUS (Fig. 14). Estos resultados, semejantes a los obtenidos por Rasmussen et al. (1993), confirman que para determinar la actividad de GUS la tinción celular con X-Glu es un método más sensible pero menos duradero que el colorimétrico.

El análisis de la expresión de genes reporteros en células de zanahoria indicó que las condiciones, el método y los promotores fusionados a *ctxB* usados para transformar células de zanahoria funcionan eficientemente.

### **Expresión de CTB**

La expresión de GFP y GUS fue similar y máxima a las 48 y 24 h respectivamente, y confirmó que el PCaMV235S (promotor que regula a *ctxB*) es más eficiente que PCaMV35S.

Sin embargo, en numerosos intentos de transformación no encontré evidencias de expresión de CTB con el ensayo de ELISA competitivo. Estos resultados negativos podrían deberse a que: 1) no hay transcripción de *ctxB*, 2) sí hay transcripción pero no hay traducción de CTB, 3) la traducción de CTB es ineficiente por el uso de codones bacterianos en las células de zanahoria y 4) la CTB recombinante es degradada inmediatamente.

Para aumentar la detección de la expresión transitoria de CTB en las células de zanahoria transformadas podríamos aislar el RNA total y realizar un RT PCR usando primer específicos para CTB y probar si hay transcripción de las construcciones.

Otra opción sería obtener células de zanahorias transformadas de forma estable, analizar la detección de CTB con una cantidad mayor de biomasa.

## CONCLUSIONES

1. Los tres métodos de transformación empleados tienen eficiencias similares.
2. La expresión de los genes reporteros GFP y GUS en las células de zanahoria transformadas es igual cuando ambos genes son regulados por el promotor PCaMV35S.
3. La máxima expresión de GFP en células de zanahoria ocurre a las 48 h de la transformación.
4. La máxima expresión de GUS en células de zanahoria a las 24 h de la transformación independiente del promotor.
5. Confirmamos que PCaMV235S más eficiente que PCaMV35S para expresar genes exógenos en células de zanahoria.
6. Las construcciones empleadas no permiten la expresión de niveles detectables de CTB en las células transformadas.

## REFERENCIAS

- Arakawa T, DKX Chong, y WHR Langridge (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnol* 16:292-298
- Arntzen CJ (1997) High-tech herbal medicine: Plant-based vaccines. *Nature Biotechnol* 15:221-222.
- Ballas N, N Zakai y A Loyter. (1987). Transient expression of the plasmid pCaMVCAT in plant protoplasts following transformation with polyethyleneglycol. *Exp Cell Res* 170:228-234.
- Bhosswani SS, and MK Razda. (1983) *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier, Amsterdam, 1-10.
- Bloom BR (1989) Vaccines for the third world. *Nature* 342:115-120.
- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Chupeau Y y G Morel (1970) Obtention de protoplastes de plantes superieures a partir de tissus cultives in vitro. *CR Acad Sci Paris* 270:2659-2662.
- Connell TD, DJ Metzger, M Wang, MG Jobling y RK Holmes (1995) Initial studies of the structural signal for extracellular transport of cholera toxin an other proteins recognized by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 63:4091-4098.
- Dalsgaard K, A Uttenthal, TD Jones, F X, A Merrywather, WDO Hamilton, JPM Langeveld, RS Boshuizen, S Kamstrup, GP Lomonossoff, C Porta, C Vela, JI Casal, RH Meloen y PB Rodgers (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnol* 15:248-252.
- Davey MR, EL Rech y BJ Mulligan (1989) Direct DNA transfer to plant cells. *Plant Mol Biol* 13:273-283.

- Hammond J (1999) The many uses and applications of transgenic plants. En *Plant biotechnology. New products and applications*. Springer-Verlag, Berlin, 1-19.
- Haq TA, HS Mason, JD Clements y CJ Arntzen (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-715.
- Hein MB, TC Yeo, F Wang y A Sturtevant (1996) Expression of cholera toxin subunits in plants. *Ann NY Acad Sci* 729:50-56.
- Honig B (1997) The banana vaccine. *Global frontrunners. Profiles* 2:10-11
- Jefferson RA (1989). The GUS reporter gene system. *Nature* 342:837-838.
- Jefferson RA, TA Kavanagh, y MW Bevan (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907.
- Kung, S, y Wu, R (1993) *Transgenic plants*. Vol. I. Academic Press. New York. 128-130.
- Ma JKC y ND Vine (1998) Plant expression systems for the production of vaccines. En *Defense of mucosal surfaces: pathogenesis, immunity and vaccines*. Springer-Verlag, Berlin, 277-291.
- Malpica R (1998) Expresión de la subunidad B de la toxina del cólera en protoplastos de zanahoria. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala-UNAM.
- Mason HS y CJ Arntzen (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *TIBTECH*. 13:388-392.
- Michalski J, JE Galen A Fasano y JB Kaper (1993) CVD110, an attenuated *Vibrio cholerae* O1 El Tor live oral vaccine strain. *Infect Immun* 61:4462-4468.
- Miller VL y JM Mekalanos (1984) Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *TaxR*. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 81:3471-2475.
- Nava PP (1995) Establecimiento de embriogénesis somática de *Daucus carota* L. Var. Nantes (zanahoria) en cultivo en suspensión en el ámbito de matraz y biorreactor Airlift. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN, D. F.
- Niwa H, S Inouye, T Hirano, T Matsuno, S Kojima, M Kubota, M Ohashi y FI Tsuji (1996) Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 93:13617-13622.
- Rasmussen JO y OS Rasmussen (1993) PEG mediated DNA uptake and transient GUS expression in carrot, rapeseed and soybean protoplasts. *Plant Sci* 89:199-207.

- Sanchez J y J Holmgren (1989) Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. Proc Nat Acad Sci (USA) 86:481-485.
- Sanchez J, S Johansson, B Löwenadler, AM Svenneholm y J Holmgren (1990) Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. Res Microbiol 141:971-979.
- Saunders JA, CH Lin, BH Hou, J Cheng, N Tsengwa, JJ Lin CR Smith, MS McIntosh y SV Wert (1995) Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts, and pollen. Mol Biotechnol 3:181-190.
- Shillito RD, MW Saul, J Paszkowski, M Müller y Potrykus (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. Bio/Tecnology 3:1099-1103.
- Svennerhorlm AM y J Holmgren (1978) Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (G<sub>M1</sub>-ELISA) procedure. Curr Microbiol 1:19-23.
- Tacket CO y HS Mason (1999) A review of oral vaccination with transgenic vegetables. Microb Infect 1:777-783.
- Tacket CO, HS Mason, G Losonsky, JD Clements, MM Levine y CJ Arntzen (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. Nature Med 4:607-609.
- Taylor DN, KP Killeen, DC Hack, JR Kenner, TS Coster, DT Beattle, J Ezzell, T Hyman, A Trofa, MH Sjögren, A Friedlander, JJ Mekalanos y JC Sdoff (1994) Development of a live, oral, attenuated vaccine against El Tor cholera. J Infect Dis 170:1518-1523.
- Taylor DN, V Cárdenas, JL Sancehz, RE Béqué, R Gilman, C Bautista, J Pérez, R Puga, A Gaillour, R Meza, P Echeverria y J Sdoff (2000) Two-year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholera vaccine in Peru. J Infect Dis 181:1667-1673.
- Thanavala Y, YF Yang, P Lyons, HS Mason y C Arntzen (1995) Immunogenicity of transgenic plant hepatitis B Surface antigen. Proc Nat Acad Sci (USA) 92:3358-3361.
- Töper R, B Gronenborn, J Schell y HH Steinbiss (1989) Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. Plant Cell 1:133-139.

- Travor AT. 1995. *In vitro* Embriogenesis in Plants. Microbiology 34:586-595.
- Watnick PI y R Kolter (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol Microbiol 39:586-595.
- Wells WA (1999) Delicious vaccines. Profiles 53:1-6.
- Widholm JM (1972) The use of fuorescee diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol 47:189-194.
- Williams Na, TR Hirst y TO Nashar (1999) Immunoodulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. Immunol Today 20:95-101.
- Zaghmout OMF y WC Wang (1992) Factor controlling variability in measurements of the transient gene expression in electroporated protoplasts of wheat callus. Anal Biochem 204:239-243.