



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**Expresión de la proteína G del virus de la
rabia en zanahoria y maíz y su
evaluación como inmunógeno oral.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

EDITH ROJAS ANAYA

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO**

**COMITÉ TUTORAL
DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DR. JUAN PEDRO LUNA ARIAS**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

A Dios por darme vida para llegar a ver cristalizado mi sueño.

A mis Padres, Estela y Bernardo, ya se me acabaron las palabras para agradecerles, no me han dejado sola nunca; porque siempre han apoyado mis decisiones, buenas y malas, por estar a mi lado ahora que he llegado a culminar esta meta. Esto es suyo más que nunca.

A Osvaldo, Javier y Diana, mis queridos hermanos, que siempre serán una inspiración para seguir creciendo juntos.

A mi esposo Alex, por tu tiempo, paciencia, amor y dedicación que sin más me regalas todos los días. Por impulsarme e inspirarme a seguir adelante juntos: gracias amor por alegrar mi vida.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio por la confianza que ha depositado en mí para formarme como profesionista. Por el apoyo en todo momento para lograr mi superación. Por sus enseñanzas, dedicación y amistad, muchas gracias.

A la Sra. Evelia y a la Sra. Lupita, a mis compañeros y amigos Luis y Fabiola; todos ellos del Laboratorio de Producción del CENID- Microbiología, por su infinito apoyo. Muchas gracias, por las charlas, las risas por compartir sus éxitos y alegrías conmigo; por hacer más llevadero el día a día en el laboratorio.

A Mayte por el tiempo, la dedicación y la amistad que siempre me has brindado; haz sido un ejemplo. A todos los integrantes del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, especialmente a Mary, Octavio e Inan, por apoyarme y brindarme todos sus conocimientos en el área de Biología Vegetal.

A los integrantes del Lab 43 del CINVESTAV, Dr. Juan Pedro y Mary mil gracias por tus conocimientos, por tu disponibilidad y amistad.

Gracias a todos los integrantes del Departamento de Biotecnología del INIA: Nereida, Estela, Julio, Ana, Juan Carlos, Carmen, Silvia, en fin a todos por su apoyo y amistad por hacer de mi estancia en Madrid una grandiosa experiencia.

AGRADECIMIENTOS

- CENID-Microbiología Animal, INIFAP, en donde se ha desarrollado la tesis de Doctorado aquí presentada. Al Director Ricardo Flores Castro, a investigadores, personal de base y administrativo.

- Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química de la UNAM. Bajo la tutoría de la MC Maria Teresa Olivera Flores.

- Laboratorio de Salud Humana y Plantas Tropicales del CINVESTAV-Irapuato dirigido por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, por la donación de los vectores de transformación vegetal.

- CINVESTAV-Zacatenco, al Dr. Juan Pedro Luna Arias por el apoyo para la realización de diferentes actividades desarrolladas (replicación de baculovirus, crecimiento de células de insecto, manejo de muestras para su análisis por espectrometría de masas) en el Laboratorio 43 del Departamento de Biología Celular.

- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, España. Al Dr. Juan Carlos Saiz Cahorra y Dr. José Ángel Martínez Escribano, por el apoyo y facilidades brindadas para llevar a cabo la expresión de la proteína G del virus de la rabia en baculovirus.

- Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UAE-Morelos. Bajo la tutoría del Dr. Fernando Esquivel Guadarrama. Por el apoyo brindado para el desarrollo de la técnica cuantificación de citocinas en ratones inmunizados.

- Al CONAyT por el otorgamiento de la beca Nacional y de Estancia en el Extranjero para llevar a cabo mis estudios de Doctorado (No. de registro 179885).

- Al Comité Tutoral y Jurado quienes han enriquecido con sus conocimientos y comentarios la tesis aquí presentada, Muchas gracias.

RESUMEN

Introducción. Para la obtención de una vacuna contra el virus de la rabia se han desarrollado diversas tecnologías incluidas las vacunas comestibles. **Objetivo.** Evaluar la respuesta inmune en animales de laboratorio inmunizados vía oral con zanahoria y maíz que expresan la proteína G del virus de la rabia (Gp-RV). **Materiales y métodos.** Células embriogénicas de zanahoria y maíz fueron transformadas por biobalística con vectores de expresión vegetal que expresan el gen G de Gp-RV. Las células embriogénicas fueron cultivadas en medio de selección con glufosinato de amonio y las plantas adultas regeneradas de ambas especies fueron analizadas para detectar la presencia de Gp-RV por PCR y Western blot. Con tejido radicular de zanahoria y semillas de maíz (expresando 100 µg de Gp-RV) se alimentaron ratones. El título de anticuerpos séricos fue evaluado cada 15 días, mientras que la inmunidad celular fue evaluada por determinación de las concentraciones de IFN- γ e IL-4 por ELISA. Los ratones fueron desafiados con el virus de la rabia a los 60 días post vacunación. **Resultados.** De las células embriogénicas transformadas se regeneraron 4 plantas adultas de maíz y 20 de zanahoria que expresaron la Gp-RV. Los ratones inmunizados con estas, desarrollaron anticuerpos antirrábicos en suero. La prueba de ELISA demostró la presencia del IFN- γ y en menor grado IL4. Tanto los animales del grupo control positivo como los animales alimentados con maíz sobrevivieron al desafío. **Discusión y Conclusiones.** Ambos tejidos administrados por vía oral fueron capaces de inducir anticuerpos protectores contra el virus de la rabia. Además en el caso de maíz, induce un balance entre la respuesta inmune TH1 y TH2.

Palabras clave: Rabia, zanahoria, maíz, biobalística, vacunas derivadas de plantas.

ABSTRACT

Introduction. To obtain a vaccine against rabies virus has developed various technologies including edible vaccines. **OBJETIVE.** Evaluate the immune response in laboratory animals immunized orally with corn and carrot that express the G protein of rabies virus (RV-Gp). **MATERIALS AND METHODS.** Embryogenic cells of carrot and corn were transformed by biobalistic with plant expression vectors that express the gene Gp-G RV. Embryogenic cells were proliferated in selection medium with glufosinate ammonium. The presence of Gp-RV was analyzed for by PCR and Western blot onto adult plants (maize and carrot). Male mice were fed with carrot root tissue and seeds of maize, that expressed 100 µg expressing GP-RV. The anti-G protein antibodies was evaluated every 15 days, whereas cellular immunity was determined only in animals immunized with maize. The concentrations of IFN- γ and IL4 were measured by ELISA. The mice were challenged with rabies virus at 60 days post vaccination. **RESULTS.** Embryogenic cells of transformed plants were regenerated 4 adult corn and 20 carrots expressing the Gp-RV. Mice immunized with transformed plant tissue developed anti-rabies antibodies in serum and the ELISA showed the presence of IFN- γ and low levels of IL4. Both the positive control group and animals fed with corn survived the challenge. **DISCUSION AND CONCLUSIONS.** Both tissues administered orally in mice induced protective antibodies against rabies virus. Moreover, in the case of maize, induce an immune response balance between TH1 and TH2.

Keywords: Rabies, carrot, maize, biolistic, plant derived vaccines.

INDICE GENERAL

1.0 Revisión de literatura	1
1.1 Características del virus de la rabia	1
1.2 Producción de antígenos en plantas	16
1.3 Justificación	28
1.4 Hipótesis	28
1.5 Objetivos	29
2.0 Materiales y métodos	30
2.1 Construcción de vectores de expresión vegetal	30
2.2 Establecimiento de cultivos vegetales	33
2.3 Transformación de callos embriogénicos de maíz y zanahoria por biobalística con pistola de baja presión	34
2.4 Selección y proliferación de callos embriogénicos.	36
2.5 Regeneración de plántulas.	37
2.6 Identificación del gen G en plantas de zanahoria y maíz transformadas.	39
2.7 Detección de la proteína G del virus de la rabia en plantas transformadas.	43
2.8 Expresión de la proteína G del virus de la rabia en baculovirus	47
2.9 Evaluación de la respuesta inmune de animales vacunados con zanahoria y maíz transformados con el gen G del virus de la rabia.	50
2.10 Desafío de animales inmunizados.	53
3.0 Resultados	54
4.0 Discusión	79
5.0 Conclusiones	90
6.0 Perspectivas	91
7.0 Referencias	92
8.0 Anexos	117
9.0 Anexo Artículo	127

Palabras clave: virus de la rabia, glicoproteína de rabia, maíz, zanahoria, vacunas derivadas de plantas, plantas transgénicas, biobalística.

1.0 REVISION DE LA LITERATURA

1.1 Características del virus de la rabia.

El virus de la rabia pertenece al orden de los Mononegavirales, a la familia *Rhabdoviridae* y al género de los Lyssavirus. Este grupo está caracterizado por ser virus envueltos, su genoma es ARN de cadena negativa no segmentado. La morfología de estos virus es cilíndrica con forma de bala de fúsil (Figura 1). Su peso molecular del virus es de 46, 106 kDa (Wunner *et al.*, 1988 y 2004; Ross *et al.*, 2008).

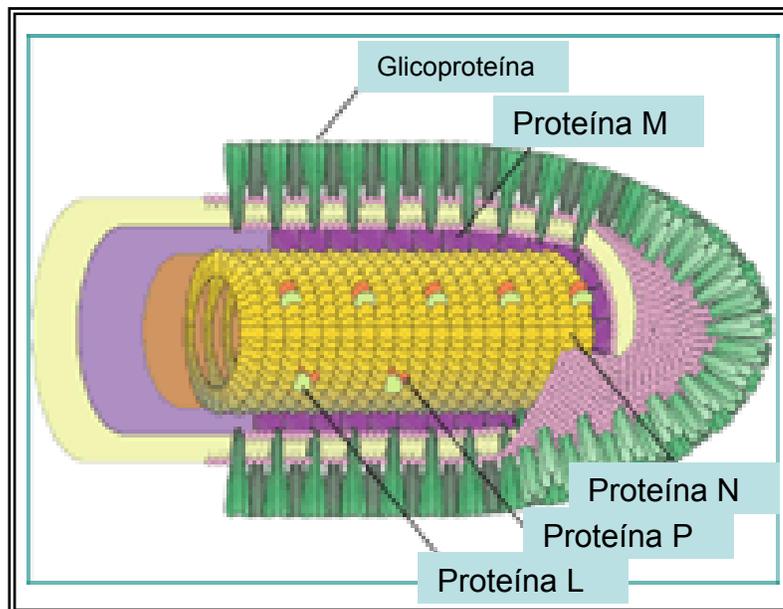


Figura 1. Esquema del virus de la rabia. Las proteínas N,P y L forman la Ribonucleoproteína que envuelve el ARN protegiéndolo.

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus reconoce siete genotipos de lyssavirus. El virus de la rabia es conocido como el genotipo 1 y los seis restantes son conocidos como lyssavirus relacionados a rabia o como lyssavirus no-rábicos (Nel & Markotter, 2007). Los lyssavirus conocidos se muestran en la Figura 2. En esta figura los autores han incluido además cuatro lyssavirus *no clasificados* aislados de murciélagos asiáticos (Nel & Markotter, 2007). Dicha clasificación está basada en la secuencia de nucleótidos de la proteína N, estos genotipos han sido confirmados además por secuenciación de la glicoproteína y de la fosfoproteína

(Badrane *et al*, 2001; Nadin-Davis *et al*, 2002). Los genotipos han sido nombrados como: virus de la rabia (genotipo 1), virus de Lagos (genotipo 2), virus Mokola (genotipo 3), virus Duvenhage (genotipo 4), lyssavirus de murciélagos europeos (EBLV) tipo 1 y 2 (genotipos 5 y 6 respectivamente), y virus de murciélagos australianos (ABLV; genotipo 7). Con excepción del genotipo 2, todos los lyssavirus han sido asociados con signos clínicos indistinguibles y enfermedad fatal en humanos (Ross *et al* 2008; Warrell & Warrel, 2004).

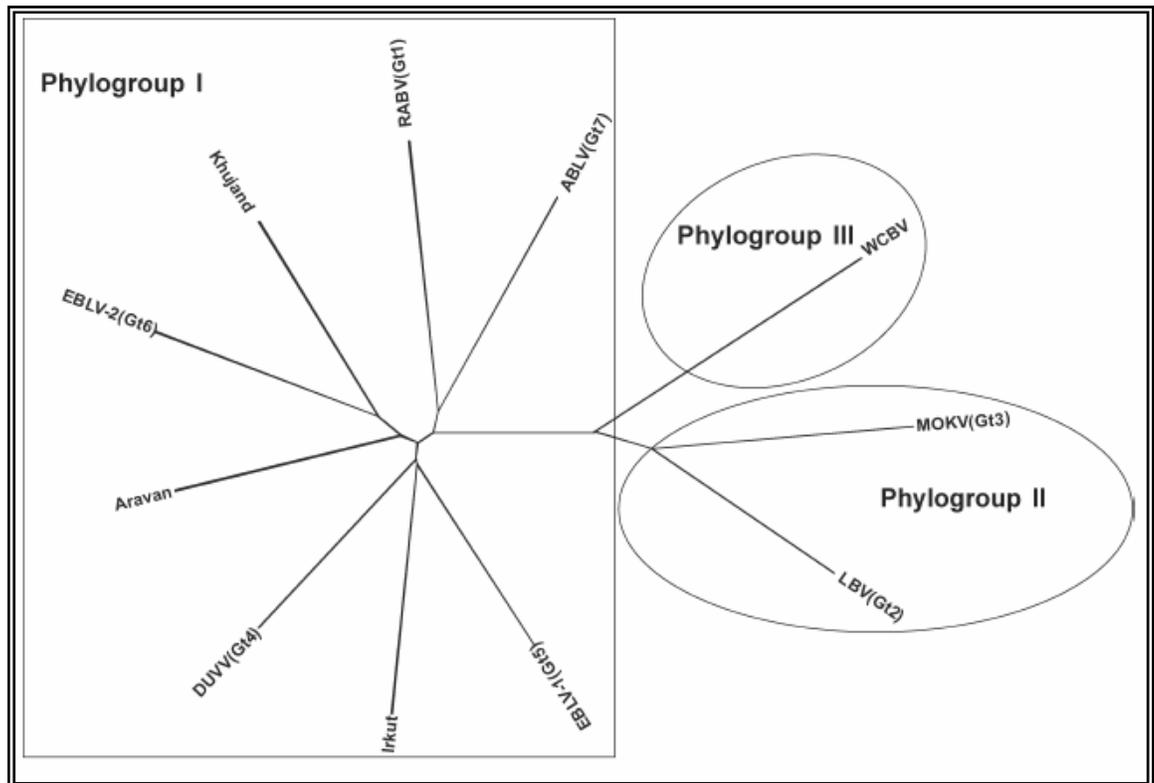


Figura 2. Árbol filogenético de los Lyssavirus. La clasificación fue llevada a cabo por alineamiento de 1353 pb del gen N de los aislamientos virales de los siete genotipos de lyssavirus y cuatro aislamientos no clasificados. RABV: virus de rabia; LBV: virus de murciélagos de Lagos; MOKV: virus Mokola; DUVV: virus de Duvenhage; WCBV: virus de murciélagos caucásicos del oeste; ABLV: lyssavirus de murciélagos Australianos. EBLV-1 y EBLV-2: lyssavirus de murciélagos Europeos 1 y 2.

El ARN viral consta de 11,932 nucleótidos, y se encuentra contenido en una nucleocápside helicoidal, constituyendo la ribonucleoproteína (RNP), la cual tiene un diámetro de 75 nm y tiene 130 nm de largo.

El virus de la rabia es envuelto, la membrana formada por fosfolípidos es derivada de la membrana plasmática de las neuronas donde se replica. La superficie externa del virus presenta peplómeros de 10 nm que le da una apariencia de espinas (Wunner, 2002).

El genoma está constituido por cinco genes: N, NS, M, G, L que codifican para el mismo número de proteínas. Entre los genes G y L, existe un pseudogen ϕ , el cual no codifica para ninguna proteína. En cepas virales modificadas se ha demostrado que dicho gen no participa en los procesos de diseminación o patogenicidad ya que no es un gen expresable, en algunos estudios se ha utilizado para epidemiología molecular, sobre todo la región cercana al gen G del virus (Ceccaldi *et al.*, 1998; Faber *et al.*, 2007; Wunner 2002).

La fosfoproteína (P).-

También llamada proteína NS (no estructural), posee 297 aa, es altamente conservada entre los genotipos (>97%), está asociada a la RNP e interactúa con la polimerasa, se ha demostrado su participación en la transcripción y en la replicación del ARN del virión. Se ha encontrado en diferentes formas de fosforilación, puede presentarse hiper o hipo-fosforilada y ambas formas pueden ser observadas a diferentes migraciones en geles de poliacrilamida (Gupta *et al.*, 2000).

Durante la formación de la nucleocápside (NC) viral la proteína P, que se encuentra estrechamente asociada a la NC; sufre cambios conformacionales, lo anterior sucede en el extremo N-terminal (Morimoto *et al.*, 2005; Pulmanusahakul *et al.*, 2008; Toriumi & Kawai, 2004). Una función esencial de la proteína P es la estabilización de la proteína L, la polimerasa del virus, en la plantilla de ARN (Curran *et al.*, 1995; Morimoto *et al.*, 2005). Por otra parte, el gen que codifica para dicha proteína ha sido utilizado para la caracterización molecular del género *Lyssaviruses*. Nadin-Davis *et al.* (2002) informaron que utilizando este

gen se revela una clara división entre los lyssavirus de murciélagos australianos y el genotipo 1, ó virus de la rabia. Además de diferencias entre el virus que circula principalmente en canidos y las cepas americanas de hospederos terrestres y quirópteros (Nadin-Davis *et al.*, 2002).

La proteína L (L).-

Contiene (2142 aa), es codificada por el quinto gen y constituye más del 50% del genoma viral. Es la polimerasa del virus por lo que es la responsable de la transcripción y de la replicación del ARN viral. Es la subunidad catalítica del complejo de la ARN polimerasa, el gen que codifica para esta proteína consta de 6380 nucleótidos. Por si misma actúa como polimerasa y junto con la P actúa como una proteína reguladora de la transcripción. Posee cuatro dominios, dos de ellos altamente conservados y se encuentran en la parte central de la proteína (Wunner 2002).

La nucleoproteína (N).-

La proteína N está formada por 450 aa, los cuales son altamente conservados entre las diferentes cepas del virus. Tiene un peso aproximado de 55 kDa es fosforilada y está asociada con el ARN viral protegiéndolo de las ribonucleasas y manteniéndolo en una configuración conveniente para la transcripción. Para el análisis de su estructura, Kawai *et al.*, (1999) demostraron mediante el reconocimiento de un anticuerpo monoclonal, que la proteína N no se fosforila inmediatamente, sino que primero se asocia con la proteína P para formar la nucleocápside. Al estar íntimamente relacionada con el complejo proteínas P-L, la proteína N juega un papel importante en los procesos de transcripción y regulación del ARN, ya que se ha observado que dicha proteína puede ser fosforilada por la casein cinasa II y la ausencia de esta fosforilación disminuye la transcripción (Toriumi & Kawai, 2004).

Durante el proceso de encapsidación del nuevo ARN genómico, la proteína N induce a la polimerasa viral que cambie del modo de transcripción viral al de

replicación viral. Se ha demostrado experimentalmente que la nucleoproteína ligada al ARN es resistente a la acción de las ARNasas durante la transcripción *in vitro* (Wu *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado la organización estructural de la proteína N activa a las células B para proliferar y producir anticuerpos. En adición, dicha proteína, induce en la RNP la potencialización de la respuesta de células T cooperadoras, resultando en una fuerte y prolongada respuesta inmune contra el virus (Lafon *et al.*, 1994). Los anticuerpos promovidos por la proteína N están dirigidos contra los cuatro sitios antigénicos que se han estudiado. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se ha visto que la conformación de dichos sitios es crucial para la inducción de anticuerpos. (Goto *et al.*, 2000; Morales *et al.* 2006). además se ha sugerido que la proteína N puede ser eficiente para ser presentada a las células presentadoras de antígeno (Koser *et al.*, 2004). Finalmente, se ha postulado a la proteína N como inmunomodulador debido a la estimulación de anticuerpos que promueve incluso cuando ha sido utilizada como adyuvante (Astoul *et al.*, 1996; Loza-Rubio *et al.*, 2009).

La proteína M.-

Posee (202 aminoácidos), se localiza sobre la cara interna de la envoltura lipídica, es una proteína estructural, con un peso molecular de 26 kDa (Wunner *et al.*, 1988). Es una proteína multifuncional, y ha mostrado que regula el balance entre la transcripción y replicación; la delección del gen M resulta hasta en 500,000 veces la reducción en la producción viral; interactúa con la RNP e induce la formación de un “esqueleto” superenrollado del complejo proteína-ARN que sirve para la formación de la RNP en la progenie viral e induce la salida de las partículas virales de la membrana plasmática o del retículo endoplásmico de las células infectadas. (Mebatsion *et al.*, 1999; Pulmanusahakul *et al.*, 2008; Wirblich *et al.*, 2008) Wunner *et al.*, 2004).

La proteína G.-

Está compuesta por trimeros de 505 aa y tiene un peso de 65 kDa, posee de dos a cuatro sitios de N-glicosilación, uno o dos son dependientes de la cepa viral y son importantes para el plegamiento de la proteína (Poian *et al.*, 2005). Tiene también una región transmembranal, con la cual se ancla a la membrana fosfolipídica del virus (Figura 3) (Faber *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2008). Los primeros 19 aa del extremo N-terminal representan el péptido señal, ya que son predominantemente hidrofóbicos. Posteriormente un dominio hidrofóbico de 22 aa es propuesto como el segmento transmembranal, importante en el correcto plegamiento del ecto-dominio. Desde este extremo se extiende una secuencia de 44 aa que corresponde a un dominio hidrofílico citoplasmático, que interactúa con la proteína M y las proteínas de la nucleocápside (Gaudin *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 2008).

La proteína G es el principal antígeno de superficie del virus y su inmunogenicidad depende de su conformación tridimensional y estructura, la cual contribuye a la formación de los tres sitios antigénicos y modificaciones postraduccionales, aunque se ha demostrado que la utilización de cualquiera de los péptidos es inmunogénico (Dietzhold *et al.*, 1990; Wunner 2002; Drings 1998).

Además, la proteína G es responsable de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T citotóxicos y cooperadores. Está involucrada en el reconocimiento del receptor celular específico y a pH bajos induce la fusión de la envoltura viral con la membrana celular (Sakai *et al.*, 2004). La proteína G es la responsable del neurotropismo del virus, mutaciones en ella disminuyen la neuroinvasividad sin perjudicar la capacidad del virus para multiplicarse en cultivo celular (Benmansour *et al.*, 1991; Drings, 1998; Kankanamge *et al.*, 2003). Estudios recientes, han demostrado que la expresión de proteína G en el sitio de inoculación del virus promueve una fuerte respuesta inmune antiviral, ya que se induce la apoptosis de las células infectadas (Finke & Conzelmann 2005; Nakamichi *et al.*, 2004). La glicoproteína es la principal

colaboradora de la patogenicidad del virus. Varios mecanismos patogénicos están asociados a la proteína G: interactúa con las moléculas de la superficie celular que pueden mediar la salida del virus; interactúa también con el complejo RNA-NP-M para la salida de las partículas virales de la célula. La patogenicidad de cepas de rabia fijas (ERA, CVS) correlaciona con la presencia de un determinante localizado en el sitio antigénico III de la proteína. Variantes del virus con mutaciones en la posición 333 (Arg→Glu) afectan el sitio antigénico III perdiendo su capacidad para matar ratones inmunocompetentes (Faber *et al.*, 2005).

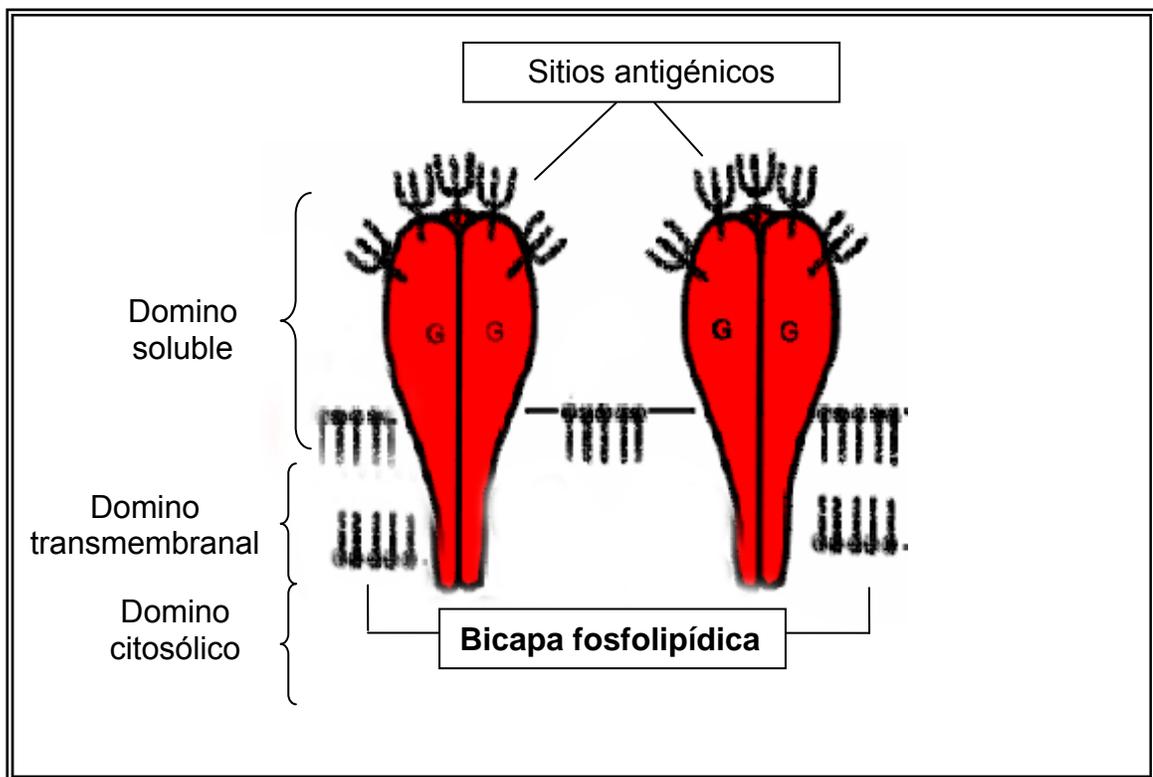


Figura 3. Esquema de la proteína G del virus de la rabia. En esta figura se observan los trimeros formados por la proteína G insertada en la membrana fosfolípida de la célula hospedera. También están representados los sitios antigénicos de la proteína, así como los dominios en los que se divide la glicoproteína.

1.1.2 Patogenia

El principal modo de transmisión es por medio de la mordedura de un animal infectado con el virus y en un grado menor los arañazos, el lamido, los aerosoles o

por trasplante de córnea. El virus de la rabia es transmitido a través del contacto con la saliva del animal enfermo, esto quiere decir, que para ser inoculado no necesita necesariamente ser mordido, sino que basta que exista una solución de continuidad en la piel que entra en contacto con la saliva del animal rabioso y que además lleve una cantidad adecuada de virus para infectar. Las evidencias experimentales indican que el virus tiene una replicación primaria en los miocitos del sitio de inoculación, justo antes de penetrar a nervios. La prolongada retención del virus en los miocitos después de la inoculación puede contribuir a las marcadas diferencias en el periodo de incubación. En periodos de incubación cortos, el virus invade los nervios periféricos y la replicación puede ser limitada a tejidos extraneuronales. La replicación viral en fibras del músculo, después de la infección y antes de la invasión del sistema nervioso central, sugiere que dicha amplificación es necesaria para la producción de virus suficiente para la invasión de los nervios periféricos (Lima *et al.*, 2005).

El virus rábico penetra a las fibras nerviosas desmielinizadas o terminaciones musculares, de las neuronas sensoriales o motoras, de la raíz de los ganglios dorsales, en la parte anterior de la médula espinal y que inervan al sitio afectado. Aquí ocurre la primera replicación viral, y de ahí se mueve en forma centrípeta e intraaxonal con un desplazamiento aproximado de 3 mm/hora, hasta el SNC. Después de la infección en el cerebro, el virus es diseminado de forma centrífuga a varios tejidos de las vías respiratorias, gastrointestinales y urogenitales. Se ha demostrado la presencia del virus en glándulas salivales, bazo, corazón, lengua, hígado, vías urinarias, músculos, uniones mioneuronales y motoras, tanto en humanos como en animales (bovinos, murciélagos, perros y gatos). En humanos se ha demostrado la presencia del virus en vías adrenales, páncreas y tracto gastrointestinal (Lima *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2007).

En general el tiempo de incubación es de 30 días, pero varía de acuerdo con la naturaleza del virus, el lugar de penetración y la cantidad de virus inoculada. Por

otra parte, se han notificado casos de perros infectados capaces de llevar el virus en la saliva por periodos prolongados, mientras permanecen como excretores asintomáticos. El período de incubación será más breve, si el punto de contacto ha sido la cabeza, el cuello o los miembros superiores, porque el virus alcanzará el sistema nervioso central (SNC) con mayor rapidez, llegando principalmente a través de los troncos nerviosos, de ahí emigra hacia los tejidos, pero sobre todo hacia las glándulas salivales, de donde es excretado a través de la saliva (Wagner 1999; Hendekli 2005; Lafon 2005). Aunque esta es la ruta mejor descrita, recientemente se ha demostrado la transmisión del virus de la rabia a través del transplante de órganos sólidos y tejidos, hasta 2005 habían sido documentados 8 casos (Burton *et al.*, 2005).

En cuanto al desarrollo de la enfermedad observado en animales, no se conocen signos clínicos especie-específicos. La severidad y variación de los signos esta relacionado al sitio específico de la lesión primaria en el sistema nervioso, a la cepa del virus, la dosis y la ruta de infección (Smart & Charlton, 1992). En general, después de algunas semanas, sigue un periodo prodrómico; este periodo se ha reportado desde 10 días hasta varios meses, al igual que en humanos la mordida en cuello o cabeza del animal, así como en áreas altamente inervadas acelera la presentación de los signos. Al fin del periodo de incubación, la enfermedad progresa a un corto estado prodrómico, encefalopatía y muerte (Charlton, 1994)

1.1.3 Inmunidad contra el virus de la rabia.

La respuesta inmune desencadenada por el virus de la rabia es peculiar debido al estatus del sistema nervioso como sitio inmuno-privilegiado. Esto esta basado principalmente en la restricción de migración de las células T y la deficiencia de células presentadoras de antígeno profesionales. Además de estos las cepas patogénicas del virus desencadenan un estado inmunosuprimido de la respuesta inmune periférica derivada de bazo (Lafon, 2002)

La protección contra el virus de la rabia es mediada principalmente por la producción de anticuerpos neutralizantes de virus, y/o linfocitos T (CD⁴⁺ cooperadores y CD⁸⁺ citotóxicos). Aunque la protección contra la infección del virus de la rabia es probablemente el resultado de diversas interacciones efector-hospedero, los anticuerpos neutralizantes de virus (ANV) que son producidos principalmente contra la proteína G, juegan el principal papel en la inmunoprotección contra la infección con rabia (Dietzschold *et al.*, 1990; Desmézieres *et al.*, 1999). Tanto la proteína G como la N juegan un papel importante en la inducción de la protección. Por un lado, la proteína G además de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes de virus, promueve también la producción de células T cooperadoras y citotóxicas. Su estructura es crítica para ambas, la inducción de anticuerpos neutralizantes como para la protección ya que está se ha demostrado haciendo desafíos intracerebrales. En el caso de la proteína N que es más conservada a través de los genotipos, estimula la producción de células T cooperadoras e induce la protección contra el desafío intracerebral, lo anterior por inducción de IFN- γ (Drings *et al.*, 1999; Hooper *et al.*, 1994).

La función de estas células T en la infección por rabia es completamente de cooperación para la inducción de células B y la producción de anticuerpos; a su vez actúan como efectores celulares para una inmunidad celular citotóxica (Jackson, 1997). Juegan un papel importante en la protección contra la infección por el virus, lo anterior ha sido demostrado en animales deficientes de células T infectados con el virus. Estos animales murieron aun cuando se utilizó una cepa del virus poco virulenta que regularmente no causa la muerte (Kaplan *et al.*, 1975)

Después de la captura por macrófagos y otras células presentadoras de antígeno, los antígenos del virus de la rabia son presentados a células CD4 o CD8. Esta estimulación induce la producción de citocinas tales como IL-2, IL-4 e IFN- γ . Las células CD4 pueden proveer ayuda para la producción de anticuerpos

neutralizantes por los linfocitos B. Se ha visto que tanto la IL2 como el IFN- γ amplifican la protección inducida por las vacunas y también activan células T citotóxicas, T cooperadoras, células B y NK (Drings, 1999).

Cuando el virus ha alcanzado a las células de la microglia estas pueden activarse e inducir neuroprotección relacionando factores trópicos y sustancias neuroprotectivas tales como plasminógeno e IL6. En contraste la microglia puede activar también apoptosis en neuronas dañadas por relación a factores tóxicos incluyendo óxido nítrico. Esta activación está controlada por citocinas y moléculas inflamatorias tales como IL-1 α/β , TNF α , IFN y óxido nítrico (NO). El resultado de esto es la migración de las células T a través de la barrera hemato-encefálica (BHE), sin embargo ha sido demostrado que las células que se han infiltrado a la BHE no pueden controlar la infección. Lo anterior puede deberse a que las células T no son específicamente activadas, son anérgicas, o son destruidas por apoptosis poco después de ingresar al sistema nervioso central (Baloul L & Lafon M, 2003). Experimentalmente, cuando el virus ha sido inyectado vía intramuescular, éste libera la expresión de ARNm para IFN- γ y bajos niveles de anticuerpos en el sistema nervioso central. Sin embargo, la inyección plantar promueve la proliferación celular y actividad citotóxica de células en linfonodos (Lafon 2005).

En cuanto a la respuesta inmune desarrollada tras la vacunación, está involucra la activación de células B específicas diferenciadas dentro del plasma que producen anticuerpos y células B de memoria. Los anticuerpos generados son específicos para la proteína G (en vacunas con virus vivo o muerto, también se generan anticuerpos contra las otras proteínas) y son dirigidos específicamente contra los componentes antigénicos de la proteína G y neutralizan al virus (Lafon et al., 1990). La producción de estos anticuerpos neutralizantes de virus involucra un refinado proceso de ajuste de especificidad resultando en la selección de células B

ávidas del antígeno. Este ajuste de especificidad y producción de anticuerpos es dependiente del correcto plegamiento de la proteína ya que de otra forma los sitios antigénicos no quedan expuestos. En un experimento donde ratones fueron inmunizados con vectores de ADN que contenían a la proteína G truncada en diferentes sitios, demostró que los sitios antigénicos II y III son los responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes de virus y que esto es como ya se había mencionado del plegamiento de la proteína (Desmézières *et al.*, 1999)

1.1.4 Vacunas antirrábicas

La primera vacuna antirrábica administrada con éxito fue realizada por Luis Pasteur a Joseph Meister, un niño de 9 años de edad. Esta consistió en inoculaciones subcutáneas de una suspensión desecada de médula espinal de conejos rabiosos; a partir de este hecho se han desarrollado diferentes tipos de vacunas (Lodmell & Ewalt, 2004; Loza-Rubio & Gómez-Lim, 2004).

Las vacunas de primera generación se producen en tejido nervioso de diferentes animales inoculados con virus de la rabia y son inactivadas con fenol, formol, luz ultravioleta y con β -propiolactona. A pesar de los severos efectos que pueden producir las vacunas a partir de cerebro de cabra y borrego (tipo Semple), y de cerebro de ratón lactante (tipo Fuenzalida) se siguen utilizando en algunos países, ya que son fáciles de preparar, y resultan económicas. En algunos países en vías de desarrollo, representan el único recurso de prevención contra la infección. En los 50's, las vacunas de embrión de pato y la Flury de alto pasaje ingresaron al mercado y permanecieron hasta los años 80, fueron retiradas del mercado, porque tenían una respuesta poco inmunogénica, además de que a menudo causaban reacciones adversas (Briggs *et al.*, 2002; Drings, 1999).

A finales de la década de los 90's se desarrollaron vacunas de tipo oral utilizando la cepa ERA del virus. La primera denominada SAD, es una vacuna de virus

atenuado. Resultó eficaz en la vacunación de animales silvestres, sin embargo presentó problemas de virulencia residual y bajos títulos de anticuerpos en ganado (Paolazzi *et al.*, 1999; Piza *et al.*, 2002; Wandeler, 2000). Por otra parte, las vacunas SAG-1 y SAG-2, derivadas de la SAD con cambios en el codón 333 de la glicoproteína, son genéticamente más estables. Lo anterior resultó en la exitosa vacunación oral de zorros en Europa y en perros (Orciari, 2001). El uso de la vacuna Rabigen (SAG-2) ha sido evaluada también de forma exitosa en la inmunización de mapaches, todos los animales inmunizados presentaron seroconversión y sobrevivieron a un desafío realizado después de seis meses post vacunación (Cliquet *et al.*, 2006). Adicionalmente, en países como la India en donde la transmisión del virus por perros callejeros se han montado ensayos piloto utilizando esta vacuna de forma oral (Pradhan *et al.*, 2008).

Uno de los principales problemas para controlar la enfermedad son los animales que funcionan como reservorios en la transmisión del virus, por lo cual fue necesario el diseño de un biológico más seguro y eficaz para la vacunación de estos animales. Hasta la década de los 70's el único recurso de vacunación para animales era la vacunación parenteral, sin embargo esto es difícil en el caso de animales silvestres (Desmettre *et al.*, 1990). Por lo que la única alternativa fue la vacunación oral. Debido a que las vacunas inactivadas que se utilizaban no eran estables al ser administradas por vía oral, se utilizó un vector viral que expresará a la glicoproteína del virus de la rabia.

En Norteamérica en 1971 y en Europa en 1972 (Baer *et al.*, 1971; Mayr *et al.*, 1972) se desarrollaron las primeras vacunaciones utilizando este sistema de vacunación. En Europa, la rabia en zorros fue controlada con la primera vacunación oral masiva que se llevo a cabo el 1978 en el valle de Rhône, Suiza en zonas endémicas posteriormente la distribución se extendió a diferentes territorios; la distribución se llevó a cabo de forma manual utilizando cebos que contenían la vacuna (12-25 cebos/Km²) (Bugnon *et al.*, 2004; Wandeler, 2000).

Para la vacuna Raboral V-RG, diseñada para uso veterinario, la proteína G fue clonada en virus vaccinia y fue utilizada para el control de la rabia silvestre en Europa, resultando en la erradicación de rabia silvestre en Bélgica, demostrando así sus propiedades inmunogénicas (Brochier *et al.*, 1991; Paloazzi, 1999). Este sistema de expresión (vaccinia-proteína G de rabia) ha sido mejorado, obteniendo buenos resultados en la inmunización por vía oral de fauna silvestre (Blanton *et al.*, 2007)

Por otra parte, la proteína G fue expresada en un adenovirus con replicación defectiva, esta vacuna se le nombró Adrab.gp. El uso de esta vacuna demostró la activación de células T citotóxicas y producción de anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados por vía subcutánea. Su eficacia fue superior a la vacuna diseñada en vaccinia, ya que la vacuna Adrab.gp se presentó un menor porcentaje de mortalidad y mayor título de anticuerpos neutralizantes (Lodmell y Ewalt, 2000; Wang *et al.*, 1997; Xiang *et al.*, 1996). Más recientemente, se ha desarrollado una vacuna utilizando un adenovirus canino para expresar la proteína G del virus de la rabia. Esta vacuna fue evaluada en gatos administrándola por las vías intramuscular, oral e intranasalmente en todos los casos los animales desarrollaron una respuesta humoral específica y sobrevivieron a un desafío con un virus de desafío estándar (Hu *et al.*, 2007) La vacuna fue administrada oral e intranasalmente en perros y después de 3 semanas post-vacunación los animales desarrollaron anticuerpos antirrábicos, manteniendo niveles de por lo menos 0.5 UI/mL hasta por dos años (Shoufeng *et al.*, 2008).

Posteriormente, debido a la preocupación de que los vectores virales utilizados pudieran integrarse a los genomas de células eucariotas, se utilizó un Canarypox, para expresar la proteína G del virus. El virus es capaz de infectar a células de mamíferos, pero no se produce la infección, ya que es un virus que sólo afecta aves. A esta vacuna se le nombró (ALVAC-RG), fue bien tolerada tanto por

animales como por humanos, demostrando promoción de respuesta humoral en perros y en gatos (Fries *et al.*, 1996). Otros esfuerzos han sido llevados a cabo utilizando este vector viral, Wright y colaboradores (2004) expresaron la proteína G del virus de la rabia en un canaripox, adicionalmente también fue expresado un antígeno del virus de inmunodeficiencia humana. La vacuna además de desarrollar respuesta humoral contra los dos antígenos sino que también mostraron la inducción de linfocitos T citotóxicos (Wright *et al.*, 2004).

Otro ejemplo de vacuna utilizando vectores virales, fue el desarrollado por Saxena y colaboradores (2008). Este grupo de trabajo expresó la proteína G del virus de la rabia en el virus sindbis, el cual es modificado para tener una replicación deficiente. La eficacia de la vacuna fue comparable con la de una vacuna de ADN y otra de cultivo celular (Rabipur). En este caso, los ratones fueron inmunizados intramuscularmente con el vector viral, desarrollaron una respuesta humoral y mediada por células, la vacuna además confirió completa protección ante un desafío (Saxena *et al.*, 2008). Otro sistema utilizado, fue el virus de pseudorabia, en este virus se expresó de igual forma la glicoproteína del virus de la rabia y al inocularlo por vía oral e intramuscular en perros fue capaz de inducir una respuesta inmune específica y duradera por 6 meses (Yuan *et al.*, 2008)

Por otra parte, se encuentran las vacunas de ADN desnudo, en las cuales la glicoproteína es clonada dentro de un plásmido que es replicado en bacterias. Estas vacunas han sido evaluadas en ratones, perros, gatos y primates (Wang *et al.*, 1997; Lodmell *et al.*, 1998; Perrin *et al.*, 1999). Este tipo de biológicos representan una ventaja sobre las vacunas tradicionales, ya que son más seguras y estables, son más fáciles de manipular en su producción y se ha demostrado la producción tanto de respuesta humoral de largo plazo, así como respuesta inmune celular (Cupillard *et al.*, 2005; Lodmell *et al.*, 2006; Tesoro-Cruz *et al.*, 2006; Tesoro-Cruz *et al.*, 2008^a y 2008^b; Xiang *et al.*, 1994).

1.2 Producción de antígenos es plantas.

1.2.1 Métodos de transformación vegetal.

La transferencia vegetal se puede definir como el proceso de cambiar el fenotipo de un organismo a través de la introducción de ADN extraño a su genoma.

Las técnicas para llevar a cabo este proceso pueden dividirse en técnicas de transformación estable (el transgen se integra al ADN vegetal y es heredable) y transitoria (el transgen se expresa solamente en el tejido trasfectado) (Kaufman *et al.*, 1995). La expresión transitoria es más rápida comparada con la estable y da resultados en días, sin embargo tiene como limitante que la producción no se puede escalar (Shillberg *et al.*, 2005).

En la actualidad, se ha demostrado que prácticamente todas las especies vegetales son susceptibles para la transferencia de genes por alguna de las técnicas siguientes: microinyección, electroporación, transferencia de ADN por infección con *Agrobacterium tumefaciens* y biobalística (Rusell *et al.*, 1992; Morrish y Fromm, 1992; Klein & Fitzpatrick-MacElligott, 1993; Christou, 1995; Kholí *et al.*, 2003).

La transformación por *A. tumefaciens* no requiere inoculación, la infección de los explantes vegetales ocurre de forma natural; existe producción de niveles constantes de proteína; y el transgen es heredable. Con este método se han realizado transformaciones exitosas utilizando hojas, cloroplastos y raíz de una amplia variedad de especies vegetales (Jiang-Li *et al.*, 2005; Hull *et al.*, 2005; Berinstein *et al.*, 2005).

Por otra parte, la biobalística o bombardeo de micropartículas, concebida por Sanford en 1988 (Sanford, 1988), permite la introducción de ADN desnudo al interior de células vegetales, mediante la aceleración de micropartículas metálicas cubiertas de ADN. Las partículas, que pueden ser de tungsteno u oro, son

aceleradas por un estallido de gas (dióxido de carbono, nitrógeno o helio) dando la suficiente fuerza para penetrar la pared celular (Klein *et al.*, 1988; Kholí *et al.*, 2003).

Para que la transferencia de ADN por biobalística se lleve a cabo, es necesario tener en cuenta algunas variables que son críticas, como: a) naturaleza, material, concentración y forma de las partículas, b) concentración y adherencia del ADN a los partículas, c) velocidad de la partícula, d) vacío en la cámara de bombardeo, e) aceleración de las partículas y f) distancia entre el tejido blanco y la pistola de disparo de partículas (Morrish *et al.*, 1993; Southgate *et al.*, 1995).

La producción de proteínas de interés farmacéutico mediante la transformación vegetal se hace más atractiva, ya que las proteínas sufren procesos postraduccionales, como la glicosilación que pueden optimizar la producción de los productos farmacéuticos liberados de la planta (Faye *et al.*, 2005).

1.2.2 Métodos de selección

Una fase crítica en la obtención de plantas transgénicas, es la selección de células transformadas, esto puede ser realizado por algún agente químico, los más utilizados son antibióticos o agroquímicos como agentes herbicidas. Lo anterior se lleva a cabo insertando genes de resistencia a alguno de estos químicos en el material genético de las células. Uno de estos es el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida BASTA® (glufosinato de amonio).

Este gen (*bar*) se obtuvo de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para la enzima fosfinitricin-N-acetil-transferasa, cuyo sustrato es la fosfinitricina conocida como glufosinato de amonio, principio activo del herbicida BASTA. Este compuesto actúa como un potente inhibidor de la glutamina sintasa que es la enzima central en el metabolismo del nitrógeno de las plantas. El resultado es la acumulación de amonio y de la deficiencia de glutamina resultado en la muerte rápida del vegetal. Dicho gen fue clonado en un vector binario manejado por el promotor de la

nopalina sintasa (pNOS), un origen de replicación RK2 y un marcador de resistencia a kanamicina para el crecimiento en *E. coli* (Becker *et al.*, 1992 Dröge *et al.*, 1992). La transformación con el vector descrito anteriormente vía *Agrobacterium tumefaciens*, ha sido descrita para alfalfa, zanahoria y tabaco así como los metabolitos resultantes de la integración de el glufosinato de amonio a las células vegetales sin repostarse daños toxicológicos en animales de laboratorio (Ruhland *et al.*, 2002).

1.2.3 Estrategias de optimización de la expresión de proteínas.

Además de la elección de la especie vegetal, otro de los aspectos importantes para obtener una vacuna comestible es obtener buenos niveles de expresión en cuanto a proteína total soluble de la proteína ($\geq 1\%$), ya que con porcentajes bajos (0.01%) obligan a purificar la proteína para concentrarla. Para lograr esto, existen diversas estrategias a seguir como son: la optimización del gen, uso de promotores fuertes (tejido específicos), secuencias líder no traducibles en la región 3', señales blanco subcelulares, cruzamiento de líneas transgénicas con alta expresión, cruzamiento en germoplasma, transformación de plastídeos y el uso de sistemas de expresión de virus vegetales (Mett *et al.*, 2008; Streatfield, 2006; Potenza *et al.*, 2004; Walmsley & Artzen, 2000; Sala *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2004; Gleba *et al.*, 2005).

1.2.3.1 Uso de promotores específicos.

En la actualidad existe un amplio espectro de promotores que han sido utilizados para regular la expresión del transgen en las plantas transformadas. La regulación de este puede ocurrir en cualquier paso del proceso de expresión y los promotores que la manejan aseguran este control durante la transcripción. La elección de un promotor para la transformación vegetal, depende del objetivo y la finalidad por la que se está transformando una planta, así como de la especie de la que se trate. Se pueden utilizar promotores específicos de especie o de tejido, de semillas o

granos, de flores, de polen, de raíces, de hoja o de tejido aéreo (Buchanan *et al.*, 2000; Potenza *et al.*, 2004).

Dentro del promotor existen regiones reguladoras, secuencias motivos o elementos *cis*, a estas secuencias reguladoras se les denomina incrementadores. Pueden estar localizados corriente arriba o corriente abajo de la región codificante. Estas regiones son requeridas para la transcripción máxima de un gen, y es por esta razón que se utilizan en los vectores de transformación vegetal (Alberts *et al.*, 2002).

El mas común de los promotores constitutivos utilizados en la transformación vegetal es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV) (Odell *et al.*, 1985), es altamente valorado debido a que aparentemente tiene altos niveles de expresión en prácticamente todas las regiones de la planta transgénica. Este promotor puede conducir a altos niveles la expresión de transgen tanto en mono como en dicotiledóneas, aunque en las primeras es un poco recalcitrante (Battraw & Hall, 1990; Benfey *et al.*, 1990a).

1.2.3.2 Vectores Virales

Una alternativa de transformación transitoria es el empleo de vectores virales. Las principales ventajas son: el pequeño tamaño de los genomas de los virus, la fácil manipulación, la facilidad para la infección y que la secuencia insertada dentro del vector puede ser altamente amplificada durante la replicación viral (Liu L *et al.*, 2005).

Dentro de los métodos de transformación transitoria se encuentra la infección del tejido vegetal con virus recombinantes que infectan plantas. Algunos ejemplos son: el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del mosaico cowpea (CPMV), virus x de la papa (PVX), virus del tomate enano (TVSV) y el virus del mosaico de la alfalfa (AIMV). Las ventajas de este sistema con respecto a la transformación nuclear son: producción de cantidades mayores de la proteína expresada (hasta 46% de proteína total soluble (Daniell *et al.*, 2005)) y menor tiempo de inversión

para obtener resultados. Sin embargo representan las desventajas de requerir de inoculación del virus en el tejido vegetal cada vez que se desee expresar la proteína; no se hereda el transgen de interés a través de la división de las células vegetales y lo que quizá es el mayor inconveniente, se requiere la purificación del virus previa inoculación en el tejido vegetal (Cañizares *et al.*, 2005; Porta & Lomonossoff, 2002).

Otra de las estrategias utilizadas para obtener una transformación estable es la transformación utilizando cloroplastos. Permite una alta producción de la proteína y además es necesario precisar el sitio de la inserción. Desgraciadamente este tipo de transformación no provee a las proteínas las modificaciones postraduccionales que los antígenos pueden necesitar (Daniell, 2006).

1.2.4 Vacunas derivadas de plantas

A lo largo de la historia, se ha visto que la forma más eficaz de controlar y en algunos casos erradicar las enfermedades infecciosas es la vacunación. Por lo anterior, la recomendación de la OMS es desarrollar vacunas que sean de bajo costo, de fácil manejo y distribución, sobre todo para países en vías de desarrollo en donde las enfermedades infecciosas tienen un alto porcentaje de mortalidad.

La producción de vacunas en plantas transgénicas fue propuesta por primera vez en la década de los 90's. El impacto de esta nueva tecnología radica en que todas las partes de las plantas como hoja, semillas, raíz y frutas pueden ser utilizadas como vehículos para la producción de productos biomédicos. La producción de vacunas derivadas de plantas pueden clasificarse en dos categorías: a) vacunas para enfermedades infecciosas y b) vacunas contra el cáncer (Kirk, 2005^{a,b}; Koprowski, 2005; Rigano *et al.*, 2005; Lal *et al.*, 2007; Yusivov & Rabindran, 2008).

Estos avances en la ingeniería genética han hecho posible la introducción de genes exógenos a muchas especies vegetales como por ejemplo los cereales o las legumbres. Esto es una ventaja que se ha empleado para producir vacunas

que expresan genes de diversos antígenos en plantas, a este tipo de vacunas se les ha dado el nombre de vacunas comestibles. (Faye *et al.*, 2005).

La especie vegetal utilizada para expresar el antígeno de interés debe permitir la liberación oral del mismo en forma de vacuna comestible. Actualmente, se han desarrollado una amplia variedad de vacunas comestibles de interés humano las cuales han completado ya la fase clínica I; mientras que las vacunas de uso veterinario, han dado resultados prometedores en fases tempranas en las especies específicas para las cuales han sido diseñadas. El principal interés de expresar antígenos en el campo de la salud animal, es el desarrollo de vacunas contra enfermedades infecciosas (Streatfield, 2005).

Algunos de los antígenos de interés veterinario que han sido expresados en sistemas de expresión vegetal son: el virus de la diarrea viral bovina (alfalfa), virus de la gastroenteritis transmisible porcina (tabaco, maíz), virus de la fiebre aftosa (*Arabidopsis*, tabaco, papa, alfalfa), virus de Norwalk (papas), rabia (tabaco, jitomate y espinaca), rotavirus (alfalfa), virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (alfalfa), *Taenia* (papaya), herpes virus bovino (tabaco), rotavirus bovino (tabaco y alfalfa), parvovirus canino (tabaco), (lechuga, alfalfa y papa), papiloma de los conejos (tabaco), virus de la bronquitis infecciosa (papa), virus de Newcastle (papa, tabaco y maíz), virus de la diarrea epidémica porcina (tabaco y papa), virus rinderpest virus (cacahuete), *Bacillus anthracis* (tabaco, alfalfa, jitomate), *Fasciola hepatica* (lechuga), *Mannhemia haemolytical* (alfalfa), *Mycobacterium tuberculosis* (*Arabidopsis* y alfalfa), *Toxoplasma gondii* (tabaco) (Berinstein *et al.*, 2005 ; Dong *et al.*, 2005; Dus Santos & Wigdorovitz *et al.*, 2005; Floss *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2007; Jiang-Li *et al.*, 2005; Kang TJ *et al.*, 2005; Loza-Rubio & Gómez-Lim M, 2006; Tacket CO, 2005; Wigdorovitz *et al.*, 2004; Lal *et al.*, 2007; Yusivov & Rabindran, 2008). Todos estos sistemas han sido utilizados en la inmunización por vía oral y parenteral en algunos casos ya que las proteínas que han sido expresadas en tabaco tienen que ser purificadas. En la

mayoría de los casos se ha trabajado con el ratón como modelo biológico y sólo en algunos cuantos se han inmunizados animales de la especie blanco.

Ya que una de las principales ventajas a la que siempre se hace referencia cuando se trata de vacunas derivadas de plantas es el bajo costo de estas, en el Cuadro 1 se hace una comparación de este rubro y otras características en comparación con biológicos desarrollados en otros sistemas tanto de vacunas de nueva generación, como de vacunas tradicionales (Boehm 2007; Bower *et al.*, 2007; Daniell *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2005; Mett *et al.*, 2008; Peeters *et al.*, 2001; Tillman, 2004).

1.2.5 Vacunas comestibles contra el virus de la rabia

Uno de los principales métodos de control y erradicación de la rabia es la inmunización, sin embargo la producción y distribución de los biológicos puede resultar difícil en campo. Por esta razón, resulta atractivo el diseño de una vacuna derivada de plantas contra el virus de la rabia.

Debido a que la proteína G del virus de la rabia es la responsable de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos en el hospedero; esta proteína así como la proteína N han sido expresadas tanto en plantas transgénicas de jitomate (McGarvey PB, *et al.*, 1995; Perea-Arango *et al.*, 2008) como de tabaco (Asraf *et al.*, 2005; Modeslka *et al.*, 1998; Perea-Arango *et al.*, 2008; Yusibov *et al.*, 1997) y espinaca.

En todos los casos en donde se evaluó el tejido vegetal que expresó a la proteína, o la proteína purificada de tejido transformado; resultaron ser inmunogénicas en animales de laboratorio y también en humanos en el caso de la espinaca, produciendo buenos índices de neutralización (Yusibov V, *et al.*, 2002).

Tabla 1. Comparación de los diferentes tipos de vacunas que existen tanto en el mercado como a nivel de experimentación

Tipo de Vacuna	Ventajas	Desventajas	Costo de producción	Ejemplo
Vivas, atenuadas	<ul style="list-style-type: none"> - Respuesta inmune fuerte. - Inmunidad prolongada con una o dos dosis 	<ul style="list-style-type: none"> - Pueden originar la forma virulenta del patógeno. - Deben ser refrigeradas para mantener su potencia. - Posible -diseminación del patógeno al medio ambiente. -Administración parenteral (jeringas) 	300-10,000 USD	Sarampión, Rabia
Inactivadas o muertas	<ul style="list-style-type: none"> - Más seguras y estables que las vivas. - Respuesta inmune comparada con las vivas 	<ul style="list-style-type: none"> -Respuesta inmune más débil que las vivas. -Regularmente requieren refuerzos. -Administración parenteral (jeringas) 	300-10,000 USD	Hepatitis A, Rabia
Vectores Virales	<ul style="list-style-type: none"> -Simulan la infección natural, fuerte respuesta inmune. -Puede generarse respuesta contra más de un patógeno. -Infraestructura sofisticada. -Pueden administrarse por vía mucosal 	<ul style="list-style-type: none"> -Su desarrollo requiere de mucho tiempo por la construcción génica del vector. -No ha sido completamente demostrado que el ADN no sea integrado al genoma del hospedero. -Complicados procesos de purificación 	*No reportado	<ul style="list-style-type: none"> -Ensayos clínicos. -Existen varias experimentales incluyendo las de rabia.
ADN recombinante	<ul style="list-style-type: none"> -Producen fuerte respuesta celular y de anticuerpos. -Relativamente fáciles de producir. -No necesariamente necesitan cadena fría. -Pueden administrarse por vía mucosal 	<ul style="list-style-type: none"> -Uso de pistola de genes. -Requieren refuerzo ya que no contienen el antígeno como tal. -No ha sido completamente demostrado que el ADN no sea integrado al genoma del hospedero. -Requiere purificación. -Puede contener impurezas que resulten tóxicas en el hospedero 	> \$100 USD	<ul style="list-style-type: none"> -Ensayos clínicos. -Existen varias experimentales incluyendo las de rabia.
Subunitarias: Bacterias, Baculovirus, Levaduras	<ul style="list-style-type: none"> -Son blanco-específicas. -Seguras en su producción y manejo. -Baja probabilidad de reacciones adversas. 	<ul style="list-style-type: none"> -Su desarrollo puede consumir mucho tiempo. -Poco inmunogénicas -Necesitan adyuvantes. -Administración parenteral (jeringas) 		Hepatitis B, neumonía causada por <i>Streptococcus</i>

Tabla 1. Comparación de los diferentes tipos de vacunas que existen tanto en el mercado como a nivel de experimentación (Cont.)

Bacterias	<ul style="list-style-type: none"> -Es el mejor sistema de producción caracterizado para vacunas subunitarias. -Fácil manejo. -Eficiente en producción de proteínas bacterianas. -Nivel de expresión: 0.3g/L -Fácil escalamiento de producción 	<ul style="list-style-type: none"> -Limitado a la producción de péptidos o pequeñas proteínas. -No realiza procesos post-traduccionales. -Requiere purificación. -Puede contener impurezas que resulten tóxicas en el hospedero. 	\$500 USD/gramo de proteína recombinante.	Ensayos clínicos
Levaduras	<ul style="list-style-type: none"> -Puede expresarse más e una proteína. -Realiza procesos postraduccionales. -Nivel de expresión: >1g/L 	<ul style="list-style-type: none"> - Necesita purificación de la proteína. -Sistema poco desarrollado. -Posible degradación de la proteína en el medio. 	*No reportado	<ul style="list-style-type: none"> -Hepatitis B -Virus de papiloma Humano
Baculovirus	<ul style="list-style-type: none"> -Puede expresarse más e una proteína. -Realiza procesos postraduccionales. -Nivel de expresión: >0.1mg/L -Producción, manejo y distribución seguros. -Fácil escalamiento de producción 	<ul style="list-style-type: none"> -Necesita purificarse del medio. -Cultivo de células. 	\$1 USD por dosis	-Virus de papiloma humano
Derivadas de plantas	<ul style="list-style-type: none"> - Puede expresarse más e una proteína. -Realiza procesos postraduccionales. -Producción, manejo y distribución seguros. -Administración oral -Nivel de expresión: hasta 200mg/L células en suspensión. Y: hasta 1g/Kg de tejido fresco 	<ul style="list-style-type: none"> -El nivel de expresión es muy variable entre plantas individuales. -Manejo de organismos genéticamente modificados. -La producción a gran escala de plantas completas es complicado. 	<ul style="list-style-type: none"> \$50 USD/gramo de proteína recombinante. \$0.23 USD por dosis 	-Virus de Newcastle

1.2.6 El maíz como modelo de expresión

El maíz es una planta herbácea anual, cuyo nombre científico es Zea mays (Internacional Code of Botanical Nomenclature, XV International Botanical Congress, 1993). Sus células poseen $2n$ cromosomas; con un gran desarrollo vegetativo que puede alcanzar hasta los 5 m de altura (el promedio es de 2 a 2.5 m). Muy robusta, tallo nudoso y macizo y con 15 a 30 hojas alargadas y abrasadoras (4 a 10 cm de ancho por 35 a 50 cm de largo), de borde áspero, finamente ciliado y algo ondulado. Desde el entrenudo inferior pueden nacer tallos secundarios que no suelen dar espiga y en caso de darlas son abortivas (Reyes, 1990). Posee un sistema radicular fasciculado bastante extenso formado por tres tipos de raíces: raíces primarias, raíces secundarias o principales y raíces aéreas o adventicias (C.I.A., 1980). Posee flores masculinas y femeninas. Las flores masculinas se agrupan en una panícula (penachos o pendones) terminal y las femeninas se reúnen en varias espigas (panojas) que nacen de las axilas de la hojas del tercio medio de la planta (Castañeda FN, 1990). El fruto de maíz (grano) lo describe Reyes (1980) como una cariósida formada por la cubierta o pericarpio (6% del peso del grano), el endospermo (80%) y el embrión o germen (14%).

El grano de maíz está constituido por diferentes compuestos:

Almidón: constituido por amilasa y amilopectina conformando un 90% en el endospermo; fuente principal de energía durante la germinación (Hamaker R et al, 2002). Este y otros carbohidratos son el principal componente del maíz.

Proteína: Las zeínas son las más abundantes, 90% del total de proteínas en el endosperma y tienen pesos moleculares que van desde los 19 a 60 kDa. Funcionan como proteínas de almacenamiento principalmente, las no zeínas participan en diversas funciones a nivel de pared celular y citoplasma (Hamaker R et al, 2002). La proteína total varía entre el 30% (Watson, 1987), lo que lo hace uno de los modelos biológicos más prometedores para la expresión de proteínas exógenas, además de ser uno de los sistemas más ampliamente estudiados

dentro del grupo de los cereales. Es justamente la cantidad de proteína total una de las características más deseables al elegir un sistema de expresión vegetal.

Lípidos: mono, di y triglicéridos, ácido linoleico y oleico, fosfolípidos y esteroides conformando del 3.5 al 5% en grano (Hamaker R et al, 2002).

Componentes menores: fitato, yodo, zinc, hierro, vitamina E, piridoxina y niacina; (Hamaker R et al, 2002).

México es centro de origen del maíz y su riqueza de razas y variedades es el producto de generaciones que han logrado obtenerlas y preservarlas. Estas razas y variedades de maíz están adaptadas prácticamente a todas las condiciones. Debido a esto, se puede encontrar maíz cultivado desde las costas de ambos océanos hasta más de 3000 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas medias mensuales, durante su ciclo vegetativo, de 28°C en las zonas más calidas y de 12°C o menos en las zonas frías (C.I.A., 1980).

Reyes (1990) señala que las razas de maíz, las cuales son ampliamente comerciales, rendidoras de grano y forraje, y que han intervenido de manera notable en los programas nacionales de desarrollo son: a) raza Vandefío, se cultiva en la tierra caliente de la costa del Pacífico Sur; b) raza Tuxpeño, se cultiva en las tierras bajas de la costa del golfo de México; c) raza Tabloncillo, solamente se cultiva en Jalisco y Nayarit y d) raza Celaya, se cultiva en la zona del Bajío.

1.2.7 La zanahoria como modelo de expresión

La zanahoria (*Daucus carota L*) es una planta de clima frío bianual, pero cultivada también en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en grandes altitudes. Es la hortaliza de mayor importancia y consumo de la familia de las umbelíferas. La zanahoria contiene proteínas en un 1.5%, un 0.2% de grasa, 7.3% de azúcares y abundantes vitaminas. Posee hierro, potasio y calcio en niveles muy

considerables y algo menos de fósforo. La composición de la raíz (parte comestible) es muy compleja y entre sus azúcares contiene glucosa y sacarosa (Shcianone & Cooke, 1985). En la actualidad es uno de los modelos biológicos más estudiados en el campo del cultivo de tejidos vegetales, más aun como sistema de expresión de proteínas. Si bien no como planta completa si como sistema de expresión de proteínas exógenas en cultivo de células en suspensión (Yusibov, *et al.*, 2008). Las ventajas de su uso es su relativa eficiencia al ser transformado, ya sea por biobalística o por infección con *Agrobacterim*. Si bien como se menciona en este párrafo, su contenido de proteínas es bajo, al producir grandes cantidades ya sea del vegetal o de las células en suspensión su potencial como sistema de expresión de antígenos es muy elevado. Este vegetal además de ser consumido en forma cruda por el ser humano ha sido incorporado al alimento de varias especies ganaderas como caballos entre otros.

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La rabia es una enfermedad que además de generar anualmente pérdidas económicas debido a la administración de vacunas pre-exposición y post-exposición, tiene un gran impacto en la ecología de animales silvestres debido a la falta de programas de vacunación masiva en este ámbito. La vacunación en países en vía de desarrollo donde la incidencia de la enfermedad es alta, resulta difícil debido a los costos de producción y administración. La producción de vacunas subunitarias reduce los riesgos de manipulación y administración de vacunas tradicionales (virus vivos o atenuados). Y aunque se han desarrollado ya vacunas antirrábicas desarrolladas mediante ADN recombinante, estas al ser producidas en cultivo celular, bacterias o levaduras, y posteriormente ser purificadas y almacenadas en refrigeración. Lo anteriormente descrito hace necesario el desarrollo de nuevas alternativas para el desarrollo de una vacuna antirrábica. Algunas de las ventajas de las vacunas derivadas de plantas, son la disminución de costos en producción, almacenaje, transporte y distribución, además es posible administrar el tejido vegetal a humanos y/o animales sin purificar la proteína de interés. Por las razones anteriormente descritas, en este trabajo de investigación fue expresada la proteína G del virus de la rabia, principal antígeno del virus, en dos especies vegetales: maíz y zanahoria, para evaluar la capacidad protectora de estos prototipos de vacuna comestible en animales de laboratorio.

1.4 HIPÓTESIS

La expresión de la proteína G del virus de la rabia en zanahoria y maíz permitirá la obtención de una vacuna derivada de plantas que al ser administrada a ratones por vía oral, además de proveer inmunidad humoral a dichos animales, los protegerá contra un desafío del virus rábico.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta inmune humoral y protectora de animales de laboratorio inmunizados vía oral con maíz y zanahoria que expresan la proteína G del virus de la rabia.

1.5.2 Objetivos particulares

- Clonar el gen G del virus de la rabia en vectores de expresión en plantas para realizar la transformación genética de células embriogénicas de maíz y zanahoria mediante biobalística.
- Obtener plantas adultas que expresen la proteína G llevando a cabo una selección con el herbicida glufosinato de amonio y posteriormente analizar la expresión en tejido vegetal por medio de técnicas moleculares.
- Evaluar la respuesta inmune humoral, celular y de protección en animales de laboratorio inmunizados vía oral con el maíz o zanahoria que expresan la proteína G.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Construcción de vectores de expresión vegetal.

2.1.1 Vector para transformar callos embriogénicos de zanahoria.

Para la construcción del vector de expresión se obtuvo el gen G completo del virus de la rabia del vector de clonación pAcYM-SKG (donado por la Dra. Susan Nadin-Davis del CFIA, Canadá) El fragmento de 1.5 Kb se subclonó en el vector pBLUEScript II KS- (Invitrogen, USA) y se ligó con Ligasa T4 (Invitrogen, USA) al vector pBLUEScript II KS- a esta construcción se le nombro pKS/G.

La construcción pKS/G se utilizó para transformar células de *E. coli* (Invitrogen, USA) por electroporación. Las bacterias fueron sembradas en medio LB con IPTG (Invitrogen, USA) y ampicilina (Gibco, USA) (100 µg/mL). Las clonas fueron seleccionadas por interrupción del gen *lacZ*. Las clonas seleccionadas fueron analizadas realizando mini preparaciones para la obtención de ADN plasmídico. El pKS/G obtenido fue digerido para obtener el gen G completo, el cual se clonó corriente abajo del doble “incrementador” del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) en el vector pUCpSS; a esta construcción se le llamó pUCpSSrabG (Figura 4). El ADN se purificó y cuantificó en el espectrómetro Gene Quant II (Pharmacia-Bioech, Reino Unido) a una longitud de onda de 260 nm y posteriormente fue observado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. 1 mg del vector fue digerido toda la noche con la enzima *HindIII* (Invitrogen, USA) para obtener el casete de expresión (promotor-gen-terminador) con el cual se transformaron los callos embriogénicos de zanahoria. El producto de la digestión fue observado en un gel de agarosa y la banda correspondiente al casete de expresión (2.5 Kb) fue extraída; el ADN fue purificado utilizando el kit GFX PCR-DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, Reino Unido).

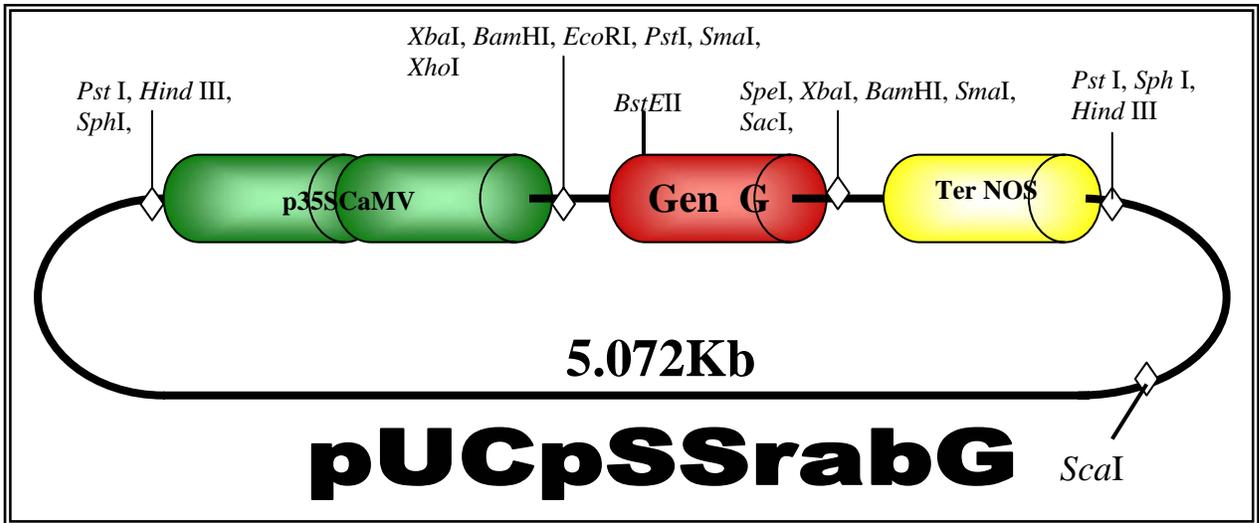


Figura 4. Vector de expresión para zanahoria pUCpSS. 35SCaMV: Doble incrementador del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Gen G del virus de la rabia. NOS: terminador del gen que codifica para la enzima nopalina sintasa.

2.1.2 Vector para transformar callos embriogénicos de maíz.

El vector que se utilizó para la transformación de callos embriogénicos de maíz con la proteína G fue designado como pGHNC5. En este caso, el G del virus de la rabia fue clonado corriente debajo de un promotor del gen de ubiquitina de maíz y todo el cassette fue flanqueado por una secuencia de regiones MAR's que son secuencias de anclaje a la membrana (Figura 5).

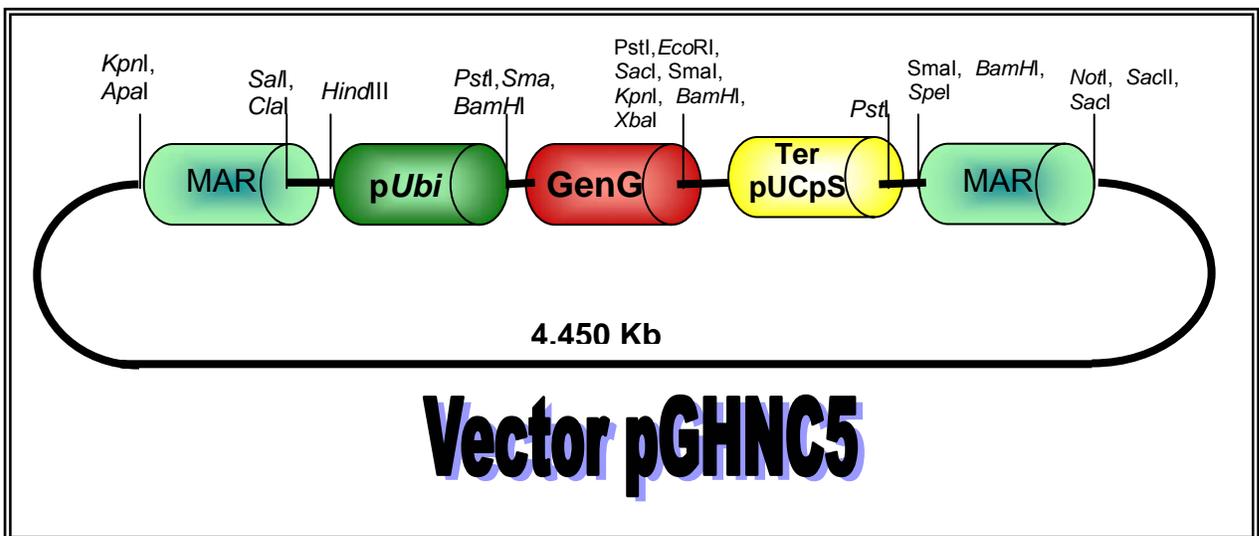


Figura 5. Vector de expresión para maíz pGHNC5. Vector pGHNC5 (MAR: matriz attachment region. pUbi: promotor de ubiquitina de maíz. Ter pUCpS: doble terminador del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

2.1.3 Obtención del vector de selección

Para seleccionar los callos embriogénicos transformados, estos fueron co-transformados con el vector de expresión para plantas que contiene al gen *bar* que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (Basta®, Sigma, USA). Este vector se denomina pCAMBIA-3301 (Ver Figura 6); fue purificado y cuantificado como el vector pUCpSSrabG. Este vector se utilizó para la transformación de los callos embriogénicos tanto de zanahoria como maíz, funcionando además como control positivo para la transformación.

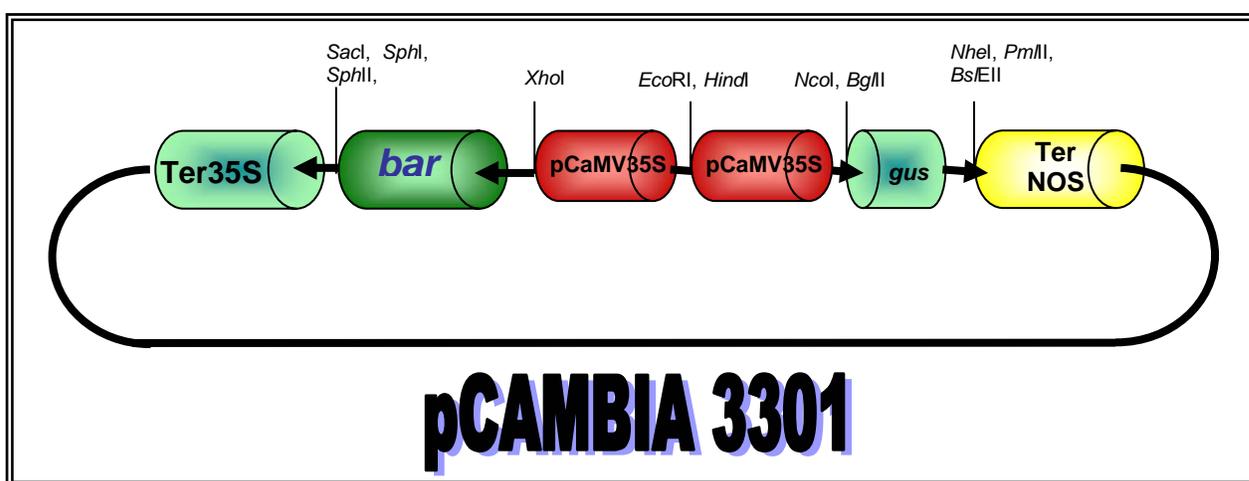


Figura 6. Vector de selección pCAMBIA3301. Utilizado para conferir resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Ter35S: terminador del 35S de CaMV35S, *bar*: gen que codifica para la enzima PAT, *gus*: gen que codifica para la enzima β -glucuronidasa y TerNOS: terminador de la nopalina sintetasa.

2.2 Establecimiento de cultivos vegetales.

Material biológico: callos embriogénicos de zanahoria.

Como material biológico se utilizaron distintos explantes provenientes de plántulas originadas de quince días de germinación *in vitro* de semillas de zanahoria *Daucus carota L.*

Para la inducción de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota L.*). Se utilizaron semillas de zanahoria desinfectadas, con lavados consecutivos de

etanol, Tween 20 y plata coloidal (Microdín®, México). Finalmente se realizaron cuatro enjuagues con agua desionizada estéril. Las semillas desinfectadas se colocaron en frascos de vidrio, treinta por frasco, con medio MS sin hormonas (Murashige & Skoog, 1962. Ver Anexo I) y se incubaron durante tres semanas en un cuarto de fotoperiodo a 25°C, con 16 horas de luz por 8 de oscuridad, para la obtención de las plántulas.

Transcurrida la incubación, las plántulas fueron disectadas en pecíolos y tallos. Estos explantes se cortaron en fragmentos de 0.5 cm de longitud colocando 15 explantes por frasco con medio MyT1 modificado (Anexo II) por un periodo de 21 días en las condiciones de incubación antes mencionadas. Los callos formados fueron subcultivados cada 20 días en medio MyT1 y/o de acuerdo a la producción de éste, eliminando las regiones que presentaran algún grado de oxidación (coloración café, ver Figura 9).

Material biológico: callos embriogénicos de maíz.

Se utilizaron semillas de maíz para obtener los embriones inmaduros (*Zea mays* L. raza tuxpeño) proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). A partir de los fragmentos de la mazorca desinfectadas se disectaron los embriones inmaduros inoculando frascos con 30 ml de medio nutritivo N₆-inducción y se mantuvieron en un cuarto de incubación con ambiente controlado en condiciones de oscuridad. La inducción de callo se llevo a cabo durante un mes y posteriormente se subcultivaron a medio N₆-proliferación (Anexo II). El callo se mantuvo a 25°C en fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 de oscuridad, para la obtención de las plántulas.

2.3 Transformación de callos embriogénicos de maíz y zanahoria por biobalística con pistola de baja presión.

2.3.1 Preparación de micropartículas.

Se utilizaron partículas de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (BioRad, USA), las cuales fueron sonicadas por 60 seg (Sonicador 1210, Marca Branson, USA) en hielo por 20 min con HNO_3 . El sobrenadante fue eliminado y posteriormente se adicionó al tubo 1 mL de agua desionizada estéril. La muestra se transfirió a otro tubo sonicando nuevamente. Posteriormente, las partículas fueron centrifugadas 30 seg a 10,000 xg; se eliminó el sobrenadante y las partículas se sonicaron con 1 mL de etanol absoluto. Se repitió la centrifugación y se sonicó con agua estéril como se mencionó anteriormente. De esta suspensión, se hicieron alícuotas de 200 μL , a las que se les adicionaron 750 μL de agua estéril y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Para el bombardeo, se tomaron 50 μL de la suspensión de micropartículas de tungsteno, a los cuales se agregaron 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN de pCAMBIA3301 y del vector pUCpSSrabG ó pGHNC5 en una relación de 1:9. La mezcla se agitó suavemente y se adicionaron 50 μL de cloruro de calcio (Sigma) 2.5 M más 20 μL de espermidina (Phytotechnology Laboratories, USA) 0.1 M; se agitó con vortex y se centrifugó a 10,000 xg por 10 s, después de eliminar 100 μL del sobrenadante las micropartículas se resuspendieron en el líquido remanente (25 μL aproximadamente).

2.3.2 Transformación de callos embriogénicos.

El día anterior al bombardeo se colocó 1.0 g de callo embriogénico de maíz o zanahoria extendiéndolo en una caja Petri de 60X15 mm con 15 mL de medio MyT1 o N_6P para zanahoria o maíz respectivamente.

Se tomaron 5 μL de la suspensión de partículas y se colocaron en el centro del filtro de la pistola de la cámara, mientras que la caja de Petri se colocó en el centro de la platina de la cámara de bombardeo cubriéndola con una malla de plástico

estéril, esto para amortiguar la velocidad del disparo. Las condiciones del disparo en la cámara de baja presión fueron: una presión de helio de 120 psi a una distancia de 13 cm entre el filtro de la pistola y el tejido blanco a un vacío de 20-22 pulgadas Hg.

Las cajas con callo embriogénico ya sea de zanahoria o maíz, se dividieron en tres grupos:

- 1) Cajas para el co-bombardeo con pCAMBIA3301-*bar* / pUCpSSrabG o pGHNC5;
- 2) Cajas bombardeando sólo con el plasmido pCAMBIA3301 como control positivo;
- 3) Cajas bombardeando sólo con partículas de tungsteno sin ADN como control negativo.

Posterior a la transformación, los callos se mantuvieron en las condiciones de incubación de 25 °C, con 16 horas de luz por 8 de oscuridad, para permitir la proliferación del callo embriogénico.

2.4 Selección y proliferación de callos embriogénicos.

2.4.1 Zanahoria

Una semana después de realizar el bombardeo se inició la selección de células transformadas. Para ello, el callo transformado fue disgregado y transferido a matraces de 50 mL con medio líquido MyT1 (medio MyT1 sin gelificante) con agitación constante de 100 rpm manteniendo las mismas condiciones de incubación. La concentración de BASTA® (glufosinato de amonio) (Sigma, USA) fue de 2.5 mg/L de medio. Las condiciones de selección en medio líquido se mantuvieron durante un mes y medio cambiando el medio cada 15 días desechando el material necrosado (consistencia dura y de color café oscuro); posteriormente los callos se transfirieron a medio MyT1 sólido.

2.4.2 Maíz

Para la proliferación de callos embriogénicos transformados, estos se subcultivaron en medio MS durante una semana, sin agente de selección, esto para favorecer la recuperación del callo post-transformación; siete días después se subcultivaron a medio N6-p más 3 mg/L de Basta® (Sigma, USA), las condiciones de fotoperíodo y temperatura permanecieron igual.

En los siguientes subcultivos se mantuvieron las condiciones antes descritas. Posterior a tres meses de selección. La concentración del herbicida y la concentración de hormonas vegetales se redujeron a la mitad para propiciar el desarrollo de embriones somáticos a partir del callo, los cuales darían lugar a plántulas.

2.5 Regeneración de plántulas.

2.5.1 Zanahoria.

Para proliferar las células transformadas, los callos embriogénicos transformados fueron subcultivados en medio de reciente elaboración. Lo anterior se llevo a cabo cada 3 semanas después del subcultivo. Seis meses posteriores a la transformación, se observó la aparición de embriones y la presencia de pequeñas raíces; estos embriones fueron separados del resto de callo y subcultivados a medio MS sin hormonas para favorecer el desarrollo de plántulas.

Las plántulas resultantes que crecieron en los frascos de aproximadamente 8 cm fueron individualizadas y transplantadas a medio MS sin hormonas en frascos de mayor tamaño (20 cm de altura) para permitir el crecimiento de las plántulas. Estas condiciones fueron mantenidas hasta que las plantas alcanzaron una talla de aproximadamente 15 cms. y se observo un engrosamiento tanto en tallo, como en raíces.

Las plantas con las características antes mencionadas fueron transferidas a una mezcla de tierra con hojarasca (2:1) en una relación de 1:1 con sustrato Peat moss (Sunshine, Canadá), un sustrato sólido enriquecido. Las plantas fueron

mantenidas en condiciones de invernadero en bolsas de 30 cm de longitud para permitir el desarrollo de la parte radicular de planta (parte comestible).

2.5.2 Maíz.

La supresión de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Sigma, USA) y cinetina origino brotes (embriones con raíces) que fueron separados del callo embriogénico. La concentración del agente de selección se mantuvo a 1.5 mg/L hasta que las plántulas alcanzaron una talla de 4-6 cm, los restos de callo se eliminaron para favorecer el crecimiento de las plántulas.

Cuando las plantas alcanzaron 10-12 cm de altura se conservaron en medio N6-p sin reguladores de crecimiento y 1 mg/L de Basta®, posteriormente se individualizaron en frascos de 20 cm de alto por 8 de ancho para permitir el desarrollo de raíces y un adecuado intercambio gaseoso.

Las plantas se sacaron de los recipientes de vidrio en condiciones asépticas quitando el exceso de medio de cultivo con agua desionizada estéril, con un bisturí estéril se cortaron las hojas o raíces secas antes de transferirlas al sustrato sólido.

Con la finalidad de fortalecer a los tallos y a las raíces, las plántulas se mantuvieron durante un mes en frascos de 20 cm de alto conteniendo agrolita estéril, a la cual se le adicionó medio de cultivo N₆p adicionado con AIA (ácido indol acético) (Sigma, USA) y BAP (benzoamino purina) (USA), pero sin gelificante ni azúcar.

Finalmente, las plantas que sobrevivieron fueron preparadas para ser transplantadas a tierra y estimular el desarrollo de las plantas adultas. Para lo anterior, se preparó una mezcla de sustratos (previamente esterilizados) de acuerdo a la siguiente relación:

Primero se mezcló tierra negra y hojarasca en relación 2:1. Esto se incorporó al sustrato nutritivo Peat moss en relación 1:1 y finalmente a la mezcla anterior se le agregó agrolita en una relación de 2:1.

Las plantas de maíz con un sistema radicular vigoroso se transfirieron a esta mezcla húmeda haciendo una perforación, para permitir que las raíces quedaran a aproximadamente 10 cm de profundidad. Las plantas ya en el sustrato fueron rociadas con agua introduciéndolas en una cámara de aclimatización durante 4 meses.

Al finalizar el período en la cámara de aclimatización, las plantas se transfirieron a macetas con tierra de hoja y permanecieron en invernadero hasta su etapa reproductiva, en donde se observa la presencia de espigas y desarrollo de mazorcas.

2.6 Identificación del gen G en plantas de zanahoria y maíz transformadas.

2.6.1 Extracción de ADN genómico de zanahorias transformadas.

De las plantas jóvenes transformadas se extrajo el ADN genómico de la parte aérea de las plántulas de zanahoria. La extracción se llevó a cabo con reactivo Plant DNAzol reagent (Invitrogen, USA), modificando el protocolo descrito por el fabricante. 200 mg el tejido de zanahoria pulverizados en nitrógeno líquido se mezclaron con 300 μ L del reactivo, agitando por inversión varias veces. Se dejó en incubación a temperatura ambiente con agitación constante adicionando 100 μ g RNasa A (Amresco, USA) por cada mL de Plant DNAzol durante 30 min. Posteriormente, se adicionaron 300 μ L de cloroformo (Sigma, USA) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación por 5 min, la mezcla se centrifugó a 14,000 xg (Centrífuga Z300H, Hermele, Australia) por 10 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo repitiendo esta extracción una vez más. La fase acuosa se mezcló con etanol al 100% (Amresco, USA) para precipitar el ADN, se incubó 5 min a temperatura ambiente (TA) para obtener el ADN, nuevamente se centrifugó

a 5000 xg por 5 min y se removió el sobrenadante. Para lavar el ADN, se preparó una mezcla de Plant DNAzol y de etanol 100%. De esta solución, se tomaron 300 μ L y se mezclaron por agitación en vortex; posteriormente las muestras se incubaron 5 min a TA y se centrifugaron 5000 xg por 5 min. La solución de lavado se decantó y la pastilla se lavó con etanol al 75%. Para secar la pastilla, se decantó la solución de lavado y los tubos se conservaron invertidos durante 2-3 min; finalmente se reconstituyó en amortiguador Tris-EDTA (TE) pH 8.0. Este ADN fue visualizado en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Invitrogen, USA).

2.6.2 Extracción de ADN genómico de maíz transformado.

De las plantas transformadas y mantenidas en condiciones *in vitro* se tomó una muestra de tejido de hoja joven que fue pulverizada en nitrógeno líquido. 200 mg de tejido fueron mezclados con el doble del volumen del buffer de extracción para maíz (Anexo III). La mezcla se agitó por 45 min. a temperatura ambiente. Esto fue incubado 5min temperatura ambiente agitando cada minuto. Con 700 μ L de fenol-cloroformo (1:1) (Amresco, USA). La muestra se centrifugo 10 min a 10 000 xg. A la fase superior se le adicionaron 400 μ L de fenol-cloroformo (1:1) y se mezclaron por 5 seg a 4°C repitiendo la centrifugación anterior. La fase superior se mezcló con 300 μ L de cloroformo-isoamilico 24:1 (a -20°C), centrifugando nuevamente. La fase superior se transfirió a otro tubo agregando acetato de amonio al 7.5 M, pH 8 y la mezcla se incubo 1 hr a TA. Posteriormente, se centrifugó 10,000 xg por 15 min. Al sobrenadante se le agregó isopropanol (1:1) (Amresco, USA) y la mezcla se centrifugo 10,000 xg por 10 min. El pellet fue lavado con 1 mL de etanol 70% centrifugando a 10,000 xg 5 min. El etanol se eliminó y el pellet fue resuspendido en 50 μ L de amortiguador TE.

2.6.3 Detección del gen G en el genoma vegetal de las plantas transformadas.

Para identificar si la zanahoria y el maíz habían integrado a su genoma al gen G del virus de la rabia, se llevó a cabo una PCR punto final. Para el caso de zanahoria se utilizaron los oligonucleótidos: sentido 5'-AAG AAA GAT GGT TCC TC (3310-3326) y antisentido 5'- ATT CCA ACA ACT CCA TAT G (4523-4541) (Orciari et al. 2001). El tamaño esperado fue de 1231 bp. Las condiciones del PCR fueron: 2 min a 95 °C, 35 ciclos a 95 °C por 90 seg, 57 °C por 90 seg, 72 °C por 90 seg y un ciclo final a 72 °C por 10 min. En el caso de maíz se diseñaron otro par de oligonucleótidos que identifican el gen completo del virus de la rabia (1572 pb), esto debido a que el genoma de maíz es muy grande y al hacer un análisis de los oligonucleótidos utilizados para zanahoria no funcionaban para maíz. Los oligonucleótidos fueron: sentido (5'-ATG GTT CCT CAG GCT CTC C), anti-sentido (5'- CAG TCT GGT CTC ACC CCC). La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que con los oligonucleótidos anteriores en un termociclador iCycler (Bio-Rad, USA). Como platilla para la reacción se utilizaron 500 ng de ADN genómico vegetal, además se adicionaron 5 µL de buffer de PCR 10X, 10 mM dNTP's (Invitrogen, USA), 75 mM MgCl₂, 25 pmol de cada oligonucleótido, 1.5 U Taq polimerasa (Invitrogen, USA) y se llevo a 50 µL con agua estéril.

Como testigo positivo se utilizó el plásmido utilizado para transformar los callos embriogénicos de maíz o de zanahoria (pGHNC5 y pUCpSSrabG respectivamente). Los testigos negativos fueron agua y ADN genómico de maíz o zanahoria sin transformar. Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 1%.

2.6.4 Extracción de ARN de tejido vegetal.

Para determinar el nivel de transcripción del transgen G del virus de la rabia se utilizó la técnica de RT-PCR. Como plantilla para la RT-PCR se obtuvo el ARN vegetal total de ambas especies como se describe a continuación.

Para lo anterior, se mezclaron 200 mg de tejido molido en nitrógeno líquido con 500 μ L de amortiguador de extracción de ARN (Anexo III). La mezcla se agito por inversión durante 5 min y posteriormente se centrifugo 4 min a 10,000 xg a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se le adicionaron 500 μ L de una mezcla alcohol-cloroformo-isoamilico (25:24:1) a 4°C y centrifugando a 10,000 xg 20 min 4 °C. El procedimiento de extracción clorofórmica se repitió dos veces colectando los sobrenadantes. A los sobrenadantes obtenidos se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto incubando 2 hrs a -20 °C, para precipitar el ARN. La mezcla se centrifugo a 10,000 xg 20 min a 4 °C. La pastilla obtenida, que contenía al ARN, se lavó con 500 μ L etanol al 80%. Esta fue resuspendida con 700 μ L de agua DEPC (Dietil pirocarbonato Sigma, USA) y 250 μ L de LiCl 8 M incubando toda la noche a -20 °C. Para recuperar el ARN se centrifugó a 10,000 xg por 15 min a 4 °C. Se desecho el sobrenadante y la pastilla fue resuspendido en agua DEPC y congelado a -70 °C hasta su uso. La calidad del ARN obtenido se verificó visualizando 4 μ L en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. El ARN obtenido fue tratado con DNAsa I (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6.5 Amplificación del gen GAPC3 como control interno de la RT-PCR.

Como control interno de la RT-PCR se amplificó un fragmento de 800 pb del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica (GAP-C3) (Manjunath & Sachs, 1997), la expresión de esta enzima es constitutiva en las células vegetales, tanto de monocotiledóneas, como dicotiledóneas.

Para la RT-PCR se utilizó SuperScript III One Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) siguiendo el protocolo descrito a continuación. Se mezclaron 25 μ L de mezcla de reacción con 5 μ L de ARN vegetal, a ésta se le adicionaron 10 μ M de la mezcla de iniciadores sentido 5'- ACC CAT CCT CGT TTC CTC CGT CTA G-3' y antisentido 5'- CCT TGA CCG CAG CCT TGA TCT CAT-3', 2 μ L de Super Script III RT/Platinum Taq Mix; esto fue llevado a un volumen final de 50 μ L con H₂O-DEPC (Sigma, USA). La reacción

se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo 94°C 2 min, 45°C por 30 min, 1 ciclo 94°C 3 min; 40 ciclos de 94°C 30 seg, 60°C 30 seg, 68°C 3 min y finalmente 1 ciclo de 68°C 10 min. Como testigo positivo se utilizó ARN de tejido vegetal sin transformar; mientras que como testigo negativo se utilizó agua. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%.

2.6.6 Detección del ARNm del gen G del virus de la rabia por RT-PCR.

Para determinar que las células vegetales transcribieron al gen G del virus de la rabia integrado al genoma vegetal, se realizó una transcripción reversa del ARN total de las plantas que resultaron positivas por PCR; para esto se utilizaron 2 µg de ARN total, 25 pmol del iniciador sentido y agua DEPC. Esta mezcla se incubó 5 min a 65 °C y 15 min a 37 °C y a esta se le adicionaron 4 µL de amortiguador de reacción, 2 µL de dNTP's, 2 µL de DTT y 1 µL de transcriptasa reversa (Invitrogen, USA). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hr 30 min a 37 °C y a 90 °C por 5 min. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C y posteriormente se realizó una PCR con las mismas condiciones mencionadas en la Sección 2.6.3. Como testigo positivo se utilizó ADNc sintetizado a partir de ARN del virus de la rabia cepa CVS-11; como testigos negativos se usaron ARN de tejido de zanahoria sin transformar y agua. Los productos de la RT-PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%.

2.7 Detección de la proteína G del virus de la rabia en plantas transformadas.

Para la identificación de la proteína G del virus de la rabia en plantas transformadas, se llevó a cabo la técnica de Western blot (WB). Para ello, se utilizó tejido vegetal de la parte aérea de las plántulas que resultaron positivas al RT-PCR.

2.7.1 Purificación de proteína G del virus de la rabia.

Para la prueba de Western blot se utilizó como testigo positivo a la proteína G purificada por elusión a partir de geles de poliacrilamida. Por otra parte, para detectar la proteína G en extractos proteicos; se generaron anticuerpos policlonales específicos contra la proteína G de rabia, utilizando la proteína G de origen viral purificada de geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Lo anterior se llevo a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación.

2.7.1.1 Obtención de anticuerpos específicos de conejo contra el virus de la rabia (Bourhy, et al 1992).

Para hacer más específica la reacción antígeno anticuerpo en la prueba de Western blot, se obtuvieron anticuerpos antirrábicos producidos en conejos conforme al siguiente protocolo.

Se inmunizaron dos conejos machos de 2 Kg por vía intramuscular (en la cara interna del miembro posterior del animal) con 400 μ g de proteína G del virus de la rabia purificada, junto con 400 μ L de adyuvante completo de Freund (Sigma, USA). El esquema anterior se repitió cada tres semanas en tres ocasiones más. Posterior a estas inmunizaciones se determinó el título de anticuerpos antirrábicos por la técnica de reducción de la inhibición de focos fluorescentes (RIFFT). Los animales fueron sacrificados humanitariamente y fueron sangrados vía intracardiaca para obtener el suero. El suero de ambos conejos se mezcló y congeló hasta su uso. A este suero se le adicionó un volumen igual de una solución de sulfato de amonio saturado, después de agitar durante 15 min, la mezcla fue centrifugada a 3500 xg durante 15 min en centrífuga refrigerada. La pastilla obtenida fue disuelta en solución salina hasta alcanzar el volumen original de suero, y se le adicionó la mitad del volumen de solución de sulfato de amonio saturado repitiendo el procedimiento anterior dos veces más de tal forma, que el sulfato de amonio final adicionado, fuera un tercio del volumen original de suero. El sedimento final obtenido fue disuelto en un amortiguador de solución salina y

solución de boratos y se dializó durante cuatro días contra amortiguador de boratos pH 7.4. Trascorrida la diálisis, la muestra se centrifugó a 2500 xg por 10 min; el sobrenadante se guardó en alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para obtener las inmunoglobulinas purificadas, se utilizó una columna de DEAE-celulosa, la cual fue activada de la siguiente forma: 15 g de la celulosa se resuspendieron en 500 mL de HCl 0.5 M agitando durante 5 min y dejando sedimentar 30 min. Se eliminó el sobrenadante y a la celulosa se lavó con agua destilada manteniendo la agitación. Posteriormente, la celulosa se transfirió a un embudo de porcelana con un filtro Whatman #1 y se continuó lavando con agua hasta que el efluente alcanzó el pH de 5.0. La celulosa se colocó en un matraz con NaOH 0.5M, repitiendo el procedimiento realizado con el HCl; nuevamente se lavó con agua hasta alcanzar un pH de 5.0. Nuevamente la celulosa se colocó en el embudo para ser lavada con un amortiguador de fosfatos hasta que el efluente alcanzó un pH de 7.5 y con ese material se rellenoó una columna de vidrio de aproximadamente 20 cm de alto. La columna se llenó con un amortiguador de fosfatos pH 7.5 0.01 M hasta que la celulosa se empaquetó completamente. El efluente de la columna se colectó hasta que pasaron por la celulosa las inmunoglobulinas obtenidas por la precipitación con sulfato de amonio. Se colectaron 30 fracciones de 4 mL cada una y se midió la concentración de proteínas (Espectrofotómetro Microplate Reader Modelo 550, Bio-Rad, USA) de cada fracción para finalmente conservar sólo aquellas que tuvieran mayor concentración. Esta fracción se almacenó a -20 °C, para ser utilizado como primer anticuerpo en la prueba de Western blot.

2.7.2 Identificación de la proteína G por Western blot.

Para identificar a la proteína G del virus de la rabia que se expresó en plantas transformadas de zanahoria y maíz, se estandarizó una prueba de Western blot. Para lo cual, 200 mg de tejido vegetal (raíz para zanahoria y semillas para maíz) fueron pulverizados con nitrógeno líquido y se mezclaron con 400 µL de amortiguador de extracción de proteínas. La mezcla se agitó en vortex y

posteriormente se centrifugó a 10,000 xg, 15 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y las proteínas fueron liofilizadas (Free Zone Benchtop Freeze Dry System, Labconco, USA) para su concentración, finalmente se cuantificaron utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (BioRad, CA, USA) midiendo la absorbancia a 595 nm (Espectrofotómetro Microplate Reader Modelo 550, Bio-Rad, USA).

Se tomaron 50 µg de las proteínas totales extraídas, fueron resueltas en un geles SDS-PAGE al 12%, adicionando un volumen igual de amortiguador de carga. Posteriormente, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa 0.45 µm (BioRad, CA, USA) en un equipo de electrotransferencia semiseca (Transblot semidry BioRad, CA, USA) a 22 V durante 45 min. La membrana se bloqueó con leche descremada al 3 % en PBS durante toda la noche a 4 °C y posteriormente se lavó cuatro veces con PBS-Tween 20 0.05 %, cada lavado de 10 min a temperatura ambiente. Como primer anticuerpo se utilizaron inmunoglobulinas de conejo anti-proteína G del virus de la rabia diluidas 1:500 en amortiguador de dilución (leche descremada 1 % en PBS-Tween 20 0.02 %) y se incubó a 37 °C 1 hora. Se repitieron los lavados como arriba y la membrana se incubó con el conjugado Proteína G acoplada a peroxidasa (Bio-Rad, USA), dilución 1:6,000 durante a 37 °C 1 h. Nuevamente se repitieron los lavados anteriormente citados y las bandas se revelaron con la solución de revelado (ver Anexo III); la reacción se detuvo con agua destilada al aparecer las bandas. Finalmente, las membranas fueron conservadas en seco y fotodocumentadas (Fotodocumentador EDAS Kodak, NY, USA).

2.7.3 Cuantificación de proteína G por densitometría.

Del extracto proteico obtenido tanto de zanahoria como de maíz, se tomaron 50 µg de proteína total soluble y se resolvieron en geles poliacrilamida al 10 %, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Bio-Rad, USA) por 1 h y posteriormente se destiñeron durante el mismo tiempo. Por otra parte se hizo una curva estándar con proteína G purificada, esta también fue resuelta en un gel de poliacrilamida a la

misma concentración y teñido como anteriormente se describe. Ambos geles fueron analizados en el documentador de geles EDAS (Kodak, NY, USA), comparando la intensidad de la banda producida por la proteína recombinante con la curva de albúmina.

2.8 Expresión de la proteína G del virus de la rabia en baculovirus.

2.8.1 Vector pFastBacMelGHIS

Para obtener el vector pFAST-Bac que expresa el gen G del virus de la rabia se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la secuencia que codifica para el dominio soluble de la glicoproteína de rabia. Para la amplificación del gen G se utilizó ADNc de una cepa mexicana del virus de la rabia empleando 20 ng. Se utilizó el kit Expand high fidelity PCR system (Roche, Alemania). El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1% para purificarlo mediante una extracción fenol clorofórmico como se describe en el Anexo IV. El producto de la digestión fue purificado de un gel agarosa de bajo punto de fusión al 1 % utilizando el kit Pure Link (Invitrogen, España) conforme a las indicaciones del fabricante.

Se calculó la concentración del ADN del gen para clonarlo en el vector pFastBacMel (Patente Algenex, Madrid, España). Para hacer la ligación vector-inserto, se utilizó la ligasa T4 (Roche, Alemania). Con este material se transformaron células de *E. coli* DH5 α (Invitrogen, España) mediante electroporación. Las colonias obtenidas se crecieron en medio LB con ampicilina y se incubaron en agitación constante a 37 °C toda la noche. De las colonias que crecieron se realizó la extracción de ADN utilizando el kit: Charge switch-pro plasmid miniprep kit (Invitrogen, España). El ADN plásmidico obtenido fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas para comprobar la inserción del gen G. Se eligió una colonia positiva a la digestión y fue secuenciada para evitar mutaciones.

2.8.2 Construcción del bacmido

A partir del ADN plasmídico de la clona secuenciada, se utilizó 1 ng/ μ L para transformar células bacterias DH10 Bac competentes (Invitrogen, España), las cuales contienen el bacmido y un plásmido cooperador que ayuda a que se lleve a cabo la transformación.

La mezcla se mantuvo en hielo 30 min y posteriormente se paso a un baño de 42 °C por 45 seg, las células se transfirieron inmediatamente a hielo por 2 min y se adicionaron 900 μ L de medio SOC (Invitrogen, España). Las bacterias se dejaron incubar a 37 °C por 4 horas en un agitador orbital a velocidad constante de 225 rpm.

Al terminar la incubación, las bacterias se sembraron en las placas de LB con tetraciclina, kanamicina y gentamicina (Ver anexo V). Las placas se incubaron por 48 h a 37 °C para permitir en este tiempo la selección por color de colonias azules y blancas.

Posterior a la incubación, de las placas se seleccionan 4 colonias blancas y se sembraron por estría en nuevas placas de LB en las mismas condiciones que se mencionan anteriormente. Las placas se incubaron nuevamente a 37 °C por 48 h. De las colonias blancas que crecieron en las estrías se seleccionó la clona con mejores características morfológicas (tamaño, forma y completamente blanca).

Esta colonia fue aislada y crecida en 3 mL de medio LB líquido con tetraciclina (Gibco, USA), kanamicina (Gibco, USA) y gentamicina (Gibco, USA) todas a 10 mg/mL y fue incubada 8 h a 37 °C en agitación constante a 225 rpm. La mitad del inóculo fue transferido a un litro de medio LB con los antibióticos mencionados previamente. El cultivo fue incubado por 16h a 37 °C en agitación constante a 225 rpm.

La extracción del ADN del bacmido se realizo con el kit de extracción Pure link Filter Maxi Columns (Invitrogen, España) según instrucciones del fabricante.

El ADN obtenido es el bacmido que contiene el gen G del virus de la rabia y se utilizó para transfectar células de insecto.

2.8.3 Obtención del baculovirus BacMelGrabHis

Para obtener el baculovirus que expresa la proteína G del virus de la rabia, se transfectaron células Sf21 (Gibco, USA) con el bacmido creado. Las células se crecieron en una botella de 75 cm² durante 48 horas para obtener una monocapa confluyente.

Para verificar que la proteína G se estuviera expresando a través de los diferentes pases en las células de insecto, las monocapas de células de insecto de las botellas infectadas se desprendieron raspando la botella y fueron tratadas con un amortiguador de rompimiento (Anexo IV). El extracto celular fue observado en un gel de poliacrilamida al 10% y la identidad de la proteína expresada fue visualizada en Western blot, desarrollado como se describe en el Anexo V.

2.8.4 Titulación del Baculovirus

De una botella de células de insecto Sf21 de de 75 cm² se eliminó el medio y se raspo la monocapa para desprender las células que posteriormente se contaron para ajustar a una suspensión 1×10^6 cel/mL. En una placa de cultivo de 6 pozos se sembraron 2×10^6 células por pozo y se dejaron reposar durante 1 hr para que se adhirieran a la placa. Por otra parte se prepararon diluciones del baculovirus desde 10^{-3} hasta 10^{-7} , se agregaron 0.5 mL a cada pozo. A un pozo sólo se le agregó medio para usarlo como testigo negativo. La infección se dejó incubando 1h a 28 °C.

Durante este tiempo se disolvió en microondas agarosa de bajo punto de fusión diluyendo a 1 % con medio BD Baculo Gold (BD,USA) y se agregó anfotericina B a 0.0025 mg/mL.

Al concluir el tiempo de infección, se agregaron 2 mL de la mezcla agarosa-medio a cada pozo por la pared. Al gelificar la agarosa se adicionaron 2 mL de medio BD.

La placa se protegió de la luz y se incubó a 28 °C durante 7 días. Al terminar la incubación se agregaron 1.5 mL de rojo neutro al 0.03 %, durante tres horas, después de las cuales se eliminó y se contaron las placas formadas.

Para determinar el título del baculovirus se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{pfu/mL} = \# \text{placas} \times \text{Fac. dilución} \times 1/\text{mL inóculo}$$

2.9 Evaluación de la respuesta inmune de animales vacunados con zanahoria y maíz transformados con el gen G del virus de la rabia.

2.9.1 Material biológico

Ratones

Se utilizaron 84 ratones hembras de la cepa CD1 obtenidos del Bioterio México, los cuales fueron mantenidos en condiciones controladas de alimentación.

Maíz

Las mazorcas de las plantas que expresan la proteína G del virus de la rabia fueron desgranadas y los granos de maíz fueron pulverizados en nitrógeno líquido para obtener una harina, la cual fue mezclada con PBS para formar pastillas. El resultado de la cuantificación de la proteína expresada en plantas fue que la proteína expresa 50 µg de proteína G por gramo de tejido vegetal, por lo que se formaron pastillas con 2 g de la harina de maíz conteniendo 100 µg.

Zanahoria

Las zanahorias que expresan la proteína G del virus de la rabia fueron cortadas en trozos pequeños de aproximadamente 5 mm para facilitar la ingestión por los ratones. En esta especie la proteína expresó 25 µg de proteína G por gramo de tejido vegetal.

2.9.2 Inmunización

Se formaron siete grupos conformados por 12 hembras cepa CD-1 de 11 semanas (Bioterio México) que fueron divididos como se muestra en la Tabla 2. La noche anterior a la inmunización, los animales fueron restringidos en el alimento y fueron separados en jaulas de manera individual para tener la certeza de que cada animal consumiera completamente la pastilla de maíz o los trozos de zanahoria. Además se administró una solución de bicarbonato de sodio al 4 % en agua destilada, esto con la finalidad de disminuir la acción de las enzimas digestivas, y permitir la llegada íntegra de la proteína G recombinante al intestino. Una vez que los animales consumieron por completo su dosis de vacuna se mantuvieron durante 60 días post vacunación con su alimentación tradicional. Los ensayos de inmunidad fueron realizados por duplicado.

Tabla 2. Distribución de grupos inmunizados con diferentes biológicos.

Grupo	Biológico administrado	Vía	Dosis única (μg)
G1	Maíz que expresa proteína G	Oral	100
G2	Maíz sin transformar	Oral	-----
G3	Zanahoria que expresa proteína G	Oral	100
G4	Zanahoria sin transformar	Oral	-----
G5	Proteína G purificada	Oral	100
G6	Proteína G purificada	IM	100
G7	Sin tratamiento	-----	-----

2.9.3 Evaluación de la respuesta inmune humoral.

Los ratones fueron sangrados vía retroorbital para la obtención de suero, cada 15 días durante 2 meses post-vacunación, para así evaluar la presencia de anticuerpos contra la proteína G. Los sueros fueron evaluados mediante la técnica

de ELISA utilizando como antígeno sobrenadante de células de insecto infectadas con un baculovirus que expresa la proteína G del virus de la rabia.

Para la ELISA se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano (Maxisorb, Nunc, USA), las cuales fueron sensibilizadas con 75 ng de la proteína G obtenida de sobrenadante de células de insecto, infectadas con el baculovirus que expresa la proteína G del virus de la rabia. La proteína G fue diluida en amortiguador de carbonatos (ver Anexo V). Posteriormente las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Transcurrida la incubación, se lavaron 4 veces con PBS- Tween 0.05 %. El bloqueo de las placas se llevo a cabo con 3% de leche descremada en PBS-Tween 0.05 % y se incubaron 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron como antes y se agregaron los sueros de los ratones diluido 1:100 en 1 % de leche en PBS-Tween 0.05 %. Como testigo positivo se utilizó un pool de sueros de ratón vacunados con una vacuna antirrábica comercial. El testigo negativo fueron los sueros de ratones que no recibieron ningún tratamiento. Todos los sueros se pusieron en la placa por duplicado. Las placas se incubaron nuevamente 1 hr a 37 °C, y se lavaron una vez más. Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Marca Jackson, USA) a una dilución de 1:6,000 repitiendo la incubación anterior. Finalmente las placas se revelaron con 10 mg de OPD (cloruro de orto-phenildiamina, Marca Sigma, USA) diluido en amortiguador de citratos y peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 2 N leyendo las placas a 450 nm de longitud.

2.9.4 Evaluación de la respuesta inmune celular.

La evaluación de la respuesta inmune celular sólo se llevo a cabo con el grupo de ratones inmunizados con maíz, los grupos testigo positivo y negativo. Para evaluar la respuesta inmune celular, 3 ratones de cada grupo fueron sacrificados para la obtención de linfocitos, con los cuales se llevo a cabo la determinación de interleucina-4 (IL-4) e interferón gamma (IFN- γ) mediante la prueba de ELISA.

Los ratones fueron sacrificados humanitariamente y de inmediato se obtuvieron los bazos mediante disección, se hizo un pool de los bazos para la obtención de linfocitos. Los bazos se lavaron con 10 mL de medio RPMI (In Vitro, México) al 5 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, USA) y fueron disgregados con una malla de acero. La suspensión de células se lavó con 3 mL de medio RPMI 5% de SFB y se pasaron a través de otro disgregador celular de nylon de 100 μm para eliminar los grumos (BD Falcon, USA). La suspensión fue centrifugada a 1800 xg 10 min a 10 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla fue resuspendida en 20 mL de cloruro de amonio a 0.15 M. La suspensión se incubó 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se repitió la centrifugación anterior. El botón fue resuspendido en 10 mL de medio RPMI al 10 % de SFB. Con la finalidad de mejorar la calidad de los linfocitos estos fueron tratados con el reactivo Lympholyte®-M (Celardane, Canadá).

La suspensión fue ajustada a una concentración de células de 2×10^7 cel/mL y 5 mL se agregaron a un tubo de 50 mL que contenía 5 mL de Lympholyte®-M. El tubo fue centrifugado 20 min a 1500 xg a temperatura ambiente. De la fase intermedia de la suspensión se recuperaron los linfocitos. Las células obtenidas fueron diluidas con medio RPMI 10 % y se centrifugaron 800 xg por 10 min. Finalmente los linfocitos fueron diluidos en 10 mL de medio RPMI 10% y se contaron las células. La suspensión celular se ajustó a 2×10^6 cel/mL.

2.9.4.1 Cuantificación de IL-4 e IFN- γ por ELISA

Para cuantificar la concentración de las interleucinas, 1 mL de la suspensión de células obtenidos como anteriormente fue descrito, fueron sembradas en placas de 6 pozos. Los cultivos fueron incubados por 48 h a 37 °C, concluida la incubación se recolectaron los sobrenadantes y fueron centrifugados a 10,000 xg para eliminar restos celulares, el botón fue desechado mientras que el sobrenadante fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

La cuantificación de IL-4 e INF- γ se llevo a cabo por medio de un ensayo de ELISA de tipo sándwich, utilizando como muestra los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos. Lo anterior se realizó utilizando los paquetes comerciales: Mouse IL-4 ELISA ready-SET-Go y Mouse INF- γ ELISA ready-SET-Go (Marca eBioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.10 Desafío de animales inmunizados.

Todos los animales inmunizados con la zanahoria o maíz transformado así como los grupos testigos positivo y negativo, fueron desafiados con una dosis letal del virus de la rabia de cepa vampiro con un título de $10^{6.1}$ /mL LD₅₀. Los animales fueron observados durante 60 días, en los cuales se recolectaron los cerebros de aquellos que murieron con signos de la enfermedad.

3.0 RESULTADOS.

3.1 Cultivo de callos embriogénicos de zanahoria.

Para la transformación de zanahoria y maíz fue necesaria la proliferación de callos embriogénicos, para lo cual se utilizaron los medios de proliferación Myt1 y N₆ de inducción respectivamente. En el caso de zanahoria se utilizaron tallos y pecíolos de plántulas para el desarrollo del callo; mientras que para maíz embriones inmaduros de semillas de maíz raza Tuxpeño (Figura 7). Una vez que se observó la presencia de callo embriogénico en toda la superficie, éste fue retirando el tejido madre (tejido origen de consistencia dura) a medio N6-p o MyT1 fresco, lográndose la proliferación.

El uso de estos medios permitió la obtención de 100 g de masa de callo en aproximadamente dos meses para llevar a cabo la transformación (Figura 8). Los callos obtenidos presentaron una consistencia friable (disgregable), textura granular y color blanco a amarillento (Figura 8).



Figura 7. Obtención de callos embriogénicos. A) Zanahoria y B) Maíz.



Figura 8. Callos en estadio de proliferación. A) Zanahoria, B) Maíz.

3.2 Transformación y selección de callos embriogénicos.

Para la transformación de callos de zanahoria y maíz se clonó el gen G del virus de la rabia en dos vectores de expresión con características diferentes. Para el caso de zanahoria se obtuvo el vector pUCpSSrabG, que contiene un doble incrementador del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV), el cual ha sido descrito en la bibliografía como un promotor muy eficiente en plantas dicotiledóneas. En el caso de el vector pGHNC5 el gen G del virus de la rabia fue clonado corriente debajo de un promotor de la ubiquitina de maíz, que aunque es constitutivo es específico de especie, con lo cual se esperaba que la proteína clonada corriente debajo de él fuera expresada en altos porcentajes.

Por otra parte, se utilizó el vector pCAMBIA 3301, el cual contiene el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio utilizado como agente de selección. La razón para utilizar este vector es que en la actualidad el uso de genes que confieren resistencia a antibióticos como marcadores de selección es controversial para uso humano y animal.

Cabe mencionar que en el caso de maíz fueron realizadas siete transformaciones debido al bajo nivel de regeneración de plantas adultas obtenido, sin embargo en todos los casos las condiciones fueron las mismas, ya que no se observó que la transformación por si misma fuera la causante de este problema, esta cuestión será discutida más adelante.

Posterior a la transformación no se observó daño masivo en el callo embriogénico causado por el bombardeo. Se observó que las partículas de tungsteno de 4 μm no causaron muerte celular en los callos embriogénicos controles de ninguna de las dos especies.

En la semana siguiente, los callos fueron transferidos a medio nuevo. El único cambio en el medio con BASTA® que fue observado en los callos embriogénicos transformados fue la muerte celular, revelado por una coloración café y pérdida de la friabilidad (Figura 9). La muerte celular se debe a que las células no expresaron

el gen de selección *bar*, por tanto las probabilidades de que integraran el gen G del virus de la rabia son prácticamente nulas.

Cabe mencionar que se observaron claras diferencias en comparación con los callos control negativo, los cuales fueron bombardeados sólo con partículas sin ningún plásmido. La presencia de necrosis en los callos embriogénicos demuestra que la transformación es efectiva y que existen células tanto transformadas, como sin transformar. Los callos embriogénicos de maíz se mantuvieron en selección con 3 o 2.5 mg/L de glufosinato de amonio según la especie durante tres meses en medio sólido.

En cuanto a la selección de callos embriogénicos de zanahoria, esta se llevo a cabo durante un mes en medio líquido, es decir medio MyT1 pero sin gelificante (Figura 10). En el medio líquido las células de zanahoria tienen una mejor selección ya que todas las células están en contacto con el agente de selección. Además este medio permite una mayor proliferación del callo. Posteriormente los callos fueron transferidos a medio sólido para continuar con la proliferación y selección del mismo. En experimentos realizados previamente, la selección en medio líquido no fue efectiva para células de maíz, ya que éstas sufren de estrés y mueren.

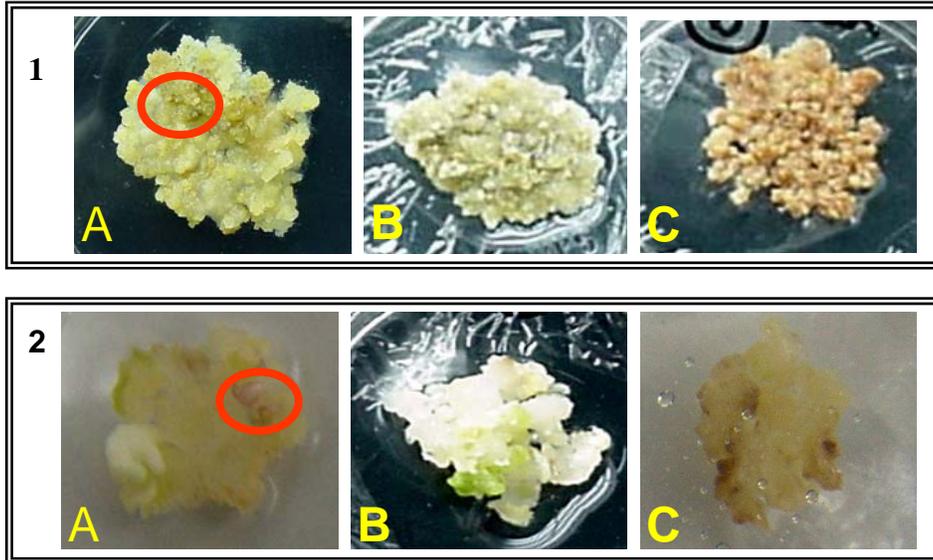


Figura 9. Callos embriogénicos en selección con glufoisinato de amonio. Panel 1: callos embriogénicos de zanahoria transformados. Panel 2: callos embriogénicos de maíz transformados. A: callos transformados por cobombardeo con los vectores que contienen el gen G del virus de la rabia y el vector pCAMBIA 3301. Los círculos rojos indican las zonas necrosadas en los callos. B: callos controles positivos transformados sólo con el vector pCAMBIA 3301; no se observan zonas de oxidación. C: control negativo bombardeado con partículas sin ADN plasmídico. Los callos muestran una coloración café en su totalidad debido a la ausencia del gen *bar*.

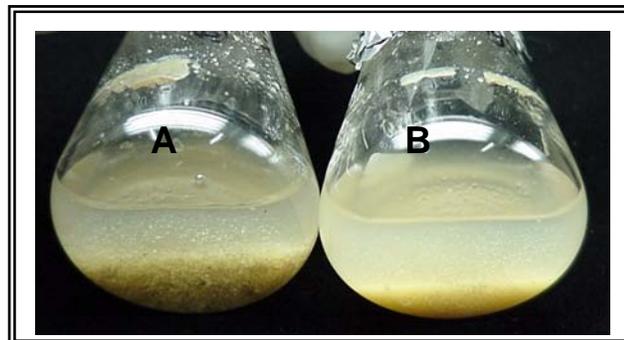


Figura 10. Callos embriogénicos de zanahoria en medio líquido de selección con BASTA. A: callos embriogénicos de zanahoria sin transformar. Se observa una gran cantidad de células muertas. B: callos transformados por cobombardeo con los vectores pUCpSS y el vector pCAMBIA 3301.

3.3 Regeneración y obtención de plantas adultas transformadas con el gen G y N del virus de la rabia.

Debido a que en esta etapa los resultados fueron variables entre las dos especies transformadas, los resultados se presentan por separado.

3.3.1 Zanahoria.

Para favorecer la formación y germinación de embriones somáticos, dos meses después de mantener las condiciones de selección estricta con BASTA al 2 mg/L, la concentración fue disminuida a la mitad así como la del regulador del crecimiento ácido 2-metil-4-clorofenoxipropionico (MCP) (1.5 mg/L).

La germinación de embriones somáticos se observó al presentarse en la superficie de los callos proyecciones de color verde de aproximadamente 5 mm (Figura 11). Estas proyecciones corresponden al tallo de la plántula y en algunos casos se pudo observar la presencia de raíces, por lo cual estos brotes fueron individualizados en medio MS sin hormonas pero con el agente de selección a una concentración de 1 mg/L para evitar la obtención de plantas escape (no transformadas). Por cada callo transformado fue posible recuperar hasta 30 plántulas.

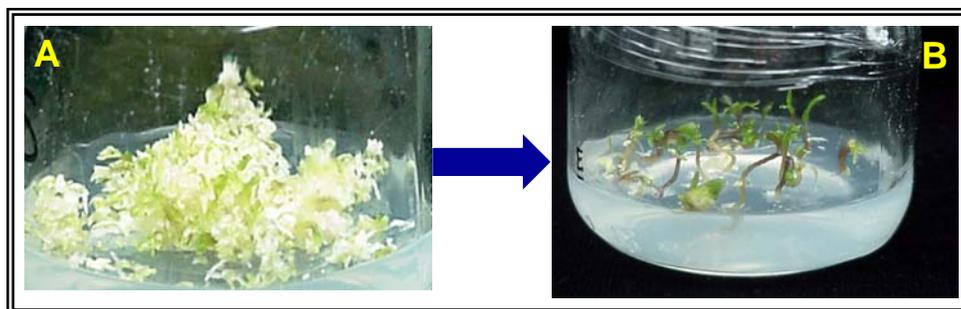


Figura 11. Regeneración de plántulas. Las plántulas fueron individualizadas en frascos con medio nuevo colocando hasta 15 plántulas por cada uno. Y permitir un crecimiento de hasta 10 cm.

Las plántulas individualizadas fueron sucesivamente trasplantadas a frascos de 20 cm de altura para permitir un adecuado intercambio gaseoso hasta que alcanzaron una talla de 10 cm. En este estadio se lograron recuperar hasta 100 plantas (Figura 12). Antes de sacar las plantas de las condiciones estériles, el

medio MyT1 fue suplementado con los reguladores de crecimiento AIA y BAP, los cuales fortalecen la parte radicular (parte comestible) y del tallo de las plantas. Una vez que se observó que dichas plantas presentaban un fortalecimiento, 70 de éstas fueron trasplantadas a la mezcla de tierra, como fue descrito en Materiales y Métodos.



Figura 12. Plantas de zanahoria en condiciones *in vitro*.

En la primera fase de aclimatación, las bolsas en las que fueron plantadas las zanahorias transformadas fueron cubiertas con un plástico y después de un par de semanas se pusieron en condiciones de invernadero. De las plantas trasplantadas se recuperaron 20 en edad adulta con un sistema aéreo fortalecido y la parte radicular desarrollada, como se observa en la Figura 13.

La talla de la parte radicular de las plantas obtenidas fue de entre 7-15 cm y fueron analizadas para verificar la integración y expresión del gen G del virus de la rabia. Aquellas zanahorias que resultaron positivas en la PCR y en el Western blot fueron congeladas una vez que la parte aérea de la planta presentó color amarillento, lo cual es signo de muerte celular y por lo tanto el decaimiento de la planta.

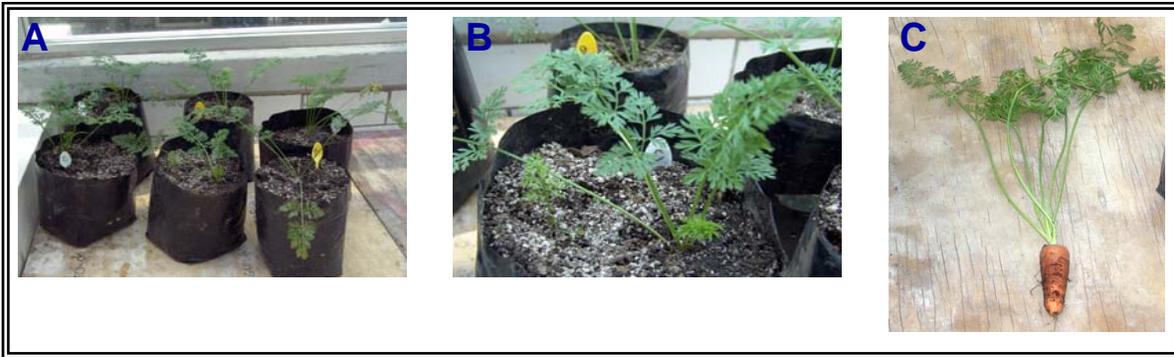


Figura 13. Plantas adultas de zanahoria. A: Grupo de plantas adultas en condiciones de invernadero. En comparación con las plantas control, las características morfológicas no se vieron alteradas debido a la transformación. B: Planta de zanahoria que expresa la proteína G del virus de la rabia: como se puede observar la parte aérea de la planta se observa completamente sana y fortalecida, después de la fase de aclimatación. C: Parte radicular de la planta de zanahoria de con una talla aproximada 15 cm.

3.3.2 Maíz

En cuanto a maíz, como se mencionó en la sección anterior se redujo paulatinamente la concentración del agente de selección, para disminuir las condiciones de estrés. Al mismo tiempo se redujo la concentración del 2,4-D y de la cinetina a la mitad. Este callo presentaba como características color blanco amarillento y zonas conformadas por embriones que presentaron un color verde, lo que indica la viabilidad del callo, señalando que dichas células incorporaron el gen de selección *bar* al genoma vegetal. La reducción en la concentración de los reguladores del crecimiento permitió la germinación de embriones somáticos de los callos co-bombardeados.

Al término de un par de semanas, se observaron varios embriones con forma redonda y color verde en la superficie del callo (Figura 14A). Cuando los embriones germinaron se observó la presencia de raíces y hojas (Figura 14B) y fueron subcultivadas a medio nuevo, para permitir el desarrollo de plántulas individualizadas. En esta fase se mantuvieron las mismas condiciones de selección para evitar el desarrollo de plantas escape. Los subcultivos posteriores al desarrollo de brotes de plántulas de maíz se realizaron cada tres semanas o dependiendo de la rapidez de crecimiento de las mismas.

Dos meses después de la germinación de los embriones se eliminó por completo la presencia de reguladores del crecimiento en los medios de cultivo, no así del

glufosinato de amonio, el cual se mantuvo. Estas plántulas presentaron un color verde homogéneo y con características morfológicas similares a los controles negativos. La eliminación de reguladores del crecimiento permitió el desarrollo de un sistema radicular definido (Figura 15). Durante el desarrollo de la plántula se eliminaron los restos de callo embriogénico para evitar la competencia por nutrientes. Las plantas en condiciones *in vitro* se fueron traspasando a botellas de mayor tamaño de forma individual, para permitir un adecuado intercambio de gases que permitiera su crecimiento.

Las plantas que llegaron a alcanzar una talla desde 10 hasta 15 cm de largo (Figura 16) en 12 semanas posteriores a la germinación de los embriones, fueron subcultivadas en medio sin reguladores de crecimiento y agente de selección. Esto permitió el fortalecimiento tanto de raíces, como de la parte aérea. De estas plantas se obtuvieron hasta 40 plantas en cada transformación. Sin embargo no todas lograron desarrollar un sistema radicular fortalecido que permitiera su traspaso a tierra. Aquellas que presentaron un sistema radicular abundante y vigoroso fueron transplantadas a tierra en las condiciones descritas en Material y Métodos para su aclimatación al invernadero.

Cabe mencionar que hasta esta fase de la regeneración de plantas *in vitro*, las condiciones fueron las adecuadas, ya que de todos los callos embriogénicos transformados se logró la obtención de plantas de hasta 20 cm de talla.

Sin embargo, como se mencionó previamente, no se logró la regeneración de plantas adultas en invernadero durante las primeras etapas de este trabajo de investigación (primeras cinco transformaciones), por lo cual se modificó el medio N6 de regeneración.

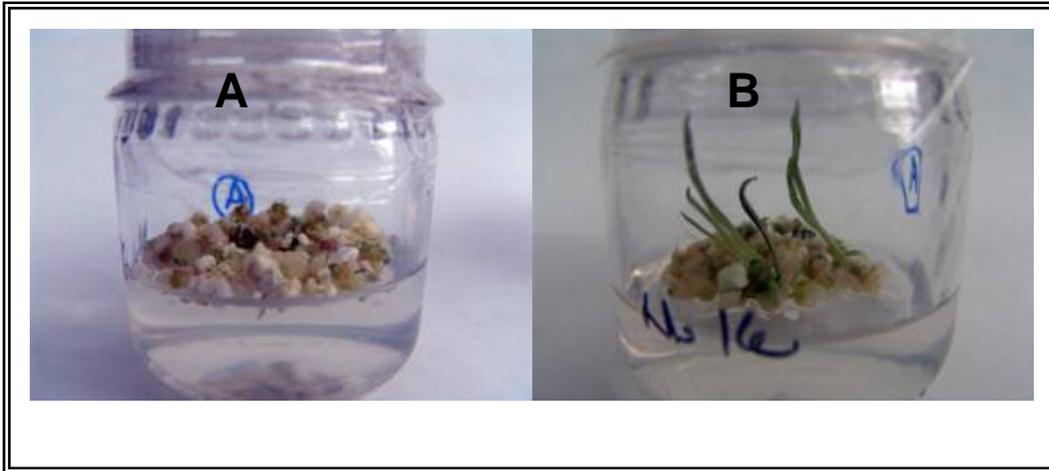


Figura 14. Desarrollo de embriones de maíz. En la Figura A se observan embriones y en la Figura B se muestra las plántulas generadas de dichos embriones.



Figura 15. Plántulas de maíz en condiciones *in vitro*. En esta etapa se observaron plántulas definidas y con un sistema radicular (señalado con la flecha) que permitió un buen desarrollo en los medios de cultivo utilizados.



Figura 16. Plantas jóvenes de maíz en condiciones *in vitro*. Las hojas en color café que se observan se deben a la muerte de las hojas más viejas y que son remplazadas por hojas nuevas.

A este nuevo medio se le denominó medio de regeneración 1, dicho medio fue el N6 (descrito en el Anexo I) enriquecido con dos reguladores de crecimiento, BAP y AIA. Estos compuestos son hormonas de crecimiento vegetal, la primera perteneciente al grupo de las auxinas y la segunda a las citocininas. Las dos hormonas permiten la división celular y al usarlas juntas permiten el crecimiento de la parte aérea de la planta mientras fortalecen las raíces. Por otra parte, el principal regulador del crecimiento, el 2,4-D se fue reduciendo paulatinamente en cada subcultivo para permitir más rápidamente la regeneración de plántulas. En ningún momento se quitó del medio el agente de selección, para evitar la obtención de plantas sin transformar. Esta estrategia permitió la obtención de plantas mas vigorosas en condiciones *in vitro* como se observa en la Figura 17.

Las plantas crecidas bajo las condiciones antes mencionadas fueron trasplantadas a frascos con agrolita para aclimatarlas de una forma paulatina. La agrolita es un polímero que se agrega a la tierra para aumentar la porosidad de la misma, lo que permite que las raíces tengan una mejor distribución en las macetas. En este experimento, se utilizó con la finalidad de permitir un mejor desarrollo de raíces y adaptar las plantas a condiciones ambientales de invernadero. La agrolita fue puesta en frascos (antes de pasar a la fase de sembrar las plantas en tierra) y fue bañada con el medio de regeneración 1 (sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, AIA y BAP, pero sin gelificante ni azúcar). En estos frascos se sembraron las plantas, las cuales mejoraron su aspecto y sobre todo se observo un aumento en el tamaño de las raíces (Figura 18).



Figura 17. Plantas de maíz en condiciones *in vitro* con un sistema radicular enriquecido, así como con tallo fuerte.



Figura 18. Plantas de maíz en condiciones *in vitro* sembradas en agrolita para fortalecer sobre todo la parte aérea y desarrollo de raíces.

De los siete bombardeos realizados sólo se logró la obtención de cuatro plantas con buen aspecto morfológico (tallo vigoroso y raíces largas), las cuales fueron entonces trasplantadas a tierra y se mantuvieron en el cuarto de cultivo hasta su madurez, posteriormente se llevaron a invernadero para obtener mazorcas (Figura 19). Las cuatro plantas obtenidas tuvieron un crecimiento de entre 1-1.5 m de altura y su aspecto físico fue variable entre ellas, mientras dos se observaron con follaje abundante y la presencia de 4 mazorcas (Figura 20); las dos plantas restantes, aunque presentaron mejor talla, sólo llegaron al periodo de espigación y dos meses posteriores a dicho evento murieron sin dar lugar a mazorcas (Figura 21).



Figura 19. Plantas de maíz en condiciones de invernadero. Las plantas observadas en la figura, son de aproximadamente un mes sembradas en mezcla de tierra-Pete moss y agrolita. En un principio éstas crecieron lentamente y muy débiles pero se fortalecieron durante el tiempo de aclimatación.



Figura 20. Plantas de maíz en invernadero de aproximadamente 1.0 m de talla después de tres meses sembradas en mezcla de tierra- Pete moss y agrolita y en condiciones de invernadero, las cuales presentaron las mejores condiciones morfológicas y de las cuales se obtuvieron las mazorcas.



Figura 21. Plantas de maíz en invernadero de aproximadamente 1.5-2 m de talla después de tres meses sembradas en mezcla de tierra- Pete moss y agrolita y en condiciones de invernadero. Como se puede observar no presentaron buen desarrollo de la parte aérea, dichas plantas sólo mostraron espiga (circulo rojo) y posteriormente murieron.

En la Tabla 3 se muestra el nivel de regeneración alcanzado, como se puede observar éste fue muy bajo ya que sólo se lograron obtener cuatro plantas

después de siete bombardeos. En todos los casos se logró un alto nivel de plántulas regeneradas en condiciones *in vitro* (hasta cuarenta en algunos bombardeos), sin embargo la regeneración se obtuvo hasta la sexta transformación al utilizar las condiciones descritas previamente. Todo el material vegetal obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su uso, incluso la parte verde de las plantas que no generaron mazorca.

Tabla 3. Recuperación de plantas de maíz transgénico.

No. Transformación	No. de callos embriogénicos	Regeneración en invernadero
1	90	----
2	80	----
3	75	----
4	75	----
5	70	----
6	180	2
7	90	2

En la tabla se resume la recuperación de plantas de maíz transgénicas con respecto al número de transformaciones realizadas. En todos los casos el número de plántulas en condiciones *in vitro* supero los 20. En el bombardeo 5 se presentó una contaminación masiva de los callos tanto por hongos y bacterias, se perdió todo el lote (posible causa material contaminado del laboratorio).

3.4 Identificación del gen G del virus de la rabia en el genoma vegetal de plantas transformadas.

Para la identificación del gen G del virus de la rabia se extrajo el ADN de hojas jóvenes de plantas regeneradas. Este ADN fue utilizado como plantilla para amplificar por PCR el gen G completo de 1572 pb en maíz y 1231 pb en zanahoria. En la Figura 22 se muestran los amplicones correspondientes al ADN de las plantas de zanahoria que integraron exitosamente el gen G del virus de la rabia en su genoma, mientras que en la Figura 23 se observa el resultado obtenido para las plantas de maíz.

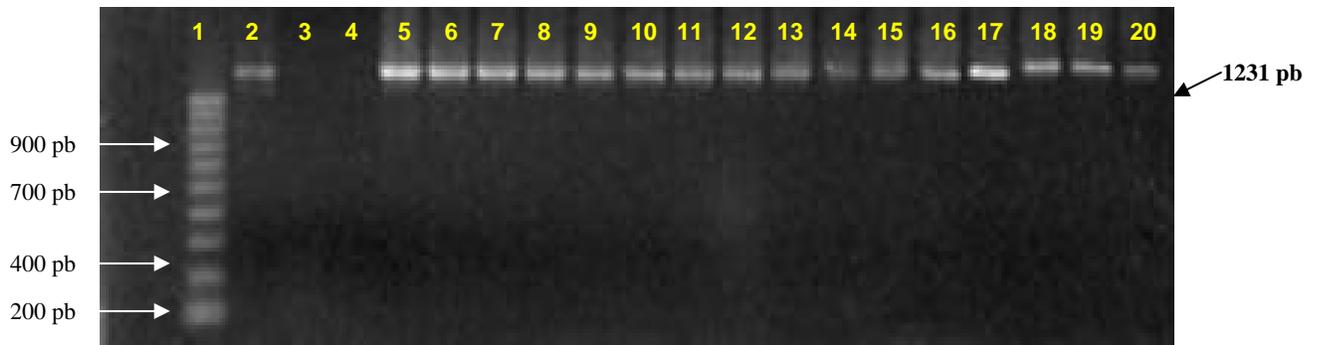


Figura 22. Amplificación del gen G del virus de la rabia por PCR en plantas de zanahoria transformadas. Carril 1, Marcador de peso molecular 100 pb (BioRad); 2: control positivo (cassette de expresión pUCpSSrabG); 3 y 4: control negativo (tejido vegetal sin transformar y agua); 5 a 20: tejido vegetal de plantas transformadas con en gen G del virus de la rabia.

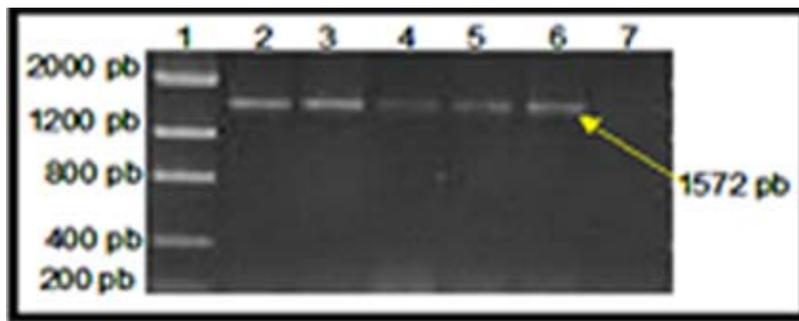


Figura 23. Amplificación del gen G del virus de la rabia en plantas de maíz transformadas. Carril 1, Marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen); 2: control positivo (cassette de expresión p pGHNC5); 3-6 tejido vegetal de plantas transformadas con en gen G del virus de la rabia; carril 7 control negativo (tejido vegetal sin transformar).

Todas las plantas analizadas integraron el gen G a su genoma, por lo anterior se puede decir que tanto el método de transformación, como el de selección fueron adecuados para obtener plantas transgénicas que adoptaron el gen que se les integro.

3.5 Detección del ARN m del gen G del virus de la rabia en tejido vegetal transformado.

Para verificar el estado del ARN extraído de tejido vegetal, previo al análisis del ARNm del gen G, se amplifico el gen GAPC3 que codifica para la gliceraldehído-3-fosfatasa citosólica una enzima constitutiva distribuida tanto en mono como dicotiledóneas. En la Figura 24 se muestra el producto de amplificación de aproximadamente 800 pb que corresponde a un fragmento del gen GAPC3 tanto

de zanahoria, como de maíz, cabe mencionar que todas las plantas se analizaron, aunque en la fotografía sólo aparecen algunas de ellas para fines de presentación.

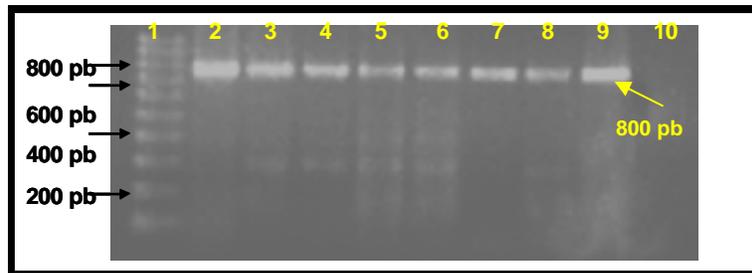


Figura 24. RT-PCR del gen GAPC3 utilizando ARN extraído de tejido vegetal. 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Bio Rad); 2: control positivo; 3-4: tejido de plantas de maíz transformadas; 5-9: tejido de plantas de zanahoria transformadas; 10: control negativo.

Una vez observada la condición del ARN, se llevó a cabo una RT-PCR en dos pasos utilizando como plantilla el ARN total obtenido de las plantas adultas transformadas tanto de maíz, como de zanahoria para confirmar la presencia del transcrito del gen G del virus de la rabia. En la Figura 25, se observa el producto de amplificación obtenido de la RT-PCR de las cuatro plantas de maíz y algunas de las plántulas de zanahoria. Este resultado indica que el gen G del virus de la rabia fue transcrito en la célula vegetal de las plantas que integraron a su genoma el gen G del virus de la rabia.

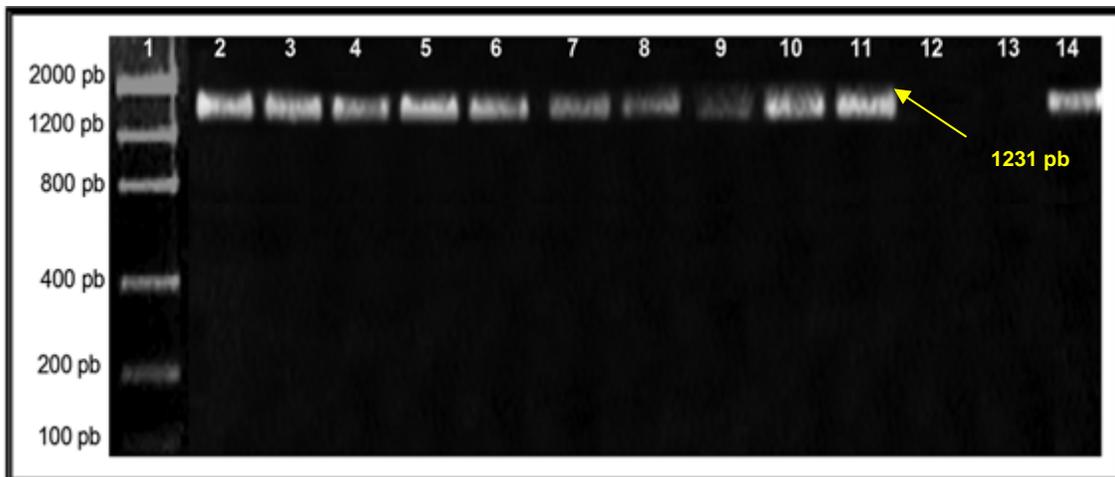


Figura 25. RT-PCR para el ARNm del gen G del virus de la rabia expresado en tejido de maíz (carriles 2-5) y zanahoria (carriles 6-11). Línea 1: Marcador de pesos molecular DNA Low Mass Leader; línea 2-12; ADN de tejido transformado con el gen G; línea 12 y 13: tejido sin transformar (maíz y zanahoria respectivamente); línea 14: control positivo.

3.6 Identificación de la proteína G del virus de la rabia en plantas transformadas

Para identificar a la proteína G del virus de la rabia, se utilizó proteína total soluble extraída de las zanahorias (parte radicular) y maíz (semillas), transformados con el gen G del virus de la rabia en la prueba de Western blot.

En la Figura 26 A se muestran las proteínas totales obtenidas de las cuatro plantas de maíz analizadas, en las cuales se detectó un banda de aproximadamente 70 kDa correspondiente a la proteína G del virus de la rabia, en el tejido sin transformar no se observó dicha banda. En dicha Figura las bandas se detectaron por encima del control positivo (proteína G purificada). Lo mismo fue observado en la Figura 26 B correspondiente a la identificación en maíz. Lo anterior demostró que el 100% de las plantas que integraron al gen G del virus de la rabia en su genoma también lo expresaron en el tejido vegetal.

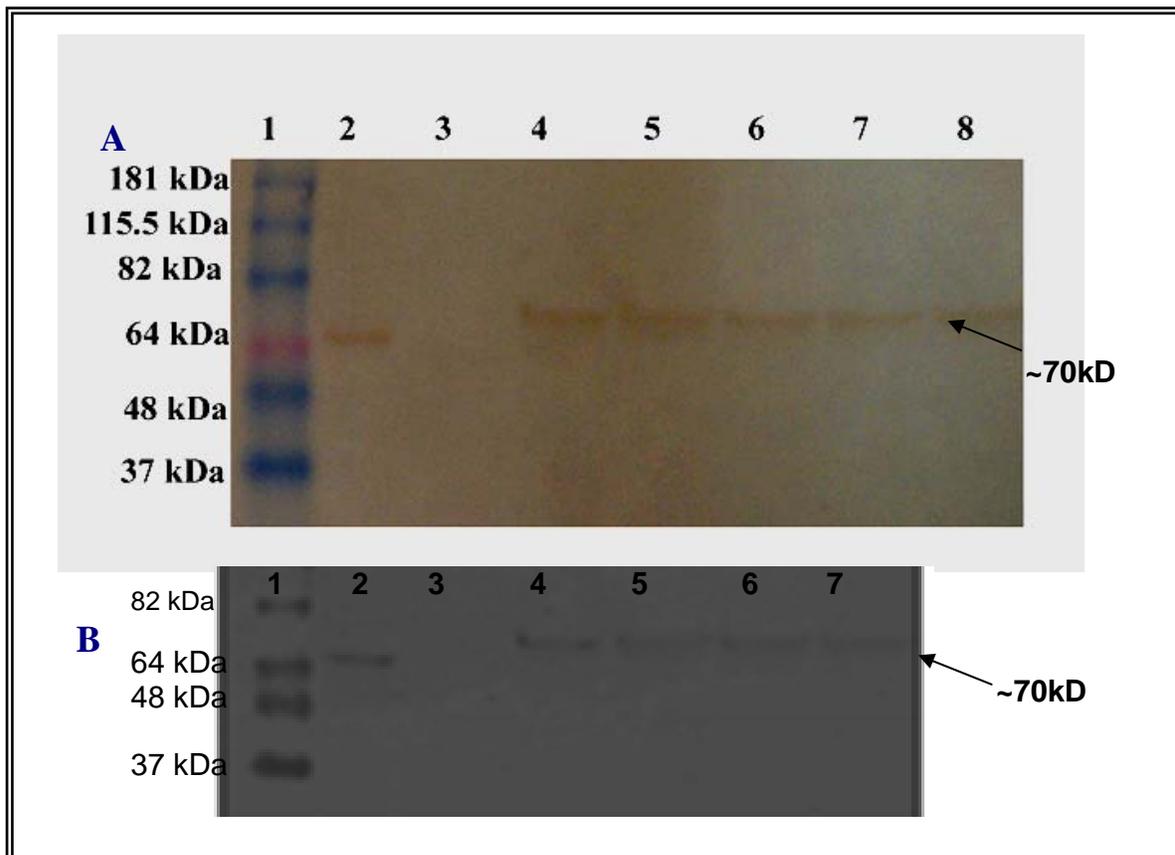


Figura 26. Identificación por Western blot de la proteína G del virus de la rabia en plantas de transformadas. **A Tejido De zanahoria:** Carriles 1-5: tejido de plantas de zanahoria transformadas con el gen G; carril 6: tejido de zanahoria sin transformar; carril 7: proteína G de virus de la rabia purificada 8: Marcador de peso molecular See Blue Prestained (Invitrogen, USA). **B Tejido de maíz:** Carril 1: marcador de peso molecular BenchMark Pre-stained protein ladder (Invitrogen, USA); carril 2: proteína G de virus de la rabia purificada; carril 3: tejido de maíz sin transformar; carril 4-7: tejido de plantas de maíz transformadas con el gen G.

Por otra parte para completar la identificación y cuantificar la concentración de proteína G expresada en el tejido vegetal se llevo a cabo una prueba de densitometría (Figura 27). Para lo anterior, el extracto de proteína de 200 mg de tejido vegetal ya sea de la parte comestible de zanahoria o de semillas de maíz fue separado en geles PAGE 10% y este fue analizado como se describe en Material y Métodos.

En la Figura 28 se puede observar el gel correspondiente a los extractos de maíz, el resultado fue que las semillas de maíz analizadas expresan 50 μ g de proteína G

por cada gramo de tejido vegetal (~1% de proteína total soluble (PTS) en promedio). Mientras que el resultado de la densitometría hecha con la Figura 29 revelo que en zanahoria expresa solamente 25 µg de proteína G por gramo de tejido vegetal (~0.4-1.2% de PTS en promedio)

3.7 Expresión de la proteína G del virus de la rabia en baculovirus.

Con la finalidad de estandarizar un inmuno-ensayo enzimático para la detección de anticuerpos y así como para utilizar la proteína como control positivo en el experimento de inmunización con las vacunas comestibles, se obtuvo un baculovirus transformado con la proteína G del virus de la rabia.

Para la obtención de la proteína G de origen recombinante, se construyó un baculovirus BacMelGrabHis, como se describe en la sección Material y Métodos. Una vez obtenido el baculovirus este fue titulado por la prueba de formación de placas obteniendo un titulo de 68×10^7 pfu/mL.

El sobrenadante de las células infectadas con este baculovirus fue observado en gel de poliacrilamida al 10% (Figura 30), en todos los carriles se cargaron 30 µg de proteína total, de la misma forma se llevo a cabo una prueba de Western blot para demostrar la presencia de la proteína G del virus de la rabia. Como se observa en la Figura 31 la proteína G del virus de la rabia fue detectada específicamente por un anticuerpo anti-proteína G producido en conejos.

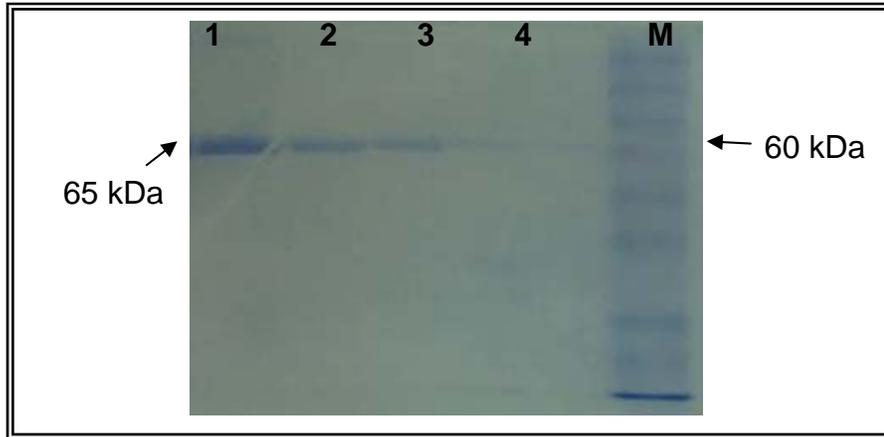


Figura 27 Curva estándar para cuantificar la proteína G expresada en plantas transformadas. Carril M: marcador de peso molecular; Carriles 1-4: 1, 0.75, 0.5 y 0.250 μg de proteína G del virus de la rabia purificada.

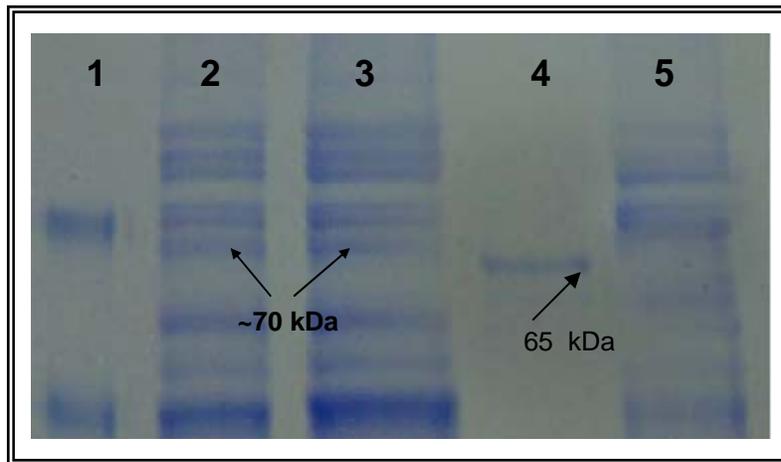


Figura 29. Cuantificación de la proteína G expresada en maíz. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-3: Tejido de maíz transformado. Carril 4: proteína G del virus de la rabia purificada. Carril 5: Tejido de maíz sin transformar.

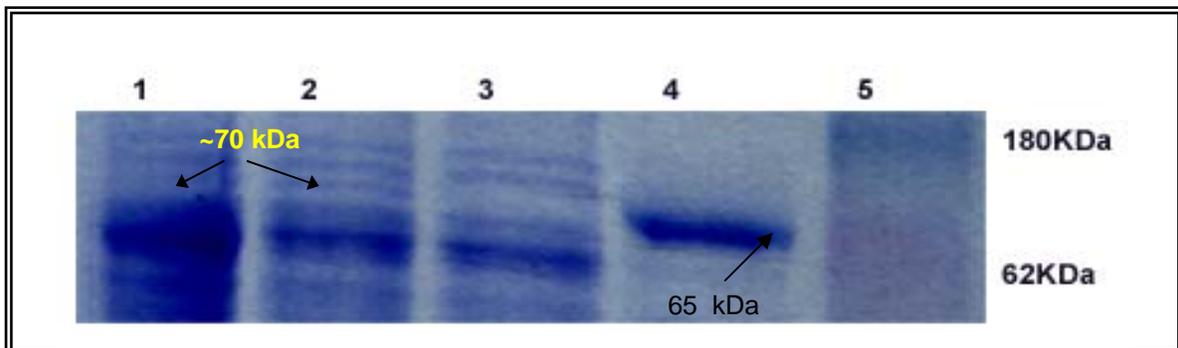


Figura 28. Cuantificación de la proteína G expresada en zanahoria. Carriles 1: zanahoria sin transformar; Carriles 2 y 3; zanahoria transformada; carril 4: Proteína G del virus de la rabia purificada; **Carril 5**; marcador de peso molecular

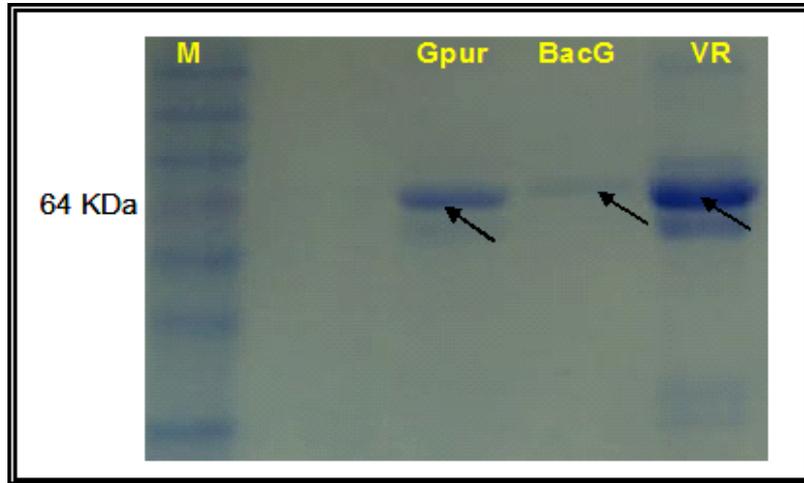


Figura 30. Visualización de la proteína G del virus de la rabia expresada en células de insecto Sf21. 50 μ g de proteína total del sobrenadante de células de insecto Sf21 infectadas con el baculovirus BAcMelGrab, fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 10%. Carriles: M: marcador de peso molecular BenchMark Pre-stained protein ladder (Invitrogen, USA); G pur: proteína G purificada de geles de poliacrilamida. BacG: sobrenadante de células de insecto que expresan la proteína G del virus de la rabia. VR: extracto del virus de la rabia cepa ERA. Las flechas indican la proteína G

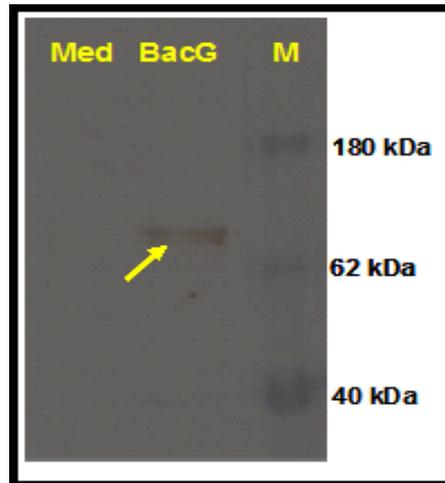


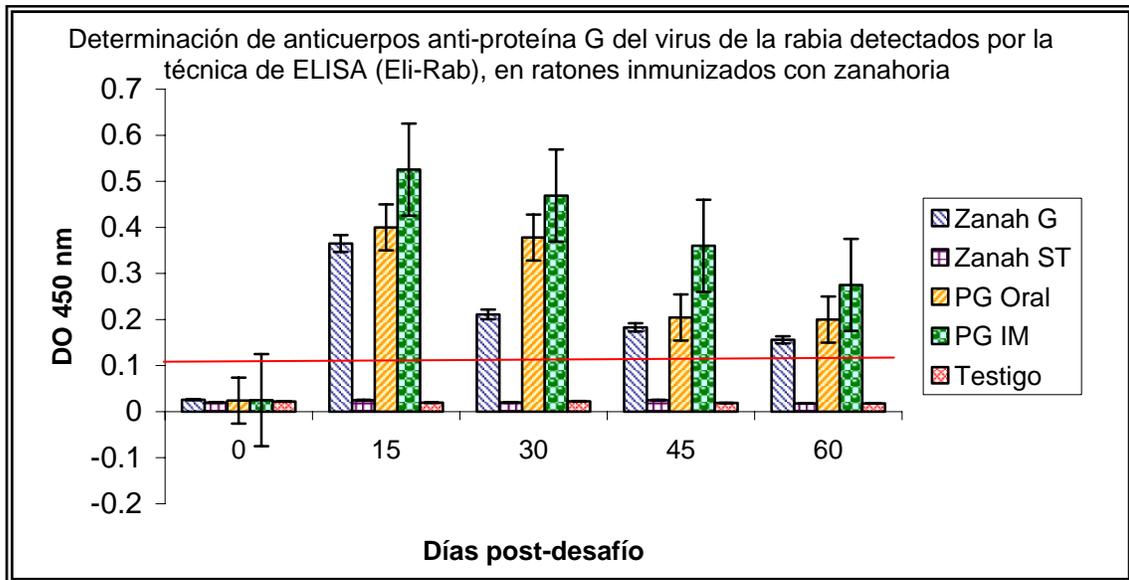
Figura 31. Western blot para la detección de la proteína G de rabia en el sistema de baculovirus. Para identificar la proteína se utilizó como anticuerpo un suero hiperinmune de conejo. Med: medio de células sin infectar; BacG: sobrenadante de células infectadas con baculovirus que expresa la proteína G; M: marcador de peso

3.8 Inmunización de animales de laboratorio.

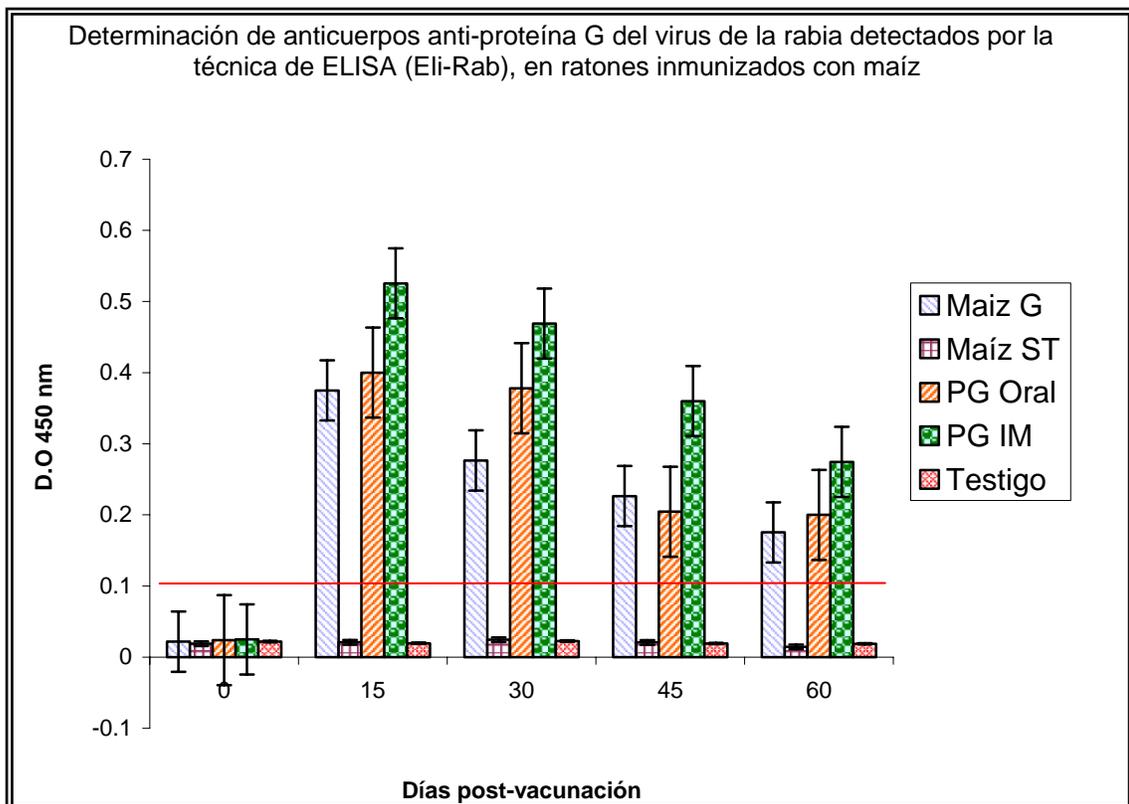
3.8.1 Inmunidad humoral.

Conociendo la concentración de proteína expresada en el tejido de zanahoria y maíz, se determinó la cantidad con la que se inmunizaron, por vía oral, los ratones. En zanahoria se expresaron 25 μg de proteína G por gramo de tejido vegetal, por lo que cada animal recibió 4 g conteniendo 100 μg de proteína; mientras otro grupo de animales recibió 2g de harina de maíz que contenían la misma cantidad de antígeno.

Los resultados de la determinación de anticuerpos anti-proteína G realizados mediante una ELISA (Eli-Rab) estandarizada en el laboratorio, se presentan en la Gráfica 1, para zanahoria y en la Gráfica 2 para maíz. Cabe mencionar que el ensayo de inmunización para maíz se llevo a cabo por duplicado, mientras que el de zanahoria por la disposición del material vegetal, sólo se llevo a cabo en una ocasión tal como se muestran los resultados. Sin embargo en un ensayo independiente, se inmunizaron ratones con zanahoria pero además adicionando diferentes adyuvantes orales. Los resultados de anticuerpos fueron similares a los presentados en este trabajo así como los niveles de protección descritos en la siguiente Sección 3.9, por esta razón se incluyeron para el análisis estadístico de datos. En ambas gráficas se puede observar que los grupos de ratones inmunizados con zanahoria (Grupo1) y maíz (Grupo 3) desarrollaron anticuerpos contra la proteína G. Ambos grupos fueron comparables con los del Grupo 5 (animales inmunizados por vía oral con proteína G derivada de baculovirus), y fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$ en ambos grupos). Como era de esperarse, el grupo de animales inmunizados con la proteína G por vía intramuscular (Grupo 6), fue el que mayor titulo de anticuerpos desarrollo. Ninguno de los grupos controles negativos (Grupo 2, 4 y 7) desarrollo anticuerpos contra la proteína G del virus. El punto de corte para considerar un suero negativo (0.112) fue la densidad óptica mas tres desviaciones estándar de los datos obtenidos.



Gráfica 1. Determinación de anticuerpos anti-proteína G del virus de la rabia detectados por la técnica de ELISA (Eli-Rab) en ratones inmunizados con zanahoria. El análisis de ANOVA reveló que todos los grupos de animales inmunizados tuvieron diferencia significativa con el grupo testigo ($P = 0.004$). La línea roja indica el punto de corte (0.112)



Gráfica 2. Determinación de anticuerpos anti-proteína G del virus de la rabia detectados por la técnica de ELISA (Eli-Rab) en ratones inmunizados con maíz. El análisis de ANOVA reveló que todos los grupos de animales inmunizados tuvieron diferencia significativa con el grupo testigo ($P = 0.010$). La línea roja indica el punto de corte (0.112)

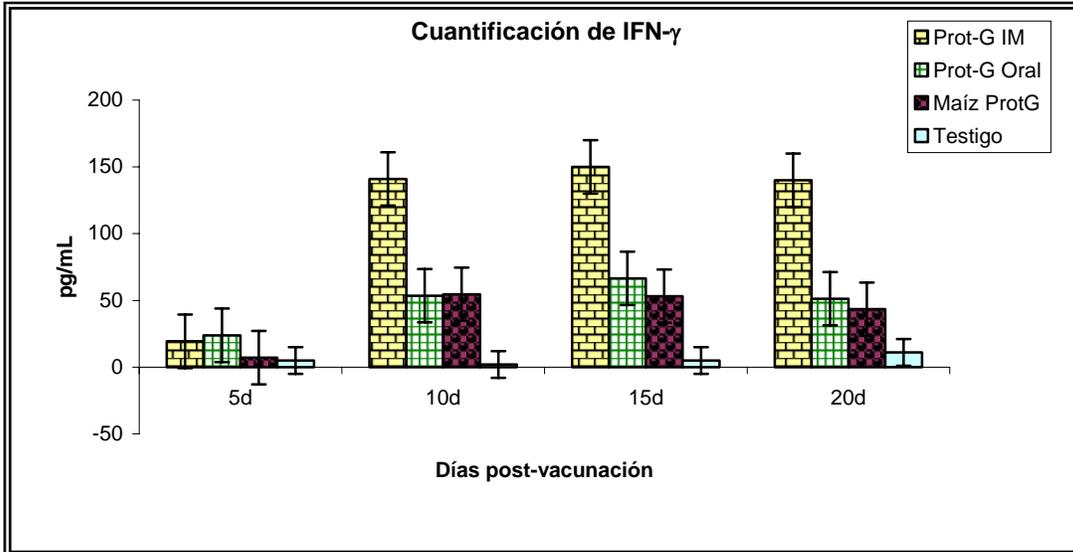
3.8.2 Inmunidad celular

La presencia de las citocinas INF- γ y IL4 fue determinada utilizando una prueba de ELISA comercial. Para lo cual se utilizaron los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de ratones inmunizados. La prueba dio como resultado la presencia de INF- γ (Gráfica 3) en los grupos inmunizados con la proteína G, ya sea origen recombinante o expresadas en maíz, y en menor nivel la presencia de IL-4 (Gráfica 4).

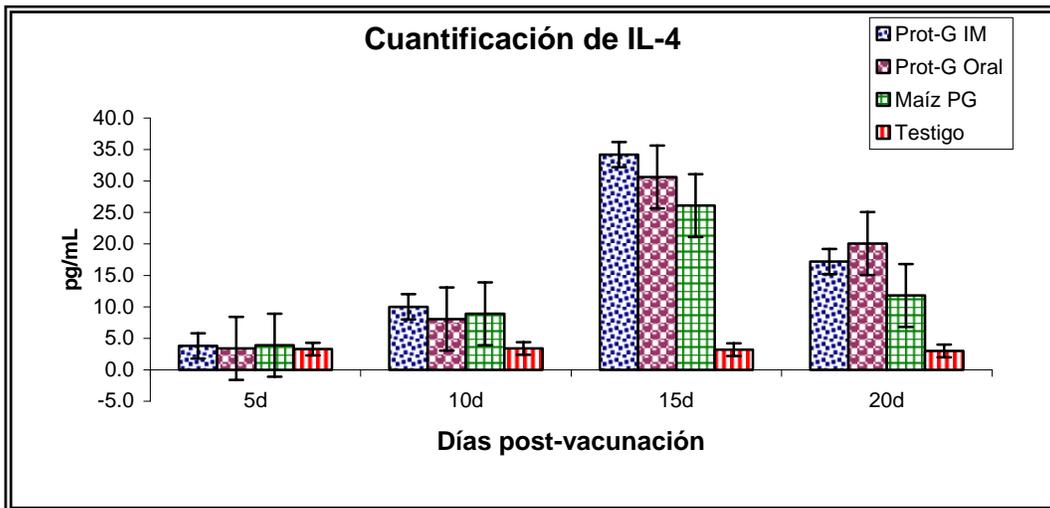
Este resultado, lleva a pensar que la respuesta inmune que se monta en los primeros días de la inmunización con la vacuna comestible desarrollada en este trabajo es una respuesta del tipo Th1 regulada por una respuesta Th2, mostrada por la presencia de la IL-4. Aunque, la presencia de esta se observó en las determinaciones después del día 15, lo cual concordaría con el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (respuesta tipo Th2) después de este día.

3.9 Supervivencia de animales vacunados y desafiados con el virus de la rabia.

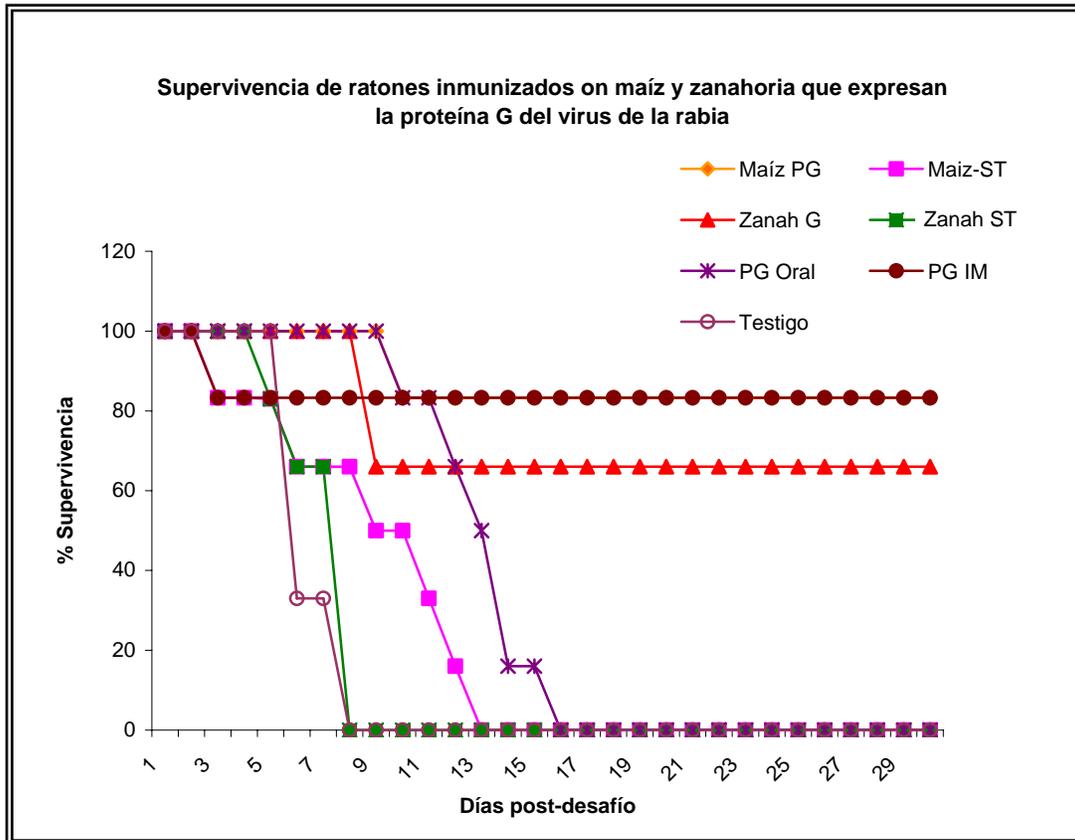
Sesenta días después de la inmunización todos los ratones fueron desafiados con un aislado de virus rábico de cepa vampiro. Los resultados que se muestran en la Gráfica 5 indican una protección parcial de la proteína G frente a una infección viral experimental. Se puede observar que el nivel de protección fue similar entre el grupo control positivo (proteína G recombinante) y los ratones inmunizados con maíz (83% de supervivencia). En el caso de los ratones inmunizados con zanahoria que expresa la proteína G del virus de la rabia se observó un menor porcentaje de supervivencia (66%) aunque recibieron la misma dosis de proteína G. Es importante resaltar que todos los animales de los grupos controles negativos murieron de rabia, en estos se pudieron observar los signos rábicos, los cerebros se probaron por la prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia.



Gráfica 3. Cuantificación de IFN- γ en linfocitos extraídos de bazos estimulados con proteína G del virus de la rabia. Análisis de varianza (ANOVA) ($p=0.024$)



Gráfica 4. Cuantificación de IL-4 en sobrenadantes de linfocitos extraídos de bazos estimulados con proteína G del virus de la rabia. Análisis de varianza (ANOVA) ($p=0.042$)



Grafica 5. Porcentaje de supervivencia de ratones desafiados con el virus de la rabia. Los grupos G1 y G3 (inmunizados con maíz, y con proteína G purificada respectivamente) presentaron un 83.3% de supervivencia. Mientras que el grupo G3, inmunizado con zanahoria presentó una supervivencia de 66 %. Ningún animal de los grupos control G2, G3 y G7 sobrevivió al desafío.

4.0 DISCUSIÓN.

La rabia es una de las enfermedades más antiguas conocidas, por la humanidad y la zoonosis viral más importante con implicaciones tanto de salud pública, como veterinaria (Fournier-Caruana, *et al*, 2003; Rupprecht, *et al*, 2002). La principal estrategia para el control de la enfermedad es la vacunación, por lo que el diseño de una vacuna antirrábica que sea efectiva, segura y de bajo costo es una prioridad. En el caso particular de esta investigación, se evaluó la respuesta inmune humoral, celular y de protección inducida en ratones vacunados vía oral con plantas de maíz y zanahoria que expresan a la proteína G del virus de la rabia. Para lograr esta meta, la primera fase de experimentación fue el diseño de vectores de expresión en plantas que contuvieran al gen G del virus.

Una característica importante de los vectores de expresión para plantas es el promotor; uno de los más ampliamente utilizados es el del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) por ser un promotor constitutivo. Los estudios de expresión han revelado que la transcripción es manejada por el fragmento -208 a -46. Al duplicar esta región el efecto del promotor se ve directamente reflejado en el aumento de la expresión del gen de interés (Omirullen *et al*, 1993). Por esta razón, en este estudio, se decidió utilizar como promotor esta región incrementadora duplicada en el vector pUCpSS que fue utilizado para la transformación de zanahoria. Para maíz se optó por utilizar el promotor de la Ubiquitina de maíz (*Ubi*). El empleo de este promotor ha demostrado dar los niveles más altos en la expresión de genes en varias especies de cereales (Cornejo *et al*, 1993; Gallo-Meagher & Irving, 1993 y Taylor *et al*, 1993; Vasil, 1994). El resultado de el uso de ambos promotores, fue la expresión de 1% de proteína G con respecto a la proteína total soluble, existen pocos reportes en donde la transformación nuclear de estos resultados.

Una fase crucial en este trabajo de investigación fue el cultivo de tejidos vegetales, manejo de reguladores del crecimiento y medios de cultivo, ya que permiten la obtención de plantas que expresen proteínas exógenas. Las auxinas y demás

componentes que constituyen dichos medios, así como las concentraciones utilizadas fueron determinadas previamente para la obtención del callo embriogénico (Tokuji & Kuriyama, 2003), y las modificaciones a dichos medios han sido descritas previamente por Mere & Vázquez, 2003; y Jiménez 2006

Lo anterior se ve afectado también y de forma directa por el método de selección, el cual no debe afectar el desarrollo de la planta, pero debe ser eficaz para evitar el desarrollo de plantas escape. Este tipo de plantas se generan cuando células que son transformadas, no integraron al transgen debido a la ineficacia del método de selección y por tanto no expresan la proteína deseada. En este sentido el uso del Basta®, glufosinato de amonio, ha sido exitosamente empleada para recuperar líneas transformadas en maíz (Fromm *et al*, 1990; Gordon-Kamm *et al*, 1990). Con base en ello, se optó por emplear un herbicida en lugar de un antibiótico como agente de selección en ambas especies trabajadas en la investigación. Lo anterior debido a que el uso de antibióticos como marcadores de selección es controversial, debido al potencial de diseminación para proveer nuevas características a las plantas en la transferencia de genes (Chambers *et al.*, 2002).

Posterior a la transformación, un paso crucial para obtener plantas transgénicas que expresen el transgen es continuar con un riguroso proceso de selección. El glufosinato de amonio es el principio activo del herbicida BASTA®. Es parte del tripéptido fosfotricil-alanil-alanina e inhibe principalmente a la enzima glutamina sintetasa. El gen de resistencia ha sido transferido a diversos cultivos de interés económico entre ellos el maíz. Las plantas transformadas con estos genes producen una nueva enzima, la fosfotricin acetil transferasa, que inactiva el glufosinato en las células por acetilación; mientras que las plantas sin transformar mueren por la acumulación de glufosinato, ya que no presentan dicha enzima (Weller *et al.*, 2003). La acumulación de éste causa muerte celular y necrosis en los tejidos tal y como se observó en los callos embriogénicos sin transformar (Figura 9). En la transformación, el gen *bar* se encuentra 9 veces menos representado que

el gen G de rabia, por lo que se infiere que las células que han integrado el gen *bar* también habrán integrado el de rabia.

Para dirigir a los callos embriogénicos transformados hacia la regeneración de plántulas, se disminuyó gradualmente el regulador de crecimiento vegetal en el medio (Ibaraki & Kurata, 2001; Ammirato, 1983; Emons y Kieft, 1995). El alto grado de regeneración obtenido en condiciones *in vitro* para maíz, coincide con lo informado por Hardegger y Sturm, 1998; en donde de igual forma se logró una alta tasa de regeneración, pero utilizando *Agrobacterium* como método de transformación. Otros como Gordon-Kamm *et al* (1990) regeneraron un total de 76 plantas de las cuales, 35 alcanzaron la madurez, aunque no dan datos de número de callos transformados; Spencer *et al* (1992) regeneraron 219 plantas; Register III *et al* (1994) obtuvieron 95 plantas regeneradas de 75 transformaciones; Zhong *et al* (1996) regeneraron 5 plantas de cada una de las 10 callos transformados y O'Connor *et al* (2002) regeneraron 29 líneas, sin que informen del número de transformantes. En este trabajo, la cantidad obtenida de plantas de maíz regeneradas en condiciones *in vitro* se considero exitosa, concluyendo que las condiciones de regeneración empleados fueron adecuadas. Sin embargo las condiciones de climatización sólo permitieron el crecimiento de 4 plantas con una altura promedio de 1-1,30 metros y algunas presentaron una espigación anómala al igual que la formación de la mazorca. Con lo cual el índice de rendimiento es muy bajo.

Anormalidades morfológicas similares en plantas regeneradas de maíz han sido previamente descritas por Gordon-Kamm *et al* (1990), D'Halluink *et al* (1992), Walters *et al* (1992), Zhong *et al* (1996) y O'Connor *et al* (2002), lo anterior puede deberse al estrés al que estuvieron sometidos los callos por parte del herbicida y el tiempo en el que permanecieron tanto del agente de selección, como del regulador de crecimiento provocando variación somaclonal. El fenómeno de variación somaclonal se da en plantas regeneradas a partir de cultivos de tejidos (Larkin y Acowcroft, 1981). Dicho evento se debió al régimen de cultivo (intervalo

del subcultivo y condición física del medio) y los componentes del medio; especialmente hormonas y reguladores de crecimiento han demostrado su influencia sobre el estatus citológico de las células en cultivo. El fenómeno tiende a incrementarse con la duración del crecimiento *in vitro* y la inestabilidad cromosómica está frecuentemente asociada con el crecimiento del callo desorganizado (Bayliss, 1980; Lee y Phillips, 1988), características en la naturaleza recalcitrante de las especies gramíneas por el uso de altas concentraciones de auxinas fuertes como 2,4-D (Vasil, 1994). Por esto, en este trabajo fue necesario utilizar, además de esta hormona, otros reguladores del crecimiento, ya que después de cinco transformaciones no se logró recuperar ninguna planta adulta en condiciones de invernadero. El medio N6 fue enriquecido con la citocina BAP (benzilaminopurina) y la auxina AIA (ácido indolacético) en la etapa de regeneración. Lo anterior debido a que estos compuestos son hormonas de crecimiento vegetal. Ambos permiten la división celular y cuando se usan juntas permiten el crecimiento de la parte aérea de la planta mientras permiten el fortalecimiento de la parte radicular (experiencia del laboratorio de Cultivos Vegetales, datos no publicados). El uso de este medio y la pre-aclimatación de las plantas utilizando agrolita como sustrato fueron los factores determinantes para la obtención de plantas adultas en invernadero.

Aun con los resultados obtenidos en la fase de regeneración, esta fase fue poco exitosa debido a la gran cantidad de recursos y tiempo dedicados a lograr la obtención de plantas adultas y fértiles. Por esta razón debe considerarse en futuros estudios un sistema de expresión que sea más estable.

La identificación del gen G del virus de la rabia en el genoma vegetal de ambas especies transformadas así como la expresión del transgene en ellas fueron analizadas por PCR y RT-PCR. Todas las plantas analizadas de ambas especies fueron positivas al amplificar los 1572 pb del gen G del virus de la rabia. El éxito de la obtención del 100% de plantas transgénicas se debe principalmente a la rigurosa fase de selección con el glufosinato de amonio, ya que dicho agente no

fue retirado por completo de los medios hasta que las plantas fueron aclimatadas a condiciones de invernadero. Aquellas plantas que no integraron al gen *bar*, fueron eliminadas por selección (Fu, et al, 2000), con lo cual también podemos concluir que el procedimiento de co-bombardeo, con dos vectores, no interfiere con el porcentaje de plantas regeneradas, ya que el fenómeno de integración del transgen por bombardeo de partículas es completamente al azar.

En la identificación, fue importante eliminar la presencia de plantas escape, es decir que hayan integrado el gen *bar* pero no el gen G del virus de la rabia. Lo anterior debido a que durante la transformación genética vegetal, los transgenes que son integrados al genoma vegetal pueden ser reconocidos como invasivos durante dicho proceso y no son transcritos. (De Wilde, et al, 2000; Matzke & Eggleston, 1996). Con los resultados observados, se asume que no hubo efecto de silenciamiento, ya que en todas las plántulas que integraron el gen, lo transcribieron.

Para la identificación de la proteína G en el tejido vegetal transformado se llevo a cabo mediante Western blot. Para ambas especies se observó una banda específica de la proteína G del virus de la rabia que tiene un peso alrededor de 70 kDa cuya migración se observó un poco más lenta que la observada para la glicoproteína control. Se observaron algunas bandas inespecíficas reconocidas por el anticuerpo específico, este efecto se ha visto en varias publicaciones (Tae-Jin, et al, 2003; Marquet-Blouin, et al, 2003; Streatfield *et al.*, 2003; Yusibov, et al, 1997).

El aumento de peso molecular en la glicoproteína del virus de la rabia puede deberse a los procesos post-traduccionales que se efectúan en las células vegetales. Uno de ellos es la glicosilación, que es un proceso que puede modificar las propiedades físico-químicas y biológicas de la proteína que se está expresando, por ejemplo la resistencia a la desnaturalización por calor, protección de la degradación proteolítica, inmunogenicidad y solubilidad (Faye, et al, 2005).

Se sabe que en la proteína G del virus de la rabia existen tres sitios de glicosilación y que aunque estos tres presenten glicosilación no interfiere con el reconocimiento o formación de anticuerpos neutralizantes de virus, esto depende más bien de la conformación y plegamiento que adopte la proteína (Drings, 1998). Es probable que en las células vegetales se haya llevado a cabo la glicosilación en uno o más sitios de la proteína, y por ello haya aumentado el peso molecular. Morimoto y Kawai (2002), demostraron que las diferencias en la movilidad electroforética de la proteína G expresada en diferentes sistemas celulares, son debidas a diferentes procesos de glicosilación que sufre, no todos los sistemas la glicosilan de la misma forma. Este mismo grupo de trabajo demostró, mediante el uso de un panel de anticuerpos monoclonales, el diferente patrón de glicosilación no interfirió con el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Lo mismo se presume en este caso, que los cambios en la glicosilación que sufrió la proteína en la célula vegetal, no interfirieron con la formación de anticuerpos que fueran capaces de neutralizar al virus en el ensayo de protección.

McGarvey, et al, en 1995, observo que la proteína G del virus de la rabia sufre procesos post-traduccionales diferentes a los ocurridos en células animales, ya que cuando expresaron a la glicoproteína del virus de la rabia en jitomates obtuvieron dos bandas en el sitio que correspondía al tamaño de la proteína G. Aunque esto pudo deberse a un proceso proteolítico, más que a uno de glicosilación.

Otro objetivo de este proyecto fue obtener una proteína recombinante que permitiera utilizarla como control positivo para el ensayo de inmunidad; así como antígeno en las prueba de ELISA, para determinar anticuerpos antirrábicos. Por ello, la proteína G del virus de la rabia fue expresada también en un sistema de baculovirus. Dicha proteína fue funcional, ya que fue reconocida en Western blot por IgG derivados de suero de conejos hiperinmunizados. Con la proteína G de desarrollo una técnica de ELISA indirecta capaz de detectar anticuerpos contra la proteína G en muestras de suero de animales inmunizados con dicha proteína.

Estos resultados concuerdan con otros reportes en donde se utiliza una proteína G de origen viral o recombinante como antígeno en un ensayo de ELISA (Servat 2007; Cliquet 2000, 2003, 2004, 2006; Grasi 1989). La ventaja de utilizar una proteína recombinante en lugar del antígeno purificado de cultivos celulares infectados con el virus, como en las publicaciones anteriormente citadas, es la disminución del riesgo de manejar dicho virus. Lo anterior sin perder la especificidad de detección de anticuerpos. Si bien en el ensayo de ELISA no se están determinando específicamente anticuerpos neutralizantes de virus, ha sido ampliamente demostrado que los anticuerpos contra la proteína G del virus de la rabia son la principal respuesta contra el virus. Aunque en las Gráficas 3 y 4 se observan bajos niveles de anticuerpos a los 60 días, estos fueron suficientes para conferir protección ante un desafío con el virus de la rabia, lo cual significa que los anticuerpos detectados por la prueba de ELISA fueron neutralizantes. Para evitar la disminución de anticuerpos y tener una respuesta más sostenida, se tendrían que hacer revacunaciones con el antígeno, para lo cual también deben hacerse ensayos de tolerancia. Lo anterior ya que el uso consecutivo de una proteína antigénica por vía oral podría causar anergia de las células ante ella, en este caso dejaría de montarse una respuesta inmune, el efecto contrario a lo que se busca con una vacuna. El efecto de tolerancia ante la administración de una vacuna derivada de plantas ha sido ampliamente discutido (Landrige & Weiner, 2000) sin que hasta el momento se tengan evidencias de que esto haya ocurrido en alguna de las vacunas que se están evaluando por diferentes grupos de investigación .

En este ensayo de protección demostramos que la glicoproteína expresada tanto en zanahoria (Rojas et al, 2009), como en maíz fue capaz de inducir anticuerpos contra la proteína G que son protectores ante un desafío con el virus de la rabia. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos previos donde la glicoproteína ha sido expresada en diferentes sistemas vegetales como tabaco (Yusibov et al. 1997; Ashraf et al. 2005), y espinaca (Modelska et al. 1998; Yusibov et al. 2002). En estos trabajos los animales inmunizados no sólo producen anticuerpos neutralizantes de virus, sino que además dichos

anticuerpos, protegen ante un desafío viral. Una diferencia significativa con los trabajos anteriores es que en todas ellas la administración del antígeno fue por vía parenteral después de haberlo purificado del tejido vegetal. Aunque esto puede representar una desventaja frente a las vacunas comestibles, en las publicaciones más recientes se propone con mayor probabilidad de aceptación la denominación de antígenos derivados de plantas, que corresponde a la purificación del antígeno que ha sido expresado en algún sistema vegetal para posteriormente ser inmunizado.

Con respecto a la inducción de citocinas, los resultados muestran una tendencia al desarrollo de una respuesta celular de tipo Th1, demostrada por la presencia de IFN- γ hasta el día 20 post-vacunación, lo anterior ha sido mostrado también por Tesoro-Cruz et al., 2006 utilizando una vacuna antirrábica de ADN. Este resultado se soporta en la hipótesis sustentada por Drings (2002) que sugiere que una vacuna subunitaria (como una vacuna comestible) desarrollara preferentemente una respuesta tipo Th1 (Drings, 2002). Sin embargo después del día 15 fue observado un pequeño incremento en la concentración de la IL-4, interleucina característica de una respuesta del tipo Th2. La presencia de estas ambas citocinas también fue reportada por Perrin et al., 2000, al administrar una vacuna de ADN desnudo. Con lo anterior se presume que existe una mezcla de células tanto Th1 como Th2. Aunque es necesario desarrollar otros ensayos para ser concluyentes en este punto.

En cuanto al ensayo de protección, no se observó el 100% de protección con el uso de ninguno de los dos sistemas vegetales, esto posiblemente puede deberse a que parte del antígeno administrado fue degradado por efecto de los jugos gástricos. Este efecto podría ocurrir más aún en zanahoria, en donde la proteína se encuentra menos protegida que en maíz, debido a la presencia de almidones en el cereal. Sin embargo en el caso de maíz el porcentaje de protección fue el mismo que el conferido por la proteína G derivada de baculovirus, es decir 83%. Para ninguno de los grupos se administraron adyuvantes, ni tampoco

revacunación. Así que con los datos obtenidos se propone ya sea el uso de adyuvantes orales para investigar si esto promueve una mayor porcentaje de protección o bien hacer revacunaciones con el antígeno. Se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes de virus que proveen protección ante un desafío con el virus de la rabia son inmunoglobulinas del isotipo IgG (Turner 1978). Aunque esto no lo podemos comprobar con la prueba de ELISA que fue desarrollada en este estudio, se propone para futuros estudios determinar el tipo de inmunoglobulina que esta detectando la prueba. La protección conferida por una vacuna oral contra un desafío intracerebral del virus puede explicarse ya que aunque la barrera meto-encefálica es impermeable a los anticuerpos, la barrera que rodea los nervios es un poco más permeable, esto podría estar dando una oportunidad para que los anticuerpos específicos contra el virus entren y neutralicen la infección. También existe la posibilidad de que exista una gran cantidad de anticuerpos en el sitio antes de que el virus entre a sistema nervioso central (Moalem *et al.*, 1999).

El principal objetivo de expresar el gen de la proteína G del virus de la rabia en plantas de maíz, fue generar un prototipo de vacuna de nueva generación que satisfaga las necesidades de vacunación en la actualidad. La expresión estable de la glicoproteína del virus de la rabia lograda con la transformación de maíz y zanahoria, permitió la obtención de plantas que pueden ser utilizadas como una vacuna derivada de plantas, ya que la proteína producida fue reconocida por anticuerpos específicos contra la proteína G del virus, e inducir una respuesta inmune protectora por lo que se puede concluir que sus características inmunogénicas no fueron modificadas por los procesos post-traduccionales que se llevan a cabo por las células vegetales.

Sin embargo, es importante considerar que las nuevas tecnologías aplicadas a alimentos han desatado controversia en cuanto a su legislación y aceptación por el público. Y ya que en este trabajo se propone el uso de las vacunas comestibles, específicamente para la inmunización masiva contra el virus de la rabia; es

importante mencionar la situación en nuestro país en cuanto a estos tópicos se refiere.

Se considera que los organismos genéticamente modificados (OGM) deberían ser vigilados desde su desarrollo en el laboratorio, su ensayo en el medio ambiente y su uso comercial, ya que se ha postulado la contaminación con transgenes a especies nativas. Estos aspectos son examinados en tratados como el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad, el cual fue firmado por México. En nuestro país, se desató un gran debate debido a la introducción de variedades de maíz transgénico y su posible cruce con variedades nativas del país, ya que como se sabe nuestro país es centro de origen de dicho cereal (Gálvez, 2004). En la actual legislación sobre el manejo de OGM en México, no se mencionan los lineamientos a seguir para la liberación de una vacuna derivada de plantas.

Finalmente, aunque el sistema de vacunas liberadas en plantas pueda ser atractivo y novedoso, en la práctica su aplicación puede resultar complicada por las razones descritas a continuación:

- La dosificación del antígeno depende del nivel de expresión del mismo en el tejido vegetal, y aunque en general se ha mostrado buenos niveles de expresión, para determinar este parámetro debe analizarse cada línea vegetal producida (plantas individuales).
- Los niveles de expresión no siempre son heredables a través entre sucesivas generaciones de la línea transgénica.
- Las semillas originadas de las líneas pueden tener características genotípicas y fenotípicas poco deseables, como pérdida de la fertilidad entre otras.

Por lo descrito antes, es importante considerar para el desarrollo de una vacuna derivada de plantas: uso de especies vegetales que no sean controversiales en cuanto a que esta sea nativa de la región en donde se producirá la vacuna. Esto

aplica específicamente en el caso de maíz, esta especie vegetal, si bien presenta la ventaja de expresar niveles considerables de la proteína exógena, tiene como inconveniente que México es centro de distribución de maíz con lo cual su producción en campo abierto puede ser prohibitiva. Una alternativa es la producción del maíz transgénico en condiciones controladas de invernadero.

En cuanto a zanahoria, si bien presenta características convenientes como la administración en forma cruda de la parte comestible, dicha especie no genera semillas con las cuales se pueda seguir generando la vacuna sin necesidad de pasar cada ciclo de producción por la etapa *in vitro*. La alternativa para este sistema es la producción del antígeno en cultivos de suspensión de células, lo anterior ya ha sido demostrado con éxito por otros grupos de trabajo (Yusibov, *et al.*, 2008).

El uso de los sistemas de células en suspensión resulta más atractivo para la producción de una vacuna derivada de plantas, ya que las características de obtención serían las mismas sin llegar a la obtención de plantas adultas. Lo anterior ha resultado más aceptable para la producción y aprobación de dichas vacunas por diversos grupos de expertos en vacunas (Plotkin et al, 2007; Weniger 2007).

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación y habiendo enfrentado los problemas descritos durante la producción de plantas adultas, se propone el uso de células vegetales en suspensión transformadas con los antígenos de interés. Lo anterior ha sido demostrado con la aprobación por la FDA en Estados Unidos de la primera “vacuna derivada de plantas” contra el virus de Newcastle que ha sido desarrollada en cultivo de células en suspensión. Esta estrategia puede solventar algunos de los problemas descritos previamente.

5.0 CONCLUSIONES

- Mediante el uso de biobalística como método de transformación genética vegetal y utilizando vectores de expresión de plantas (pUCpSSrabG y pGHCNS) con promotores constitutivos, se logró la regeneración de plantas completas de zanahoria y maíz que expresan a la proteína G del virus de la rabia.
- De acuerdo a los resultados obtenidos de las técnicas moleculares utilizadas, se observó que la proteína G expresada en ambos sistemas vegetales fue funcional, aún cuando esta sufrió algunos cambios postraduccionales.
- Con los resultados obtenidos de los ensayos de inmunidad, concluimos que el tejido de maíz fue más efectivo para proveer mayor protección ante un desafío con el virus de la rabia de la cepa vampiro, que es el principal transmisor del virus en nuestro país.
- Los resultados muestran que tanto zanahoria como maíz son sistemas convenientes para expresar a la proteína G; ya que alcanzó buenos niveles de expresión (25 $\mu\text{g/g}$ y 50 μg de tejido de zanahoria y maíz respectivamente), que permitirían la producción de una vacuna subunitaria.
- Finalmente, los resultados obtenidos en este proyecto se suman a todas aquellas publicaciones donde la expresión de antígenos ha sido exitosa utilizando diferentes métodos de transformación. El bombardeo de microproyectiles, permite la expresión permanente, ya que el transgen es integrado al genoma vegetal y este puede ser segregado en futuras generaciones, obteniendo un muy buen candidato de vacuna comestible contra el virus de la rabia, tanto para animales, como para humanos.

6.0 PERSPECTIVAS.

Los resultados obtenidos permiten visualizar el desarrollo de una vacuna antirrábica derivada de plantas, ya que se demostró que las células vegetales de las dos especies evaluadas son capaces de expresar a la proteína G del virus en cantidades suficientes. Sin embargo es necesario realizar evaluaciones de la misma en las especies blanco para las cuales fueron desarrolladas, animales silvestres, que actúan como vectores de la enfermedad y domésticos; además en humanos. Por otra parte, también deben considerarse ensayos de la evaluación inmunológica que permitan concluir sin lugar a dudas que la vacuna funcionará en dichas especies blanco. Lo anterior a nivel de anticuerpos neutralizantes de virus, determinar cual es el papel de la inmunidad celular en la respuesta inmune promovida por la vacuna derivada de plantas, y finalmente, evaluar que estrategias de vacunación permitan mantener el nivel de protección, como puede ser el uso de adyuvantes o revacunaciones.

Por otra parte, es importante la evaluación del desarrollo de dichas vacunas derivadas de plantas en células en suspensión, comparadas con las desarrolladas en planta completa. Esto a nivel de expresión de proteína, tiempo de obtención de la vacuna, impacto comercial y costos, ya que es una de las principales ventajas atribuidas a este sistema.

7.0 REFERENCIAS

Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4th edn. New York: Garland Science, 2002.

Ammirato PV. Some Effects of Abscic Acid on the Development of Somatic Embryos From Cells Caraway (*Carum caru* L.). *Bot Gaz* 1973; 135: 328-337.

Ashraf S, Singh PK, Yada DK, Shahnawaz M, Mishra S, Sawant SV, Tuli R. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol* 2005; 119:1-14.

Astoul E, Lafage M, Lafon M. Rabies superantigen as a V3 T-dependent Adjuvant. *J Exp Med* 1996; 183:1623-1631.

Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N. Evidence of two phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J Virol* 2001; 75: 3268-3276.

Baer GM, Abelseth M, Debbie J. Oral vaccination of foxes against rabies. *Am J Epidemiol* 1971; 93:487-990.

Baloul L, Lafon M. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie*. 2003; 85:777-88.

Battraw MJ, Hall TC. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-B-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol* 1990; 15:527-538.

Bayliss MW. Chromosomal Variation in Plant Tissue Culture. *Int Rev Cytol Suppl* 1980; 11A: 113-124.

Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 1992; 20:1195-1197.

Benfey PN, Ren L, Chua N-H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J* 1990; 9:1677-1684.

Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* 1991; 64: 4198-4203.

Berinstein A, Vazquez-Rovere C, Asurmendi S, Gómez E, Zanetti F, Zabal O, Tozzini A, Conte-Grand D, Taboga O, Calamante G, Barrios H, Hopp E, Carrillo E. Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine* 2005; 23:5583-5589.

Blanton DJ, Self J, Niezgoda M, Faber ML, Dietzchold B, Rupprecht Ch. Ora vaccination of raccoons (*Procyon lotor*) with genetically modified rabies virus vaccine. *Vaccine* 2007; 25:7296-7300.

Boehm R. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cell as production platforms. *Ann NY Acad Sci.* 2007;121-131.

Bourhy H, Sureau P. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage. Institut Pasteur. Geneva. 1992 P 32-33.

Bowe DM, Kristala L, Prather J. Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 82:805-813.

Brochier B, Kieny MP, Costy F, Coppens P, Bauduin B, Lecocq JP, Languet B, Chappuis G, Desmettre P, Afiademanyo K, Labois R, Pastoret PP. Large scale eradication of rabies using a recombinant vaccinia rabies vaccine. *Nature* 1991. 354: 520-522.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, American Society of Plant Physiologists. 2000. p: 340-342.

Bugnon P, Breitenmoser U, Peterhans E, Zanoni. Efficacy of oral vaccination in the final stage of fox rabies elimination in Switzerland. *J Vet Med* 2004; 51:433-437.

Burton CE, Burns KD, Opatowsky MJ, El-Feky HW, Fishbach B, Melton L, et al. Rabies encephalomyelitis. *Arch Neurol*. 2005;62:873-882.

Cañizares MC, Nicholson L, Lomonossoff GP. Development of cowpea mosaic virus-based vectors for the production of vaccines in plants. *Expert Rev Vac* 2005; 4:687-97.

Castañeda FN. *El Maiz*. 4^a ed. Ed. Limusa, México. 1990. pp. 76.

Ceccaldi PE, Fayet J, Conzelmann KK, Tsiang H. Infection characteristics of rabies virus variants with deletion or insertion in the pseudogene sequence. *J NEuroviol*. 1998; 4:115-119.

Centro de Investigaciones Agrarias C.I.A. *El Cultivo del Maíz en México*. 1^a Ed. México, DF. 1980. pp 11-42.

Cliquet F, Guiot AL, Munier M, Baillo J, Rupprecht CE, Barrat J. Safety and efficacy of the oral rabies vaccine SAG2 in raccoon dogs. *Vaccine*. 2006; 24:4386-4392.

Cliquet F, Müller T, Mutinelli F, Geronutti S, Brochier B, Selhorst T, et al. Standardisation and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine*. 2003; 21:2986-2993.

Cliquet F, Picard-Meyer E. Rabies and rabies related virus: a modern perspective on an ancient disease. *Rev Sci Tech*. 2004; 23:625-642.

Cliquet F, Sangné L, Schereffer JL, Aubert MF. ELISA test rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*. 2000; 18:3272-3279.

Cornejo M, Luth D, Blankenship KM, Anderson OD, Blencl, AE. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 1993; 23: 558-567.

Cupillard L, Juillard V, Latour S, Colombet G, Cachet N, Richard S, Blanchard S, Ficscher L. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine* 2005; 23:1910-1916.

Chambers AP, Duggan SP, Heritae J, Forbes MJ. The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens. *J Antimicrobiol Chem*. 2002; 49:161-164.

Charlton KM. The pathogenesis of rabies virus and other lyssaviral infections: recent studies. *Current Top Microbiol Immunol*. 1994;187:95-119

Christou P. Particle Bombardment. In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 50. Academic Press, Inc. 1995. pp 375-382.

Curran J, Boeck R, Lin-Marq N, Lupas A, Koladofsky D. Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils. *Virology*. 1995; 214:139-149.

Daniell H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J* 2006; 1: 1071-1079.

Daniell H, Chebolu S, Kumar S. Chloroplast-derived vaccine antigen and other therapeutic proteins. *Vaccine*. 2005;23:1779-1783.

De Wilde C, Van Hout H, De Buck S, Angenon G, De Jaeger G, Depicker A. Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Mol Biol* 2000; 43:347-359.

Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*. 2001; 6:219-226.

Desmettre P, Languet B, Chappuis G, Brochier B, Thomas I, Lecocq L-P, Kieny M-P, Blancou J, Aubert M, Artois M, Pastoret P-P. Use of vaccinia recombinant for oral vaccination of wildlife. *Vet Microbiol* 1990; 23:227-36.

Desmezières E, Jacob Y, Saron MF, Delpyroux F, Tordo N, Perrin P. Lyssavirus glycoproteins expressing immunologically potent foreign B cell and cytotoxic T lymphocyte epitopes as prototypes for multivalent vaccines. *J Gen Virol* 1999; 80:2343-51.

D'Halluink, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J. Transgenic Maize Plants by Electroporation. *Plant Cell* 1992; 4 :1495-1505.

Dietzschold B, Gore M, Casali P, Ueki Y, Rupprecht CE, Notkins AL, Koprowski H. Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus. *J Virol* 1990; 64:3087-90.

Dietzschold B, Gore M, Marchadier D, Niu HS, Bunschoten H, Otvos L, et al. Structural and immunological characterization of a lineal epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J Virol* 1990; 4:3804-3809.

Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 2005; 339:153-63.

Dus Santos MJ, Wigdorovitz A. Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:229-38.

Driggs JD, Dreesen WD, Wunner HW. Vaccines. In: Jackson AC, Wunner HW (ed). *Rabies*. Academic Press. London, U.K. 2002. p. 371- 400.

Drings, A, Jallet, C, Chambert, B, Tordo, N, Perrin, P. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine* 1999; 17:1549-1557.

Drings A. Towards a vaccine against the European Lyssaviruses a structural and immunological approach. Freien Universität Berlin. Berlin, 1998. (Thesis Doctor)

Dröge LW, Broer I, Pühler A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyl transferase gene metabolize the herbicide L-phosphinotricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 1992; 187:142-151.

Emons AM Kieft CH. Somatic Embryogenesis in Maize (*Zea mays* L.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 31. Y. S. P. Bajaj (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1995. pp 24-39.

Faber M, Faber M-L, Li J, Preuss ARM, Schnell JM, Dietzchold B. Dominance of a nonpathogenic glycoprotein gene over a pathogenic glycoprotein gene in rabies virus. *J Virol* 2005; 81:7041-7047.

Faye L, Boulaflous A, Benchabane M, Gomord V, Michaud D. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 2005; 23:1770-1778.

Finke S, Conzelmann KK. Replication strategies of rabies virus. *Virus Res* 2005; 111: 120-131.

Fischer R, et al. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7:152-158.

Floss DM, Falkenburg D, Conrad U. Production of vaccine and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants. *Transgenic Res* 2007; 16:315-332.

Fournier-Caruana J, Poirier B, Haond G, Jallet C, Fuchs F, Tordo N, Perrin P. Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method. *Biologicals* 2003; 31:9-16.

Fries LF, Tartaglia J, Taylor J, Kauffman EK, Meignier B, Paoletti E, Plotkin S. Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system. *Vaccine* 1996; 14:428-34.

Fromm ME, Morrish F, Armstrong Ch, Williams R, Thomas J and Klein T. Inheritance and Expression of Chimeric Genes in the Progeny of Transgenic Maize Plants. *Bio/Technology* 1990; 8: 833-839.

Fu X, Duc TL, Fontana S, Bong BB, Tinjuanjun P, Sudhakar D, Twyman MR, Chistou P, Kohli A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Res.* 2000; 9:11-19.

Gallo-Meagher M. Irving JE. Effects to tissues type and promotor strength on transient GUS expression in sugar cane following particle bombardment. *Plant Cell Rep* 1993; 12: 666-670.

Gálvez MA. Transgénicos y Legislación. *Ciencia y Desarrollo* 2004; 175:38-41.

Gaudin Y, Moreira s, Benejean J, Blondel D, Flamand A, Tuffereau C. Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. *J Gen Virol* 1999; 80:1647-56.

Gaudin Y, Ruigrok RW, Tuffereaud C, Kaosson M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 1992; 187: 627-632.

Gleba Y, Klimyuk S, Marillonet. Magnificcion: A New Platform for Expressing Recombinant Vaccines in Plants. *Vaccine* 2005; 23: 2042-2048.

Gordon-Kamm W, Spencer JTM, Angano ML, Richard TRA, William JD, Start G. Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *The Plant Cell* 1990; 2: 603-618.

Goto H, Minamoto N, Ito H, Sugiyama M, Kinjo T, et al. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J Gen Virol.* 2000;81:119-127.

Grassi M, Wandeler AI, Peterhans E. Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibodies to the enveloped glycoprotein of rabies virus. *J Clin Microbiol.* 1989;899-902.

Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MT, Feérvári-Bone T, Gómez-Lim MA. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res.* 2006; 15:455-463.

Gupta A, Blondel D, Choudhary S, Banerjee A. Phosphoprotein (P) of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C. *J Virol.* 2000; 74; 91-98.

Hamaker R, Bruce & Brian A. Larkins. Maize food and feed: a current perspective and consideration of future possibilities. In: *Transgenic plants and crops.* George G. Khachatourians, Alan McHughen, Ralph Scorza, Wai-Kit Nip (eds) Marcel Dekker, Inc., New York; USA. 2002. pp 637-654.

Hendekli, CM. Current therapies in rabies. *Arch Virol* 2005; 150:1047-1056.

Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso, G, López-Casillas F, Guevara-García-a, Rosas G, León-Ramírez C, Juárez P, Sánchez-García G, Cervantes J, Acero G, Toledo A, Cruz C, Bojalil R, Herrera-Estrella L, Sciotto, E. A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 2007; 25:4252-4260.

Hooper DC, Pierrard L, Modelska A, Otvos L, Fu ZF, Koprowski H, Dietzschold B. Rabies nucleocapsid as an oral immunogen and enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994; 91:10908-10911.

Hu RL, Liu Y, Zhang SF, Zhang F, Fooks AR. Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralization antibody response against rabies. *Vaccine* 2007;25:5301-5307.

Hull AK, Criscuolo CJ, Mett V, Groen H, Steeman W, Westra H, Chapman G, Legutki B, Baillie L, Yusibov V. Human-derived, plant produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax. *Vaccine* 2005; 23:2082-2086.

Ibaraki Y, Kurata K. Automation of somatic embryo production. *Plant Cell Tissue Org Culture*. 2001;65:179-199.

Jackson CA. Rabies. *Viral Pathogenesis*. 24;575-591

Jiang-Li D, Ben-Guo L, Yong-Sheng J, Wan-Jun Z, Tao W. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 2005; 339:153-163.

Jin-Tao L, Lei F, Zhi-Rong M, Jing W, Yan T, Hai-Yang H, Li W, Yu-Zhang W. Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology* 2006; 356:171-178.

Jimenez VMAJ. Transformación Genética de Callos Embriogénicos de Maíz (*Zea mays* L.) con el Gen de la Glicoproteína G del Virus de Rabia. UNAM. Tesis. 2006.

Kang TJ, Seo JE, Kim DH, Kim TG, Jang YS, Yang MS. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr Purif* 2005; 41:378-383.

Kawai A, Toriumi H, Tochikura TS, Takahashi T, Honda Y, Morimoto K. Nucleocapsid formation and/or subsequent conformational change of rabies virus

nucleoprotein (N) is a prerequisite step for acquiring the phosphatase-sensitive epitope of monoclonal antibody 5-2-26. *Virology*. 1999;77:177-184.

Kankanamge PJ, Irie T, Mannen K, Tochikura TS, Kawai A. Mapping of the low pH-sensitive conformational epitope of rabies virus glycoprotein recognized by a monoclonal antibody #1-30-44. *Microbiol Immunol* 2003; 47:507-19.

Kaplan MM, Wiktor TJ, Koprowski H. Pathogenesis of rabies in immunodeficient mice. *J Immunol* 1975; 114:1761-1765.

Kaufman PB, Wu W. Gene transfer and expression in plants. In: Kaufman, P.B. Wu, W. *Molecular and cellular methods in biology and medicine*. CRC Press Inc. Florida, U.S.A. 1995. p 367-393.

Kohli T, Abranches RM, Wegel R, Stoger E, Chistou, P. Transgene integration, organization in plants. *Plant Mol Biol* 2003; 52:247-258.

Kirk DD, Mclotosh K, Walmsley AM, Peterson RK. Risk analysis for plant-made vaccines. *Transgenic Res* 2005a. 14:449-62.

Kirk DD, Webb SR. The next 15 years: taking plant-made vaccines beyond proof of concept. *Immunol Cell Biol* 2005b; 83:248-56.

Klein TM & Fitzpatrick-McElligott S. Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Curr Opin Biotechnol* 1993; 4: 583-590.

Klein TM, Fromm M, Weissinger A, Dwight T, Schaaf S, Sletten M, Sanford JC. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 4305-4309.

Koprowski H. Vaccines and sera through plant biotechnology. *Vaccine* 2005.; 23:1757-1763.

Koser LM, McGettinger PJ, Tan SG, Smith EM, Koprowski H, Dietzchold B, Schnell JM. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. 101:9405-9410.

Landridge S, Weiner H. Oral tolerance for treatment of autoimmune diseases. *Ann Rev Med*. 1997; 48: 341-51.

Lafon M. Rabies virus receptors. *J Neurovirol* 2005; 11:82-7.

Lafon M. Immunology. In: Rabies. Jackson AC, Wunner HW (ed). Rabies. Academic Press. London, U.K. 2002. 351-367.

Lafon M. Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. *CTMI*. 2005; 289 : 239-258.

Lafon M, Edelman I, Bouvet JP, LafangeM, Martchatre E. Human monoclonal antibodies specific for the rabies virus glycoprotein and N protein. *J Gen Virol*. 1990; 71: 1689-1696.

Lafon M, Scott-Alegra D, Marche NP, Cazenave PA, Jouvin-Mache E. Neonatal deletion and selective expansion of mouse T cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J Exp Med* 1994; 180:1270-1215.

Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R. Edible vaccines: current status and future. *Ind J Med Microbiol* 2007; 25:93-102.

Larkin PJ, Acowcroft WR. Somaclonal Variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical Appl Genet* 1981; 60: 197-214.

Larrick WJ, Thomas WD. Producing proteins in transgenic plant and animals. *Curr Opin Biotech* 2001; 12:411-418.

Lee M, Phillips RL. The Chromosomal Basis of Somaclonal Variation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1988; 39: 413-437.

Lima KC, Megid J, Silva AV, Cortez A. The heminested RT-PCR for the study of the rabies virus patogenesis. *J Virol Methods* 2005; 124:79-85.

Liu L, Cañizares C, Monger W, Perrin Y, Tsakiris E, Porta C, Shariat N, Nicholson L, Lomonosoff PG. Cowpea mosaic virus-based systems for the production of antigens and antibodies in plants. *Vaccine* 2005; 23:1788-1792.

Lodmell DL, Ray NB, Parnell MJ, Ewalt LC, Hanlon CA, Shaddock JH, Sanderlin DS, Rupprecht CE. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med* 1998; 4:949-52.

Lodmell DL, Ewalt CL. Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with different combinations of DNA, inactivated or recombinant vaccinia virus vaccines. *Vaccine* 2000; 18:2394-2398.

Lodmell DL, Ewalt CL. Rabies cell culture vaccines reconstituted and stored at 4°C for 1 year prior to use protect mice against rabies virus. *Vaccine* 2004; 22:3237-3239.

Lodmell DL, Ewalt LC, Parnell MJ, Rupprecht CE, Hanlon CA. One time intradermal DNA vaccination in ear pinnae one year prior to infection protects dogs against rabies virus. *Vaccine* 2006; 24:412-416.

Loza-Rubio E, Gomez-Lim MA. De Pasteur a nuestros días, batalla contra la rabia. *Ciencia y Desarrollo* 2004; 176:26-33.

Loza-Rubio E, Gomez-Lim MA. Production of vaccines and other biological compounds in transgenic plants. *Vet Mex.* 2006;37:441-455.

Loza-Rubio E, Molina-Güarneros J, Montañó-Hirose JA. Nucleocapsid of rabies virus improbable immune response of an inactivated avian influenza vaccine. *Vet Res Comm* 2009; Jan 31.

Mason SH, Warzecha H, Mor T, Arntzen ChJ. Edibles plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med* 2002; 8: 324-329.

Marquet-Blouin, E, Bouche, FB, Steinmetz, A, Muller, CP. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.) – derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol* 2003; 51:459-469.

Matzke MA, Eggleston BW. Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? *Trends Plant Sci* 1996; 1:382-388.

Mayr A, Kraft H, Jaeger O, Haacker H. Oral immunisierung von Fuchsen gegen. Tollwut *Zentbl Veterinärmed B* 1972; 19:615-25 (Abstract).

Mett V, Farrance EC, Green BJ, Yusibov V. Plants as biofactories. *Biologicals.* 2008;36:354-358.

McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper CD, Fu FZ, Dietzschold B, Koprowski H, Michaels HF. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* 1995; 13:1484-1487.

Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann KK. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol* 1999; 73:242–250.

Mere VG, Vázquez AV. Bombardeo de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota* L.) y su regeneración con la proteína G del virus de la rabia. Facultad de Química, UNAM, México, D. F., 2003. (Tesis).

Mett V, Ferrance E, Green BJ, Yusibov V. Plants as biofactories. *Biologicals* 2008; 36: 354-358.

Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu FZ, Steplewski K, Hooper CD, Koprowski H, Yusibov V. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 2481-2485.

Morales-Martínez ME, Rico-Rosillo G, Gómez-Olivares JL, Aguilar-Setién A. Immunogenic importance of the N protein in the rabies virus infection. *Vet Mex.* 2006; 37:351-367.

Morimoto K, Shoji Y, Inoue K. Characterization of P gene-deficient rabies virus: propagation, pathogenicity and antigenicity. *Virus Res* 2005; 111:61–7.

Morrish FM, Fromm ME. Cereal Transformation Methods. *Curr Opin Biotechnol* 1992; 3:141-146.

Nadin-Davis SA, Abdel-Malik J, Wandeler AJ. Lyssavirus P gene characterisation provides insight into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. *Virology* 2002; 298:286-305.

Nakamichi K, Tamasaki T, Morimoto K, Kurane I. Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXC chemokine ligand 10 expression in macrophages

through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Virol* 2004; 78: 9376-9388.

Nakahara T, Toriumi H, Irie T, Takahashi T, Ameyama S, Mizukoshi M, Kawai A. Characterization of a Slow-Migrating Component of the Rabies Virus Matrix Protein Strongly Associated with the Viral Glycoprotein. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 977-988.

Nel LH and Markotter. Lyssaviruses. *Critical Rev Microbiol*. 2007 33:301-324.

O'Connor-Sánchez, A, Cabrera-Ponce JL, Valdez-Melara M, Téllez-Rodríguez P, Pons-Hernández JL, Herrera-Estrella L. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenetic and embriogenia-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Rep* 2002; 21: 302-312.

Odell J, Nagy F, Chua N-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 1985; 313: 810-812.

Omirulleh S, Abraham M, Golovkin M, Stefanov Karabaev MK, Mustárdy L, Mórocz S, Dudits D. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast – derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol Biol* 1993; 21:415-428.

Orciari AL, Niezgodá M, Hanlon C, Shaddock HJ, Sanderlin WD, Yager AP, Rupprecht ECh. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs alter oral vaccination. *Vaccine* 2001; 19:4511-4518.

Paolazzi CC, Pérez O, De Filippo J. Rabies vaccine. *Mol Biol* 1999; 11:137-147.

Perea-Arango I, Loza-Rubio E, Roja-Anaya E, Olivera-Flores T, González de la Vara L, Gómez-Lim MA. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune response in mice. *Plant Cell Rep* 2008; 27:677-685.

Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Setien A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmezieres E, Aubert M, Cliquet F, Tordo N. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999; 18:479-86.

Perrin P, Jacob Y, Tordo N. DNA-based immunization against Lyssavirus. *Intervirology*. 2000; 43:302-311.

Peeters K, Wilde CHD, Jeager G, Angenon G, Depicker A. Production of antibodies and antibody fragment in plants. *Vaccine*. 2001; 19: 2756-2761.

Piza AT, Pieri KMS, Lusa GM, Caporale GMM, Terreran MT, Machado LA, Zanetti CR. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein on the potency of rabies vaccination in cattle. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 2002; 97:265-268.

Plotkin S, Pardoll, Weniger B. Packaging of time capsule for opening in 2017. *Memorias: The tenth annual conference on Vaccine Research; 2007 abril 30-mayo 2; Baltimore (Maryland) USA. Maryland: National Foundation for Infectious Diseases, 2007.*

Poian D, Carneiro F, Stauffer F. Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:813-23.

Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan Ch. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2004; 40:1-22.

Porta C, Lomonossoff GF. Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2002; 19:245-91.

Pradhan HD, Gurbuxani JP, Cliquet F, Pattnaik B, Patil SS, Regnault A, et al. New steps in the control of canine rabies in India. *Dev Biol (Basel)*. 2008:131;157-166.

Pulmanausahakul R, Li J, Schnell JM, Dietzschold B. The glycoprotein and matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J Virol* 2008; 82: 2330-2338.

Register III JC, David JP, Philip JB, Bullock JP, Evans IJ, Frame B, Greenhalgh AJ, et al. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Mol Biol* 1994; 25: 951-961.

Reyes CP. *El maíz y su cultivo*. AGT Editor S.A. México, D.F. 1990. pp 460.

Rigano MM, Walmsley AM. Expression systems and developments in plant-made vaccines. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:271-7.

Rojas-Anaya E, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MT, Gomez-Lim M. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Transgenic Res*. 2009; 10.1007/S11248-009-9278-8. DOI. 2009.

Ross BA, Favi MC, Vásquez V. Glicoproteína del virus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. *Rev Chil Infect* 2008; 25: S14-18.

Rupprecht EC, Nalón AC, Hemachudha. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:327-343

Ruhland M, Enghardt G, Pawlizki. A comparative investigation of the metabolism of the herbicide glufosinate in cell cultures of transgenic glufosinate resistant and non transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and corn (*Zea mays*). *Environ Biosafety Res* 2002; 1:29-37.

Russell JA, Mihir KR, Sanford JC. Physical Trauma and Tungsten Toxicity Reduce the Efficiency of Biolistic Transformation. *Plant Physiol* 1992; 98:1050-1056.

Sakai M, Kankanamge PJ, Shoji SJ, Kawata S, Tochikura ST, Kawai A. Studies on the conditions required for structural and functional maturation of rabies virus glycoprotein (G) in G cDNA-transfected cells. *Microbiol Immunol* 2004; 48:853-864.

Sala F, Rigano M, Barbante A, Basso B, Walsley AM, Castiglione S. Vaccine Antigen Production in Transgenic Plants: Strategies, Gene Constructs and Perspectives. *Vaccine* 2003; 21: 803-808.

Sanford JC. The biolistic Process. *Trends in Biotechnol* 1988; 6:299-302.

Saxena S, Dahiya SS, Sonwane AA, Patel CL, Saini M, Rai A, Gupta KP. A sindbis virus replicon-based DNA vaccine encoding the rabies virus glycoprotein elicits immune responses and complete protection in mice from lethal challenge. *Vaccine* 2008;26:6592-6601.

Servat A, Feysaguet M, Blanchard I, Morize JL, Schereffer JL, Cliquet F. A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J Immunol Methods*. 2007; 318: 1-10.

Schiavone FM, Cooke F. A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell culture. Pp 1573-1578.

Schillberg S, Twyman MR, Fischer. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plant-technology assessment. *Vaccine* 2005; 23:1764-179.

Shoufeng Z, Liu Y, Fooks AR, Zhang F, Hu R. Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine* 2008;26:345-350.

Smart NL, Charlton KM. The distribution of challenge virus standard rabies virus versus skunk street rabies virus in the brains of experimentally infected rabid skunks. *Acta Neuropathol.* 1992;84:501-508.

Spencer TM, James M, O'Brien V, William G, Start T, Adams R, Williams J, Gordon-Kamm J, Lemaux PG. Segregation of Transgenes in Maize. *Plant Mol Biol* 1992; 18: 201-210.

Southgate EM, Davey MR, Power JB, Marchant R. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnol Adv* 1995; 13: 631-651.

Streatfield SJ, Lane JR, Brooks ChA, Barker DK, Poage ML, Mayor JM, Lamphear BJ, et al. Corn as production systems for human and animal vaccines. *Vaccine* 2003; 21: 812-815.

Streatfield SJ. Plant-based vaccines for animal health. *Rev Sci Tech* 2005; 24:189-199.

Streatfield SJ. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods* 2006; 38:150-157.

Tacket CO. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 2005; 7:1866-1869.

Tae-Jin K, Nguyen-Hoang L, Mi-Ok J, Yong-Suk J, Young-Sook K, Jo-Eun S, Moon-Sik Y. Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transg Res* 2003; 12:682-691.

Tan SG, Preuss ARM, Williams CJ, Schnell JM. The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *PNAS* 2007; 104: 7229-7234.

Taylor MG, Vasil I, Vasil, IK. Enhanced GUS expression in cereal/grass cell suspension and immature embryos using the maize ubiquitin-based plasmid pAHC25. *Plant Cell Rep* 1993; 12: 491-495.

Tesoro-Cruz E, Hernández-González R, Alonso-Morales R, Aguilar-Setién A. Rabies DNA vaccination by intranasal route in dogs. *Dev Biol (Basel)* 2006; 125: 221-231.

Tesoro Cruz E, Feria RIA, Lopez MJG, Orozco SS, Hernández GR, Blanco FF, Pérez TA, Aguilar SJA. Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally. *Vaccine* 2008; doi:10.1016/j.vaccine.2008.09.083.

Tesoro-Cruz E, Caderón Rodríguez R, Hernández-González R, Blanco-Favéla F, Aguilar-Setién A. Intradermal DNA vaccination in ear pinna is an efficient route to protect cats against rabies virus. *Vet Res* 2008; 39:16.

Tillman U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeast and filamentous fungi. *Nature Biotechnol.* 2004; 22: 1409-1414.

Toriumi H, Kawai A. Association of rabies virus nominal phosphoprotein (P) with viral nucleocapsid (NC) is enhanced by phosphorylation of the viral nucleoprotein (N). *Microbiol Immunol* 2004; 48:399-409.

Tokuji Y, Kuriyama K. Involvement of gibberellin and cytokine in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). *J Plant Physiol.* 2003; 160:133-141.

Vasil IK. Molecular Improvement of Cereals. *Plant Mol Biol* 1994; 25: 925-937.

Wagner KE. *Basic Virology.* Blackwell Science. U.S.A. 1999. p 33-44.

Walmsley AM, Arntzen CJ. Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11:126-129.

Walters DA, Vetsch CS, Potts DE, Lundquist RC. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol Biol* 1992; 18: 189-200.

Wandeler AI. Oral immunization against rabies: afterthoughts and foresight. *Schweiz Arch Tierheilk* 2000; 142: 455-462. (Abstract)

Wang Y, Xiang Z, Pasquini S, Ertl HC. The use an E1-deleted, replication defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glicoproteína for early vaccination of mice against rabies virus. *J Vilol* 1997; 71:3677-3683.

Warrell L, Warrell M. Rabies and other lyssavirus diseases. *Lacet Infect Dis* 2004; 363: 959-69.

Watson SA. Structure and composition. In S.A. Watson & P. E. Ramstad, eds. Corn: chemistry and technology. St Paul, Minn., USA, Am. Assoc. Cereal Chem. 1987. p. 53-82.

Weller GM, Diemer M, Wersching C, Niesser R, Sochor H. Development of antibodies for the detection of N-acetyl-glufosinate. J Agric Food Chem. 2003; 51:6668-6675.

Wenniger BG. Vaccine delivery technologies in 2017. The tenth annual conference on Vaccine Research; 2007 abril 30-mayo 2; Baltimore (Maryland) USA. Maryland: National Foundation for Infectious Diseases, 2007.

Widdorovitz A, Carrillo A, Dus-Santos JM, Trono K, Peralta A, Gómez CM, Ríos DR, Franzone MP, Sadir MA, Escribano MJ, Borca VM. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. Virology 1999; 255:347-353.

Wigdorovitz A, Mozgovej M, Santos MJ, Parreno V, Gomez C, Perez-Figeira DM, Trono KG, Rios RD, Franzone PM, Fernandez F, Carrillo C, Babiuk LA, Escribano JM, Borca MV. Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. J Gen Virol 2004; 85:1825-32.

Wirblich Ch, Tan SG, Papaneri A, Godlewski JP, Orenstein MJ, Harty NR, Schnell JM. PPEY motif within the rabies virus (RV) matrix protein is essential for efficient virion release and RV pathogenicity. J Virol. 2008;82:9730-9738.

Wright PF, Mestecky J, McElrath MJ, Keefer MC, Gorse GJ, Goepfert PA, et al. Comparison of systemic and mucosal delivery of 2 canarypox virus vaccines

expressing either HIV-1 genes or the gene for rabies virus G protein. *J Infect Dis*. 2004;189:1221-1231.

Wu X, Lei X, Fu ZF. Rabies virus nucleoprotein is phosphorylated by cellular casein kinase II. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 304:333-338.

Wunner W. Rabies Virus. In: Rabies. Jackson A, Wunner W (Eds). Academic Press, CA, USA. 2002. p 23-61.

Wunner WH, Larson JK, Dietzchold B, Smith LC. The molecular biology of rabies viruses. *Rev Infec Dis* 1988; 10: S771-S784.

Wunner WH, Palatroni C, Curtis PJ. Selection of genic inhibitors of rabies virus. *Arch Virol* 2004; 149:1653-1662.

Xiang ZQ, Yang Y, Wilson MJ, Estl CJE. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 1996; 219:220-227.

Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HC. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994; 199: 220-227.

Yuan Z, Zhang S, Liu, Zhang F, Fooks RA, Li Q, Hu R. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine* 2008;26:1314-1321.

Yusivov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowsky H. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002; 20:3155-3164.

Yusivov, V, Modelska, A, Steplewski, K, Agadjanyan, M, Weiner, D, Hooper, Koprowsky, H. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:5784-5788.

Yusivov V, Rabindran Sh. Recent progress in the development of plant-derived vaccines. *Exp Rev Vaccines* 2008; 7:1173-1183.

Zhong H, Baolin Sun, Warkentin D, Zhang S, Wu R, Wu T, Sticklen BM. The Competence of Maize Shoot Meristems for Integrative Transformation and Inherited Expression of Transgenes. *Plant Physiol* 1996; 110: 1097-1107.

8.0 ANEXOS

A N E X O I. CULTIVO VEGETAL

- Composición el medio MS (Murashige & Skoog, 1962)

	Compuesto	Concentración (mM)	Stock 100X (mM)
Solución I Nitratos	NH ₄ NO ₃	20.6	2060
	KNO ₃	18.8	1880
Solución II Sulfatos	MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5	150
	MnSO ₄ H ₂ O	1X10 ⁻²	1.0
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	3X10 ⁻²	3.0
	CuSO ₄ 5H ₂ O	1X10 ⁻⁴	1X10 ⁻²
Solución III Haluros	CaCl ₂ 2H ₂ O	3.0	300
	KI	5X10 ⁻³	0.5
	CoCl ₂	1X10 ⁻⁴	0.01
Solución IV Fosfato/Borato/ Molibdeno	KH ₂ PO ₄	1.25	125
	H ₃ BO ₃	0.001	10
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.001	0.01
Solución V Hierro/EDTA	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.1	10
	EDTA2H ₂ O	0.1	10
Fuente de Carbono	Sacarosa	87.63	

Medio MS modificado para proliferación.	
Sol I	10 mL
Sol II	10 mL
Sol III	10 mL
Sol IV	10 mL
Sol V	10 mL
Vitaminas R2	10 mL
Glicina (Sigma, USA)	2 mL
Gellan (Sigma, USA)	2.5 mg
Azúcar	30 g
Agua	cbp 1000
pH	5.7

- **MEDIO MyT1 modificado.**

Compuesto	Concentración
2,4 -D (ácido diclorofenoxiacético)	10 mg. L ⁻¹
Vitaminas R ₂	10 mg. L ⁻¹
Sales del Medio MS	
Solución nitratos	10 mg. L ⁻¹
Solución sulfatos	10 mg. L ⁻¹
Solución halógenos	10 mg. L ⁻¹
Solución Boro/Molibdeno	10 mg. L ⁻¹
Solución EDTA	10 mg. L ⁻¹
MCPP (ac. 2-metil-4-clorofenoxipropionico)	3mg/L
BAP (benzilaminopurina)	0.03 mg L ⁻¹
Cinetina (Sigma, USA)	
Sacarosa	30 g L ⁻¹
Gellan (Sigma, USA)	2.5 g L ⁻¹

- **Medio de cultivo N₆ .**

Compuesto	mgL ⁻¹
KNO ₃	28.00
CaCl ₂ .7H ₂ O	1.13
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.75
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.50
MnSO ₄ .H ₂ O	5.97
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.50
KH ₂ PO ₄	2.94
H ₃ BO ₃	1.60
KI	0.80
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
C ₁₄ H ₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .H ₂ O	37.30
2,4-D	1.0
Cinetina (Sigma, USA)	1.0
Glicina (Sigma, USA)	1.0
Adenina (Sigma, USA)	10.0
Sacarosa (Sigma, USA)	30000
Gellan (Sigma, USA)	2800

A N E X O II. ANÁLISIS DE ADN Y ARN VEGETAL

- **Amortiguador de extracción de ADN para maíz:**

7.0M de urea, 0.35M NaCl, 0.05M de Tris HCl pH 8.0, 0.02M EDTA, 1% sarcosine.

- **Amortiguador de extracción de ARN para maíz y zanahoria.**

10 mM Tris HCl pH 9.0, 200 mM DTT, 1% sarcosyl, 20 mM de EDTA.

- **Amortiguador TE.**

10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA.

A N E X O III. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

- **Gel de poliacrilamida (PAGE) al 10%.**

Gel separador	
Buffer Tris-HCl pH 8.8	1.875 mL
Acrilamida- bisacrilamida	1.875 mL
Agua	4.25 mL
SDS 10%	75 μ L
Persulfato de amonio	375 μ L
TEMED	10 μ L

Gel concentrador	
Buffer Tris-HCl pH 6.8	625 μ L
Arcrilamida- bisacrilamida	1.25 mL
Agua	2.85 mL
SDS 10%	50 μ L
Persulfato de amonio	250 μ L
TEMED	7 μ L

- **Amortiguador de muestra 2X**

25 mg de azul de bromofenol, 308 mg, 2 mL glicerol, 800 μ L agua destilada, 3.2 mL.

- **Amortiguador de extracción de proteínas.**

10mM EDTA, 0.15% Na₂HPO₄, 0.04% KH₂PO₄, 0.1% Triton 100X, 0.61% NaCl, 5mg/mL ascorbato de sodio, 100mM PMSF. Disolver en agua destilada y desionizada

- **Amortiguador de corrida de proteínas 5X**

25.0 g Tris base, 72.0 g glicina, 5.0 g SDS; ajustar pH 8.3 y llevar a 1L con agua destilada.

- **Amortiguador de corrida de transferencia.**

800 mL de buffer de corrida de proteínas 1X; 200 mL de metanol absoluto.

- **Buffer de revelado.**

30 mg de 2,4 diaminobencidina, 60 mL de PBS, 30 µL H₂O₂

A N E X O IV. SISTEMA DE BACULOVIRUS

- **Obtención del gen G para clonar en pFastBac**

Los productos de PCR se purificaron por precipitación como sigue.

1. Se midió el volumen total juntando los tres tubos de cada reacción, se transfirieron a un tubo nuevo.
2. Se añadió un volumen igual de mezcla fenol-cloroformo- isoamílico (24:24:1) y se vortexeo por un min. Después se centrifugo a 10 000 xg/10'.
3. Se toma la fase superior y se transfirió a otro tubo midiendo dicho volumen.
4. A la fase acuosa se le agregaron 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se agitó por 1 min. en vortex y se repitió la centrifugación anterior.
5. Se recuperó el sobrenadante y se precipito con 10 % del volumen recuperado de acetato de sodio al 3 M y 2.5 volúmenes, de la mezcla anterior, de etanol absoluto a -20 °C.

6. La mezcla se dejó precipitando toda la noche a 4 °C
7. La mezcla se centrifugó a 10 000 xg/20'/4°C. Desechando el sobrenadante con pipeta
8. Las pastillas se enjuagaron con etanol frío al 70 % y finalmente. Nuevamente se centrifugó a 10 000 xg/15'/4°C eliminando el sobrenadante. La pastilla se dejó a secar a TA para eliminar el etanol.

Las pastillas obtenidas fueron directamente resuspendidas en la mezcla de digestión utilizando enzimas de la marca Roche®: *Bam*HI 10U, *Xba*I 10U, Buffer A 2µL, H₂O 16µL.

- **Placas de medio LB agar para selección de bacmido.**

1L LB agar adicionar 1.5% bactoagar

Esterilizar por autoclave y dejar enfriar. Cuando este aproximadamente a 20 °C adicionar los antibióticos: tetraciclina, kanamicina y gentamicina todas a 10 mg/mL.

Vaciar en cajas petri desechables y dejar enfriar por completo.

Al momento de usar agregar IPTG y x-gal (4%).

- **Buffer de rompimiento de células de insecto:**

NaCl 150 mM, b-mercaptoetanol 5mM, Nonidet P40 1%, SDS 0.1%, Tris-HCl pH 8 50 mM.

- **Rojo Neutro 0.03%**

0.3 g de rojo neutro fueron disueltos en PBS 1X.

Al momento de uso esta solución es diluida 1:10 en PBS estéril y la solución final es filtrada en un filtro de 0.2 µm.

Western blot utilizando extractos celulares de células de insecto y proteína purificada.

1. De los extractos celulares se tomaron para un primer ensayo 10 μL y se resolvieron en geles de poliacrilamida PAGE-SDS al 10% en condiciones reductoras. Las muestras se incubaron 5 min a 100°C antes de correrlas en el gel.
2. Los geles se corrieron hasta dejar salir el frente del mismo y posteriormente se dieron dos lavados rápidos con buffer de transferencia (buffer de electroforesis 1X y metanol al 20%).
3. Para la transferencia se utilizó membrana de nitrocelulosa 0.45 μm y se transfirieron en cámara de electroforesis durante 2h a 180 mA.
4. Al terminar la transferencia nuevamente las membranas se lavaron dos veces ahora con PBS-Tween 20 al 0.05 %.
5. El bloqueo de las membranas se llevo a cabo a temperatura ambiente durante una hora incubándolas en leche al 5 % en PBS-Tween 20 al 0.05 %.
6. Al terminar el bloqueo las membranas se lavaron dos veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, cada lavado de 10 min. Posteriormente se dejaron incubar toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-histidina (Roche, Alemania) diluido 1:5000 en leche descremada al 1%.
7. Después de la incubación la membrana se lavo tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, cada lavado de 10 min. Para revelar, la membrana fue incubada con anti-IgG de ratón diluido 1:3000 en leche al 1%.
8. La membrana fue lavada 4 veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, cada lavado de 15 min. y un lavado de PBS por el mismo tiempo.

9. Para revelar se utilizó la técnica de quimioluminiscencia utilizando luminol y H_2O_2 . En cuarto oscuro, a las membranas se les quito el PBS y se secan ligeramente en papel absorbente, después se incubaron 1 min con la solución de revelado (luminol 250 mM, ácido Cumárico, 90 mM, Tris-HCl 1M, H_2O_2 0.018 %).
10. Al terminar nuevamente se secan con papel absorbente y se ponen en contacto con la película 15 seg. para que se lleve a cabo la exposición.

A N E X O V. ELISA para determinar anticuerpos anti-proteína G del virus de la rabia.

- **Buffer carbonatos para sensibilizar placas de ELISA.**

$NaCO_3$ 2.26 g; $NaHCO_3$ 0.91 g. Los reactivos se disuelven en 1 L de agua destilada y desionizada y se ajusto el pH a 9.6.

- **Buffer PBS**

$NaCl$ 8.0 g; K_2HPO_4 1.21 g; KH_2PO_4 0.34 g. Los reactivos se disuelven en 1 L de agua destilada y desionizada y se ajusto el pH 7.2

- **Buffer PBS-Tween 20**

$NaCl$ 8.0 g; K_2HPO_4 1.21 g; KH_2PO_4 0.34 g; Tween 0.05%; se disuelven en 1 L y ajustar a pH 7.2

- **Buffer Fosfato-Citrato.**

Fosfato de sodio dibásico 0.7296 g en 25.7 ml de agua destilada y desionizada; ácido cítrico 0.51069g llevarlo a 24.3 ml de H_2O se mezclan y se ajusta el pH 5.0

- **Ácido sulfurico**

3.3ml H_2SO_4 concentrado diluidos en 16.7 ml agua destilada y desionizada.