



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

“GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN CEREAL
TRANSGÉNICO PARA EL GEN *E* DEL VIRUS DEL OESTE DEL NILO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

LUIS GÓMEZ NÚÑEZ

DIRECTORA:

DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO



México D. F.,

Octubre, 2009



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.

Datos del Jurado.

Datos del alumno.

Gómez

Núñez

Luis

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

96195378

Datos del tutor.

Doctora en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Elizabeth

Loza

Rubio

Datos del Sinodal 1

Doctor

Antonio

Verdugo

Rodríguez

Datos del Sinodal 2

Doctor

Víctor

Tenorio

Gutiérrez

Datos del Sinodal 3

Doctor

Gary

García

Espinoza

Datos del Sinodal 4

Doctor

Juan Pedro

Luna

Arias

Datos del Trabajo escrito.

“Generación y caracterización de un cereal transgénico para el gen E del Virus del Oeste del Nilo”.

82 páginas

2009.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado a este trabajo de investigación a través del proyecto SAGARPA-2004-24 “Desarrollo de una vacuna comestible en sorgo para la prevención del Virus del Oeste del Nilo”. Así como también por otorgarme una beca-crédito durante la realización de los estudios de maestría (N° de registro 207881)

Este trabajo de investigación fue desarrollado en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CENID microbiología animal). Bajo la dirección de la Dra. Elizabeth Loza Rubio.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la asesoría de la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio por permitirme colaborar en el proyecto de grupo SAGARPA-2004-24.

A la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores por su asesoría técnica en el desarrollo de cultivo de tejidos vegetales.

Al Dr. Elpidio García Ramírez y Dr. Octavio Guerrero Andrade por todo su apoyo en la realización de las pruebas moleculares y gracias por su amistad.

A Aracely, quien en el momento menos esperado llego para brindar alegría, amor y comprensión a mi vida, espero que te quedes conmigo siempre.

A mis compañeros de laboratorio del CENID-INIFAP: Dra. Edith Rojas Anaya, Sra. Guadalupe Castrejon, Sra. Evelia y el Sr. Daniel de la Rosa, por compartir sus conocimientos conmigo e iniciar el gusto por la investigación.

A Javier Sánchez, Rocío Cortes, Iván Cano, Innan Godínez, Mónica Martínez, María de Jesús Jiménez, Yaddith Cruz, Carlos Bravo, Manuel Buendía, Enrique Muñoz y Silvia Godínez, porque han hecho de mi estancia en el laboratorio un excelente lugar para hacer amigos.

A toda mi familia Luis E. Gómez[†], Antonia Meza, Josefina Alarcón[†], Faustino Núñez[†], Leticia[†], Marcos, Joel, Libia, María de la Luz, Saúl, Alicia, Lorena, Alberto, Alejandra, Emilio y a sus respectivas familias por permitirme crecer con ustedes, compartir sus experiencias y fomentar diariamente la amistad entre nosotros.

DEDICATORIAS

A mi padre, gracias por compartir tus consejos conmigo y ayudarme en los momentos difíciles, te admiro mucho y espero regalarte pequeñas satisfacciones como tú lo has hecho durante toda mi vida, estoy muy orgulloso de ti.

A mi madre, por tener siempre tiempo para escucharme y llenarme de esperanza para continuar haciendo lo que me gusta, por tu amor incansable e incondicional hacia tus hijos, gracias por creer en mí.

Los dos son todo un ejemplo de vida y gracias por guardar siempre en su corazón las palabras precisas que muy frecuentemente necesito escuchar, los amo.

A mis hermanos Jackeline Gómez y José Antonio Gómez por estar siempre presente en los mejores momentos de mi vida, gracias por todo su apoyo y por ser fuente de inspiración y superación en todo momento. Los quiero mucho.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. RESUMEN | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| II. INTRODUCCIÓN | 3 |
| III. ANTECEDENTES | 6 |
| 3.1 Clasificación taxonómica | 8 |
| 3.1.1 Estructura genómica | 9 |
| 3.1.2. Morfología y composición del virión | 10 |
| 3.1.3 Ciclo de replicación | 11 |
| 3.1.4 Proteínas virales | 13 |
| 3.1.5 Ciclo de transmisión | 15 |
| 3.2 Hospederos Invertebrados (vectores) | 18 |
| 3.3 Hospederos vertebrados (reservorios) | 20 |
| 3.3.1 Patogenia | 21 |
| 3.3.2 Descripción clínica | 22 |
| 3.4 Vacunas para la prevención del virus del Oeste del Nilo | 23 |
| 3.4.1 Vacunas de virus inactivado | 23 |
| 3.4.2 Vacunas experimentales | 24 |
| 3.5 Las vacunas comestibles | 27 |
| 3.6 El sistema inmune mucosal | 33 |
| 3.7 La transformación genética de maíz | 33 |
| 3.7.1 Los callos embriogénicos de maíz | 35 |
| 3.7.2 Expresión del gen reportero <i>uidA</i> en plantas | 36 |
| 3.7.3 Resistencia al glufosinato de amonio | 38 |
| IV. Justificación | 40 |
| V. Hipótesis | 41 |
| VI. Objetivo | 41 |
| 6.1 Objetivo general | 41 |
| 6.2 Objetivos específicos | 41 |

| | |
|--|----|
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS | 42 |
| 7.1. Cultivo de callos embriogénicos de maíz tipo II | 42 |
| 7.2 Amplificación y purificación del vector INIFAP-VON 3301 | 42 |
| 7.2.1 Cortes de restricción | 44 |
| 7.3 Transformación genética mediada por biobalística | 44 |
| 7.3.1 Prueba histoquímica de expresión transitoria (β -glucoronidasa)..... | 45 |
| 7.3.2 Identificación de la proteína β -glucoronidasa mediante Western blot... | 45 |
| 7.4 Identificación del gen <i>E</i> del virus del Oeste del Nilo mediante RT-PCR | 46 |
| 7.5 Identificación de la proteína E mediante Western blot | 47 |
| 7.6 Cuantificación de la proteína E expresada en callos embriogénicos de maíz..... | 47 |
| VIII. RESULTADOS | 48 |
| 8.1 Análisis de restricción de la construcción INIFAP-VON 3301 | 48 |
| 8.2 Prueba histoquímica de expresión transitoria | 49 |
| 8.3 Identificación de la proteína β -glucoronidasa mediante Western blot | 49 |
| 8.4 Identificación del gen <i>E</i> del virus del Oeste del Nilo mediante RT-PCR | 51 |
| 8.5 Titulación del anticuerpo antiWest-Nile Virus 8150, mediante Western blot | 52 |
| 8.6 Identificación del la proteína E mediante Western blot..... | 53 |
| 8.7 Cuantificación de la Proteína E expresada en callos embriogénicos de maíz. | 55 |
| IX. DISCUSIÓN | 56 |
| X. CONCLUSIÓN | 62 |
| XI. PERSPECTIVAS | 62 |
| XII. ANEXO | 63 |
| XII. LITERATURA CITADA | 69 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura genómica del virus del Oeste del Nilo..... | 9 |
| Figura 2. Estructura del Virus del Oeste del Nilo determinada por cryo-EM a 17 Å | 11 |
| Figura 3. Ciclo de replicación del Virus del Oeste del Nilo | 13 |
| Figura 4. Ciclo primario del Virus del Oeste del Nilo en Aves | 16 |
| Figura 5. Ciclos de transmisión del virus del Oeste del Nilo | 17 |
| Figura 6. Hospederos vertebrados para el virus del Oeste del Nilo | 20 |
| Figura 7. Reacción de hidrólisis del sustrato cromogénico X-Gluc®..... | 37 |
| Figura 8. Plantas transformadas tolerantes al glufosinato de amonio..... | 38 |
| Figura 9. Esquema de la Construcción INIFAP-VON3301..... | 44 |
| Figura 10. Análisis de restricción de la construcción INIFAP-VON 3301..... | 48 |
| Figura 11. Prueba histoquímica de expresión transitoria β-glucoronidasa..... | 49 |
| Figura 12. Gel de poliacrilamida al 10% de extractos crudos de callos embriogénicos de maíz, a las 24 horas posbombardeo..... | 50 |
| Figura 13. Identificación de la proteína β-glucoronidasa mediante Western blot en callos embriogénicos de maíz, a las 48 horas post-bombardeo..... | 51 |
| Figura 14. Identificación del gen <i>E</i> del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz mediante RT-PCR..... | 52 |
| Figura 15. Titulación del anticuerpo monoclonal antiWest Nile virus 8150..... | 53 |
| Figura 16. Transferencia de los extractos crudos de callos embriogénicos bombardeados a la membrana de PDVF teñida con rojo de Ponceau al 0.5% | 54 |
| Figura 17. Identificación de la proteína E recombinante en callos embriogénicos de maíz mediante Western blot. | 54 |
| Figura 18. Gel de poliacrilamida al 10% de extractos crudos de callos embriogénicos de maíz..... | 55 |
| Figura 19. Curva de albumina sérica bovina para la cuantificación de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en callos transgénicos de maíz tipo II | 55 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Vectores Competentes para el virus del Oeste del Nilo | 18 |
| Tabla 2. Vacunas de subunidad expresadas en plantas para uso humano y veterinario | 30 |
| Tabla 3. Vacunas de subunidad expresadas en maíz | 34 |
| Tabla 4. Reacción de RT-PCR para el gen <i>E</i> del VON | 46 |

I. Resumen

La tecnología de genes recombinantes para la expresión de antígenos es un método efectivo para la inmunización de animales y humanos contra agentes virales. El desarrollo de vacunas orales sugiere que los antígenos son procesados correctamente dentro de la planta e inducen una respuesta inmune al ser consumidos. Los antígenos expresados en maíz (*Zea mays*) son particularmente atractivos debido a que son depositados en tejidos y semillas de la planta. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue la expresión de la proteína E del virus del Oeste del Nilo (VON) en callos embriogénicos de maíz. La secuencia codificadora del gen *E* (TM171-03) fue incorporada en el plásmido pCambia 3301 (INIFAP-VON3301). Para verificar la inserción del gen *E* se realizó un análisis con enzimas de restricción *Kpn* I y *Nco* I. Los resultados mostraron un producto de aproximadamente 1500 pb que corresponden al tamaño esperado del gen *E*. Posteriormente callos embriogénicos de maíz fueron bombardeados mediante biobalística con el vector INIFAP-VON3301. La identificación del transgen *E* fue realizado por RT-PCR del ARN aislado de callos transformados con la construcción INIFAP-VON3301 y pCambia3301, usando iniciadores específicos previamente diseñados que amplificaban un producto de 700 pb. La expresión de la proteína E fue identificada mediante Western blot en la proteína soluble total (PST) obtenida de callos transformados positivamente. Los resultados demostraron la expresión de una proteína de aproximadamente 68kDa. La proteína recombinante representó solo el 0.86% de la proteína soluble total.

II. Summary

The technology of recombinant gene for the expression of antigens it is an effective method for the immunization of animals and humans against viral pathogens. The developed oral vaccines suggest that the antigens are correctly processed within the plant and induce an immune response when swallowed. The antigens expressed in maize (*Zea mays*) are particularly attractive because are deposited in plant tissues and seeds. Therefore, the aim of this work was the expression of the protein E of West Nile virus (WNV) in embryogenic calli of maize. The protein codifying sequence of the gene *E* (TM171-03) was incorporated to the plasmid pCambia3301 (INIFAP-VON3301). To verify the insertion of the gene *E* an analysis with enzymes of restriction *Kpn* I and *Nco* I was done. The results showed a product of approximately 1500 pb that corresponded to the expected size for gene *E*. Later, embriogenic calli were transformed by biobalistic bombardment, with the vector INIFAP-VON3301. The identification of the transgene *E* was realised by RT-PCR from the RNA isolated transformed calli with construction INIFAP-VON3301 and pCambia3301, using previously designed specific initiators that amplified a product 700 pb. The expression of the protein E was identified Western blot at the soluble proteins (PST) obtained form transformed positive calli. The results demonstrated the expression of a protein of approximately 68kDa. The recombinant protein represented only 0.86% of total soluble protein.

II. Introducción

El virus del Oeste del Nilo (VON) presenta una amplia distribución en los Estados Unidos y suroeste de Canadá (Estrada-Franco *et al.*, 2003). En los EUA en el 2002, el VON fue responsable de 6,300 casos de meningitis/encefalitis en humanos de los cuales 633 casos fueron fatales (CDC, 2004; Beasley *et al.*, 2005). Mediante evidencia serológica se sugiere que podría estar ampliamente distribuido en México, (Blitvich *et al.*, 2003; Estrada-Franco *et al.*, 2003, Loroño-Pino *et al.*, 2003), partes del Caribe (Dupuis AP, 2003, Komar *et al.*, 2003c); Quirin *et al.*, 2004) y posiblemente el Salvador (Cruz *et al.*, 2005).

Las primeras evidencias de la circulación del virus del Oeste del Nilo en México, se reportaron en el 2003 en los estados de Coahuila (Blitvich *et al.*, 2003), Yucatán (Loroño-Pino *et al.*, 2003), Tamaulipas, Chihuahua, Veracruz y Tabasco (Estrada *et al.*, 2003; Campomanes, 2008). El estudio del estado de Coahuila correspondió al análisis serológico de 24 equinos procedentes de diferentes municipios, donde el 62.5% de las muestras presentaron anticuerpos contra el VON, sin presentar antecedentes de vacunación, ni reporte de haber viajado fuera del estado (Blitvich *et al.*, 2003). El estudio del estado de Yucatán comprendió el análisis de 252 muestras de sueros de caballos colectadas de julio a octubre del 2002, donde el 1.2% de las muestras resultaron positivas (Loroño-Pino *et al.*, 2003). Posteriormente se realizó un estudio con 441 muestras de suero de equinos colectadas durante el verano del 2002 a marzo del 2003, procedentes de 14 estados de la República Mexicana, que incluían estados colindantes con Texas, EUA. De las muestras procesadas se encontraron 97 muestras (22%) con anticuerpos específicos contra el VON procedentes de los estados de Tabasco, Coahuila, Tamaulipas, Chihuahua, Veracruz y Yucatán, mientras que en los estados de Nuevo León y Tamaulipas en el 2003 se reportó serología positiva en aves (Estrada *et al.*, 2003; Fernández-Salas *et al.*, 2003; Blitvich *et al.*, 2003; Campomanes, 2008). Hasta el 20 de agosto del 2003, fueron notificadas serologías positivas del VON en 12 estados y 57 municipios. Durante este periodo se presentaron 636 casos confirmados en equinos, 25 casos positivos en aves de 23 especies, entre las que predominan aves residentes (Campomanes, 2008).

Hasta el 2003 se tenían reportados nueve aislamientos del VON en México, procedentes del encéfalo de un equino en el municipio de Aldama, Tamaulipas; un zanate de Hermosillo, Sonora, un pelicano en Altamira, Tamaulipas, seis aves migratorias de Mexicali, B.C. y dos lagartos del estado de Tabasco. Para el 2004 se habían estudiado 758 muestras en equinos, de las cuales el 19% fueron muestras positivas a VON en animales asintomáticos y 56 muestras en aves con el 3% de sueros positivos. En el 2004 se realizaron dos aislamientos del virus, el primero de un zanate en el municipio de Etchojoa en el estado de Sonora y el segundo de un cuervo en la ciudad de Tecate Baja California. El Laboratorio de Alta Seguridad del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria hasta marzo del 2005 había realizado un total de catorce aislamientos del VON en el territorio nacional. El último aislamiento viral fue realizado en el mes de marzo del 2007 a partir de un zanate en el estado de Aguascalientes (Campomanes, 2008).

Actualmente existen dos vacunas disponibles en el mercado para equinos contra el VON, la primera es de virus inactivado y se encuentra disponible en EUA (Fort Dogde®). En México, la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) desarrolló una vacuna con virus inactivado que al ser evaluada en caballos mostró buenos resultados de protección. Uno de los inconvenientes de este tipo de inmunógenos es que al ser empleada en nuestro país, no se podría llevar a cabo una diferenciación entre los animales que han sido vacunados y los que pudieron haber adquirido la infección en el campo. Además, aunque esta vacuna es segura, se requiere de varios refuerzos para otorgar protección (Davidson *et al.*, 2005; Loza-Rubio, 2008a).

Con los avances de la biotecnología moderna actualmente se ensayan varios prototipos de vacunas contra el VON que contemplan como antígenos protectores a la proteína de premembrana (prM) y a la proteína E. La biotecnología basada en plantas es un área relativamente nueva para la obtención de productos con alto valor farmacéutico como vacunas, proteínas terapéuticas, enzimas y sustancias químicas específicas. Las vacunas orales muestran diversas características de interés como son: una fácil manipulación genética, el no requerir de rigurosa cadena fría y solamente manejar los genes responsables

de promover la inmunidad humoral y celular, lo que podría permitir diferenciar entre animales infectados y animales vacunados.

Uno de los principales objetivos de la transformación genética del maíz ha sido la expresión de antígenos de patógenos de humanos y animales. Se ha demostrado que los granos son un excelente sistema para el suministro de vacunas comestibles, ya que el antígeno puede permanecer durante largos periodos de tiempo sin la necesidad de refrigerar, considerándolo como un sistema de expresión idóneo para la producción comercial de proteínas que conservan su integridad estructural y actividad biológica. La bioencapsulación natural de las proteínas recombinantes en los cereales podría incrementar su vida media en el intestino y promover la presentación del antígeno en la superficie mucosal, estimulando el sistema inmunológico e induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de conferir protección contra cepas letales (Guerrero Andrade *et al.*, 2006; Gómez-Núñez L, 2007).

III. Antecedentes

El virus del Oeste del Nilo, es miembro del género *Flavivirus*, pertenece al serocomplejo de la encefalitis Japonesa (EJ) conformado por virus que causan infecciones en el sistema nervioso central, tales como el virus de la encefalitis Japonesa en Asia; virus de la encefalitis de San Luis en el continente Americano; virus Rocio en Brasil, Nueva Zelanda y Nueva Guinea; y el virus Kunjin (reclasificado como subtipo del VON) en Australia (Scherret *et al.*, 2001; Solomon, 2004). A mediados de los 90's, el VON fue responsable de brotes esporádicos de enfermedad, que presentaban signos como fiebre y ocasionalmente encefalitis, en África, Medio Oriente y el Oeste de Asia. Sin embargo, desde 1996, la encefalitis del Oeste del Nilo en humanos ha sido reportada frecuentemente en Europa, Medio Oriente, Rusia, Norte y Oeste de África (Marfin y Gluber, 2001). En 1999, el VON emergió en la ciudad de Nueva York y áreas adyacentes, donde ocasionó la muerte de personas, aves y caballos (Gould y Fiking, 2004; Marfin y Gluber, 2001). A partir de esta fecha se ha diseminado por todo los EUA y ha sido documentada la infección de humanos, aves y caballos en Canadá, el Caribe y América Central (CDC, 2004). El alto índice de diseminación del virus plantea un serio problema en salud pública y veterinaria en los siguientes años (Gould y Fiking, 2004), si se considera que para la población humana no existe una vacuna disponible que proteja a la población en riesgo (Huang *et al.*, 2005).

En México la primera evidencia serológica del VON en caballos fue detectada en el 2002 en los estados fronterizos con Texas, EUA y la costa del Golfo de México. Aún no se ha determinado como el virus se introdujo en el continente Americano, aunque se sospecha que las aves migratorias fueron los principales huéspedes introductorios (Boletín epidemiológico, 2000; Loeb *et al.*, 2005; Deardorff *et al.*, 2006). Las evidencias serológicas reportadas por Loroño-Pino *et al.*, (2003) sugieren que este podría ser el punto de incursión del VON hacia Latinoamérica, debido a que el estado de Yucatán es una de las principales áreas a las que arriban muchas de las especies de aves migratorias del noreste y oeste de los EUA. Sin embargo, mediante el análisis filogenético se observa que el aislamiento realizado en Tabasco (TM-171-03) durante el 2003 presenta características filogenéticamente distintas a los otros aislamientos realizados en México y además se encuentra cercanamente relacionado con las cepas que circulaban en Lousiana y Florida en el 2001 a 2002. Los aislamientos obtenidos de Baja California, Sonora y Tamaulipas, a diferencia de la cepa TM-171-03, mostraron una mayor relación filogenética, y aparentemente se

encuentran relacionados con cepas que circulan en Arizona y California (Deardorff *et al.*, 2006; Cuevas-Romero, 2008). En base a los resultados se sugiere que la introducción del VON a México, pudiera haber sido por dos rutas independientes y que la cepa identificada en el estado de Tabasco, presenta una distribución limitada en la zona sur de la república Mexicana (Deardorff *et al.*, 2006).

El primer aislamiento del VON en aves fue reportado en el 2003 de un cuervo (*Corvus corax*) en el estado de Tabasco (TM-171-03) (Estrada-Franco *et al.*, 2003). Beasley *et al.*, 2004 establecieron que existe una divergencia de 46 nucleótidos (0.42%) y 4 aminoácidos (0.11%) entre la cepa del VON (TM.171-03) con respecto a la cepa prototipo (NY99) aislada originalmente en Nueva York. En base a este estudio se sugiere la presencia de una nueva variante en México, donde el aislamiento TM-171-03, presenta una mutación en el segmento 156 de la proteína E, que aparentemente ocasiona una atenuación de la cepa al ser evaluada en ratones (Beasley *et al.*, 2004).

Posteriormente, en marzo y abril del 2006, se han reportado serologías positivas en humanos, caballos y otros mamíferos, así como en réptiles y aves (Estrada-Franco *et al.*, 2003; Elizondo-Quiroga *et al.*, 2005; Farfán-Ale *et al.*, 2006; Deardorff *et al.*, 2006, Alonso-Padilla *et al.*, 2009). Estudios previos indican que la expansión e infectividad del VON ha sido muy diferente en México al comportamiento observado en los EUA, debido a que no se han presentado casos de enfermedad en humanos, donde hasta febrero del 2006, se estudiaron 182 casos de meningoencefalitis y todas han resultado negativas al VON.

Una de las posibles explicaciones que el grupo de expertos en Vectores en la Secretaria de Salud ha planteado es que: “El panorama actual del VON en México, pudiera ser la etapa previa a la aparición de brotes y que el virus se este adaptando a la ecología de los diferentes escenarios del país. La segunda explicación se relaciona a que en México, existe una serología cruzada, con otros virus de la misma familia, como es el virus del Dengue que se encuentra ampliamente distribuido (Comité Intersectorial, 2003; Campomanes 2008). Por lo tanto, la vigilancia epidemiológica resulta indispensable para valorar la expansión viral, elucidar las diferencias

epidemiológicas y patogénicas observadas en los Estados Unidos y el resto del mundo (Blitvich *et al.*, 2003; Loroño-Piño *et al.*, 2003, Blitvich BJ, 2008; Alonso-Padilla *et al.*, 2009).

Alonso-Padilla y colaboradores en el 2009 realizaron un estudio de seroprevalencia en equinos asintomáticos no vacunados, en los estados de Chiapas y Puebla, identificando la presencia de IgG's en el 31.6% (91/288) del total de sueros muestreados, presentando una distribución del 53.3% y 8.0%, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron corroborados mediante la técnica de seroneutralización en placa, los cuales mostraron una especificidad del 99.4% y una sensibilidad de 84.9% con los datos obtenidos por ELISA. La incidencia de otros flavivirus (virus del Oeste del Nilo, virus de la Encefalitis de San Luis y virus Ilheus) fueron detectados mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) en 138 muestras, los resultados mostraron que el 53% de las 83 muestras positivas (IH), tuvo reacción específica para el VON. Según los autores estos datos sugieren una expansión continua del VON a través de México.

3.1 Clasificación taxonómica

La familia *Flaviviridae* consiste de tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*, los cuales se encuentran distantemente relacionados, pero comparten genes similares y motivos conservados en sus proteínas no estructurales. Actualmente 70 virus clasificados en el género *Flavivirus* se encuentran subdivididos en doce serogrupos antigénicos. El VON pertenece al serogrupo del virus de la encefalitis Japonesa (EJ), que además incluyen a otros virus como Cacipacore, Koutango, encefalitis de Valley Murray, encefalitis de San Luis, Usuto y Yaounde (Poidinger, 1996; Heinz *et al.*, 2000a). Basándose en la homología de sus secuencias nucleotídicas, el virus Kunjin endémico de Australia y Asia, actualmente se considera un subtipo del VON (Heinz *et al.*, 2000a, Scherret *et al.*, 2001). Los diferentes aislamientos virales del VON han sido agrupados por tiempo y espacio dentro de dos linajes genéticos (I y II) con base en las substituciones de aminoácidos en su secuencia o las deleciones en su proteína de envoltura (Berthet *et al.*, 1997). El linaje I incluye aquellas cepas que han causado brotes de encefalitis en humanos, caballos y aves. En contraste, las cepas del linaje II incluyen cepas de África del Sur, África Central, la cepa prototipo de Uganda aislada en 1937 que no han sido asociados con brotes de enfermedad severa en dichas especies (Jia *et al.*, 1999; Lanciotti *et al.*, 1999; Brinton, 2002).

3.1.1 Estructura genómica

El VON presenta un genoma ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (ARN sentido). Una estructura cap tipo 1 ($m^7GpppAmp$) se encuentra presente en el extremo 5' del ARN (Cleaves y Dubin, 1979), pero en su extremo 3' presenta un CU_{OH} (Brinton, 1986; Wengler, 1991). La región 5' no codificante (RNC) del genoma de ARN es de 96 nucleótidos de longitud, mientras que la RNC 3' es de 631 nucleótidos. El genoma del VON presenta una longitud de 11,029 nucleótidos y contiene un solo marco de lectura abierto (ORF) de 10,301 nucleótidos (Lanciotti *et al.*, 1999). La maduración de las diez proteínas virales codificada en este ORF es producida por el procesamiento proteolítico de una sola poliproteína por la acción de la proteínserina viral NS2B-NS3 y otras proteasas celulares (Nowak, 1989; Lindenbach y Rice, 2001) (Figura 1). Las tres proteínas estructurales, cápside (C), membrana (prM/M) y de envoltura (E) son codificadas entre la porción 5' del ORF genómico, mientras que las siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B y NS5) son codificadas por la porción 3' (Rice *et al.*, 1985; Brinton, 2002).

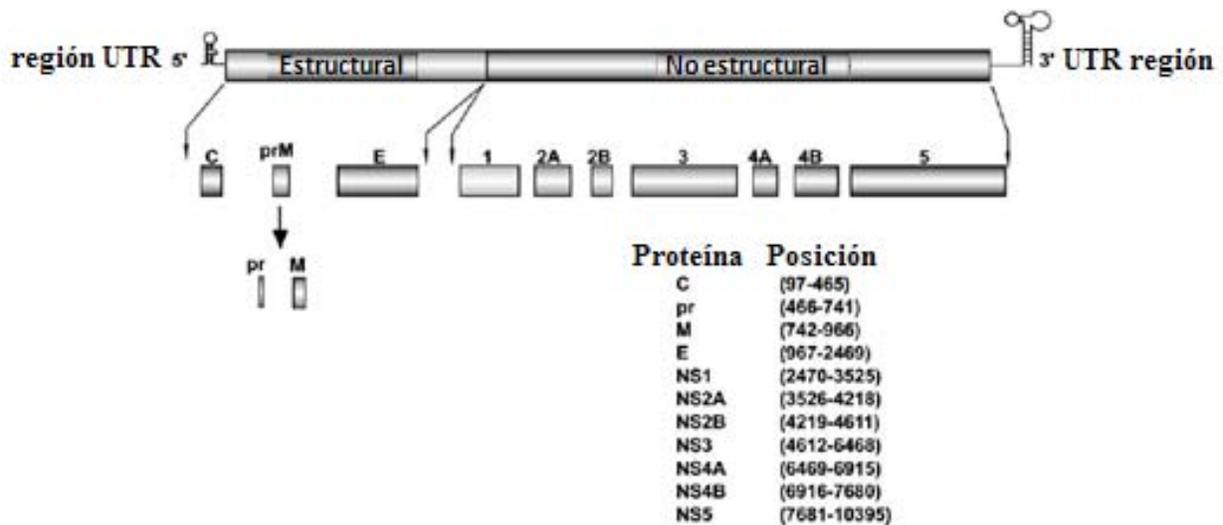


Figura 1. Estructura genómica del virus del Oeste del Nilo. El marco de lectura abierto codifica una poliproteína que es procesada por la proteasa viral NS2B-NS3 y por algunas proteasas celulares, para dar como resultado la maduración de las proteínas virales. Además, se muestra las posiciones de cada una de las proteínas virales en el genoma obtenidas a partir del genoma de la cepa EG101 del VON (Brinton, 2002).

3.1.2 Morfología y composición del virión

Los viriones del VON son pequeños (aproximadamente 50 nm de diámetro), esféricos y envueltos. La nucleocápside tiene aproximadamente 25 nm de diámetro y está compuesta de copias múltiples de la proteína C. La envoltura y la cápside del virión presentan una estructura icosaédrica simétrica (Heinz *et al.*, 2000a). Algunos estudios indican que la simetría del virus es conferida en la partícula viral por las interacciones de la proteína E, y no por las interacciones de la proteína de la cápside (Pletnev *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2002). Muckopadhyay *et al.*, (2003) determinaron la estructura de la cepa del VON responsable del brote en Nueva York (NY99), empleando microscopía crioelectrónica (cryoEM) y técnicas de reconstrucción de imagen. A una resolución de 17 Å el VON presentó una simetría icosaédrica de 500 Å aproximadamente, sin proyecciones en la superficie u espigas (Figura 2A). Una vista transversal del virus muestra la asociación de capas concéntricas, indicando la organización del virus en multicapas (Figura 2B). La capa más externa contiene una alta densidad que corresponde a las proteínas transmembranales E y M. Una capa lipídica de 35 a 40 Å aparece con los componentes transmembranales de las proteínas E y M, por otra parte la nucleocápside contiene copias múltiples de la proteína de la cápside y del genoma de ARN. La proteína de superficie E es la responsable de unirse al receptor membranal de la célula hospedera y de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. Aunque la estructura atómica de la proteína E del VON es poco conocida, los ectodominios están estrechamente relacionados con otras proteínas membranales como la proteína E del virus del dengue. La molécula está ordenada como un homodímero que en cada monómero presenta tres dominios (I, II, III). Basándose en la similitud de la proteína E del VON y del virus del dengue (49% identidad), se construyó un modelo para la proteína E del VON mediante Cryo-EM utilizando el programa EMFit (Figura 2C) (Beasley, 2002). Una serie de tres dímeros se encuentran alineados uno detrás de otro, el cual forma un caparazón de proteínas alrededor de la capa lipídica. Una amplia proporción de la proteína E en la superficie puede ser neutralizada por anticuerpos monoclonales (Beasley, 2002). El arreglo de la proteína E del VON es similar a la del virus del dengue (Kunh *et al.*, 2002); sin embargo, características para cada uno de los virus han sido observadas a diferentes densidades (Figura 2D). La densidad positiva indica las diferencias en los residuos de glicosilación 67 y 153 para el virus del dengue. Por otra parte, la densidad negativa corresponde al residuo 154 para el virus del Oeste del Nilo.

Probablemente estas diferencias en su estructura contribuyen a la transmisión y patogénesis para cada uno de los agentes virales (Muckopadhyay *et al.*, 2003).

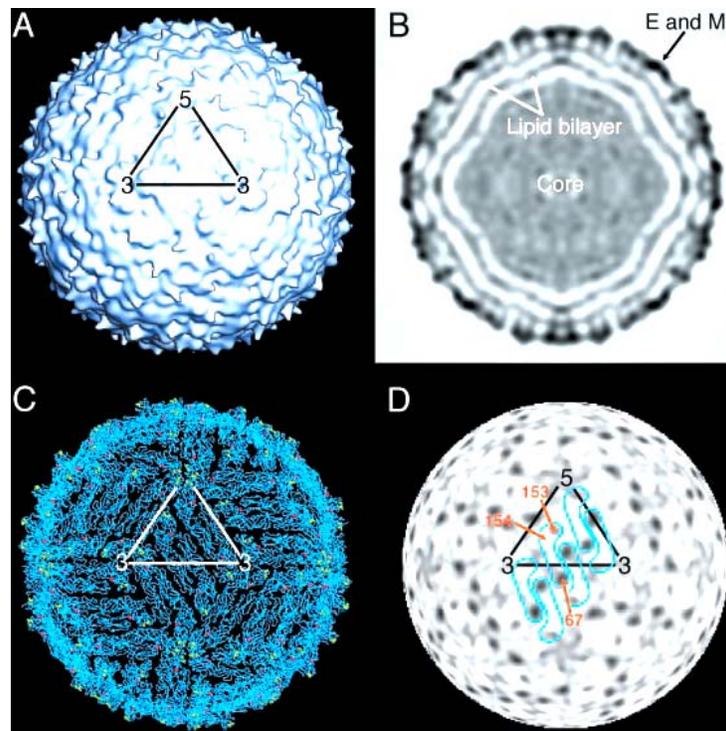


Figura 2. Estructura del Virus del Oeste del Nilo determinada por cryo-EM a 17 Å. (A) Una vista superficial del virus con una unidad asimétrica del icosaedro mostrado por el triángulo. (B) Sección central mostrando las capas concéntricas por densidad. (C) El arreglo de la proteína E homóloga del VON. Los residuos 307 y 330 que unen a los anticuerpos monoclonales, se demuestran en verde. El residuo Asn¹⁵⁴, que está glicosilado se muestra en color rojo. (D) Densidad diferencial entre el virus del dengue y el VON a 248 Å La densidad positiva del virus del dengue se muestra en negro y la densidad negativa del VON se muestra en blanco. Los esquemas de tres homodímeros de E son indicados por las líneas azules (Muckopadhyay *et al.*, 2003).

3.1.3 Ciclo de replicación

El virus del Oeste del Nilo se ha replicado en células embriogénicas de pollo, pato y ratón, en líneas celulares continuas de mono, humano, cerdo, roedores, anfibios e insectos, sin observar la presencia de efectos citopáticos (Brinton, 2002). La identificación de dos glicoproteínas como receptores probables del virus del dengue 4 sugiere que las moléculas de superficie de las células

hospederas son necesarias para la entrada de flavivirus (Salas-Benito y del Ángel, 1997). Después de la unión a un receptor celular desconocido, los viriones entran a la célula mediante endocitosis y a un pH bajo se fusiona la membrana viral con la membrana de la vesícula endosomal, liberando a la nucleocápside dentro del citoplasma (Heinz y Allison, 2000a) (Figura 3A). El genoma de ARN es liberado y traducido en una poliproteína simple (Figura 3B). La proteínserina NS2B-NS3 y varias proteasas celulares cortan la poliproteína en sitios múltiples para generar proteínas virales maduras (Figura 3C). La ARN polimerasa viral ARN dependiente NS5 en conjunto con otras proteínas virales no estructurales y posiblemente proteínas celulares, copian la cadena complementaria del molde de ARN genómico (Figura 3D), y esta cadena de ARN a su vez sirve como molde para la síntesis de nuevos ARNs (Figura 3E). La síntesis de ARN es semiconservativa y asimétrica. Chu y Westaway (1985) sugirieron que solamente una cadena simple de ARN se copia en cierto tiempo determinado (forma replicativa RF), mientras que las cadenas se reinician eficientemente para que nuevas cadenas sean copiadas de una cadena simple utilizada como molde de replicación intermedia RI. Una vez establecida la cadena de ARN viral, la síntesis puede continuar en ausencia de síntesis de proteínas, indicando que el precursor de la poliproteína viral no es requerido (Cleaves, 1981; Chu y Westaway, 1985; Westaway, 1999). Los nuevos genomas de ARN podrían funcionar como molde para la traducción y transcripción, así como para la producción de sustratos de encapsidación. Datos obtenidos con un replicón del virus Kunjin sugieren que la traducción es un requisito previo para la replicación de nuevos ARNs (Khromykh *et al.*, 1999), y que la replicación es indispensable para la encapsidación (Khromykh *et al.*, 2001). Al comienzo del ciclo de replicación, nuevos genomas de ARN podrían alternarse entre la replicación y la traducción porque hasta ese momento no se ha acumulado una suficiente cantidad de proteínas estructurales. El ensamblaje del virión ocurre en asociación con la membrana del retículo endoplásmico rugoso. Los viriones intracelulares inmaduros, que contienen heterodímeros de E y prM (precursor de M), son acumulados en vesículas y a través de la vía secretora del hospedero (Figuras 3F y 3G), donde los glicanos de E y prM son modificados (Wengler, 1989; Heinz *et al.*, 1994) (Figura 3H). La glicosilación y la porción hidrofílica N-terminal de prM es partida en el aparato de Golgi por las proteasas celulares (Stadler *et al.*, 1997). La porción carboxilo-terminal (M) permanece insertada en la envoltura del virión maduro y contiene un ectodominio corto y dos dominios de membrana (Murray, 1993).

La interacción prM-E podría mantener a la proteína E estable y liberar nuevos viriones. Los viriones son transportados a la membrana plasmática en vesículas y son liberados por exocitosis (Mason, 1989; Nowak, 1989) (Figura 3I). La progenie es liberada después de 10 a 12 horas de la infección y los títulos extracelulares no son observados antes de las 24 horas (Brinton, 2002a).

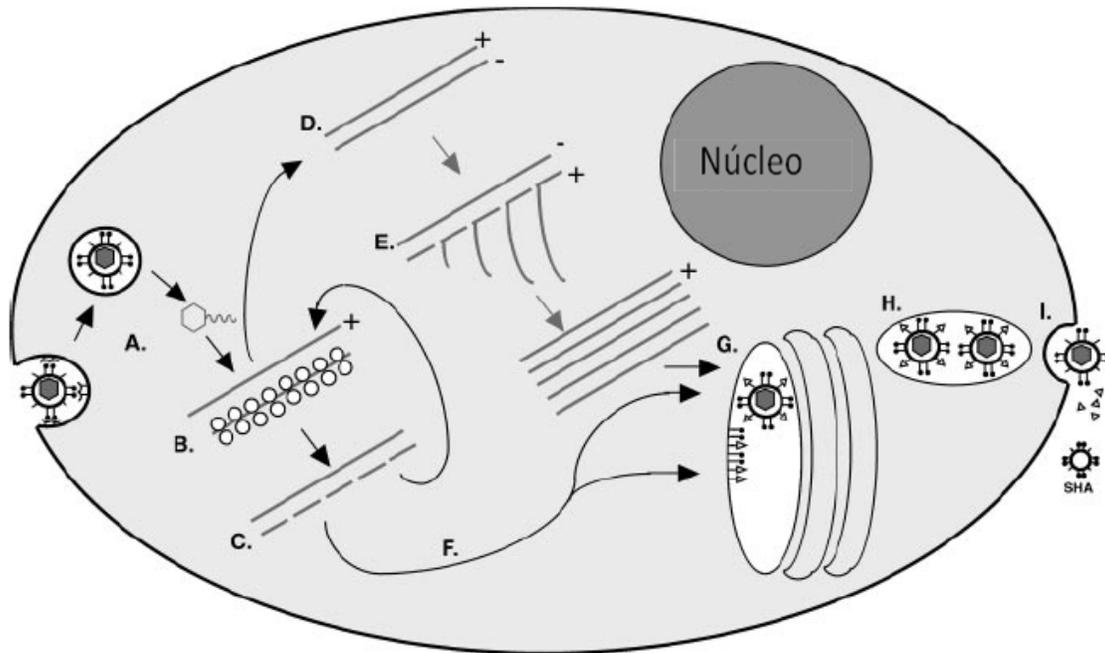


Figura 3. Ciclo de replicación del Virus del Oeste del Nilo. **A.** Unión y entrada del virión. **B.** Traducción del ARN vírico. **C.** Proceso proteolítico de la poliproteína. **D.** Síntesis del ARN vírico. **E.** Síntesis de nuevos ARNs. **F.** Transporte de proteínas estructurales a las vesículas de la membrana citoplasmática. **G.** Encapsidación de los nuevos ARNs. **H.** Movimiento de viriones a la superficie de las células. **I.** Liberación de las nuevas partículas virales. **SHA** Hemaglutinina de sedimentación (partícula subviral que se libera en algunas ocasiones) (Brinton, 2002).

3.1.4 Proteínas virales

El ARN del VON es un sólo marco de lectura que codifica para 10 proteínas, tres estructurales (Proteína de Cápside, Premembrana-membrana y Proteína de envoltura) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). El marco de lectura está flanqueado por regiones no codificantes que contienen estructuras secundarias que juegan un papel importante en la replicación viral (Beasley, 2005).

La proteína de la cápside pC se ha encontrado en dos formas. La proteína se corta en la región C-terminal en su parte hidrofóbica y la parte residual se designa como proteína de anclaje a la membrana (C_{anch}). El corte subsecuente de este tallo hidrofóbico por la proteasa viral, resulta en una proteína madura asociada al virión (C_{vir}), que es integrada a la membrana del retículo endoplásmico. Las regiones terminales -C y -N, se anclan al genoma viral (Khromykh, 1998).

Por otra parte, la proteína de premembrana prM, forma un dímero con la proteína de envoltura pE. Esta proteína es esencial para el correcto plegamiento de la proteína E, lo que sugiere que prM tiene una función de chaperona. Estas proteínas originan la producción de partículas subvirales (Beasley, 2005).

La proteína de envoltura pE juega un papel importante en la fusión a la membrana. Es el principal antígeno y promotor de anticuerpos neutralizantes de virus. Contiene doce residuos de cisteína muy conservados, así como tres sitios de glicosilación; se ha mostrado que la proteína puede formar dímeros, cada monómero comprende tres distintos dominios estructurales. El dominio III es la región principal al receptor y el sitio de reconocimiento de anticuerpos, la antigenicidad y el tropismo del virus también se relacionan con esta región (Rey *et al.*, 1995; Roehring, 2003; Beasley, 2005). En estudios realizados utilizando anticuerpos monoclonales, se observó que este epítipo no está conservado en todas las cepas del virus, aunque la discriminación no fue entre cepas que pertenecen a diferentes linajes genéticos. Por otra parte la exposición a pH ácidos induce cambios dramáticos conformacionales en la proteína E que son acompañadas por la transición de las formas diméricas a triméricas y esta trimerización es la que permite la fusión con la membrana (Bressanelli *et al.*, 2004).

En cuanto a las proteínas no estructurales, estas juegan un papel importante tanto en la replicación viral como en la interacción con las proteínas de la célula hospedera. Además de que parecen funcionar como antagonistas del interferón. La proteína NS1 es glicosilada y existe tanto la forma dimérica como hexamérica en las células infectadas. Las mutaciones afectan la glicosilación, el procesamiento y transporte de la proteína. Su asociación con el ARN viral y el efecto de las mutaciones sugieren un papel importante en los eventos de la replicación temprana.

Por otra parte, la proteína NS3 es relevante en la replicación viral codificando para la proteasa viral. Estudios estructurales y mutacionales han identificado el sitio activo de la proteasa haciéndolo un buen blanco para la terapia antiviral. Las otras cuatro proteínas no estructurales (NS2A, NS2B, NS4A, NS4B) son pequeñas proteínas hidrofóbicas, que están involucradas en la replicación viral. Las proteínas NS3 y NS5 también están relacionadas con la replicación viral y se ha visto que se unen específicamente al extremo 3' no codificante del ARN genómico (Jones *et al.*, 2005).

3.1.5 Ciclo de transmisión

La conexión de los ciclos de transmisión local del VON en áreas tropicales del Sureste y áreas templadas del Norte sugiere ser mediante aves migratorias. Las aves tropicales y las comunidades de mosquitos podrían mantener permanentemente los ciclos de transmisión local. Sin embargo, se contempla que las migraciones podrían transportar el virus hacia el norte, áreas templadas y proveer la posibilidad de la aparición de brotes esporádicos de la enfermedad (Rappole *et al.*, 2000).

Si se contempla que la diseminación del VON podría ser mediante aves migratorias, se vuelve indispensable el comprender las rutas migratorias, para anticipar la dinámica espacial de la enfermedad. Las rutas de las aves migratorias son claras; aves del este de los Estados Unidos migran en gran parte hacia el Caribe, Sudamérica y a Mesoamérica. En contraste, aves del Oeste de los Estados Unidos generalmente migran al sur, entre ellos México y Centroamérica (Townsend *et al.*, 2004).

El principal ciclo de transmisión para el VON involucra a los mosquitos ornitofílicos como vectores, y a las aves como hospederos. Entre las aves se incluyen 25 especies de nueve órdenes que se han visto afectadas. En general, las especies del orden de los Passeriformes parecen representar el principal reservorio para la transmisión del VON, aunque otros órdenes podrían contribuir. Los modos alternativos de transmisión, incluyen la transmisión vertical y contacto directo entre hospederos vertebrados en la ausencia de vectores artrópodos. La segunda categoría podría incluir la transmisión sexual, fecal-oral, oral y aerosoles (Kuno *et al.*, 2001) (Figura 4).

La transmisión vertical para el VON ha sido reportada tanto para vertebrados como para invertebrados. En el 2002 se reportó un caso de infección por el VON en un infante; la infección fue atribuida a la transmisión transplacentaria que ocurrió subsecuentemente a la del mosquito vector (CDC, 2002). El infante nació con daño cerebral aproximadamente once semanas después, detectando la presencia de IgM's en sangre y siendo positivo el tejido placentario para el ARN viral. La transmisión vertical en vertebrados no humanos hasta el momento no ha sido documentada. Sin embargo, se notificó la persistencia de bajos niveles de infección en el ovario en un estornino once días después de haber terminado la tasa detectable de viremia; la pregunta que surge entonces: es si la transmisión transovárica en aves es posible (Komar *et al.*, 2003b). La transmisión transplacentaria en ratones (Mathur *et al.*, 1982), cerdos (Burns *et al.*, 1950), y humanos (Chaturvedi *et al.*, 1980) ha sido reportada para otros flavivirus como la Encefalitis Japonesa (Komar, 2003a).

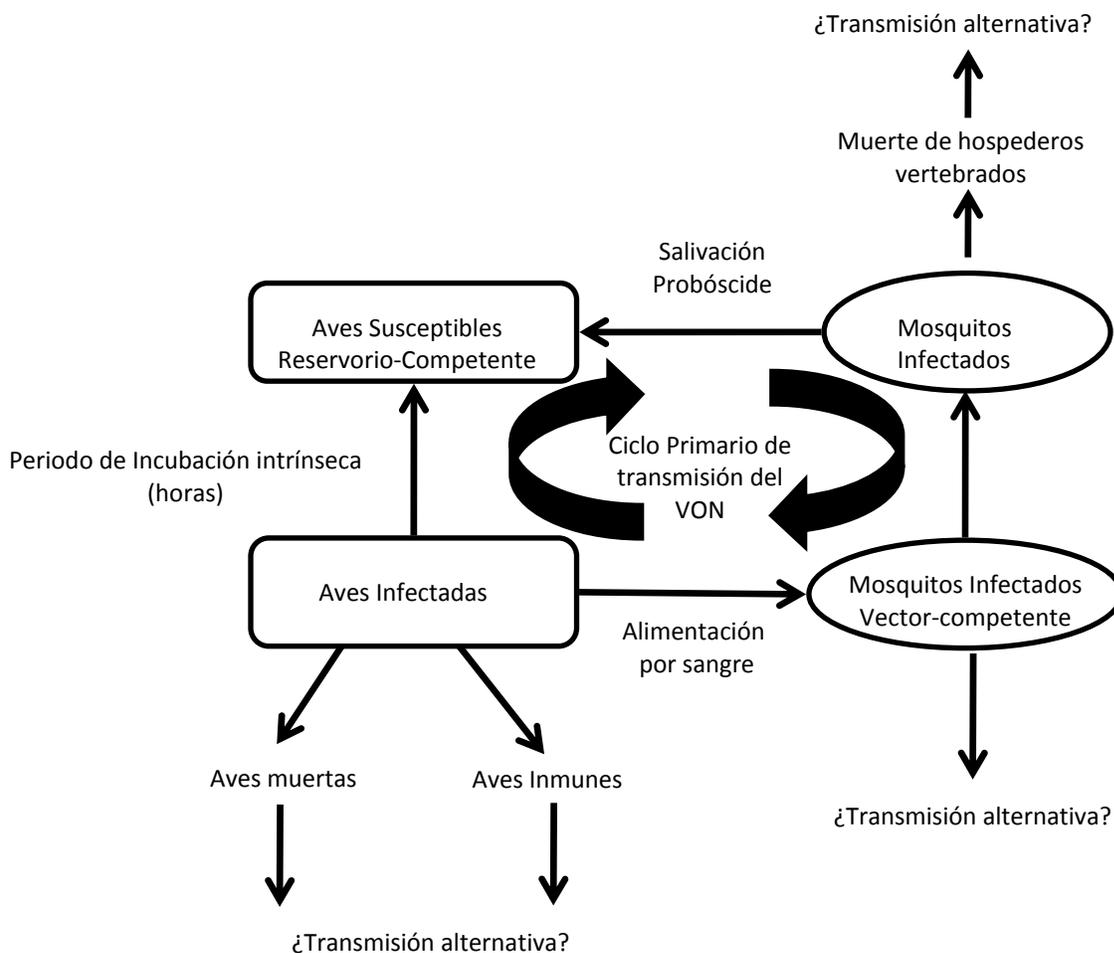


Figura 4. Ciclo primario del Virus del Oeste del Nilo en Aves (Komar, 2003a).

Varios ciclos alternativos, han sido documentados y servido como argumento de la complejidad del ciclo de transmisión. El potencial de un ciclo ave-garrapata-ave ha sido demostrado en Europa (Hubalek y Halouzka, 1996). El VON ha sido aislado de dos tipos de garrapata *Argasidae* y *Amblyommine*. Bajo condiciones experimentales, las garrapatas del género *Argas*, *Ornithodoros* y *Dermacenter* han demostrado su capacidad de transmisión del VON a aves, aunque las pruebas realizadas como vector competente fueron negativas (Anderson *et al.*, 2003) (Figura 5).

Otros posibles vectores del VON podrían incluir a las moscas *Icosta americana* (Orden: Diptera, Familia: Hippoboscidae) de las cuales el VON ha sido aislado en Norteamérica (Komar, 2003a; Gancz *et al.*, 2004). Muchas especies de mosquitos podrían ser capaces de transmitir el VON de manera vertical. Estudios experimentales han demostrado bajas tasas de transmisión vertical en *Aedes albopictus*, *Aedes Aegypti*, *Culex tritaeniorhynchus* y *Culex pipiens*. La transmisión transovárica se presume que puede ser la causa de la persistencia del virus durante el invierno en el género *Culex* spp. y la hembra mosquito *Cx. univittatus* (Komar, 2003a).

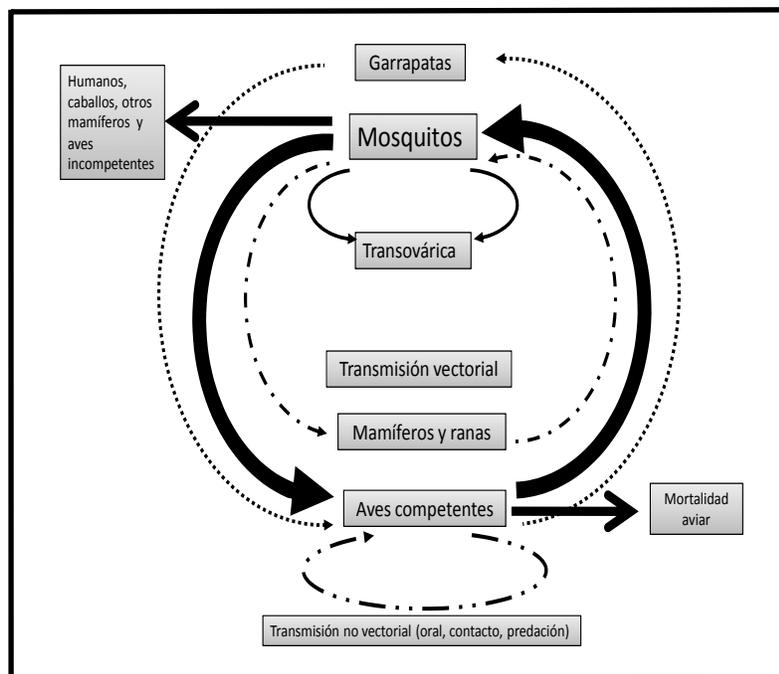


Figura 5. Ciclos de transmisión del virus del Oeste del Nilo (Peterson *et al.*, 2004).

3.2 Hospederos Invertebrados (Vectores)

Actualmente la infección por el VON ha sido documentada en una gran variedad de especies de mosquitos incluidas 43 especies en Europa (Hubálek y Halouzka, 1999). En el hemisferio oeste docenas de especies de mosquitos han sido reportadas como acarreadoras del virus (Andreadis *et al.*, 2001). El género *Culex* aparece como el vector dominante en el mantenimiento de los ciclos de transmisión local. Otros géneros, sin embargo, podrían ser muy importantes en otras regiones geográficas demostrando ser vectores competentes para la transmisión del VON (Komar, 2003a) (Tabla 1).

Tabla 1. Vectores competentes para el virus del Oeste del Nilo

| ESPECIES | # | TASA DE INFECCIÓN ^a | TASA DE TRANSMISIÓN ^b |
|-----------------------------|-----|--------------------------------|----------------------------------|
| <i>Cx. erythrothorax</i> | 25 | 100 | 64 |
| <i>Cx. Nigripalpus</i> | 127 | 84 | 10 |
| <i>Cx. Pipiens</i> | 209 | 84 | 25 |
| <i>Cx. Quinquefasciatus</i> | 236 | 63 | 30 |
| <i>Cx. Salinarius</i> | 20 | 95 | 35 |
| <i>Cx. Stigmatosoma</i> | 48 | 77 | 19 |
| <i>Cx. Tarsalis</i> | 91 | 81 | 62 |
| <i>Ochleratus dorsalis</i> | 29 | 41 | 34 |
| <i>O. japonicus</i> | 119 | 76 | 71 |
| <i>O. melanimon</i> | 60 | 48 | 20 |
| <i>O. sierrensis</i> | 50 | 14 | 6 |
| <i>O. taeniorhynchus</i> | 75 | 12 | 3 |
| <i>Aedes albopictus</i> | 241 | 81 | 66 |
| <i>A. sollicitans</i> | 50 | 70 | 12 |
| <i>A. vexans</i> | 35 | 37 | 17 |
| <i>Culiseta inornata</i> | 28 | 75 | 21 |

^a Porcentaje de mosquitos expuestos previo a la infección

^b Porcentaje estimado de mosquitos vectores competentes (Goddard *et al.*, 2002).

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América ha enlistado 22 especies diferentes de vectores que incluyeron, hasta diciembre del 2001: *Aedes albopictus*, *A. cinereus*, *A. vexans*, *Anopheles punctipennis*, *A. quadrimaculatus*, *Coquillettidia perturbans*, *Culex pipiens*, *C. restuans*, *C. nigripalpus*, *C. quinquefasciatus*, *C. salinarius*, *Culiseta melanura*, *Ochlerotatus canadensis*, *O. cantator*, *O. japonicus*, *O. sollicitans*, *O. trivittatus*, *Orthopodomyia signifera*, *Psorophora columbiae* y *Uranotaenia sapphirina* (Nótese que las especies del género *Ochlerotatus* eran previamente clasificadas como *Aedes*) (CDC, 2002).

Existen vectores denominados primarios, los cuales se alimentan preferentemente de aves, particularmente de especies que desarrollan elevados niveles de viremia. Si las condiciones son las apropiadas para la reproducción y alimentación del vector (factores ambientales, densidad de población, tasa de infección), una infección epizootica podría ocurrir en la población de aves. Por otro lado, existen vectores denominados de puente, los cuales presentan una alimentación más general, es decir, que se alimentan de un mayor número de especies, y aunque no sean vectores de amplificación muy eficientes debido a que no presentan niveles elevados de viremia, los cuales representan un gran riesgo para la infección en humanos y equinos, dado que estos vectores pueden infectarse cuando se alimentan de una ave infectada y transmitir el virus a un mamífero susceptible (Hayes *et al.*, 2005b).

En Europa ha sido documentada una gran variedad de especies de mosquitos como vectores de la infección para el VON. Se han reportado 43 especies de mosquitos, incluyendo como vectores principales a mosquitos del género *Cx. pipiens*, *Cx. modestus* y *Coquillettidia richardi* (Hubalek y Halouzka, 1999). En Asia, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus* y *Cx. visniu* (Delgado-López *et al.*, 2003). La abundancia del vector está directamente relacionada con la intensidad de la transmisión del VON. Por otra parte, se ha informado de la transmisión del virus por vías no relacionadas con vectores, como son: la transfusión sanguínea, donación de órganos, infección durante el embarazo o alimentación y la exposición ocupacional al virus (Hayes *et al.*, 2005b).

3.3 Hospederos vertebrados (reservorios)

El VON presenta un amplio rango de hospederos que podrían ser infectados. El CDC ha reportado la infección del virus en 29 especies de mamíferos, entre ellas: la ardilla del Este (*Tamias estriatus*), zorrillos (*Mephitis mephitis*), zorra (*Scirius niger*), ardilla gris (*Scirus carolinensis*), lobo gris (*Canis lupus*), oveja (*Ovis domesticus*), cabra (*Oreamnos americanus*), gran murciélago café (*Eptesicus fuscus*), focas (*Oryctolagus cuniculus*), gato doméstico (*Felis domesticus*) y el perro (*Canis familiaris*). Otros vertebrados podrían además iniciar una función como amplificadores. En Rusia, el VON fue aislado de ranas (*Rana ridibunda*) que subsecuentemente se demostró que era hospedero competente para la infección de mosquitos (*Culex pipiens*). Investigaciones recientes han mostrado que serpientes (*Thamnophis sirtalis*), iguana verde (*Iguana iguana*) y la rana toro (*Rana catesbeiana*) son reservorios incompetentes (Klenk y Komar, 2003) (Figura 6).

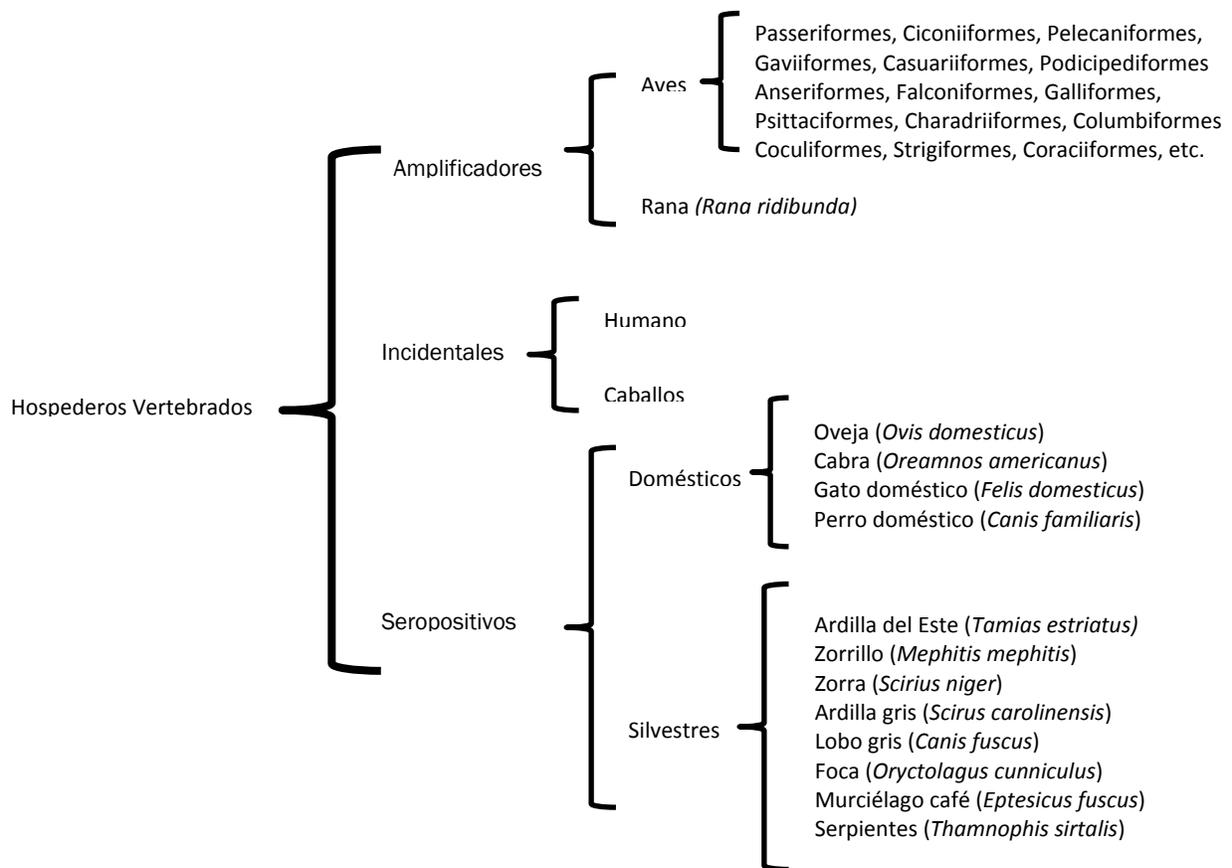


Figura 6. Hospederos vertebrados para el virus del Oeste del Nilo

3.3.1 Patogenia

El VON se replica en las células dendríticas del sitio de inoculación y se disemina a los nódulos linfáticos y médula. La penetración viral al sistema nervioso central antecede a la estimulación de los receptores tipo toll-3 en las células dendríticas y se incrementan los niveles del factor de necrosis tumoral- α (TNF α). El virus infecta directamente a las neuronas, especialmente las células de la materia gris y de la médula espinal. En algunos casos el daño tisular se ha asociado a la respuesta inmune, lo cual contribuye a los cambios patológicos. Por otra parte las infecciones no fatales del virus parecen ser neutralizadas por el sistema inmune del hospedero, sin embargo; el virus puede persistir en algunos vertebrados (Hayes *et al.*, 2005c; Hayes y Gubler, 2005a).

Un elevado porcentaje de las infecciones en humanos son asintomáticas, y en los casos clínicos se pueden presentar fiebre, síntomas gastrointestinales, encefalitis e incluso parálisis. Los signos clínicos no neurológicos son raros e incluyen hepatitis, pancreatitis, miocarditis, orquitis, manifestaciones oculares como corioretinitis. La infección del tallo cerebral así como del cordón espinal, puede causar parálisis muscular, parálisis diafragmática y parálisis intercostal, dando como resultado falla respiratoria (Hayes *et al.*, 2005c).

El periodo febril asociado a la infección puede durar varios días hasta meses; mientras que las manifestaciones neurológicas pueden estar presentes por meses o años. En el caso específico de infecciones en humanos, la forma neuroinvasiva de la enfermedad representa un 9%. En el caso de los equinos, tienen mayor posibilidad de desarrollarla, sin conocer la causa a la que se deba esta mayor susceptibilidad. Los signos que se presentan en caballos con encefalitis son debilidad, ataxia, incremento en la temperatura corporal, movimientos anormales, anorexia, el rechinar de los dientes y finalmente la postración y muerte (Hayes *et al.*, 2005c).

3.3.2 Descripción Clínica

a) Humanos

La infección del VON en humanos causa manifestaciones subclínicas hasta la muerte. Las infecciones clínicas presentan una duración de 2-21 días después de la infección. Los casos sin manifestaciones neurológicas generalmente no requieren hospitalización, y son llamados Fiebre del Oeste del Nilo (FON), mientras que los neurológicos comúnmente comprenden meningoencefalitis, por lo que han sido llamados Meningoencefalitis del Oeste del Nilo (MON) (Petersen, y Marfin, 2004).

Asnis *et al.*, (2000) publicaron las observaciones en ocho pacientes con meningoencefalitis evaluados durante el brote de la ciudad de Nueva York en 1999. El cuadro clínico en este grupo fue similar al encontrado en Europa y el Medio Oriente. Los síntomas presentados fueron fiebre, síntomas gastrointestinales y cambio en el estado mental; la mitad de los pacientes presentó dolor de cabeza y debilidad muscular severa. Las manifestaciones clínicas en común fueron malestar general, fatiga, síntomas gastrointestinales, temblor, dolor abdominal, cambios sensorio-focales, faringitis, conjuntivitis, ataques y linfadenopatía. Causando hipertensión, diabetes mellitus y enfermedad de la arteria coronaria como problemas médicos secundarios (Komar, 2003a).

b) Equinos

La infección por el VON en caballos y otros equinos domésticos se clasifican desde asintomáticos hasta encefalitis fatal. Una alta proporción de caballos infectados desarrollan encefalitis comparados con los humanos. Estudios experimentales sugieren que cerca del 10% de los caballos infectados desarrollan la enfermedad clínica (Bunning *et al.*, 2002). En caballos naturalmente infectados, la infección del VON típicamente causa cambios de actitud (somnia, apatía, aprehensión, depresión, o hiperexcitabilidad) y signos neurológicos como paresis y parálisis. Las lesiones histológicas se observan en el tallo cerebral y materia gris (Komar, 2003a). Sin embargo, la vigilancia epidemiológica en los equinos en el continente Americano requiere del diagnóstico diferencial para otras encefalitis equinas encontradas en esta región, tales como Encefalitis Equina Venezolana, virus de la Encefalitis Equina del Este y Oeste, virus de la Encefalitis de San Luis y virus de la rabia (Fernández-Salas *et al.*, 2003).

c) Aves

La mortalidad atribuida a la infección del VON en Norte América ha sido reportada en 198 especies desde el 2002. Algunas especies de aves, especialmente los córvidos son altamente susceptibles. Generalmente los signos de infección incluyen letargia, recumbencia y en algunos casos, hemorragia (Komar *et al.*, 2003b). Swayne *et al.*, (2002) documentaron la postura anormal en un ganso doméstico (*Anser anser domesticus*).

A causa de los índices de infección natural en aves durante epizootias, la enfermedad en aves seropositivas podría ser difícil atribuirla a una infección por VON. Esto es particularmente un problema en aves cautivas en zoológicos y centros de rehabilitación en vida libre. En Norte América, mediante estudios histopatológicos se ha descrito la patogénesis natural, de la infección aguda del VON en aves de 14 especies, representada por ocho órdenes, y la infección experimental en gansos. La hemorragia cerebral, esplenomegalia, meningoencefalitis y miocarditis fueron las lesiones prominentes encontradas. Las células de Purkinge fueron particularmente el blanco de infección, excepto en córvidos. La causa de la muerte en muchas de estas aves fue probablemente por el deterioro múltiple de los órganos (Komar *et al.*, 2003b).

d) Otros vertebrados

Las manifestaciones clínicas causadas por el VON en otros vertebrados permanecen desconocidas, así como en réptiles, anfibios y otros mamíferos. En Norte América, caimanes cautivos han muerto por la infección del VON. Infecciones fatales han sido reportadas de manera informal desde el 2002 en aproximadamente 20 especies de mamíferos además de caballos y humanos (Komar *et al.*, 2003b).

3.4 Vacunas para la prevención del virus del Oeste del Nilo

3.4.1 Vacunas de virus inactivado

La vacunación con virus inactivados o modificados ha sido un mecanismo efectivo para la prevención de infecciones causadas por flavivirus en humanos y animales domésticos (Hoke *et al.*, 1988; Xin, 1988). Actualmente existen dos vacunas disponibles en el mercado para equinos contra el VON; la primera es de virus inactivado y se encuentra disponible en EUA para utilizarla en caballos (Fort Dogde®). La protección de la vacuna fue del 94% en los animales vacunados

ante un desafío por vía parenteral con el virus del Oeste del Nilo. En México, la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) desarrolló una vacuna con virus inactivado que al ser evaluada en caballos mostró buenos resultados de protección, pero requiere de varios refuerzos para otorgar protección (Davidson *et al.*, 2005).

Minke *et al.*, (2004) desarrollaron un canaripox (vCP2017) expresando los genes prM/E de la cepa aislada NY99 de VON. La capacidad protectora del vCP2017 fue probada en equinos vacunados a través de la picadura de mosquitos infectados. La vacuna indujo anticuerpos neutralizantes y confirió inmunidad por un año en los caballos. Posteriormente esta vacuna fue aprobada por la USDA para ser utilizada en esta especie.

3.4.2 Vacunas Experimentales

Davis *et al.*, (2001) evaluaron una vacuna de ADN (pCBWN) que contenía los genes *prM/E* del VON. Cuatro caballos fueron vacunados con una sola dosis vía intramuscular. Se monitoreo la producción de anticuerpos neutralizantes mediante la prueba de reducción de la neutralización en placa (PRNT), en donde los caballos vacunados desarrollaron títulos de anticuerpos de $\geq 1:5$ entre los 14 y 31 días post-vacunación. Para determinar si la vacuna podría proteger a los caballos de la infección fueron desafiados con aproximadamente 15 mosquitos infectados por el virus. Los caballos vacunados con el plásmido pCBWN permanecieron sanos después del desafío. En ninguno de ellos se detectó viremia o fiebre a los 14 días post-desafío, mientras que los caballos no vacunados presentaron la infección después de ser expuestos al virus, desarrollando siete de ellos viremia durante los primeros 6 días post-desafío.

Pletnev *et al.*, (2002) establecieron las bases para el desarrollo de una vacuna quimérica atenuada contra el VON. Construyeron 18 quimeras con un virus del Dengue tipo 4 (DEN4). Los genes para las proteínas estructurales prM y E del DEN4, fueron remplazados de la clona de cDNA por los genes correspondientes de la cepa NY99. Dos de las 18 clonas de la quimera WN/DEN4 produjeron transcritos completos de ARN que eran infecciosos cuando se transfectaban células susceptibles. Las dos clonas infecciosas compartían un motivo en el dominio transmembranal localizado inmediatamente río abajo de la proteasa NS2B-NS3 (sitio que separa la proteína de la cápside en el DEN4 y la proteína prM del VON en la quimera), a diferencia de las 16 quimeras

no infecciosas. La quimera WN/DEN4 fue 28,500 veces menos neurovirulenta en ratones destetados inoculados vía intracerebral y 10,000 veces menos virulento en ratones adultos inoculados vía intraperitoneal. La quimera WN/DEN4 confirió protección ante un desafío letal del VON.

Hall *et al.*, (2003) probaron una vacuna de ADN que contenía una mutación en la proteína NS1 del virus Kunjin (prolina-250/leucina) previamente atenuado en ratones destetados. El virus Kunjin fue aislado a partir de sangre de ratones inmunizados de 3-4 días después de la inoculación del DNA, demostrando que el ARN infeccioso fue transcrito en el sistema *in vivo*, sin embargo, ningún síntoma asociado al virus fue observado. Posteriormente 19 días post-inmunización, se detectaron anticuerpos neutralizantes en suero de los animales inmunizados. Los animales inmunizados fueron desafiados con una dosis letal de la cepa NY99 o un virus Kunjin silvestre vía intracerebral o intraperitoneal, los ratones inmunizados con 0.1-1 µg de plásmido fueron completamente protegidos contra el VON.

Pletnev *et al.*, (2003) desarrollaron una vacuna quimérica para el virus del Oeste del Nilo (WN/DEN4) la cual presentaba una deleción de 30 nucleótidos ($\Delta 30$) en la región no codificante 3' del virus del Dengue tipo 4. La viremia en monos vacunados con WN/DEN4-3' $\Delta 30$ se redujo al 100% comparada con los monos infectados con el virus del VON o Dengue. Los resultados indicaron que la sola quimerización y la presencia de la mutación $\Delta 30$, independientemente contribuyen a la atenuación fenotípica viral en primates no-humanos. A pesar de los elevados niveles de atenuación en monos, las quimeras indujeron títulos de anticuerpos neutralizantes de moderados a altos y previnieron la viremia en monos desafiados contra el VON.

Candela-Iglesias *et al.*, (2005) clonaron las proteínas prM y E en un lentivirus. En este reporte se encontraron resultados alentadores en ratones, al utilizar un vector viral como sistema de expresión para estos antígenos, ya que se indujo una respuesta inmune celular y la producción de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo los mismos autores destacan que la aplicación de este tipo de vacunas, involucra cuidados extensivos tanto en la producción como en su uso, debido a los riesgos durante su evaluación en la fase clínica.

Monath *et al.*, (2006) desarrollaron una vacuna recombinante ChimeriVax-WN02, construida de una clona del virus 17D de la Fiebre Amarilla, en la cual se remplazaron los genes de las proteínas prM y E del 17D por los del virus del Oeste del Nilo. Pruebas preclínicas en monos definieron los sitios de replicación *in vivo*. La vacuna ChimeriVax-WN02 y 17D de la Fiebre Amarilla presentan una distribución similar pero diferentes cinéticas de replicación. Los sitios prominentes de replicación fueron la piel y órganos linfoides. Los virus fueron aislados de sangre al día 7 y de órganos al día 14. En el estudio clínico, monos adultos fueron inoculados con 5.0×10^{10} unidades formadoras de placas (UFP) (n=30) o 3.0×10^{10} UFP (n=15) de ChimeriVax WN02, vacuna comercial YF (n=5) y placebo (n=30). La incidencia de eventos adversos en los animales que recibieron la vacuna fue similar a la del grupo placebo. La viremia transitoria fue detectada en 42 de los 45 animales vacunados con ChimeriVax-WN02 (93%) y cuatro de cinco animales vacunados con YF-Vax (80%). Todos los animales desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra el virus del Oeste del Nilo, la vacuna ChimeriVax-WN02 rápidamente indujo una respuesta inmune después de haber administrado una sola dosis.

Watts *et al.*, (2007) midieron la eficacia de una vacuna recombinante para el virus del Oeste del Nilo en hámster. Los grupos de hámsteres fueron inmunizados vía subcutánea con la proteína de envoltura recombinante (80 μ g de E) con/sin la proteína NS1. Los animales vacunados fueron desafiados vía intraperitoneal con una cepa virulenta a las 2 semanas, 6 meses y 12 meses post-vacunación. Los resultados para ambos tratamientos fueron similares, en ninguno de los casos se detectaron niveles de viremia post-desafío, tanto para los desafiados a las 2 semanas como a los 6 meses. En contraste, el porcentaje de mortalidad en los animales desafiados a las 2 semanas fue del 73%, mientras que para los desafiados a los 6 meses fue del 53% comparados con el grupo control. Cuando se desafiaron 12 meses post-vacunación, se detectaron bajos niveles de viremia en algunos de los hámsteres vacunados, presentándose un solo caso de la enfermedad. En comparación con el grupo control el índice de mortalidad fue del 77%.

Lieberman *et al.*, (2007) utilizaron como sistema de expresión células de *Drosophila* S2 para la expresión de la proteína troncada de envoltura (80E) y NS1 del virus del Oeste del Nilo. Las proteínas purificadas fueron utilizadas en conjunción con el adyuvante ISCOMATRIX®, utilizando un esquema de vacunación en ratones con 1, 3 y 10 μ g de la proteína 80 E, y 0, 0.3 y 1

µg de la proteína NS1. Los ratones fueron monitoreados para medir la respuesta inmune humoral y celular por la prueba de reducción de la neutralización en placa y ELISA, además de medir la proliferación de linfocitos y la producción de citocinas. Los resultados revelaron que las proteínas 80E y la proteína NS1 indujeron altos títulos de anticuerpos neutralizantes. Los esplenocitos de los ratones inmunizados, mostraron proliferación y la producción de citocinas (INF- γ , IL-4, IL-5 e IL-10). El nivel de proliferación de linfocitos y la producción de citocinas estimulados por el antígeno vacunal 80E y NS1 fueron comparables a los niveles obtenidos por la estimulación con el mitógeno (fitohemaglutinina) indicando una robusta respuesta celular.

Jang-Hann *et al.*, (2007) expresaron el dominio III de la proteína E del virus del Oeste del Nilo (WNVE III). La inmunización con la proteína recombinante fue administrada por vía intraperitoneal utilizando como adyuvante oligodeoxinucleótido (CPG-DNA) durante un periodo de tres semanas (3 inyecciones). Los ratones inmunizados generaron altos niveles de anticuerpos neutralizantes. El isotipo de IgG fue predominantemente IgG2a en los sueros murinos. Los cultivos de esplenocitos de los ratones vacunados con la proteína WNV E III, secretaron una amplia cantidad de INF- γ e IL-2 y mostraron proliferación de células T en presencia de la proteína WNV E III, desarrollando un tipo de respuesta inmune tipo Th1 contra el virus del Oeste del Nilo.

3.5 Las vacunas comestibles

A lo largo de la historia, se ha observado que la forma más eficaz de controlar y en algunos casos erradicar las enfermedades infecciosas es la vacunación. Mediante técnicas de biología molecular se ha contribuido en el desarrollo de nuevas estrategias para la producción de vacunas. Estas comprenden a las proteínas derivadas de agentes patógenos tales como virus, bacterias y parásitos. El cultivo de tejidos vegetales ha desarrollado diversos métodos como herramientas para la propagación clonal, hibridación somática, células en suspensión y protoplastos, para su transformación genética comenzando una función vital en el establecimiento de organismos de producción alternos (Tiwari *et al.*, 2009).

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 la planta como hoja, semillas, raíz y frutos pueden ser utilizadas en la elaboración de productos biomédicos. Las vacunas de subunidades consisten en macromoléculas específicas que inducen una respuesta inmune protectora contra el agente patógeno. Estas vacunas son la consecuencia de la localización de antígenos responsables o involucrados en la inducción de la respuesta inmune protectora, el aislamiento de los genes correspondientes, y la producción de la proteína recombinante en el sistema de expresión. Estos avances en la ingeniería genética han hecho posible la introducción de genes exógenos a muchas especies vegetales como los cereales o las legumbres. Esta ventaja 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”. La producción de antígenos por este sistema resulta más atractiva ya que estas proteínas sufren procesos postraduccionales, como la glicosilación o la proteólisis que pueden optimizar su función (Faye *et al.*, 2005).

Actualmente, se han desarrollado una amplia variedad de vacunas comestibles de interés veterinario, donde se han obtenido resultados prometedores en las especies blancos para las cuales han sido diseñadas. Entre ellas se incluyen la expresión de los péptidos del virus epidémico de la diarrea porcina (PEDV) (COE) y (CO-26) en papa y tabaco, la glicoproteína S de la gastroenteritis transmisible del cerdo en maíz, papa, hojas de *Arabidopsis* y tabaco; la región antigénica (ESAT-6) de *M. tuberculosis* en hojas de *Arabidopsis thaliana*; la glicoproteína G del virus de la rabia en cacahuate, tabaco, jitomate, espinaca, zanahoria y maíz; el antígeno de superficie (SpaA) de *Erysipelothrix rhusopathiae* en tabaco; la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle en arroz y maíz; la leucotoxina (LKT) de *Manhemia haemolítica* en hojas de trébol blanco; la proteína de la cápside (VP2) del parvovirus canino en hojas de *Arabidopsis*, virus del mosaico de chícharo y tabaco; la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSVG) en tabaco; la proteína estructural VP60 del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHVD) en papa; la variante HA1/H5 del virus de la influenza aviar HA1/H5 en tabaco; la glicoproteína capsular antifagocítica (F1) de *Yersina pestis* en tabaco y jitomate; la proteína de la cápside del virus de Norwalk en tabaco y papa; la proteína de la cápside (VP2) del virus de la enteritis del mono (virus del mosaico del chícharo); la glicoproteína S del virus de la

hepatitis murina (virus del mosaico del tabaco); la proteína estructural VP1 del virus de la enfermedad Foot & Mouth en *Arabidopsis*, alfalfa, virus del mosaico del chícharo, virus del mosaico del tabaco y papa (Wigdorovitz *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2005; Dus Santos *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005; Tacket, 2005; Tiwari *et al.*, 2009) (Tabla 2).

Entre las vacunas comestibles para uso humano se encuentran la subunidad enterotoxigénica termolábil de *E. coli* en tabaco, papa y maíz; la subunidad B de *V. cholerae* en papa; la subunidad A del pilus estructural de *E. coli* entreopatógena en tabaco; la subunidad B de *V. cholerae* en tabaco, papa y jitomate; el antígeno de superficie del virus de la hepatitis humana en hojas y cultivos celulares de tabaco, papa, callos de lupin (leguminosa), soya y lechuga; la hemaglutinina del virus de sarampión en tabaco; las proteínas gp41, gp120 y el péptido V3 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo I en virus del mosaico de alfalfa, chícharo y tabaco; la proteína G y de fusión del virus respiratorio sincitial en jitomate y tabaco; el péptido D2 de fibronectina de *Staphylococcus aureus* en tabaco y virus del mosaico de chícharo; la proteína F de *Pseudomonas aeruginosa* en el virus del mosaico de tabaco; el péptido de circunsporozoito de *Plasmodium falciparum* en tabaco; la oncoproteína del papilomavirus humano tipo 16 en tabaco, entre otros (Streatfield, 2003; Tiwari *et al.*, 2009) (Tabla 2).

Los niveles de expresión varían enormemente dependiendo de la proteína a expresar y la elección del tipo de planta utilizada. La especificidad del sistema de expresión muestra una fuerte influencia en los niveles de producción del antígeno. Factores como el genoma (núcleo Vs plásmido) (Daniell *et al.*, 2001), las características del promotor (Chikwamba *et al.*, 2002), la elección de secuencias líder, el procesamiento del mensaje (Richter *et al.*, 2000) y la presencia de órganos blanco para la expresión de proteínas en la célula vegetal (Ritcher *et al.*, 2000; Streatfield *et al.*, 2003) entre otros, son algunos de los aspectos que pueden afectar el nivel de expresión.

La importancia de expresar antígenos en genomas vegetales, ha sido con el objetivo de producir vacunas de subunidades (Dalsgaard *et al.*, 1997; Brennan *et al.*, 1999) (Tabla 2).

Tabla 2. Vacunas de Subunidad Expresadas en Plantas para uso Humano y Veterinario

| Patógeno/Hospedero | Antígeno | Sistema | Expresión | Referencia |
|---|---|------------------------------|--------------------------|---|
| Cepa Enterotoxigénica de <i>E. coli</i> / humano y cultivos animales | Toxina B Termo-lábil | Tabaco | 0.001% PST/0.0002% Pf | Haq <i>et al.</i> , 1995 |
| Cepa Enterotoxigénica de <i>E. coli</i> / humano y cultivos animales | Toxina B Termo-lábil | Papa | 0.2% PST/0.001% Pf | Haq <i>et al.</i> , 1995; Mason <i>et al.</i> , 1995; Tacket <i>et al.</i> , 1998; Lauterslager <i>et al.</i> , 2001 |
| Cepa Enterotoxigénica de <i>E. coli</i> / humano y cultivos animales | Toxina B Termo-lábil | Maíz | 10% PST/0.1% P | Streatfield <i>et al.</i> , 2001; Chikwamba <i>et al.</i> , 2002; Lamphear <i>et al.</i> , 2002; Streatfield <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>V. cholera</i> /humano | Toxina de Cólera (CTB) | Papa | 0.3% PST/0.002% Pf | Arakawa <i>et al.</i> , 1997, 1998 |
| <i>E. coli</i> Enteropatógena/humano | Pilus estructural sub. A | Tabaco | 8% PST/ 1% Pf | da Silva <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>V. cholerae</i> /humano | Toxina de Cólera (CTB) | Tabaco | 4% PST/ 0.5% Pf | Daniell <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>V. cholerae</i> /humano | Toxina de Cólera (CTB) | Jitomate | 0.04% PST/0.005% Pf | Jani <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>V. cholerae</i> , rotavirus, cepa Enterotoxigénica de <i>E. coli</i> /humano | Toxina de Cólera B fusionada con la enterotoxina NSP4 de rotavirus Toxina de cólera A fusionada con el factor de colonización fimbrial de <i>E. coli</i> CFA/1 | Papa | 0.003% Pf | Yu y Langridge, 2001 |
| Virus de la Hepatitis B/humano | Antígeno de Superficie | Tabaco | 0.007% PST/ 0.0008% Pf | Mason <i>et al.</i> , 1992; Thanavala <i>et al.</i> , 1995 |
| Virus de la Hepatitis B/humano | Antígeno de Superficie | Papa | 0.002% Pf | Richter <i>et al.</i> , 2000; Kong <i>et al.</i> , 2001 |
| Virus de la Hepatitis B/humano | Antígeno de Superficie | Callo de lupino | 0.00002% Pf | Kapusta <i>et al.</i> , 1999 |
| Virus de la Hepatitis B/humano | Antígeno de Superficie | Lechuga | 0.0000006% Pf | Kapusta <i>et al.</i> , 1999 |
| Virus de la Hepatitis B/humano | Antígeno de Superficie | Papa | 0.006% PST/ 0.00004% Pf | Ehsani <i>et al.</i> , 1997 |
| Virus de la Hepatitis B/humano | Antígeno de Superficie | Cultivos celulares de soya | 0.007% Pf | Smith <i>et al.</i> , 2002 |
| Virus de la Hepatitis B/humano | Antígeno de Superficie | Cultivos celulares de Tabaco | 0.0008% Pf | Smith <i>et al.</i> , 2002 |
| Virus de la Hepatitis B/humano | Proteína Intermedia | Papa | 0.001% PST/ 0.000009% Pf | Ehsani <i>et al.</i> , 1997 |
| Virus de la Hepatitis C/humano | Región hipervariable 1 de la proteína 2 fusionada con la subunidad B de la de cólera | Tabaco | 0.04% PST/0.005% Pf | Nemchinov <i>et al.</i> , 2000 |
| Virus Norwalk/humano | Proteína de la Cápside | Tabaco | 0.2% PST/0.03% Pf | Mason <i>et al.</i> , 1996 |

Tabla 2. (Continuación)

| Patógeno/Hospedero | Antígeno | Sistema | Expresión | Referencia |
|---|---|--------------------|-----------------------|--|
| Sarampión/humano | Hemaglutinina | Tabaco | Datos no publicados | Huang <i>et al.</i> , 2001; Webster <i>et al.</i> , 2002 |
| Virus de la Inmunodeficiencia tipo I/humano | Péptido de la proteína gp41 | Chícharo | Datos no publicados | Porta <i>et al.</i> , 1994 |
| Virus de la Inmunodeficiencia tipo I/humano | Péptido V3 Proteína gp120 | Tabaco | Datos no publicados | Yusibov <i>et al.</i> , 1997 |
| Virus de la Inmunodeficiencia tipo I/humano | Péptido V3 Proteína gp120 | Jitomate | 0.03% Pf | Joelson <i>et al.</i> , 1997 |
| Virus de la Inmunodeficiencia tipo I/humano | Péptido de la proteína transmembranal gp41 | Chícharo | 2% TPV/0.002% | McLain <i>et al.</i> , 1996; Durrani <i>et al.</i> , 1998; Mc Inerney <i>et al.</i> , 1999 |
| Virus de la Inmunodeficiencia tipo I/humano | Péptido de la proteína transmembranal gp41 | Tabaco | Datos no publicados | Marusic <i>et al.</i> , 2001 |
| Virus de la Inmunodeficiencia tipo I/humano | Proteína de la Nucleocápside p24 | Tabaco | 0.4% PST/0.05% Pf | Zhang <i>et al.</i> , 2000; 2002 |
| Citomegalovirus/humano | Glicoproteína B | Semillas de Tabaco | 0.01% PST/0.00007% Pf | Tackaberry <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Rhinovirus tipo 14</i> /humano | Péptido de la proteína VP1 | Chícharo | Datos no publicados | Porta <i>et al.</i> , 1994 |
| Virus Sincitial Respiratorio/humano | Peptido dela proteína G | Tabaco | 0.006% Pf | Belanger <i>et al.</i> , 2000 |
| Virus Sincitial Respiratorio/humano | Proteína de fusión | Jitomate | 0.0003% Pf | Sandhu <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> /humano | Péptido D2 de fibronectina unido a la proteína FnBP | Chícharo | 4% TPV/0.005 Pf | Brennan <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> /humano | Péptido D2 de fibronectina unido a la proteína FnBP | Papa | 2% TPV/0.0003 Pf | Brennan <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /humano | Proteína F | Chícharo | 4% TPV/0.005% Pf | Brennan <i>et al.</i> , 1999; Gilleland <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /humano | Proteína F | Tabaco | Datos no publicados | Staczek <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Plasmodium falciparum</i> (malaria)/humano | Péptidos de circumporozoito | Tabaco | 0.003% Pf | Turpen <i>et al.</i> , 1995 |
| Papilomavirus tipo 16/humano | Oncoproteína E7 | Tabaco | 0.0004% Pf | Franconi <i>et al.</i> , 2002 |
| Virus Norwalk/humano | Proteína de la cápside | Papa | 0.4% PST/ 0.003% Pf | Mason <i>et al.</i> , 1996; Tacket <i>et al.</i> , 2000 |
| Virus Norwalk/humano | Proteína VP6 | Tabaco | 0.005% Pf | O'Brien <i>et al.</i> , 2000 |

Tabla 2. (Continuación)

| Patógeno/Hospedero | Antígeno | Sistema | Expresión | Referencia |
|---|---|-----------------|------------------------|--|
| Linfoma de células B/humano | Cadena Simple Fv fragmento de | Tabaco | 0.003% Pf | McCormick <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | Antígeno Protector | Tabaco | Datos no publicados | Aziz <i>et al.</i> , 1994 |
| Virus de la Rabia/humano | Péptidos de la glicoproteína | Tabaco y | 10% TPV/0.0005% Pf | Yusibov <i>et al.</i> , 1997; |
| Animales domésticos y silvestres | y nucleocápside | Espinaca | | Modelska <i>et al.</i> , 1998; Yusibov <i>et al.</i> , 2002 |
| Virus de la Rabia/humano | Glicoproteína | Jitomate | 1% PST/ 0.1%Pf | McGarvey <i>et al.</i> , 1995 |
| Animales domésticos y silvestres | | | | |
| Virus Food & Mouth disease/animales | Proteína estructural VP1 | Arabidopsis | Datos no publicados | Carrillo <i>et al.</i> , 1998 |
| Virus Food & Mouth disease/animales | Proteína estructural VP1 | Alfalfa | Datos no publicados | Wigdorovitz <i>et al.</i> , 1999 |
| Virus Food & Mouth disease/animales | Proteína estructural VP1 fusionada a β -glucuronidasa | Alfalfa | 0.004% PST/0.0005% Pf | Dus Santos <i>et al.</i> , 2002 |
| Virus Food & Mouth disease/animales | Proteína estructural VP1 | Chícharo | Datos no publicados | Usha <i>et al.</i> , 1993 |
| Virus Food & Mouth disease/animales | Proteína estructural VP1 | Tabaco | 0.02% Pf | Wigdorovitz <i>et al.</i> , 1999 |
| Virus Food & Mouth disease/animales | Proteína estructural VP1 | Papa | 0.01% PST/0.001% Pf | Carrillo <i>et al.</i> , 2001 |
| Virus de la Gastroenteritis transmisible/cerdo | Glicoproteína S | Papa | 0.07% PST/0.005% Pf | Gómez <i>et al.</i> , 2000 |
| Virus de la Gastroenteritis transmisible/cerdo | Glicoproteína S | Tabaco | 0.2% PST/0.03 Pf | Tuboly <i>et al.</i> , 2000 |
| Virus de la Gastroenteritis transmisible/cerdo | Glicoproteína S | Semilla de Maíz | 2% PST/0.02 Pf | Streatfield <i>et al.</i> , 2001; Lamphear <i>et al.</i> , 2002 |
| Rotavirus Bovino grupo A/bovinos | Proteína VP6 | Papa | 0.002% PST/0.00001% Pf | Matsumura <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Mannheimia haemolítica</i> (pasteurelisis)/bovinos | Leucotoxina fusionada a GFP | Ajo | 0.5% PST/ 0.0009% Pf | Lee <i>et al.</i> , 2001 |
| Virus de la enfermedad hemorrágica/conejo | Proteína estructural VP60 | Papa | 0.3% PST/ 0.04% Pf | Castanon <i>et al.</i> , 1999 |
| Virus de la enfermedad hemorrágica/conejo | Proteína Estructural VP60 | Tabaco | Datos no publicados | Fernández-Fernández <i>et al.</i> , 1998 |
| Parvovirus canino/perro | Proteína de la cápside VP2 | Tabaco | Datos no publicados | Fernández-Fernández <i>et al.</i> , 1998 |
| Parvovirus canino/perro | Proteína de la cápside VP2 | Arabidopsis | 0.1% PST/ 0.003% Pf | Gil <i>et al.</i> , 2001 |
| Parvovirus canino/perro | Proteína de la cápside VP2 fusionada a β -glucuronidasa | Chícharo | 2% TPV/ 0.002% PF | Langeveld <i>et al.</i> , 2001; Nicholas <i>et al.</i> , 2001 |
| Virus de hepatitis murina/ratón | Glicoproteína S | Tabaco | Datos no publicados | Koo <i>et al.</i> , 1999 |

PST, Proteína soluble total; Pf, Peso fresco; TPV, Tamaño de la partícula viral (Streatfield *et al.*, 2003 (b); Tiwari *et al.*, 2009).

3.6 El sistema Inmune Mucosal

La inducción de la respuesta inmune mucosal inicia con el reconocimiento del antígeno por células especializadas llamadas células-M. Estas células están localizadas en las membranas mucosales o tejidos linfoides como las placas de Peyer en el intestino delgado. Las células-M conducen el antígeno por el tejido subalterno a las células presentadoras de antígenos (APC) que interna y procesan al antígeno. El resultado de la presentación de los epitopos antigénicos en las células APC de superficie y con la asistencia de células T colaboradoras, activan las células B. Las células B activadas migran a los linfonodos mesentéricos donde maduran dentro de las células plasmáticas y migran a las membranas mucosales para secretar inmunoglobulina A (IgA). Sobre el transcurso a través de la superficie epitelial mucosal hacia el lumen, el complejo de las moléculas de IgAs, la membrana secreta componentes para formar IgAs secretora (IgAs). Transportadas dentro del lumen, las IgA secretoras interactúan con los epitopos antigénicos y neutralizan la invasión de patógenos. Las vacunas derivadas de plantas inducen ambas respuestas, la respuesta mucosal y la respuesta inmune sistémica. Los niveles inducidos de IgA e IgG en suero proveen la capacidad de disminuir los síntomas clínicos causados por una infección con una cepa de virus atenuada de rabia (Walmsley y Arntzen, 2000). Las vacunas que estimulan la inmunidad mucosal presentan diferentes ventajas contra las vacunas tradicionales entre ellas se incluyen: 1) el potencial de conferir inmunidad sistémica y mucosal; 2) incremento en la estabilidad del biológico; 3) incremento de la vida media y 4) la eliminación de agujas y la necesidad de personal calificado en salud pública y especialistas en la administración de vacunas (Freytag y Clements, 2005).

3.7 La Transformación Genética de Maíz

Los primeros cereales transgénicos se obtuvieron por medio de la electroporación y tratamiento de los protoplastos con polietilenglicol. Estos ensayos fueron llevados con maíz, arroz y pastos forrajeros. Hasta 1990, estos métodos permanecieron como la vía principal para transformar monocotiledóneas. Posteriormente, el desarrollo del bombardeo de partículas permitió obtener plantas fértiles y se convirtió en el sistema más utilizado para transformar cereales.

El maíz es un sistema establecido con altos niveles de expresión y producción comercial de proteínas recombinantes y antígenos (Hood y Jilka, 1999). La comercialización de proteínas recombinantes como la avidina y la β -glucuronidasa purificadas de maíz, ha demostrado el potencial a gran escala para la producción de proteínas de uso terapéutico que conservan su integridad estructural y su actividad biológica (Hood *et al.*, 1997; Witcher *et al.*, 1998; Lamphear *et al.*, 2002). De esta manera, uno de los principales objetivos de la transformación del maíz ha sido la expresión de antígenos de patógenos de humanos y animales. Se ha demostrado que los granos son un excelente sistema para el suministro de vacunas comestibles, ya que el antígeno puede permanecer durante largos periodos de tiempo sin la necesidad de refrigerar. La semilla de maíz es un sitio de almacenamiento natural de proteínas que podría ser aprovechado como un poderoso vehículo para la liberación de antígenos por vía oral (Lamphear *et al.*, 2002). La bioencapsulación natural de las proteínas en el maíz, incrementa la vida media del antígeno en el intestino y promueve su liberación en la superficie mucosal (Modelska *et al.*, 1998; Bailey, 2000; Streatfield *et al.*, 2001; Streatfield *et al.*, 2002; Lamphear *et al.*, 2002; Guerrero-Andrade *et al.*, 2006). Los antígenos que han sido expresados en maíz son los siguientes: la subunidad B de la toxina de *Escherichia coli* y la proteína S del virus de la gastroenteritis del cerdo (Streatfield *et al.*, 2001); la proteína G del virus de la rabia (Loza-Rubio *et al.*, 2008b), Gómez-Núñez, 2007); la proteína F del virus de Newcastle (Guerrero-Andrade *et al.*, 2006) (Tabla 3).

Tabla 3. Vacunas de subunidad expresadas en maíz.

| Patógeno/Hospedero | Antígeno | Sistema | Expresión | Referencia |
|---|-------------------------------------|---------|-----------------|---|
| Virus de la Rabia/animales | Proteína G | Maíz | 1.0% PST | Loza-Rubio <i>et al.</i> , 2008 |
| Virus de la enfermedad de Newcastle/aves | Proteína F | Maíz | 0.95% a 3% | Guerrero-Andrade <i>et al.</i> , 2006 |
| Coronavirus TEGV/cerdo | Glicoproteína S | Maíz | 2% PST/0.02% Pf | Streatfield <i>et al.</i> , 2001; Lamphear <i>et al.</i> , 2002 |
| Cepa Enterotoxigénica de <i>E. coli</i> /humano y cultivos animales | Subunidad B de la toxina termolábil | Maíz | 10% PST/0.1% Pf | Streatfield <i>et al.</i> , 2001; Chikwamba <i>et al.</i> , 2002, Lamphear <i>et al.</i> , 2002; Streatfield <i>et al.</i> , 2003 |

PST, Proteína Soluble Total; Pf, Peso fresco

3.7.1 Los callos embriogénicos de maíz

El callo embriogénico de maíz ha sido clasificado como tipo I y tipo II. El callo embriogénico tipo I describe un callo compacto, nodular y embriogénico, el cual prolifera como una mezcla de tejido complejo exhibiendo estructuras escutelares que generan embriones somáticos. Este callo es blanco y opaco, relacionado con su contenido de almidón. Del callo tipo I se pueden regenerar plantas, pero a diferencia del tipo II, no puede mantener la capacidad regenerativa por un año de tal manera que su propagación no se puede mantener por periodos prolongados. La regeneración de plantas a partir de este tipo de callo se da por la germinación del embrión (Emons y Kieft, 1995).

El callo tipo II es friable, embriogénico, de crecimiento rápido con la presencia de numerosos embriones somáticos globulares (cuyo desarrollo es muy similar al cigótico) adheridos al callo por medio del suspensor; de color blanco a amarillento, como fue observado por Green Rhodes (1982), mantiene su capacidad tanto embriogénica como regenerativa por periodos largos: El callo tipo II se inicia directamente del escutelo y puede proliferar en toda la superficie del escutelo o bien, en otras ocasiones, únicamente en pequeños sectores (Emons y Kieft, 1995; Jiménez-Villalobos, 2006).

La elección del callo embriogénico tipo II obedeció a las siguientes razones: este tipo de callo es suave y prolifera en un alto índice más que el callo tipo I, esto constituye un factor que puede contribuir a una alta densidad de células transformadas y un mejor índice de propagación del tejido transgénico (Aulinger *et al.*, 2003). Además de cumplir con los requisitos necesarios de un sistema celular receptor: 1) las células blanco son accesibles o competentes para la introducción del ADN exógeno; 2) las células blanco son competentes a una transformación integrativa por la introducción de ADN durante el ciclo celular y la capacidad para la recombinación; 3) las células son capaces de sostener la división celular después de la transformación para permitir el desarrollo de un sector clonal transformado que pueda ser seleccionado y; 4) aquellos sectores clonales tienen la capacidad morfogenética para la regeneración de plantas fértiles (Kausch *et al.*, 1995; Jiménez-Villalobos, 2006).

3.7.2 Expresión del gen reportero *uidA* en plantas

Entre los genes reporteros disponibles, el gen *uidA* (β -glucuronidasa) es el más utilizado en la transformación de plantas, a pesar de que este tipo de ensayo es de naturaleza destructiva. La proteína β -glucuronidasa (GUS) es una hidrolasa obtenida a partir de la bacteria intestinal *Escherichia coli* que cataliza la hidrólisis de una gran variedad de β -glucurónidos, la cual se encuentra codificada por un gen denominado *uidA*. La expresión del gen *uidA* en plantas genéticamente modificadas depende directamente de las características de la secuencia promotora unida al gen. En el caso de promotores constitutivos, la enzima GUS podría estar presente en todas las células de la planta. La cantidad de enzima por célula depende en la actividad del promotor. La acumulación de la enzima ocurre dentro del citoplasma, la cual no se encuentra sujeta a modificaciones postraduccionales (Jefferson y Wilson, 1991). Con la colaboración de un péptido que se une a la secuencia codificadora del transgén, el GUS es transportado a través de la membrana del retículo endoplásmico (Gillisen *et al.*, 1998).

Si bien la unión de glucurónidos naturales no produce productos coloreados, existen glucurónidos obtenidos artificialmente que cuando son unidos a la enzima β -glucuronidasa liberan productos coloreados o fluorescentes. Uno de estos sustratos es el glucurónido di-metil umbeliferona (MUG) que al ser unido con la enzima β -glucuronidasa se libera metilumbeliferona (MU), éste puede ser detectado con alta sensibilidad gracias a su fluorescencia. Otro sustrato de la β -glucuronidasa es el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico (X-Gluc®). Al ser unido a la enzima de un intermediario indoxilo inestable, incoloro, sufre una dimerización oxidativa para dar el producto final dicloro-dibromo índigo, de color azul e insoluble en agua.

El X-Gluc® no es tan barato como el glucurónido di-metil umbeliferona, y al no fluorescer tiene una sensibilidad de detección menor. Sin embargo, es ideal para la detección histoquímica de la β -glucuronidasa, ya que al ser hidrolizado por esta enzima se forma un precipitado insoluble que no se difunde fuera del tejido aún cuando se someta a procesos de fijación.

Para resumir, el MUG se utiliza para la medición precisa de la actividad en extractos crudos de tejidos, mientras que el X-Gluc® se usa para detección histoquímica del patrón de expresión de promotores génicos en diversos tejidos (Figura 7).

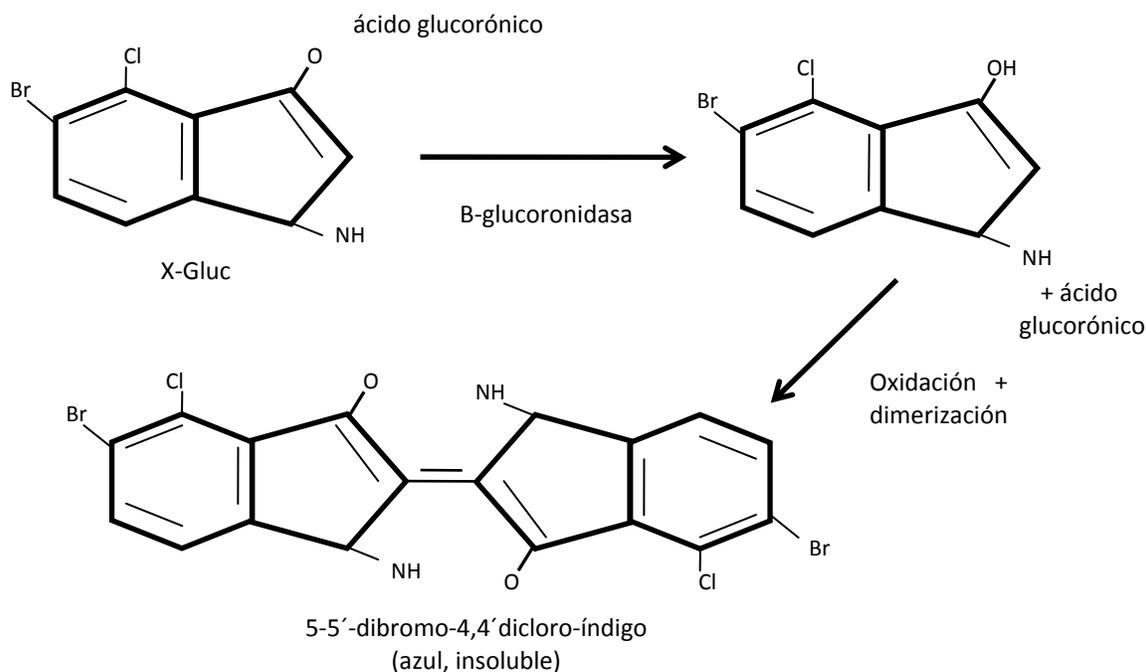


Figura 7. Reacción de hidrólisis del sustrato cromogénico X-Gluc® (incoloro), que da como producto final el compuesto colorido 5-5'-dibromo-4-4'dicloro-índigo (de color azul) (Jefferson RA, 1987).

Una amplia variedad de glucuronidos se encuentran disponibles comercialmente y podrían ser utilizados en análisis fluorométricos, espectrofotométricos, luminométricos e histoquímicos, tanto cualitativos, como cuantitativos (Gallagher, 1992; Jefferson, 1993). La actividad endógena de la β -glucoronidasa que podría ser responsable del incremento de la actividad enzimática podría ser fácilmente eliminada por tratamientos simples, como el incremento en el pH, la adición de metanol en el buffer de reacción o tratamiento con calor (Kosugi *et al.*, 1990; Jefferson y Wilson, 1991; Hansch *et al.*, 1995; Gillisen *et al.*, 1998).

3.7.3 Resistencia al glufosinato de amonio

El metabolismo endógeno del glufosinato en plantas es limitado y su degradación puede ser demasiado lenta, antes de que el herbicida cause lesión o la planta muera (Komoba y Sandermann, 1992; Muller *et al.*, 2001; OECD, 2002). Por lo tanto los genes exógenos tienen que ser insertados para codificar una enzima que pueda desintoxicar al L-glufosinato rápidamente. La enzima es llamada fosfinotricin N-acetiltransferasa (PAT). La PAT puede convertir rápidamente al L-glufosinato al metabolito no fitotóxico N-acetil-L-glufosinato (NAG) mediante la acetilación del glufosinato, reduciendo o eliminando la posibilidad de que el glufosinato inhiba a la glutamina sintetasa (GS) (Figura 7) (D'Halluin *et al.*, 1992; Drogue *et al.*, 1992; Rasche, 1995; Vasil, 1996; Muller *et al.*, 2001; OECD, 2002; Ruhland *et al.*, 2004). El herbicida en su forma inactiva D-Glufosinato parece estar estable en las plantas debido a la acetilación L-específica de la enzima PAT (Drogue *et al.*, 1992; Tan, 2005; 2006).

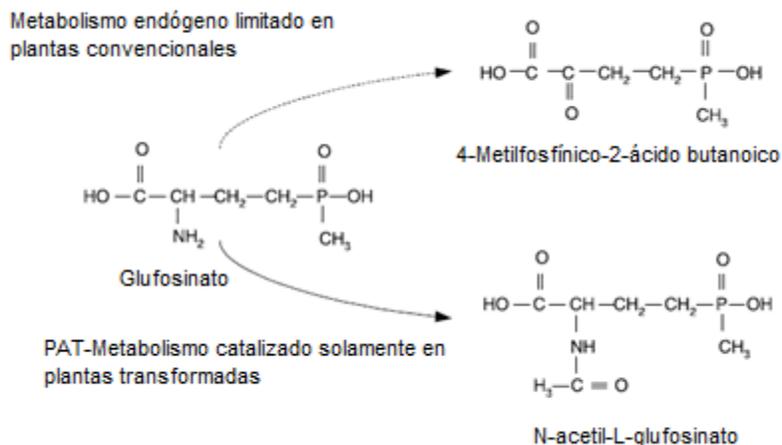


Figura 8. Plantas transformadas tolerantes al glufosinato de amonio que contienen la enzima PAT codificada por el gen *bar* o *pat*. La enzima PAT desintoxica rápidamente al glufosinato mediante la acetilación de este compuesto.

Dos tipos de genes han sido utilizados para transformar cultivos tolerantes al glufosinato. Uno de los genes, llamado *bar* aislado de *Streptomyces hygroscopicus* y el gen *pat* aislado de *S. viridochromogenes* que codifican para la enzima PAT (Rasche, 1995; Vasil, 1996; Wehrmann *et al.*, 1996; Tan, 2006) Los dos genes son altamente similares aunque provienen de diferentes especies (Vasil, 1996). La enzima PAT codificada por los genes *bar* y *pat* son funcional y estructuralmente equivalentes y dentro de las plantas presentan un funcionamiento similar en las plantas transgénicas (Wehrmann *et al.*, 1996). Si la enzima PAT es utilizada como marcador de selección en plantas transgénicas, niveles inferiores de la actividad de PAT son requeridas comparados a los niveles requeridos en cultivos tolerantes al glufosinato (OECD, 2002). Se han comercializado diversas especies tolerantes al glufosinato tales como maíz, algodón y canola (Duke, 2005). Sin embargo, la mayoría de los cultivos actualmente han sido transformados con el gen *bar* y *pat* por ser excelentes marcadores para la transformación (Dekler y Duke, 1995; Duke *et al.*, 2002; Tan, 2006).

IV. Justificación

En México hasta el 2003 se habían reportaron las primeras evidencias serológicas de la circulación del virus del Oeste del Nilo (VON) en caballos y aves de 12 estados y 57 municipios. Así mismo para el 2005 se tenían notificados 14 aislamientos procedentes de los estados de Tabasco, Tamaulipas, Sonora y Baja California. Aunque en humanos no se han detectado casos de infección los expertos en Vectores de la Secretaría de Salud sugieren que en nuestro país esta pudiera ser la etapa previa a la aparición de brotes y que el virus se este adaptando a la ecología de los diferentes escenarios. El alto índice de diseminación del virus plantea un serio problema en salud pública y veterinaria en los siguientes años, si se considera que las vacunas disponibles en el mercado son derivadas de virus inactivado (Fort Dogde® y EquiVON®). El principal inconveniente de este tipo de inmunógenos es que al ser empleada en nuestro país, no se podría llevar a cabo una diferenciación entre los animales que han sido vacunados y los que pudieron haber adquirido la infección en el campo, es por esto que resulta indispensable la elaboración de inmunógenos de nueva generación. La biotecnología basada en plantas permite la obtención de productos con alto valor farmacéutico como vacunas, proteínas terapéuticas, enzimas y sustancias químicas específicas, dentro de esta rama los callos embriogénicos han sido de los explantes comúnmente utilizados para la expresión de proteínas recombinantes, por ser un sistema particularmente útil para la transformación por biobalística y la producción de plantas transgénicas. En la actualidad se han expresado proteínas antigénicas de interés veterinario en plantas de maíz, considerándolo un sistema de expresión idóneo para la producción comercial de proteínas recombinantes que conservan su integridad estructural y su actividad inmunológica. Debido a esto el objetivo de este trabajo fue la expresión de la proteína E del virus del oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz tipo II ya que las vacunas orales muestran diversas ventajas como son: una fácil manipulación genética, el no requerir de rigurosa cadena fría y solamente manejar los genes responsables de promover la inmunidad humoral y celular.

V. Hipótesis

- Si se transforman callos embriogénicos de maíz con la construcción INIFAP-VON 3301 que codifica al gen *E* del Virus del Oeste del Nilo, entonces se generará un cereal transgénico que exprese a la proteína recombinante.

VI. Objetivo

6.1 Objetivo General

- Generar y caracterizar callos embriogénicos de maíz transgénicos que expresen la proteína E del virus del Oeste del Nilo.

6.2 Objetivos específicos

- Purificar y amplificar la construcción INIFAP-VON 3301.
- Transformar callos embriogénicos de maíz tipo II mediante biobalística.
- Mantener y proliferar callos de maíz tipo II transformados con el gen *E* del virus del Oeste del Nilo.
- Expresión transitoria del gen reportero β -glucuronidasa en callos transformados con el plásmido INFAP-VON 3301 mediante pruebas histoquímicas y Western blot.
- Identificar la expresión del gen *E* del Virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz transformados.
- Identificar la expresión de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz transformados.

VII. Materiales y Métodos

7.1 Cultivo de callos embriogénicos de Maíz tipo II.

El material biológico utilizado para la transformación genética fue proporcionado por el Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM. Los callos embriogénicos de maíz tipo II fueron obtenidos de embriones inmaduros de 8-10 días de edad. El medio N₆P fue empleado para la inducción y proliferación de los callos embriogénicos (Chu *et al.*, 1975). Los cultivos celulares de maíz fueron mantenidos en crecimiento durante 3-4 meses previo a la transformación genética.

7.2 Amplificación y purificación del vector INIFAP-VON 3301.

La secuencia codificadora del gen *E* del VON de 1,502 pb, con número de acceso AY60002 se obtuvo del GenBank, la cual corresponde a la cepa aislada de un cuervo (*Corvus corax*) en el estado de Tabasco, México (TM-171-03). La secuencia fue clonada e incorporada al plásmido pCambia 3301 que contiene la fusión transcripcional del gen *uidA* (β -glucuronidasa), con el promotor constitutivo CAMV 35S del virus del mosaico de la coliflor, y el gen *bar* que codifica para la enzima fosfotricin acetil-transferasa, que otorga resistencia al glufosinato de amonio utilizado como agente de selección en plantas.

La construcción INIFAP-VON 3301 fue proporcionada por el proyecto “Desarrollo de una vacuna comestible en sorgo para la prevención del Virus del Oeste del Nilo” SAGARPA-2004-24. Esta construcción se amplificó en células químicamente competentes DH5 α mediante choque térmico y se purificó utilizando un kit comercial Maxiprep (Qiagen™) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Posteriormente el plásmido fue cuantificado en un nanofotómetro™ (INPLEN, n° cat. LKB529, Múnich, Alemania).

Secuencia del gen *E* del virus del Oeste del Nilo aislado en México. Región: 967-2469 nt.
 Las flechas indican las regiones correspondientes a los iniciadores diseñados para la RT-PCR

```

          ttca  actgccttgg  aatgagcaac  agagacttct  tgggaaggagt
gtctggagca  acatgggtgg  atttggttct  cgaaggcgac  agctgcgtga
ctatcatgtc  taaggacaag  cctaccatcg  atgtgaagat  gatgaatatg
gagggcgcca  acctggcaga  ggtccgtagt  tattgctatt  tggctaccgt
cagcgatctc  tccaccaaag  ctgcggtgcc  gaccatggga  gaagctcaca
atgacaaacg → tgctgaccca  gcttttgtgt  gcagacaagg  ggcaaaggaa  agtgggtggac
aggggctggg  gcaacggctg  cggactatth  aataggaaga  gcattgacac
atgcgcctgct  tttgcctgct  ctaccaaggc  ttgtccatgg  accatcttga
aagagaatat  caagtacgaa  gtggccatth  gttggagcca  accaactact
gtggagtgcg  acggaaacta  cccacacag  atacacacta  ctgaggcagg
gagattcagc  atcactcctg  cgggcgcttc  cacggtcagg  aagcttggag
aatatggaga  ggtgacagtg  gactgtgaac  aagacgttct  gattgacacc
aatgcatact  acgtgatgac  tgttggaaac  gagcagtgct  tgggtccatcg
tgagtggttc  atggatctca  acctcccttg  ttgaggaacc  ggaagtactg
tgtggaggaa  cagagagacg  ttaatggagt  gagggagctc  acacgccacg
aagcagtctg  tgatagcatt  gggctcacia  aagcaacact  tgcatcaagc
tttggctgga  gccattcctg  tggaaatthc  tggaaaaatt  gtcaagttga
cgtcgggtca  tttgaagtgt  agagtgaaga  ttcaagtttc  gcagttgaag
ggaacaacct  atggcgtctg  ttcaaaggct  ggaattgcag  ttgggactcc
cgcagacaca  ggtcacggca  ctgtgggtgt  cagtggcttc  tacactggca
cggatggacc  ttgcaaagtt  cctatctcgt  aacccttttg  attgaacgac
ctaacgccag  tgggcagatt  ggtcactgtc  ggaaccacc  tttcagtggc
cacggccaac  gctaagggtc  tgattgaatt  agatcaatca  tttggagact
catacatagt  ggtgggcaga  ggagaacaac  acaaccacc  ccatgggcac
aagtctggaa  gcagcattgg  caaagccttt  ttgggacttt  tcaaaggagc
gcagagacta  gccgctctag  gagacacagc  tccatcaagt  ggatcagttg
gaggggtggt  cacctcagtt  ggggaaggctg  tggataacgc  gttcggagga
gcattccgct  cactgtttgg  aggcattgctc  tgctcgtgat  aaggattgct
gggggctctc  ctgttgtgga  tgggcattaa  tgctcttcct  aggtccatag
ctctcacggt  tctcgcagtt  ggaggagttc  tgctcttcct  ctccgtgaac
gtgcatgct
    
```

7.2.1 Cortes con Enzimas de Restricción.

El plásmido INIFAP-VON 3301 se cortó con las enzimas de restricción *Nco I* (Invitrogen) y *Kpn I* (Invitrogen) para liberar el inserto de 1502 bp correspondiente al gen *E* del virus del Oeste del Nilo. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C y los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, para corroborar la presencia del gen en la clona purificada.

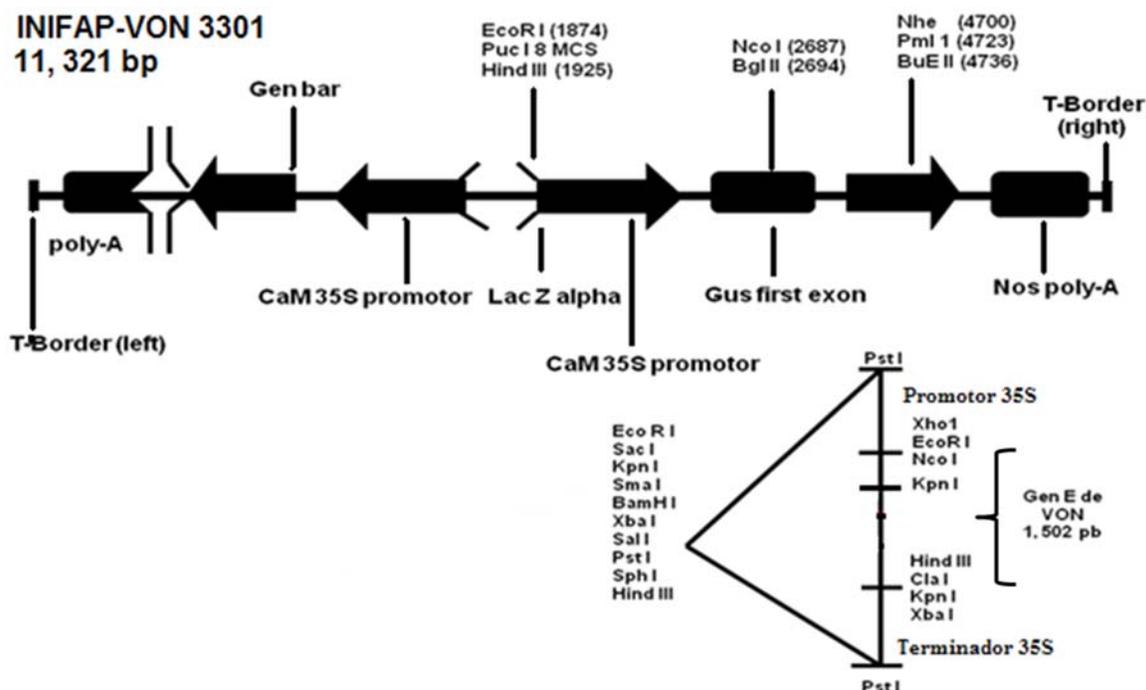


Figura 9. Esquema de la Construcción INIFAP-VON3301. En la parte inferior se puede observar la inserción de la secuencia codificante del gen *E* con los sitios de restricción para las enzimas *Kpn I* y *Nco I* que liberan un fragmento de aproximadamente 1,502 pb.

7.3 Transformación genética mediada por biobalística.

Se transformaron 100 callos embriogénicos de maíz con el vector INIFAP-VON 3301, mediante biobalística utilizando una pistola de baja presión. Los parámetros para la transformación genética fueron los siguientes: distancia 13 cm, presión de Helio 8 bar, vacío -21 In Hg, tamaño de la bala de tungsteno M5 (0.4 µm de diámetro) de acuerdo a los parámetros reportados por Jiménez-Villalobos, (2006). Como control negativo se bombardearon 20 callos de maíz con el vector pCambia 3301.

Los callos embriogénicos fueron mantenidos en medio de proliferación N6P durante 8 días posbombardeo, posteriormente fueron subcultivados en medio N6P con glufosinato de amonio a una concentración de 3.0 mg L⁻¹ durante 3 meses, para seleccionar y proliferar las células que incorporaron al vector INIFAP-VON 3301. El control negativo se mantuvo en el mismo medio con el agente de selección.

7.3.1 Prueba histoquímica de expresión transitoria (β -glucoronidasa).

A las 48 horas posbombardeo se realizó la prueba histoquímica de expresión del gen reportero *uidA* en los callos embriogénicos de maíz, utilizando el protocolo reportado por Jefferson (1987). Los explantes fueron incubados con el sustrato X-Glu (PhytoTechnology), a 37°C durante 24 horas para observar el producto 5-5'dibromo-4,4'dicloro-índigo (coloración azul índigo) en los callos embriogénicos transformados. Los resultados fueron recopilados y documentados para su posterior análisis.

7.3.2 Identificación de la proteína β -glucoronidasa mediante Western blot.

Los callos transformados y el control negativo fueron molidos en nitrógeno líquido. De esta manera, se obtuvo el extracto crudo con la proteína soluble total (PST) y se cuantificó en el programa Microplate 5.3 BioRad® con un filtro de 590 nm y un coeficiente de correlación del 0.999. Los extractos crudos fueron separados mediante SDS-PAGE al 10%. Para visualizar las bandas de acuerdo a su peso molecular, uno de los geles fue teñido con una solución de azul brillante de Coomassie G-250. El gel restante se transfirió a una membrana de PDVF de 0.45 μ m (Millipore) durante 1 hora. Posteriormente se tiñó con rojo de Ponceau al 0.5% para visualizar el patrón de proteínas. La membrana fue tratada con las soluciones A y B "Blot Restore" (Millipore) para remover los residuos de la tinción. El bloqueo de la membrana se realizó en una solución salina fosfatada (PBS) al 5% de leche descremada durante 1 hora, a continuación se realizaron tres lavados con PBS, durante 10 minutos y se incubó con el primer anticuerpo anti- β -glucoronidasa 1:1,000 (Invitrogen) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente la membrana se lavó en tres ocasiones en PBS para remover el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo anti-IgG de conejo 1: 10,000 (Sigma, n° cat. A6154) se incubó durante 1 hora a 4°C. Las placas fueron reveladas con un kit de quimioluminiscencia HRP Immobilon™ Western (Millipore).

7.4 Identificación del gen *E* del virus del Oeste del Nilo mediante RT-PCR

Para identificar la secuencia codificadora del gen *E* del virus del Oeste del Nilo en los callos de maíz transformados con la construcción INIFAP-VON 3301, se realizó una extracción de ARN total del tejido bombardeado con el gen de interés y el control, utilizando un protocolo previamente establecido en el laboratorio. A las muestras obtenidas se les realizó una RT-PCR con un kit de Qiagen® OneStep (Qiagen), utilizando iniciadores específicos previamente diseñados en el laboratorio para la cepa mexicana y que amplificaban un producto de 702 bp (Tabla 4). La secuencia de los oligonucleótidos fue la siguiente: WNVe+ Sentido 5' gac aag gag tgg tgg aca 3'; WNVe- antisentido 5' att cca aca cca cag tgc 3'. El programa utilizado en la amplificación se describe a continuación: Síntesis de cDNA 45°C 60 minutos, PCR desnaturalización inicial 94°C 2 minutos, desnaturalización 94°C 30 segundos, alineación 50°C 2 minutos, extensión 72°C 1 minuto (40 ciclos) y una extensión final 72°C 10 minutos, utilizando como control positivo una vacuna inactivada para el virus del Oeste del Nilo (Fort-Dodge®, Iowa, USA). Los productos de RT-PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

Tabla 4. Reacción de RT-PCR para el gen *E* del VON.

| <i>Componente</i> | <i>Volumen/Reacción</i> | <i>Concentración Final</i> |
|---|-------------------------|----------------------------|
| Tampón 5x Qiagen OneStep RT-PCR* | 4.0 µl | 1x |
| Mezcla de dNTP (10 mM) | 2.0 µl | 400 µM de cada dNTP |
| WNVe+ sentido (12 µM) | 1.0 µl | 0.6 µM |
| WNVe- antisentido (12 µM) | 1.0 µl | 0.6 µM |
| Enzima Qiagen OneStep RT-PCR | 2.0 µl | ----- |
| H₂O libre de ARNasa | 8 µl | ----- |
| ARN | 2.0 µl | 2 µg |
| Volumen Total | 20 µl | |

* Contiene 12.5 mM de Cl₂Mg

Una concentración final del primer de 0.6 µM es óptimo para muchos sistemas iniciador-molde.

7.5 Identificación de la proteína E mediante Western blot.

Previamente a la identificación de la proteína E del virus del Oeste del Nilo, se estandarizó la técnica de Western blot para titular el anticuerpo primario anti-West Nile virus 8150 (Chemicon, n° cat. 92590), utilizando diluciones decrecientes del anticuerpo 1:1,000, 1:2,500, 1:5,000 y 1:10,000, y como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Amersham Bioscience, n° cat. NIF825) a una dilución 1:3,000. Los resultados muestran una banda de 68 kDa correspondiente a la proteína E contenida en la vacuna comercial (Fort Dodge®). La concentración que se eligió fue de 1: 1,000 de anticuerpo primario para los ensayos de expresión de la proteína recombinante en los callos embriogénicos de maíz. Para el ensayo de expresión de la proteína recombinante del virus del Oeste del Nilo. Los callos transformados y el control negativo fueron molidos en nitrógeno líquido. De esta manera, se obtuvo el extracto crudo con la proteína soluble total (PST), y se cuantificó en el programa Microplate 5.3 BioRad® con un filtro de 590 nm, y un coeficiente de correlación del 0.999. Los extractos crudos fueron separados mediante SDS-PAGE al 10%. Para visualizar las bandas de acuerdo a su peso molecular, uno de los geles fue teñido con una solución azul brillante de Coomassie G-250. El gel restante se transfirió a una membrana de PDVF de 0.45µm (Millipore), durante 1 hora. Posteriormente se tiñó con rojo de Ponceau al 0.5% para visualizar el patrón de proteínas. Las condiciones del Western blot para la identificación de la proteína E en callos embriogénicos de maíz fue realizada bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, utilizando anticuerpos específicos para la identificación de la proteína E de VON (ver materiales y métodos). Las placas fueron reveladas con un kit de quimioluminiscencia HRP Immobilon™ Western (Millipore, n° cat. WBKLS0500, Billerica USA).

7.6 Cuantificación de la Proteína E expresada en callos embriogénicos de maíz.

La cuantificación de la proteína E recombinante se llevó a cabo mediante densitometría, midiendo el área de la proteína E de VON, en comparación con concentraciones ascendentes previamente conocidas de albúmina sérica bovina (ASB) utilizada como control. Posteriormente, los resultados fueron analizados y extrapolados por gramo de peso seco, para conocer el porcentaje de expresión de la proteína heteróloga expresada en el sistema vegetal.

VIII. Resultados

8.1 Análisis de restricción de la construcción INIFAP-VON 3301

La construcción INIFAP-VON 3301 se cuantificó en un nanofotómetro obteniendo una concentración de 5.327 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en 100 μl y una relación A260/A280 de 1.934. Previo a la transformación, la construcción fue digerida con las enzimas de restricción para verificar la inserción de la secuencia codificadora del gen *E* del VON utilizando las enzimas *Kpn I* (Invitrogen) y *Nco I* (Invitrogen), a 37°C durante 1 hora y los productos de la reacción fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. En la figura 10 se muestra las digestiones de la construcción INIFAP-VON 3301, en la parte superior del gel se observa un producto de tamaño molecular superior a los 11,000 pb que corresponde al vector pCambia 3301. Por otra parte se visualiza un producto de aproximadamente 1,502 bp que corresponde a la secuencia codificadora del gen *E* del virus del Oeste del Nilo del aislado en México. En la parte inferior del gel se observa una banda de aproximadamente 400 bp que corresponde a un sitio de corte interno del gen para la enzima *Kpn I* (Figura 9). Este resultado sugiere la presencia de la secuencia codificadora del gen *E* del virus del Oeste del Nilo, dentro de la construcción INIFAP-VON 3301. Posteriormente la concentración tuvo que ser adecuada a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la transformación genética de los callos embriogénicos de maíz.

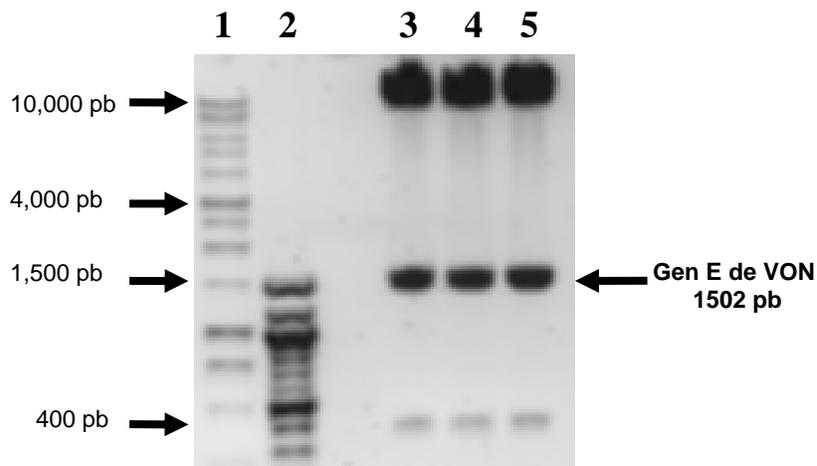


Figura 10. Análisis de restricción de la construcción INIFAP-VON 3301 con las enzimas *Kpn I* y *Nco I* para liberar al gen *E* del virus del Oeste del Nilo de 1502 pb. Carril 1.- Marcador DNA 1 kb Ladder; carril 2.- Marcador DNA 100 pb Ladder; carriles 3 al 5.- Muestras del vector INIFAP-VON 3301 digerido con *KpnI* y *NcoI*.

8.2 Prueba histoquímica de expresión transitoria.

Los resultados de la prueba histoquímica para la detección transitoria del gen reportero *uidA* en los callos embriogénicos de maíz transformados con la construcción INIFAP-VON 3301, fue realizada a las 48 horas posbombardeo. Los callos transformados con la secuencia de interés, presentaron coloración azul índigo a consecuencia de la hidrólisis del sustrato X-Gluc® con la proteína β -glucuronidasa. En la figura 11 se muestran los resultados de la prueba histoquímica para la identificación transitoria del gen reportero *uidA* en callos embriogénicos de maíz transformados y no transformados. Las tonalidades azul índigo muestran la reacción cromogénica en los callos bombardeados con la construcción INIFAP-VON 3301 (Figura 11B) y control positivo (Figura 11C), que indican de manera temprana la incorporación del transgen en el genoma vegetal.

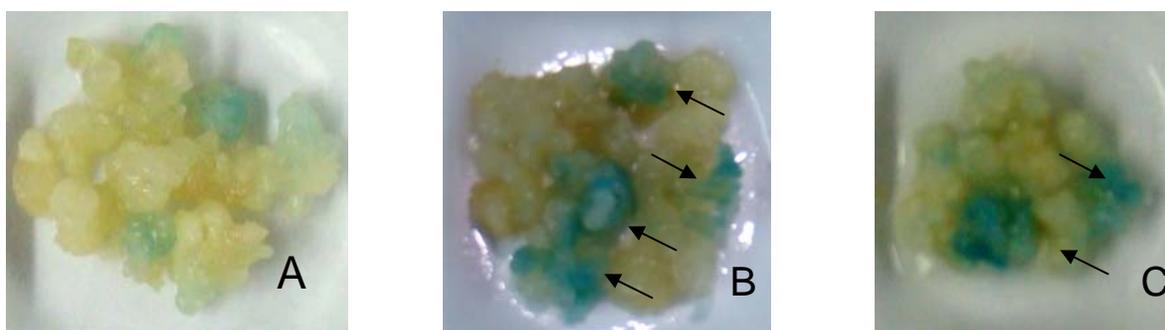


Figura 11. Prueba histoquímica para la expresión transitoria de la proteína β -glucuronidasa en los callos embriogénicos de maíz a las 48 horas posbombardeo. 11A) Callos embriogénicos de maíz bombardeados con balas M5; 11B) Callos embriogénicos de maíz bombardeados con la construcción INIFAP-VON3301 11C) Callos embriogénicos de maíz bombardeados con el vector pCambia 3301 (control positivo). Las tonalidades azul índigo muestran la expresión de la proteína β -glucuronidasa.

8.3 Identificación de la proteína β -glucuronidasa mediante Western blot.

Para corroborar los datos obtenidos en la prueba histoquímica de expresión transitoria en los callos embriogénicos de maíz. La proteína β -glucuronidasa fue identificada mediante Western blot utilizando un extracto crudo de *E. coli* como control positivo. Se tomaron muestras representativas de los callos embriogénicos de maíz bombardeados con la construcción INIFAP-VON 3301, pCambia 3301 y control negativo (M5). De cada una de

las muestras se obtuvieron las proteínas solubles totales y se cargaron 50 µg de cada uno de los extractos crudos en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. En la figura 12 se muestra el gel de poliacrilamida teñido con azul brillante de Coomassie G-250.

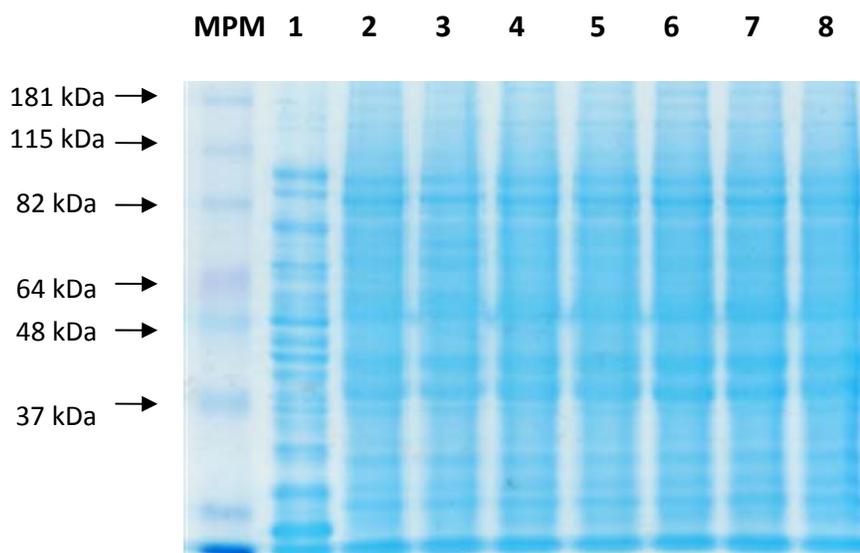


Figura 12. Gel de poliacrilamida al 10% de extractos crudos de callos embriogénicos de maíz, a las 24 horas posbombardeo. MPM.- Marcador de peso molecular Benchmark preinstained protein, Invitrogen. Carril 1.- Extracto crudo de *E. coli* (control positivo); carril 2.- Callos embriogénicos transformados con el vector pCambia 3301; carriles 3 al 7.- Callos embriogénicos de maíz transformados la construcción INIFAP-VON 3301; carril 8.- Callos embriogénicos bombardeados con balas M5.

El patrón proteínico de los callos bombardeados con balas M5 fue similar a los bombardeados con el plásmido INIFAP-VON 3301 y pCambia 3301, debido a que a las 48 horas, los callos embriogénicos no se encuentran en contacto con el agente de selección (figura 12). Sin embargo, se utilizó un Western blot para la identificación de la proteína β -glucuronidasa mediante el empleo de anticuerpos específicos. Por lo tanto, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF para detectar la expresión del gen reportero *uidA*. En la figura 13 se muestran los resultados del Western blot donde se identificó la expresión de una proteína de peso molecular aproximado a los 66 kDa, que corresponde a la proteína β -glucuronidasa de maíz reportada por Kusnadi *et al.*, (1998) en los callos

bombardeados con la construcción INIFAP-VON 3301, pCambia 3301, y en el extracto crudo de *E. coli* (control positivo), mientras que en el control negativo no se identificó la expresión de la proteína β -glucoronidasa. Sin embargo el anticuerpo policlonal reconoció dos proteínas de peso molecular de aproximadamente 70kDa y 75kDa.

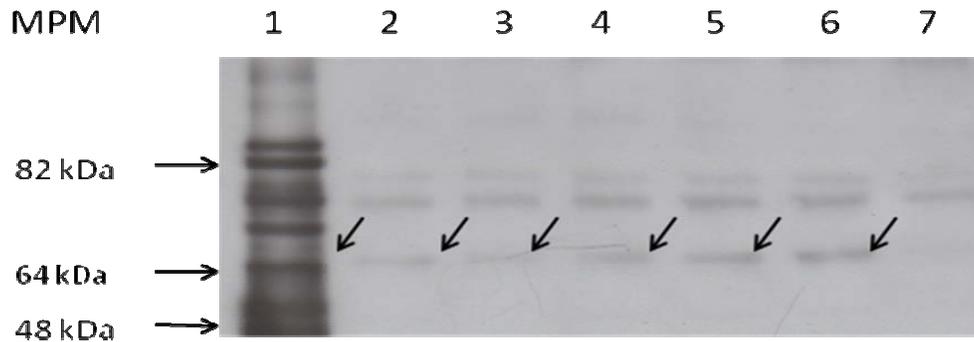


Figura 13. Identificación de la proteína β -glucoronidasa mediante Western blot en callos embriogénicos de maíz, a las 48 horas post-bombardeo. Carril 1.- Extracto crudo de *E. coli* 2.- Callos embriogénicos transformados con el vector pCambia 3301 3 al 6.- Callos embriogénicos transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301; 7.- Control negativo (sin ADN). Las flechas indican la expresión de la proteína β -glucoronidasa en los callos bombardeados de maíz y en el extracto crudo de *E. coli*.

8.4 Identificación del gen *E* del virus del Oeste del Nilo mediante RT-PCR.

Posteriormente, se identificó la incorporación del gen *E* del virus del Oeste del Nilo en los callos embriogénicos de maíz transformados con la construcción INIFAP-VON 3301, utilizando como control negativo callos embriogénicos transformados con el vector pCambia 3301, los cuales fueron mantenidos en medio N₆P, con el agente de selección glufosinato de amonio durante 3-4 meses posbombardeo. A partir del ARN genómico del tejido vegetal se corrió una RT-PCR utilizando los iniciadores específicos para detectar al gen *E* de VON. En la figura 14 se muestra los resultados de la RT-PCR. Las muestras transformadas con la construcción INIFAP-VON 3301 amplificaron un producto aproximado de 700 pb, correspondiente al gen *E* del virus del Oeste del Nilo, en comparación al control negativo (carril 2).

En los callos embriogénicos de maíz tipo II bombardeados con la construcción INIFAP-VON 3301 se identificó el transgen que codifica para la proteína E del VON mediante RT-PCR (carriles 3-7).

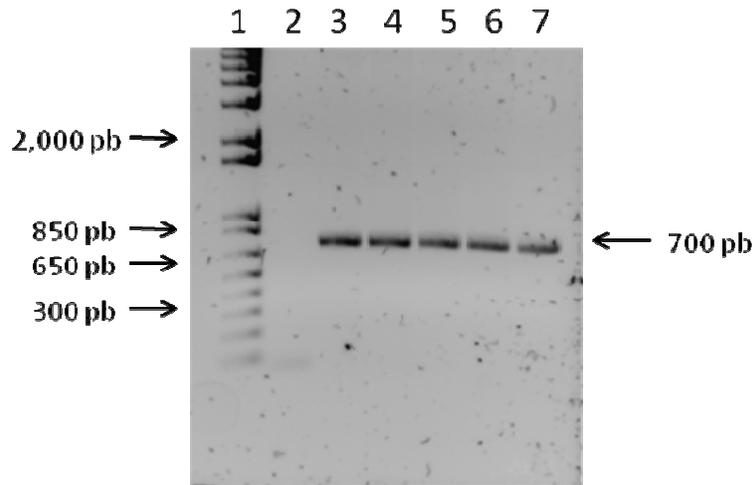


Figura 14. Identificación del gen *E* del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz mediante RT-PCR. La flecha negra muestra un producto amplificado de alrededor de 700 bp correspondiente al gen *E* del VON. Carril 1.- Marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder, carril 2.- Callos bombardeados con el vector pCambia 3301 (control Negativo), carriles 3 al 7.- Callos de maíz transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301.

8.5 Titulación del anticuerpo antiWest-Nile Virus 8150, mediante Western blot.

Previo a la identificación de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en los callos embriogénicos de maíz, se estandarizó la técnica de Western blot para identificar la proteína E vacunal realizando diluciones decrecientes del anticuerpo monoclonal anti-West Nile Virus 8150. En la figura 15, se muestran los resultados de la titulación del anticuerpo. A partir de la dilución 1: 5,000 a la dilución 1: 1,000 se identificó la proteína E contenida en la vacuna comercial (Fort-Dodge), con un peso molecular mayor a los 64 kDa, por lo que se decidió utilizar la concentración 1: 1,000, para ensayos posteriores debido a que se obtenía mayor señal.

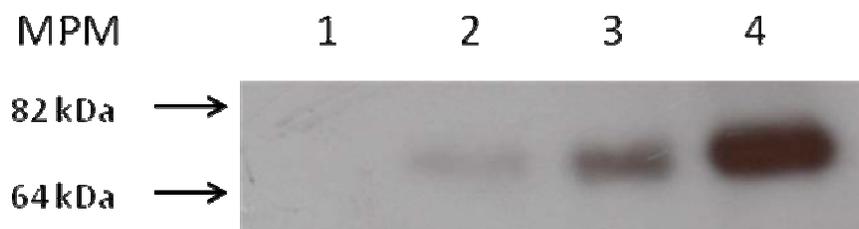


Figura 15. Titulación del anticuerpo monoclonal anti-West Nile virus 8150 a partir de la proteína E vacunal (Fort Dodge). MPM.- Marcador Benchmark protein ladder. Carril 1.- Dilución 1:10,000; carril 2.- 1:5,000; carril 3.- 1: 2,500; carril 4.- 1:1,000. Las flechas indica la expresión de la proteína E vacunal del virus del Oeste del Nilo.

8.6 Identificación del la proteína E mediante Western blot.

Los callos embriogénicos que presentaron la incorporación del gen *E* del VON en el ARN genómico, se analizaron mediante western blot, para identificar la expresión de la proteína E recombinante. Para ello se utilizaron muestras representativas de cada uno de los diferentes lotes de callos transformados con la construcción INIFAP-VON 3301. Las muestras fueron molidas en nitrógeno líquido y se obtuvo la proteína soluble total (PST). Como controles negativos se utilizaron callos embriogénicos transformados con el vector pCambia 3301.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF e incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-West Nile virus 1: 1,000. En la figura 16 se muestra el patrón proteínico de los callos embriogénicos teñidos con rojo de Ponceau. Las muestras transformadas con la construcción INIFAP-VON 3301 presentan una proteína de aproximadamente 68 kDa comparada con los callos negativos. En la figura 16 se identificó la expresión de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en los callos embriogénicos bombardeados con la secuencia codificadora del gen *E*, mediante el uso del anticuerpo monoclonal anti-West Nile virus 8150 (Chemicon®). En el carril 1 se puede identificó la proteína E contenida en la vacuna (FortDodge®) la cual presenta un peso aproximado superior a los 64 kDa.

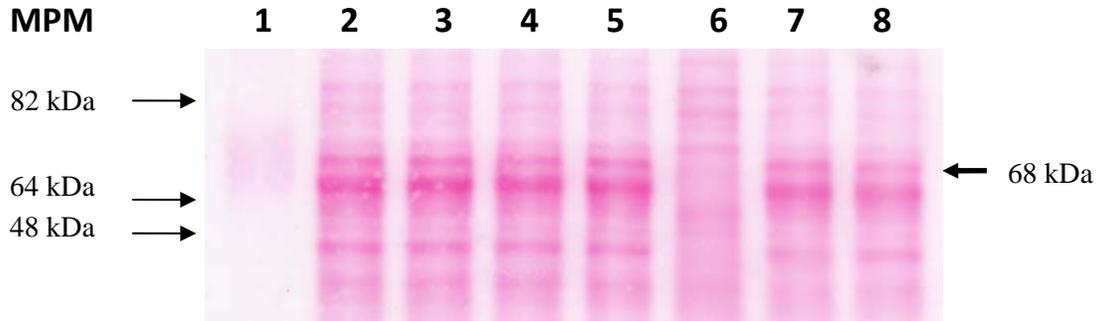


Figura 16. Transferencia de los extractos crudos de callos embriogénicos bombardeados a la membrana de PDVF teñida con rojo de Ponceau al 0.5%. MPM.- Marcador Benchmark protein ladder. Carril 1.- Proteína E vacunal (FortDodge®); carriles 2 al 5 y 7 -8.- Callos embriogénicos de maíz transformados con la construcción INIFAP-VON 3301; carril 6.- Control negativo (pCambia 3301). La flecha negra muestra la proteína de alrededor de 68 kDa en los cultivos transformados con la secuencia de interés.

Los resultados del Western blot se muestran en la figura 17 en la que se observa la expresión de la proteína E recombinante del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz, mantenidos con el agente de selección glufosinato de amonio durante 3-4 meses.

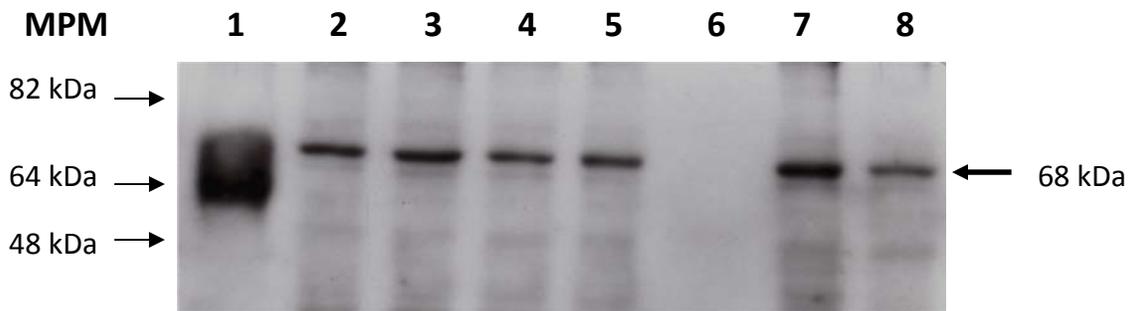


Figura 17. Identificación de la proteína E recombinante en callos embriogénicos de maíz mediante Western blot. MPM.- Marcador Benchmark protein ladder. Carril 1.- Proteína E vacuna comercial (Fort Dodge®); carriles 2 al 5 y 7 -8.- Callos embriogénicos de maíz transformados con la construcción INIFAP-VON 3301; carril 6.- Control negativo (pCambia 3301). La flecha negra indica la expresión de la proteína E recombinante del VON de aproximadamente 68 kDa.

8.7 Cuantificación de la proteína E expresada en callos embriogénicos de maíz.

La cuantificación por densitometría fue llevado mediante la resolución de los extractos crudos de los callos embriogénicos en un gel de poliacrilamida al 10%, midiendo el área de la proteína E detectada en el Western blot, comparándola con concentraciones previamente conocidas de albúmina sérica bovina, utilizada como control (figura 18). Posteriormente se llevó a cabo un análisis de regresión, para conocer la cantidad de proteína E recombinante en los 50 µg de proteína soluble total (PST), cargados en el gel de poliacrilamida. Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la cantidad presente por un gramo de peso seco del tejido vegetal. Los resultados mostraron que en un gramo de peso seco de callos transgénicos de maíz se encuentran 86 µg de la proteína E recombinante del virus de Oeste del Nilo, por lo que el porcentaje de expresión de la proteína fue del 0.86% de la proteína soluble total (PST).

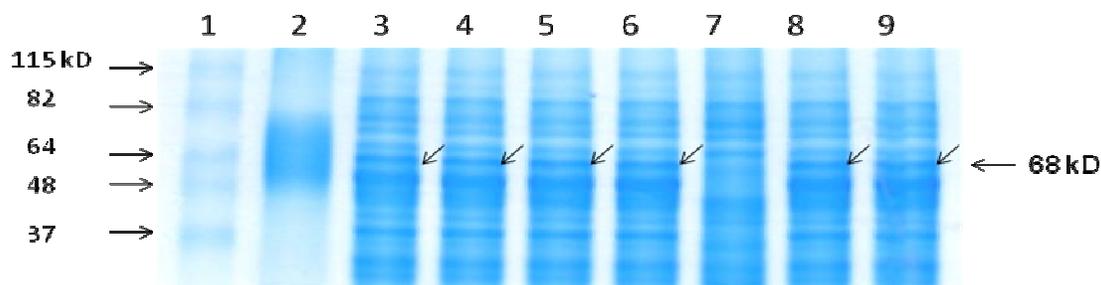


Figura 18. Gel de poliacrilamida al 10% de extractos crudos de callos embriogénicos de maíz. Carril 1.- Marcador Benchmark protein ladder, carril 2.- Proteína E vacuna comercial (Fort Dodge®); carriles 3 al 6 y 8 al 9.- Callos embriogénicos de maíz transformados con la construcción INIFAP-VON 3301; carril 7.- Control negativo transformado con el vector pCambia 3301. La flecha negra indica la proteína cuantificada en la densitometría.



Figura 19. Curva de albúmina sérica bovina para la cuantificación de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en callos transgénicos de maíz tipo II. Carril 1.- 1 µg de ASB; carril 2.- 2 µg de ASB; carril 3.- 3 µg; carril 4.- 4 µg; carril 5.- 5 µg; carril 6.- 6 µg y carril 7.- 7 µg.

IX. DISCUSIÓN

En este estudio se reporta la transformación genética de callos embriogénicos de maíz tipo II (*Zea mays* L), que expresan la proteína E del virus del Oeste del Nilo. Los callos embriogénicos transformados con la construcción INIFAP-VON 3301 expresaron una proteína de peso aproximado a los 68 kDa, la cual fue identificada con el anticuerpo monoclonal anti-West Nile virus 8150 (Figura 17). La proteína E expresada en los callos embriogénicos presentó un ligero incremento en su peso molecular en comparación con la proteína control (Fort Dodge®). La razón posible del incremento en el peso molecular de la proteína E, es que al ser expresada en los callos embriogénicos de maíz podría sufrir algunos procesos postraduccionales, tales como: glicosilación o proteólisis lo que pudiera optimizar su función según lo reportado por Faye *et al.*, 2005. La traducción de la proteína E recombinante expresada en los callos de maíz tipo II, parece conservar los sitios antigénicos en el epítoto que reconoce el anticuerpo monoclonal anti-West Nile virus 8150. El cual ha sido utilizado en la detección de anticuerpos en pollos mediante la técnica Mac-ELISA, así como, en estudios antigénicos, y en pruebas inmunohistoquímicas, mostrando una alta sensibilidad y especificidad para el virus del Oeste del Nilo y virus Kunjin (Groves *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 1994; Scherret, 2001; Höfle *et al.*, 2008). Este resultado sugiere la posible conservación de uno de los epítotos de la proteína E expresada en los callos embriogénicos transformados, por lo que podría estimular la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus del Oeste del Nilo y así, convertirla en una alternativa para el desarrollo de una vacuna comestible.

La producción de proteínas recombinantes en semillas de maíz ha sido ampliamente estudiada, produciendo proteínas inmunógenicas para diversas enfermedades relevantes en la salud animal, por ejemplo: Lamphear *et al.*, (2002) y Streatfield *et al.*, (2001) reportaron la expresión de la glicoproteína S del virus de la gastroenteritis del cerdo en maíz obteniendo un índice de expresión de 0.8% al 1.0% y 2% de la PST, respectivamente. Guerrero-Andrade *et al.*, (2006) reportaron la expresión de la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle en granos transgénicos de maíz. Los índices de expresión de la proteína F recombinante en las líneas transgénicas obtenidas fue del 0.95% al 3% de la proteína soluble total (PST), la cual fue cuantificada mediante densitometría.

Por otra parte, Loza-Rubio *et al.*, (2008b) reportaron la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en semillas transgénicas de maíz obteniendo un índice de expresión del 1% de la PST, cuantificada mediante densitometría. El índice de expresión de la proteína E obtenida en callos transformados de maíz fue del 0.86%, la cual fue cuantificada mediante densitometría. La expresión de la proteína E recombinante se encuentra dentro de los niveles de expresión reportados 0.8-3%. Sin embargo, si se toma en cuenta que la expresión de la proteína E del VON fue en callos embriogénicos y no en las semillas de maíz, muestran un incremento en la expresión al ser comparados con los obtenidos en cultivos celulares de tabaco 0.007% de la PST, y soya 0.0008% PF reportado por (Smith *et al.*, 2002). La transformación genética en plantas está dirigida a una adecuada elección del tipo de explante y el uso de promotores específicos para la expresión genética. La elección del tipo de explante se tomó en cuenta de acuerdo al índice de proliferación que presentan los callos embriogénicos de maíz tipo II, comparados con el tipo I, lo que constituye un factor importante en la contribución a una alta densidad de células transformadas y un mejor índice de propagación del tejido transgénico (Aulinger *et al.*, 2003).

En este estudio la transformación mediante el método de biobalística, mostró ser un método eficaz para la transformación de callos embriogénicos de maíz. La inserción del transgén mediante RT-PCR mostró la amplificación de un producto aproximado a las 700 pb, que correspondía a la expresión del gen *E* del virus del Oeste del Nilo (Figura 14), sugiriendo la incorporación y la transcripción del gen de interés en el genoma vegetal. La inserción del transgen varía de acuerdo al método de transformación. Los métodos comúnmente utilizados en cultivo de tejidos vegetales es mediante biobalística y la infección por *Agrobacterium tumefaciens*. Southgate *et al.*, (1995) reportaron que en el método de biobalística, sólo el 7.5% de las partículas bombardeadas, se encuentran dentro del núcleo, mientras que un 79.8% se localizan dentro de vacuolas celulares y un 12.7% en el citoplasma. Esto recae en que sólo un pequeño porcentaje de células incorporan el transgen dentro de su genoma. Por lo tanto, es indispensable realizar cinéticas de crecimiento del cultivo para identificar en que momento se lleva a cabo la fase exponencial, para optimizar la incorporación del transgen en el ADN genómico.

El uso de genes que confieren resistencia al agente de selección en plantas (*bar* o *pat*), es indispensable para la selección y proliferación de las células transformadas. La mayoría de las estrategias para la selección en plantas, se basa en la inhibición del crecimiento de las células no transformadas, es decir se hace uso de un sistema de selección positiva (Klein *et al.*, 1993; Jiménez-Villalobos, 2006).

Los genes reporteros han sido de gran utilidad, para la detección temprana de explantes transformados, uno de los genes reporteros comúnmente utilizados en plantas es el gen *uidA*, que codifica para la proteína β -glucuronidasa. Para identificar a las 48 horas posbombardeo se realizó una prueba de expresión transitoria en los callos embriogénicos de maíz bombardeados y controles para la identificación de la proteína β -glucuronidasa. Los resultados de la prueba histoquímica mostraron zonas de coloración azul índigo en los explantes transformados con la secuencia y controles positivos (Figura 11B y 11C). Los callos embriogénicos bombardeados solamente con balas M5 (control negativo), presentaron pequeñas zonas con coloración azul menos intensas (Figura 11A), la causa probable de esta coloración podría deberse a la expresión endógena de la proteína β -glucuronidasa en maíz aunque hasta el momento no ha sido reportada. Los callos embriogénicos de maíz tipo II transformados con el plásmido pCambia 3301 y la construcción INIFAP 3301 mostraron la expresión de la proteína β -glucuronidasa, como resultado de la inserción del transgen *uidA* en los callos embriogénicos de maíz tipo II. En base a los resultados de la prueba histoquímica, se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo policlonal para la detección de la proteína β -glucuronidasa. Los resultados mostraron la expresión de una proteína de 66 kDa en los callos embriogénicos de maíz bombardeados con la construcción INIFAP-VON 3301 y control positivo. La expresión de la proteína de 66 kDa detectada en el Western blot en los callos bombardeados con la construcción que contiene al gen reportero concuerda con la proteína β -glucuronidasa expresada en maíz (Kusnadi *et al.*, 1998) (Figura 13). Jefferson y Wilson (1991) argumentaron que la expresión endógena del gen *uidA* podría ser por el incremento en la actividad enzimática, y a su vez esta podría ser fácilmente eliminada por tratamientos simples, como el incremento en el pH, la adición de metanol al buffer de reacción o por tratamiento con calor (Kosugi *et al.*, 1990; Jefferson y Wilson, 1991, Hansch *et al.*, 1995;

Gillisen et al, 1998). En los ensayos realizados para la prueba histoquímica, se modificó el buffer de fosfatos a diferente pH; para disminuir la expresión del gen reportero *uidA* en callos embriogénicos de maíz no transformados, se observó que a un pH de 8.8 la expresión disminuía de manera importante, pero no se lograba erradicar por completo. Mascarenhas y Hamilton (1992) argumentaron que la prueba de expresión transitoria del gen *uidA* en cultivos celulares, presenta una alta sensibilidad por el sustrato, pero suele estar propenso a la producción artefactos. Por tal motivo en este estudio se consideró necesaria la aplicación de pruebas complementarias para la identificación del gen reportero *uidA*.

Una de las prioridades en el establecimiento de un protocolo de transformación genética de plantas es la elección del promotor y la naturaleza del explante en donde se desea expresar el gen de interés. La expresión de la proteína E del virus del Oeste del Nilo fue dirigida por el promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor que presenta diversas características de interés como son: ser de naturaleza constitutiva, lo que permite la expresión del transgen en todas las partes de la planta, estar ampliamente probado en especies dicotiledóneas y monocotiledóneas, en donde se han reportado altos niveles de expresión del transgen (Gandhi *et al.*, 1999). Wally *et al.*, (2008) compararon la expresión de la proteína β -glucoronidasa con cinco diferentes promotores en raíces y hojas de zanahoria (*Daucus carota* L.). Los resultados que obtuvieron fueron altos niveles de expresión de la proteína β -glucoronidasa en plantas con el promotor CaMV35S, Doble CaMV35S (DCaMV35S) y el promotor de ubiquitina *UBQ3*, en comparación cuando fueron dirigidas por los promotores mannopine sintasa (*mas2*) y el promotor de *Agrobacterium rhizogenes* (*rolD*). Los altos niveles de expresión de la proteína β -glucoronidasa fueron observados en raíces y tejidos vasculares de las plantas transformadas con el promotor CaMV35S, DCaMV35S y *UBQ3*. Cuando la expresión de la β -glucoronidasa fue cuantificada, el promotor *UBQ3* presentó un mayor nivel de actividad en raíces de plantas maduras, pero los promotores CaMV35S y DCaMV35S presentaron mayores niveles de actividad en las hojas de las plantas. El promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor mostró ser eficaz para la expresión a nivel transcripcional y traduccional de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz tipo II.

Prakash *et al.*, (2008) compararon el efecto de dos promotores en maíz: Os-Actina1 de arroz y CaMV35S. Utilizó como explante 5,000 embriones inmaduros repartidos en cuatro experimentos independientes para cada uno de los dos promotores. Los niveles de callos resistentes fueron más altos con el promotor Os-Actina1 en comparación al promotor CaMV35S en todos los experimentos. No existieron diferencias entre la frecuencia de regeneración o en las características morfológicas de las plantas obtenidas con ambos promotores, aunque el índice de escapes fueron bajos en los callos transformados con el promotor Os-Actina1, en comparación al promotor CaMV35S. El menor número de copias de la inserción fue significativamente alto con el promotor CaMV35S. Con base en estos resultados, los autores infieren que el tipo de promotor es un factor importante que se debe considerar en el establecimiento de protocolos de transformación, teniendo influencia no solamente en la frecuencia de transformación, si no también en el número de copias del inserto en las plantas transgénicas. Debido a que un mayor número de copias insertado en el DNA genómico de la planta, pudiera ocasionar silenciamiento del gen de interés.

Las semillas de maíz presentan características atractivas incluyendo; 1) la producción y almacenamiento de proteínas recombinantes; 2) establecimiento de la infraestructura para la producción, cultivo, transporte, almacenamiento, y procesamiento; 3) disminución en los costos de producción; 4) libre de contaminantes patógenos; 5) la relativamente fácil manipulación genética para la producción de plantas transgénicas que expresen proteínas antigénicas de interés. A lo largo del tiempo tres diferentes compañías han desarrollado productos utilizando maíz para la producción de proteínas, incluidas ProdiGene, Epicyte Pharmaceuticals Inc. y Monsanto Company. En este estudio no se logró la obtención de plantas adultas de maíz debido a que las plantas regeneradas obtenidas en condiciones *in vitro*, al momento de aclimatizarlas, no lograron continuar su crecimiento, probablemente como respuesta a los cambios en el medio ambiente y las condiciones de estrés a las que fueron sometidas, dando como resultado la muerte de la plántula (Green, 1892); por lo que como recurso final se utilizaron los callos embriogénicos de maíz, para la expresión de la proteína E recombinante del virus del Oeste del Nilo.

La bioencapsulación natural de las proteínas en callos embriogénicos o granos de maíz, puede incrementar su vida media en el intestino y promover la presentación del antígeno en la superficie mucosal. Si bien la infección del virus del Oeste del Nilo se da por vía sistémica y nuestra vacuna principalmente induce la producción de anticuerpos a nivel mucosal, se ha observado que para otras enfermedades este tipo de vacunas puede producir anticuerpos neutralizantes e inducir una respuesta inmune celular capaz de conferir protección ante el desafío contra cepas letales (Loza-Rubio, 2008; Rojas-Anaya, 2009).

La biotecnología en plantas es un área relativamente nueva para la obtención de productos de gran valor como vacunas, proteínas terapéuticas, enzimas y químicos específicos. Los costos relativos utilizando plantas o cultivos celulares como biorreactores, se estiman a ser de 20 a 1000 veces menores, comparado con sistemas de células de mamíferos o animales transgénicos, respectivamente. Se sugiere que el empleo de este sistema de expresión podría ser viable para la expresión de antígenos humanos y de interés veterinario.

X. CONCLUSIÓN

- ❖ Se logró expresar una proteína de aproximadamente 68 kDa en callos embriogénicos de maíz tipo II, que de acuerdo a los ensayos de RT-PCR y Western blot se trata de la proteína E del virus del Oeste del Nilo, manifestándose con una expresión de 0.86 µg/g de PST.

XI. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar espectrometría de masas a la proteína obtenida con el propósito que se trata de la proteína E del virus del Oeste del Nilo.

- ❖ Realizar ensayos inmunogénicos en animales de laboratorio, para evaluar a la proteína expresada en callos embriogénicos de maíz tipo II.

XII. ANEXO

MEDIOS Y SOLUCIONES

Preparación de partículas de Tungsteno Guerrero Andrade (1998).

1. Pesar 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 μm de diámetro y colocarlas en un tubo de centrifuga de 15 ml.
2. Añadir 2 ml de ácido nítrico y 1 ml de agua desionizada estéril, sonicar brevemente.
3. Centrifugar los tubos a 10,000 r.p.m. durante 10 a 30 segundos.
4. Eliminar el sobrenadante y se agregar 1 ml de etanol absoluto, sonicar brevemente.
5. Centrifugar brevemente de 10 a 30 segundos a 10,000 r.p.m.
6. Eliminar el etanol y agregar 1 ml de agua desionizada estéril, sonicar brevemente.
7. Separar en alícuotas 200 μl de la suspensión en tubos de 1.5 ml.
8. Añadir 750 μl de agua desionizada estéril a cada tubo.
9. Almacenar las alícuotas a -20°C .

Adsorción del DNA a las micropartículas. (Klein *et al*, 1988)

1. En un tubo 1.5 ml se colocan 50 μl de la suspensión de micropartículas de tungsteno.
2. Se adiciona 5 μl de DNA ($1\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$).
3. Añadir 50 μl de cloruro de calcio (CaCl_2) 2.5 M y 20 μl de espermidina 0.1 M por separado.
4. Homogenizar los componentes por pipeteo durante 2 minutos.
5. Centrifugar la mezcla durante 5 a 10 segundos a 13,000 rpm.
6. Eliminar 100 μl del sobrenadante.
7. Resuspender las micropartículas en el líquido remanente (25 μl).

Prueba de expresión transitoria de GUS (Jefferson, 1987)

1. Los explantes bombardeados se colocan en tubos de cristal y a cada uno se le agrega solución de X-gluc® hasta que los explantes sean cubiertos totalmente y se incuban a 37°C por un periodo de 48 hrs.
2. La solución X-gluc® se desecha y los explantes se lavan dos veces con Buffer “Z” pH 7.4.
3. Lavar los explantes con etanol al 70% en cuatro ocasiones.
4. Eliminar la clorofila con una solución de acetona-metanol (1:3), lavar los explantes en varias ocasiones realizando cambios de la solución.
5. Por último se lavan los explantes con buffer Z para eliminar los residuos de la solución anterior.

SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL SUSTRATO DE X-GLUC®

| Reactivo | Concentración (mM) | Stock 10X | Cantidades para 25 ml de sustrato (ml) |
|--|--------------------|-----------|--|
| Amortiguador de fosfatos de sodio (pH 7.0 y 8.5) | 100 | 1M | 2.5 |
| EDTA | 10 | 100mM | 2.5 |
| Ferrocianuro de Potasio | 0.5 | 5mM | 2.5 |
| Ferricianuro de Potasio | 0.5 | 5mM | 2.5 |
| Tritón X-100 | 0.5 | 5mM | 2.5 |
| X-Gluc* | 1mg | 5mM | 25mg |

*Se tiene que disolver en DMSO previamente

La mezcla se afora a 25 ml con agua desionizada estéril y se almacena a -20°C

SOLUCIONES PARA LA EXPRESIÓN TRANSITORIA

a) Buffer "Z"*

| REACTIVO | Concentración (mM) | Cantidad en (g) para 500 ml |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Fosfato de Sodio (monobásico) | 40 | 2.76 |
| Fosfato de Sodio (dibásico) | 60 | 2.46 |
| Cloruro de Potasio | 10 | 0.37 |
| Sulfato de magnesio (heptahidratado) | 1 | 0.12 |

*El pH se ajusta a 7.0 u 8.0

b) Etanol al 70%

| Etanol absoluto (ml) | Agua Destilada/Estéril (ml) |
|----------------------|-----------------------------|
| 350 | 150 |

c) Mezcla de Acetona-Metanol (1:3)

| Acetona (ml) | Metanol (ml) |
|--------------|--------------|
| 166 | 498 |

d) Glicerol al 50%*

| Glicerol absoluto (ml) | Agua Destilada/Estéril (ml) |
|------------------------|-----------------------------|
| 250 | 250 |

*Esterilizar en autoclave durante 18 min a 1.3Kg/cm⁻²

Análisis de restricción de la construcción INIFAP-VON 3301.

La construcción INIFAP-VON 3301 se digirió con las siguientes enzimas: *Kpn I* y *Nco I*

15 µl de agua desionizada estéril.

2 µl de buffer 1 (Invitrogen®)

0.5 µl de enzima *Kpn I* (Invitrogen®)

0.5 µl de enzima *Nco I* (Invitrogen®)

2 µl de plásmido.

Homogenizar todos los componentes de la mezcla por pipeteo e incubar a 4°C durante toda la noche. Observar el producto de la reacción en un gel de agarosa al 0.8% y se visualizarlo en un transiluminador de luz UV.

Extracción de proteínas de callos embriogénicos de maíz.

1. En tubos de 1.5 ml colocar 200 mg del tejido previamente molido en nitrógeno líquido.
2. Añadir 200 µl de buffer de extracción de proteínas*, homogenizar perfectamente el tejido por vortexeo.
3. Centrifugar las muestras a 15, 000 rpm durante 15 minutos.
4. Recuperar el sobrenadante en tubos nuevos, evitando tomar otras fases.
5. Repetir los pasos 3 y 4.
6. Almacenar las proteínas solubles totales a -20°C.
Cuantificar las proteínas solubles totales (PST) en el programa Microplate 5.0 (BioRad®), utilizando el método de Bradford (BioRad®).

*Buffer de extracción de proteínas.

| | |
|----------------------------------|-------------------------|
| EDTA | 10mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.15% |
| KH ₂ PO ₄ | 0.04% |
| Triton 100X | 0.1% |
| NaCl | 0.61% |
| Ascorbato de Sodio | 5 mg/mL ⁻¹ * |
| PMSF | 1 mM* |

*Adicionar al momento de utilizarlo.

Western Blot para la proteína β-glucoronidasa.

1. Correr las proteínas solubles totales en un SDS-PAGE 10%.
2. Activar la membrana de PDFV con metanol absoluto y enjuagar la membrana con agua desionizada estéril.
3. Preparar una mezcla del amortiguador de transferencia CAPS 100 µM (10 ml) + Metanol absoluto (10 ml) y aforar con agua desionizada a 100 ml.
4. Poner la membrana junto con el gel de poliacrilamida en la solución preparada durante 30 minutos.
5. Realizar la transferencia a 75 mA durante 1 hora 30 minutos.
6. Posterior a la transferencia la membrana se tiñe con rojo de Ponceau al 0.5% para verificar que la transferencia se haya llevado a cabo correctamente.
7. La membrana se trata con las soluciones Restore A y B (Chemicon®), para remover los residuos del colorante.
8. Lavar la membrana con PBS 1X durante 10 minutos.
9. Bloquear la membrana con PBS al 5% de leche descremada, mediante 1 hora 30 minutos. Enjuagar la membrana realizando 3 lavados de 5 minutos c/u con PBS.

10. Incubar el primer anticuerpo anti β -glucoronidasa 1:1,000 (Invitrogen®) disuelto en buffer de bloqueo al 0.5% de tween 20, durante toda la noche a 4°C.
11. Repetir los lavados con PBS, al día siguiente e incubar el segundo anticuerpo anti IgG-conejo 1:5,000 (Sigma®) disuelto en buffer de bloqueo 0.5% de tween 20, durante 1 hora 30 minutos a 4°C.
12. Repetir los enjuagues con PBS, retirar los residuos y aplicar las soluciones de revelado por quimioluminiscencia (Millipore®).
13. Revelar en una placa fotográfica (Kodak®) y fijar la placa. Almacenar los resultados para su análisis.

Western Blot para la proteína E del virus del Oeste del Nilo.

1. Correr las proteínas solubles totales en un SDS-PAGE 10%.
2. Activar la membrana de PDFV con metanol absoluto y enjuagar la membrana con agua desionizada estéril.
3. Preparar una mezcla del amortiguador de transferencia CAPS 100 μ M (10 ml) + Metanol absoluto (10 ml) y aforar con agua desionizada a 100 ml.
4. Poner la membrana junto con el gel de poliacrilamida en la solución preparada durante 30 minutos.
5. Realizar la transferencia a 75 mA durante 1 hora 30 minutos.
6. Posterior a la transferencia la membrana se tiñe con rojo de Ponceau al 0.5% para verificar que la transferencia se haya llevado a cabo.
7. La membrana se trata con las soluciones Restore A y B (Chemicon®), para remover los residuos del colorante.
8. Lavar la membrana con PBS 1X durante 10 minutos.
9. Bloquear la membrana con PBS al 5% de leche descremada, mediante 1 hora 30 minutos. Enjuagar la membrana realizando 3 lavados de 5 minutos c/u con PBS.
10. Incubar el primer anticuerpo anti West Nile virus 8150 1:1,000 (Chemicon®) buffer de bloqueo al 0.5% de tween 20, durante toda la noche a 4°C.
11. Repetir los lavados con PBS, al día siguiente e incubar el segundo anticuerpo anti IgG-ratón NIF825 1:3,000 (Amersham Biosciences®) buffer de bloqueo al 0.5% de tween 20, durante 1 hora 30 minutos a 4°C.
12. Repetir los enjuagues con PBS, retirar los residuos y aplicar las soluciones de revelado de quimioluminiscencia (Millipore®).
13. Revelar en una placa fotográfica (Kodak®) y fijar la placa. Almacenar los resultados para su análisis.

CAPS 100 μ M (ácido 3-(ciclohexilamino)-1propanosulfónico).

4.426 mg CAPS (Sigma®).
Disolver en 200 ml de agua desionizada estéril.
Ajustar a pH a 11

Solución Salina Fosfatada (PBS 10X).

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 80.0 g |
| KCl | 2.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2.7 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 14.4 g |

Disolver en 500 ml de agua desionizada. Ajustar a pH 7.2-7.4 y aforar a 1 Litro.

Bis-Acrilamida al 30%

| | |
|-------------------------|--------|
| Acrilamida | 29.2 g |
| Bis-acrilamida | 0.8 g |
| Agua desionizada c.b.p. | 100 ml |

Amortiguador del gel apilador 2X (pH 6.8).

| | |
|-------------------------|--------|
| Tris-HCl | 7.88 g |
| SDS | 0.4 g |
| Agua desionizada c.b.p. | 100 ml |

Amortiguador del gen separador 2X (pH 8.8).

| | |
|-------------------------|---------|
| Tris-HCl | 23.64 g |
| SDS | 0.4 g |
| Agua desionizada c.b.p. | 100 ml |

Buffer de Corrida SDS-PAGE

| | |
|------------------|-----------|
| Tris base | 3.03 g |
| SDS | 1.0 g |
| Glicina | 14.4 g |
| Agua desionizada | 1.0 litro |

Solución de Teñido Coomassie SDS-PAGE

| | |
|-----------------------|--------|
| Agua bidestilada | 227 ml |
| Metanol Absoluto | 227 ml |
| Ácido acético glacial | 45 ml |
| Coomasie R250 | 1.25 g |

Nota: Disolver en agitación y almacenar en un frasco ámbar. El reactivo es estable y reciclable bajo estas condiciones.

Solución decolorante SDS-PAGE

| | |
|-----------------------|--------|
| Agua bidestilada | 227 ml |
| Metanol Absoluto | 227 ml |
| Ácido acético glacial | 45 ml |

Nota: El reactivo es reciclable filtrándolo en carbón activado, se desecha cuando presenta una coloración azul intensa. El SDS-PAGE se sumerge en el reactivo en agitación constante y realizando cambios constantes en la solución.

LITERATURA CITADA

Adams SC, Broom AK, Sammels LM, Hartnett AC, Howard MJ, Coelen RJ, Mackenzie JS, Hall RA. Glycosylation and Antigenic Variation among Kunjin Virus Isolates. *Virology* 1995; 206: 49-56.

Alonso-Padilla J, Loza-Rubio E, Escribano-Romero E, Córdoba L, Cuevas S, Mejía F, Calderón R, Milian F, Travassos da Rosa A, Weaver SC, Estrada-Franco JG, Saiz JC. The continuous spread of West Nile virus (WNV): Seroprevalence in asymptomatic horses. *Epidemiol Infect.* 2009; 137:1163–1168.

Anderson JF, Main AJ, Andreadis TG, Wikel SK, Vossbrinck CR. Transstadial transfer of West Nile Virus by three species of ixodes ticks (Acari Ixodidae). *J Med Entomol* 2003; 40:528-533.

Andreadis TG, Anderson JF, Vossbrinck CR. Mosquito Surveillance for West Nile Virus in Connecticut, 2000: isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius*, and *Culiseta melanura*. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 670-674.

Asnis DS, Conetta R, Teixeira AA, Waldman G, Sampson BA. The West Nile Virus outbreak of 1999 in New York: the Flushing Hospital experience. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 413-418.

Auliger IE, Peter SO, Schmid P, Gametyc Embryos of maize as a target for biobalistic transformation. Comparison to immature zygotic embryos. *Plant Cell Rep.* 2003; 21:585-591.

Bailey MR. A model system for edible vaccination using recombinant avidin produced in corn seed. Master of Science thesis. Texas A&M University 2000.

Beasley DW, Barrett AD. Identification of Neutralizing Epitopes within Structural Domain III of the West Nile Virus Envelope Protein. *Journal of Virology* 2002; 13097-13100.

Beasley DW. Recent advances in the molecular biology of West Nile Virus. *Curr Mol Med.* 2005; 5:835-850.

Beasley DW, Davis CT, Estrada-Franco J, Navarro-López R, Campomanes-Cortes A, Tesh RB, Weaver SC, Barret AD. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolate from México. *Emerg Infec Dis.* 2004(b); 10(12): 2221-2224.

Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile Viruses. *J. Gen. Virol.* 1997; 78: 2293-2297.

Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Animal Health Research Reviews* 2008; 9:71-86.

Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, González-Rojas JI, Komar N, Gubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ. Serologic evidence of West Nile Virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2003(9):853-856.

Boletín Epidemiológico. Organización Panamericana de la Salud, 2000; 21(4). Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/sha/be-v21n4-nilo.htm>.

Brennan FR, Bellaby T, Helliwell SM, Jones TD, Kamstrup S, Dalsgaard K, Flock JI, Hamilton WDO. Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol.* 1999; 73:930–938.

Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Pescar J, Heinz FX, Rey FA. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* 2004; 4:728-738.

Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: A New Invader of the Western Hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 2002 (a); 56: 371-402.

Brinton MA, Fernandez AV, Dispoto JH. The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* 1986 (b); 153:113–121.

Buning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell CJ. Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:380-386.

Burns KF. Congenital Japanese B encephalitis infection in swine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1950; 75:621-625.

Campomanes-Cortes A. Avances en la investigación del virus del Oeste del Nilo en México. Capítulo III “El virus del Oeste del Nilo en México”. Libro Técnico Núm 1. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Enero 2008:22-32.

Candela IM, Marie-Pascale F, Mollier K, Souque P, Despres P, Charneau P. A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. *J Gene Med.* 2005.

Centers for Disease Control and Prevention. Possible West Nile Virus Transmission to an infant though breast-feeding Michigan. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51:879.

Centers for Disease Control and Prevention. West Nile virus activity-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004; August 5; 53(30):686-687.

Chaturvedi UC, Mathur A, Chandra A, Das SK, Tandon HO, Singh UK. Transplacental infection with Japanese encephalitis virus. *J Infect Dis.* 1980; 141:712-715.

Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res.* 2002; 11:479–493.

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, BI FY. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci.* 1975; 18:659-668.

Chu PW, Westaway EG. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology* 1985; 140:68–79.

Cleaves GR, Dubin DT. Methylation status of intracellular dengue type 2 40S RNA. *Virology* 1979; 96:159–165.

Cleaves GR, Ryan TE, Schlesinger RW. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form ARNs. *Virology* 1981; 111:73–83.

Comité Intersectorial. Guía para la Vigilancia, Prevención y Control del virus del Oeste del Nilo. 2003, Agosto. <http://www.cenave.gob.mx/von/archivos/GUIAVON>

Cruz L, Cardenas VM, Abarca M, Rodriguez T, Reyna RF, Mario V. Serpas, Fontaine RE, Beasley DW, Amelia P, Travassos da Rosa A, Weaver SC, Tesh RB, Powers AM, Suarez-Rangel G. Short report: serological evidence of West Nile virus activity in el Salvador. *Am. J. Trop. Med.* 2005; 72(5):612–615.

Cuevas-Romero S, Loza-Rubio E, Gómez-Núñez L. Avances en la investigación del virus del Oeste del Nilo. Capítulo IV “Líneas de Investigación en México, para el estudio del virus del Oeste del Nilo”. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Libro Técnico Núm. 1, Enero 2008:6-14.

Dalsgaard K, Uttenthal A, Jones TD, Xu F, Merryweather A, Hamilton WD, Langeveld JP, Boshuizen RS, Kamstrup S, Lomonosoff GP, Porta C, Vela C, Casal JI, Meloen RH, Rodger PB. Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat Biotechnol.* 1997; 15:248–252.

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

Davis BS, Gwong-Jen J. Chang, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchell CJ, Bowen R, Bunning ML. West Nile virus recombinant vaccines protects mouse and horse from virus

challenge and expresses In Vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Virology* 2001; 4040-4047.

Davison AH, Traub-Dargatz JL, Rodeheaver RM. Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J Am Vet Assoc.* 2005; 226:240-245.

Deardorff E, Estrada-Franco JG, Brault AC, Navarro-López R, Campomanes-Cortes A, Paz-Ramírez P, Solis-Hernández M, Ramey WN, Davis CT, Beasley DW, Tesh RB, Barrett AD, Weaver SC. Introductions of West Nile virus strains to México. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(2):314-318.

Dekler J, Duke SO. Herbicide-resistant field crops. *Adv Agron.* 1995; 54:69–116.

Delgado López N, Andrade-Zárate V, Nellen-Hummel H. Fiebre del Oeste del Nilo. *Cir Cir.* 2003; 71:66-69.

D'Halluin K, De Block M, Janssens J, Leemans J, Reynaerts A, Botterman J. The *bar* gene as a selectable marker in plant engineering. *Methods Enzymol.* 1992; 216:415–426.

Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 2005; 339(2):153-163.

Droge W, Broer I, Pulher A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Plant* 1992; 187:142–151.

Duke SO. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. *Pest Manage Sci.* 2005; 61:211–218.

Duke SO, Scheffler BE, Dayan FE, Dyer WE. Chapter 6, Genetic engineering crops for improved weed management traits. In: Rajasekaran K, Jacks TJ, Finley JW (eds) *Crop biotechnology* 2002; 52–66.

Dupuis AP, Marra PP, Kramer LD. Serologic Evidence of West Nile Virus Transmission, Jamaica, West Indies. *Emerging Infectious Disease* 2003; 9(7):860-863.

Dus Santos MJ, Wigdorovitz A. Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. *Immunol Cell Bio.* 2005; 183(3):229-238.

Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernández-Salas I, Escobar-López R, Velazco-Olomos C, Soto-Gastalun LC, Avilés-Acosta M, Elizondo-Quiroga A, González Rojas JI, Contreras-Cordero JF, Guzmán H, Travassos da Rosa A, Blitvich BJ, Beaty BJ, Tesh RB. West Nile virus Isolation in human and mosquitoes, México. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:1449-1452.

Estrada-Franco JG, Navarro-López R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos da Rosa A, Clements T, Wang E, Ludwig GV, Cortés AC, Ramirez PP, Tesh RB, Barrett AD,

Weaver SC. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(12):1604-1607.

Emons AM, Kieft H. Somatic embryogenesis in maize (*Zea mays* L). In *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer-Verlag 1995; Berlin Heidelberg. 24-39.

Farfán-Ale JA, Blitvich BJ, Marlenee NL, Loroño-Pino MA, Puerto-Manzano F, García-Rejón JE, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Ortega-Salazar A, Chavéz-Medina J, Cremieux-Grimaldi JC, Correa-Morales F, Hernández-Gaona G, Méndez-Galvan JF, Beaty BJ. Antibodies of West Nile virus in asymptomatic mammals, bird, and reptiles in the Yucatán peninsula of México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; 74:908-914.

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.

Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Blitvich BJ, González-Rojas JI, Cavazos-Álvarez A, Marlenee NL, Elizondo-Quiroga A, Loroño-Pino MA, Gluber DJ, Cropp BC, Calisher CH, Beaty BJ. Serologic Evidence of West Nile virus Infection in Birds, Tamaulipas State, México. *Vector Borne and Zoonotic Disease* 2003; 3(4):209-213.

Freytag LC, Clements JD. Mucosal Adjuvants. *Vaccine* 2005; 23(15):1804-1813.

Gallagher SR. *GUS Protocols: using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. San Diego, CA, USA: Academic Press Inc 1992.

Gancz YA, Barker KI, Lindsay R, Dibernardo A, Mckeever K, Hunter B. West Nile Virus Outbreak in North American Owls, Ontario, 2002. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10 (12):2135-2142.

Gandhi R, Maheshwari SC, Khurana P. Transient gene expression and influence on foreign gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 1999; 35:232-237.

Gillisen JW, Metz LJ, Stiekema JS, Nap Jan-Peter. Biosafety of *E. coli* β -glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Research* 1998; 157-163.

Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. Vector competence of California mosquitoes for West Nile Virus. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:3110-111.

Gómez-Núñez L. Identificación de la proteína G en plantas transgénicas de maíz, y su evaluación como inmunógeno oral en ratones. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM 2007: 1-75.

Gould LH, Fikrig E. West Nile virus: a growing concern? *J Clin Invest.* 2004; 113:1102-1107.

Grenn CE, Armstrong CL. Plant regeneration in tissue culture of maize. In maize for biological research. Edited by W. F. Sheridan. University of Dakota Press, Grand Forks 1982. 367-372.

Groves SS, Turrel JM, Bailey LC, Morozov NV. Rapid active assay for the detection of antibodies to West Nile Virus in Chickens. *J Trop Med*. 2008; 78:63-69.

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

Hall RA, Nisbet DJ, Pham KB, Pyke AT, Smith GA, Khomykh AA. DNA vaccine coding for the full-length infectious Kunjin virus ARN protects mice against the New York strain of West Nile Virus. *PNAS* 2003; 100:10460-10464.

Hansch R, Koprek T, Mendel RR, Schulze J. An improved protocol for eliminating endogenous β -glucuronidase in barley. *Plant Sci*. 1995; 105: 63-69.

Hayes BE, Gubler, JD. West Nile virus: Epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu Rev Med*. 2005 (a); 12:12-14.

Hayes BE, Komar N, Nasci SR, Montgomery PS, O'Leary, RD, Cambell LG. Epidemiology and transmission dynamics of west Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis*. 2005 (b); 11:1163-1167.

Hayes BE, Sejvar JJ, Zaki RS, Lanciotti SR, Bode VA, Cambell LG. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile Virus disease. *Emerg Infect Dis*. 2005 (c); 11:1174-1179.

Heinz FX, Allison SL. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv. Virus Res*. 2000 (a); 55: 231–269.

Heinz FX, Purcell MS, Gould EA, Howard CR, Houghton M, et al. Family Flaviviridae. In *Virus Taxonomy 2000* (b): 860–78. San Diego: Academic 2000. 860-878.

Heinz FX, Stiasny K, Püschner-Auer G, Holzmann H, Allison SL, Mandl CW, Kunz C. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 1994; 198:109–117.

Höfle U, Blanco JM, Crespo E, Naranjo V, Jiménez-Clavero MA, Sánchez A, de la Fuente J, Gortazar C. West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Veterinary Microbiology* 2008; 129:171–178.

Hoke CH, Nisalak A, Sangawhipa N, Jatanasen S, Laorakapongse T, Innis BL, Kotchasene S, Gingrich JB, Latendresse J, Fukai K. Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccine. *N Engl J Med*. 1988; 608-614.

Hood EE, Jilka JM. Plant-based production of xenogenic proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10:382-386.

Hood EE, Witcher DR, Maddocks S, Meyer T, Baszcynski C, Bailey MR, Flynn P, Register J, Marshall L, Bond D, Kulisek E, Kusnadi A, Evangelista R, Kikolov Z, Wooge C, Mehig R, Hearn R, Kappel W.K, Ritlnd Z, Li CP, Howard JA. Commercial production of avidin from transgenic maize: Characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molec Breed.* 1997; 3:291-306.

Huang H-Y, Silengo JS, Whiteman CM, Kinney MR. Chimeric Dengue 2 PDK-53/West Nile Virus retain the phenotypic attenuation markers of the candidate PDK-53 vaccine virus and protect mice against lethal challenge with West Nile Virus. *Journal of Virology* 2005; 79 (12): 7300-7310.

Hubalek Z, Halouzka J. West Nile Fever-Areemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5:643-650.

Hubalek Z, Halouzka J, Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe. *Act Scientiarum Natural Brno.* 1996; 30: 1-95.

Jang-Hann J. CHU, Cern-Cher S. Chiang, Mah-Lee NG. Immunization of Flavivirus West Nile Recombinant Envelope Domain III Protein Induced Specific Immune Response and Protection against West Nile Virus Infection. *The Journal of Immunology* 2007; 2699-2705.

Jefferson RA. Plant promoter β -glucuronidase gene construct. *United States Patent No* 1993; 5: 268-463.

Jefferson RA, Kavanagh T, Bevan MW. Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 1987; 6 (13):3901-3907.

Jefferson RA, Wilson KJ. The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* 1991; Manual B14: 1-33.

Jia X-Y, Briese T, Jordan I, Rambaut A, Chi H-C. Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet* 1999; 354:1971-1972.

Jiménez Villalobos MJ. Transformación genética de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays* L) con el gen de la glicoproteína G del virus de la rabia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias-UNAM 2006; 1-98.

Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Shlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol.* 2005; 9:5414-5420.

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(2):378-383.

Kausch AP, Adams TR, Mangano SJ, Zachwieja W, Gordon-Kam, Saines R., Willwts G, Cahmbers SA, Adams W, Anderson JR., Williams G, Haines G. Effects of microprojectile bombardment of embryogenic suspension cell cultures of maize (*Zea Mays* L). Use for genetic transformation. *Plant* 1995; 196:501-509.

Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. Trans-complementation analysis of the flavivirus Kunjin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in ARN replication. *J Virol.* 1999; 73:9247–9255.

Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG. Coupling between replication and packaging of flavivirus ARN: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol.* 2001; 75:4633–4640.

Khromykh AA, Varnavski AN, Westaway EG. Encapsidation of the flavivirus Kunjin replicon ARN by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans. *J Virol.* 1998; 72:5967-5977.

Klein TM, Fitzpatrick-McElligott S. Particle Bombardment: a Universal Approach for Gene Transgene to Cells and Tissues. *Curr Opin Biocnol.* 1993; 4:583-590.

Klenk K, Komar N. Poor replication of West Nile virus (New York 1999 strain) in tree reptilian and one amphibian species. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69: 260-262.

Komar N. West Nile virus epidemiology and ecology in North America. *Advances in virus Research* 2003(a); 61: 185-214

Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis.* 2003 (b); 9: 311-322.

Komar O, Robbins MB, Klenk K, Blitvich BJ, Marlenee NL, Burkhalter KL, Gubler DJ, González G, Peña CJ, Peterson AT, Komar N. West Nile virus transmission in resident birds, Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* 2003(c); 9:1299-1302.

Komoba D, Sandermann H. Plant metabolism of herbicides with C–P bonds: phosphinothricin. *Pesticide Biochem Physiol.* 1992; 43:95–102.

Kosugi S, Ohashi Y, Nakajima K, Arai Y. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci.* 1990; 70:33-40.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossman MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Muchopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS. Structure of dengue virus. Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002; 108:717–725.

Kuno G. Transmission of arboviruses without involvement of arthropod vectors. *Act Virol.* 2001; 45:139-150.

Kusnadi RA, Evangelista LR, Hood EE, Howard AJ, Nikolov LZ. Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant β -glucuronidase. *Biotechnology and Bioengineering* 1998; 60:44-52.

Kusnadi RA, Nikolov LZ, Howard AJ. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering* 1997; 56:473-483.

Lamphear JB, Streatfield JS, Jilka MJ, Brooks AC, Barker KD, Turner DD, Delaney ED, García M, Wiggins B, Woodard LS, Hood EE, Tizard RI, Lawhorn B, Howard AJ. Delivery of subunit vaccines in maize seed. *Journal of Controlled Release* 2002; 169-180.

Lanciotti RS, Roehring JT, Deubel V, Smith J, Parker M. Origin of the West Nile virus responsible for the outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. *Science* 1999; 286:2333-2337.

Lieberman MM, Clements DE, Ogata S, Wang G, Corpuz G, Wong T, Martyak T, Gilson L, Coller BA, Leung J, Watts M, Tesh RB, Travassos da Rosa A, Humphreys T, Weeks-Levy C. Preparation and immunogenic properties of a recombinant West Nile subunit vaccine. *Vaccine* 2007; 25:414-423.

Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* 1999; 73:4611–4621.

Loeb M, Elliott SJ, Gibson B, Fearon M, Nosal R, Drebot M. Protective behavior an West Nile virus risk. *Emerg Infect Dis.* 2005; 9:1433-1435.

Loroño-Pino MA, Blitvich BJ, Farfán-Ale JA, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, Rosado-Paredes EP, García-Rejón JE, Gluber DJ, Calisher CH, Beaty BJ. Serology evidence of West Nile Virus infection in horses, Yucatán State, México. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9 (7):857-859.

Loza-Rubio E, Gómez-Núñez L, Cuevas-Romero S. Avances en la investigación del virus del Oeste del Nilo. Capítulo I “Generalidades”. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Libro Técnico Núm 1, Enero 2008 (a):6-14.

Loza-Rubio, E. Rojas, L. Gómez, M.T.J. Olivera, M. A. Gómez-Lim. Development of an edible Rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain. *Dev Biol (Karger)* 2008 (b): 131: 477-482.

Marfin AA, Gluber DJ. West Nile encephalitis: an emerging disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 2001; 33:1713-1719.

Mascarenhas JP, Hamilton DA. Artifacts in the localization of GUS activity in anthers of petunia transformed with a CaMV 35S-GUS Construct. *Plant J* 1992; 2:405–408.

Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 1989; 169:354–364.

Mathur A, Arora KL, Chaturvedi UC. Transplacental Japanese encephalitis virus (JEV) infection in mice during consecutive pregnancies. *J Gen Virol.* 1982; 59:213-217.

Minke JM, Audonnet JC, Fisher L. Equine viral vaccines: The past, present and future. *Vet Res.* 2004; 35:425-443.

Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V. Immunization against rabies with plant delivery antigen. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 2481-2485.

Monath TP, Liu J, Kanesa-Thanan N, Myers GA, Nichols R, Deary A, McCarthy K, Johnson C, Ermark T, Shin S, Juan Arroyo, Guirakhoo F, Kennedy JS, Ennis FA, Green S, Begford P. A live, attenuated recombinant West Nile virus Vaccine. *PNAS* 2006; 6694-6699.

Muckopadyay S, Bong-Suk K, Chipman RP, Rossman GM, Kuhn JR. Structure of West Nile Virus. *Science* 2003; 302:248.

Muller BP, Zumdick A, Schuphan I, Schmidt B. Metabolism of the herbicide Glufosinate ammonium in plant cell cultures of transgenic (rhizomania-resistant) and non-transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris*), carrot (*Daucus carota*), purple foxglove (*Digitalis purpurea*) and thorn apple (*Datura stramonium*). *Pest Manage Sci.* 2001; 57:46–56.

Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol.* 1993; 74:175–182.

Nowak T, Farber PM, Wengler G, Wengler G. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 1989; 169:365–376.

OECD. Module II: herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate-ammonium (phosphinothricin-tolerant). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops 203 transgenic plants. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology 2002 No. 25.

Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus: a primer for the clinician. *Ann Intern Med Assoc J* 2004; 168:1399-1405.

Peterson AT, Komar O, Navarro-Siguenza A, Navarro-Siguenza A, Robbins BM, Martínez-Meyer E. Priority Contribution. West Nile in the New World: potential impacts on the bird species. *Bird Conservation International* 2004; 14:215-232.

Pletnev AG, Claire MS, Elkins R, Speicher J, Murphy BR, Chanock RM. Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/Dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. *Virology* 2003; 15 (1):190-195.

Pletnev AG, Putnak R, Speicher J, Wagar EJ, Vaughn D. West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *PNAS* 2002; 3036-3041.

Pletnev SV, Zhang W, Muchopadhyay S, Fisher BR, Hernández R, Brown DT, Baker TS, Rossman MG, Kuhn RJ. Locations of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that E1 forms an icosahedral scaffold. *Cell*. 2001; 105: 127–136.

Poidinger M, Hall RA, Mackenzie JS. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology* 1996; 218: 417-421.

Prakash Shiva N, Tillai Prasad V, Chidambaram P, Cherian Shoba, Jayaprakash TL, Dasgupta A, Wang Qi, Mann MT, Spencer Mt; Boddupalli Raghava S. Effect of promoter driving selectable marker on corn transformation. *Transgenic Res* 2008; 17: 695-704.

Quirin R, Salas M, Zientara S, Zeller H, Labie J, Murri S, Lefrancois T, Petitclerc M, Martínez D. West Nile Virus, Guadeloupe. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10(4); 705-708.

Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis*. 2000; 6:319-328.

Rasche E. Development of glufosinate ammonium tolerant crops and the selective use of the herbicide glufosinate ammonium. In: McLean GD, Evans G (eds) *Herbicide-resistant crops and pastures in Australian farming systems*. Bureau of Resource Sciences 1995; 25–33.

Rey FA, Heinz C, Mandl C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 1995; 375:291-298.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 1985; 229:726–735.

Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol*. 2000; 18:1167–1171.

Roering JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A. Persistence of virus-reactive serum immunological m antibody in confirmed West Nile Virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:376-379.

Ruhland M, Engelhardt G, Pawlizki K. Distribution and metabolism of D=L-, L- and D-glufosinate in transgenic, glufosinate tolerant crops of maize (*Zea mays* L ssp *mays*) and oilseed rape (*Brassica napus* L. var *napus*). *Pest Manage Sci.* 2004; 60:691–696.

Salas-Benito JS, Del Ángel RM. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J. Virol.* 1997; 71:7246–7252.

Scherret JH, Poidinger M, Mackenzie JS, Broom AK, Deubel V, Lipkin WI, Briese T, Gould EA, Hall RA. The relationships between West Nile and Kunjin Viruses. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:697-705.

Smith, ML, Mason HS, Shuler ML, Hepatitis B surface antigen (HbsAg) expression in plant cell culture: kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 80:812–822.

Solomon T. Flavivirus encephalitis. *N. Engl. J. Med* 2004; 351:370-378.

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

Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heninz FX. Proteolytic activation of tickborne encephalitis virus by furin. *J Virol.* 1997; 71:8475–8481.

Streatfield SJ, Howard JA. Plant-based vaccines. *International Journal of Parasitology* 2003 (b); 33:479-493.

Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodard SL, Beifuss KK, Horn ME, Delaney DE, Tizard IR, Howard JA. Plant-based vaccines: unique advantage. *Vaccine* 2001; 2742-2748.

Streatfield SJ, Lane JR, Brooks CA, Barker DK, Poage ML, Jocelyne MM, Lamphear BJ, Drees CF, Jilka JM, Hood EE, Howard JA. Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine* 2003. 21:812-815.

Streatfield SJ, Mayor JM, Barker DK, Brooks C, Lamphear BJ, Woodard SL, Beifuss KK, Vicuna DV, Jilka JM, Howard JA. Development of an edible subunit vaccine in corn against enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*, *In Vitro*. *Dev Biol-Plant* 2002; 38:11-17.

Swayne DE, Beck JR, Smith CS, Shieh WJ, Zaki SR. Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile Virus. *Emerg Infect Dis.* 2002; 7:741-753.

Tacket CO. Plant-derived vaccines against diarrhea diseases. *Vaccine* 2005; 23(15):1866-1869.

Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manage Sci.* 2005; 61: 246–257.

Tan S, Evans R, Singh B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids.* 2006; 30: 195–204.

Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Rakesh Tuli. Plants as bioreactors for the production vaccines antigens. *Biotechnology Advances.* 2009; Article in Press.

Towsend PA, Komar N, Komar O, Navarro-Siguenza A, Robbins BM, Martínez-Meyer E. Priority Contribution. West Nile in the New World: potential impacts on the bird species. *Bird Conservation International* 2004; 14:215-232.

Vasil IK. Phosphinothricin-resistant crops. *Herbicide resistant crops.* CRC Press 1996; 85–91.

Wally O, Jayaraj J, Punja ZK. Comparative expression of β -glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Rep* 2008; 27:279-287.

Walmsley MA, Arntzen JC. Plant for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol.* 2000; 11: 126-129.

Watts DM, Tesh RB, Siirin M, Travassos da Rosa A, Newman PC, Clements DE, Ogata S, Coller BA, Weeks-Levi C, Lieberman MM. Efficacy and durability of a recombinant subunit West Nile vaccine candidate in protecting hamsters from West Nile encephalitis. *Vaccine* 2007; 25: 2913-2918.

Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1274–1278.

Wengler G. Cell-associated West Nile flavivirus is covered with EC pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J Virol.* 1989; 63:2521–2526.

Wengler G, Wengler G. The carboxy-terminal part of the NS3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an ARN-stimulated NTPase. *Virology* 1991; 184:707–715.

Westaway EG, Khromykh AA, Mackenzie JM. Nacent flavivirus ARN colocalized in situ with double-stranded ARN in stable replication complexes. *Virology* 1999; 258:108–117.

Wigdorovitz A, Mozgovej M, Santos MJ, Parreno V, Gómez C, Pérez-Filgueira DM, Trono KG, Rios RD, Franzone PM, Fernández 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; 85:1825-1832.

Witcher DR, Hood EE, Perterson D, Bailey M, Bond D, Kusnadi A, Evangelista R, Nikolov Z, Wooge C, Mehig R, Kappel J, Register J, Howard JA. Commercial production of β -glucosidasa (GUS): a model system for the production of proteins in plants. *Molec Breed*. 1998; 4:301-312.

Xin YY, Ming ZG, Peng GY, Jian A, Min LH. Safety of a Live-Attenuated Japanese Encephalitis Virus Vaccine (SA₁₄-14-2) for Children. *Am J Trop Med Hyg*. 1988; 214-217.