

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PRESENTACIÓN DE UN PÉPTIDO ESPECÍFICO DE LA  
PROTEÍNA E2 DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA  
EN LA SUPERFICIE DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**MARÍA MARCELA ROBLES MACHUCA**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. ABEL GUTIÉRREZ ORTEGA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009.**

**BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. H53077

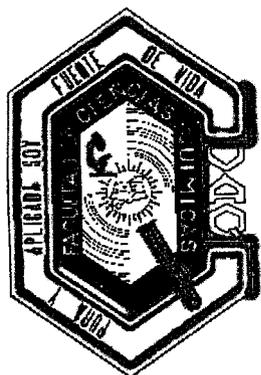
No. Título

Clas. JS

636.4088

R666 p

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PRESENTACIÓN DE UN PÉPTIDO ESPECÍFICO DE LA  
PROTEÍNA E2 DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA  
EN LA SUPERFICIE DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**MARÍA MARCELA ROBLES MACHUCA**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. ABEL GUTIÉRREZ ORTEGA**

**SINODALES**

**Dr. ABEL GUTIÉRREZ ORTEGA**  
DIRECTOR

**Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES**  
SINODAL

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**  
SINODAL

**Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ**  
SINODAL

---

---

---

---

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada  
puerta que la ciencia logra abrir.”*

Albert Einstein (1879-1955)

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mis padres, Antonio Robles y Ma. Luisa Machuca, por ser mi mayor inspiración y la razón por la que llegado hasta aquí, ustedes son el mejor ejemplo de vida y de gran orgullo, los amo.

A mis hermanos, Sara y Fer, por ser mí sustento al estar siempre conmigo, cuidándome. Los quiero demasiado, son mis mejores amigos.

Al igual, agradecer a tres ángeles que han aparecido en las distintas etapas de mi vida y me han brindado su amistad incondicional. Citlalli, Delmira (con Gabriel, mi ahijado) y Montserrat. Así como quien siempre será el amor de mi vida, Natanael, por tu inmensa ayuda y el que siempre estuviste ahí de manera incondicional, jamás olvidare lo mucho que hiciste por mí.

A mis grandes amigos que me han dejado formar parte de su vida: Gaby, Alex, Rubén, Oscar, Carlos, Crystian, Ivonne, Memo, Alonso, Karely, Paty, Adriana y a todos aquellos que me ayudaron de una forma u otra a conseguir mis metas.

A mis profesores de la carrea por sus enseñanzas y fe en esta primera generación, a mis inolvidables compañeros, así como a Arleth que siempre fue tan accesible.

También un agradecimiento al CIATEJ y las personas que lo conforman por abrirme las puertas y permitir desarrollarme en un ambiente tan enriquecedor.

Finalmente, a mis dos grandes tutores, la Dra. Angelina que es un gran ejemplo a seguir y el Dr. Abel Gutiérrez, un gran investigador y una maravillosa persona, que me brindó conocimiento, apoyo y que ha creído en mí.

A todos y cada uno de ustedes, muchas GRACIAS.

De la misma manera se le agradece de la forma más atenta al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyar al proyecto 83863-01 por medio del Fondo de Investigación Científica Básica SEP – CONACYT 2007, con material y reactivos necesarios para llevar a cabo este trabajo de tesis; así como a la Secretaría de Educación Pública (SEP) por el apoyo económico para titulación proporcionado por medio del Fortalecimiento del programa de becas 2008, BecaNET superior con numero de folio 20080065669.

## ÍNDICE GENERAL

| Contenido  | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE GENERAL   | i      |
| ÍNDICE DE CUADROS  | iv     |
| ÍNDICE DE FIGURAS  | v      |
| RESUMEN  |        |
| I. INTRODUCCIÓN  | 1      |
| II. ANTECEDENTES   | 3      |
| II.1 La fiebre porcina clásica                               | 3      |
| II.1.1 Patogenia y la transmisión                            | 3      |
| II.1.2 Control y erradicación en México                      | 5      |
| II.2 Virus de la fiebre porcina clásica                      | 6      |
| II.2.1 Relaciones antigénicas y genéticas                    | 7      |
| II.2.2 Genoma  | 8      |
| II.2.3 Componentes virales                                   | 9      |
| II.2.4 Glicoproteína E2                                      | 10     |
| II.2.5 Ensayos de inmunodiagnóstico para FPC                 | 14     |
| II.2.5.1 ELISA   | 15     |
| II.3 Partículas tipo virus                                   | 17     |
| II.3.1 Plásmido HBcAg  | 17     |
| II.4 El tabaco como modelo para expresar proteínas           | 19     |
| II.5 Técnicas para expresar proteínas heterologas en plantas | 20     |
| II.5.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                      | 20     |
| II.5.1.1 Proceso de infección                                | 22     |
| II.5.2 Agroinfección   | 24     |
| II.5.3 Tipos de transformación                               | 25     |
| II.5.3.1 Estructura de los vectores binarios                 | 26     |
| II.5.4 Electroporación                                       | 27     |

|  |    |
|--|----|
| III. HIPÓTESIS   | 28 |
| IV. OBJETIVOS  | 29 |
| VI.1 General   | 29 |
| VI.2 Específicos   | 29 |
| V. METODOLOGÍA   | 30 |
| V.1 Ubicación del ensayo   | 30 |
| V.2 Materiales   | 30 |
| V.2.1 Plásmidos utilizados   | 30 |
| V.2.2 Reactivos  | 32 |
| V.2.3 Material biológico   | 32 |
| V.2.4 Equipos  | 32 |
| VII.3 Métodos  | 34 |
| V.3.1 Diseño y alineación de la secuencia TAVSPTTLR del epítope de la glicoproteína E2 del VFPC.                 | 34 |
| V.3.2 Inserción de la región codificante del epítope de VFPC en el gen del antígeno de la nucleocápside del VHB. | 34 |
| V.3.2.1 Verificación de la presencia de la región codificante TAVSPTTLR.   | 36 |
| V.3.3 Incorporar la fusión genética HBcAg-TAVSPTTLR en el plásmido pHBV33.                                       | 38 |
| V.3.3.1 Verificar el gen quimérico HBc-FPC.  | 40 |
| V.3.4 Transformación en planta de tabaco   | 40 |
| V.3.4.1 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .  | 40 |
| V.3.4.2 Transformación de <i>N. tabacum</i> por <i>A. tumefaciens</i> .  | 41 |
| V.3.5 Análisis molecular de líneas transformantes.   | 42 |
| VI. RESULTADOS   | 44 |
| VI.1 Diseño de oligonucleótidos para la secuencia TAVSPTTLR.   | 44 |
| VI.2 Incorporación de la región TAVSPTTLR en el plásmido   | 44 |

|  |    |
|--|----|
| pHBc.  |    |
| VI.3 Confirmación de la secuencia parcial del plásmido pHBc-FPC por secuenciación.                               | 47 |
| VI.4 Incorporar la fusión genética HBcAg-TAVSPTTLR en el plásmido pHBV33.  | 48 |
| VI.4.1 Verificación del plásmido binario pHBV33-FPC por patrón de bandas.  | 50 |
| VI.5 Expresión del plásmido pHBV33-FPC en hojas de <i>N. tabacum</i> .   | 51 |
| VI.6 Análisis de la presencia de la región codificante de la proteína E2 del VFPC en líneas celulares de tabaco. | 54 |
| VII. DISCUSIÓN   | 57 |
| VIII. CONCLUSIÓN   | 62 |
| IX. PERSPECTIVAS   | 63 |
| X. BIBLIOGRAFÍA  | 64 |
| ANEXOS.  | 68 |
| 1. FORMULACIÓN PARA PREPARAR MEDIOS DE CULTIVO.  | 68 |
| 2. SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pHBc Y pHBcFPC.  | 70 |
| 3. CERTIFICADO DE ANÁLISIS EXPEDIDO POR INVITROGEN PARA LOS OLIGONUCLEÓTIDOS POR EL VECTOR NT1®.                 | 72 |
| 4. CROMATOGRAMAS DE LAS COLONIAS TRANSFORMANTES DE <i>E. COLI</i> DH5α CON EL PLÁSMIDO pHBc-FPC.                 | 74 |
| 5. ABREVIATURAS.   | 76 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |  | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Descripción funcional de las secuencia del genoma del VFPC.  | 11     |
| 2      | Métodos utilizados para el diagnóstico de laboratorio del FPC.   | 15     |
| 3      | Selección del vector binario Ti.   | 27     |
| 4      | Reactivos de uso general.  | 32     |
| 5      | Reactivos de uso molecular.  | 32     |
| 6      | Reactivos para métodos de selección y crecimiento.   | 33     |
| 7      | Tratamiento de digestión realizada a la Mezcla FPC.  | 35     |
| 8      | Tratamiento de digestión realizada al plásmido pHBc.   | 36     |
| 9      | Análisis del gen quimérico por digestión del plásmido pHBV33-FPC.  | 40     |
| 10     | Ensayos de transformación de <i>A. tumefaciens</i> .   | 41     |
| 11     | Condiciones para las reacciones en PCR y RT-PCR.   | 43     |
| 12     | Concentración de ácidos nucleicos de las colonias transformadas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .           | 47     |
| 13     | Concentración de ácidos nucleicos de las secuencias obtenidas en la digestión con las enzimas XhoI / SacI. | 48     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |  | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Principales vías de infección de la fiebre porcina clásica.            | 4      |
| 2      | Situación actual en la erradicación y control de la FPC en México.     | 5      |
| 3      | Virus de la fiebre porcina clásica.                                    | 6      |
| 4      | Organización del genoma presente en el ORF del VFPC.                   | 9      |
| 5      | Representación de las proteínas estructurales del VFPC.                | 10     |
| 6      | Glicoproteína E2 del VFPC.   | 12     |
| 7      | Árbol filogenético basado en la región E2 (190 nt) del VFPC.           | 13     |
| 8      | Comparación de la secuencia E2 del VFPC.                               | 14     |
| 9      | Antígeno de nucleocápside (HBcAg) del virus de la hepatitis B.         | 18     |
| 10     | Microscopía electrónica de la partícula tipo virus en <i>E. coli</i> . | 19     |
| 11     | Esquema del plásmido Ti con la región T-DNA de <i>Agrobacterium</i> .  | 21     |
| 12     | Genes de virulencia de <i>A. tumefaciens</i> .                         | 22     |
| 13     | Modelo de transformación genética mediada por <i>A. tumefaciens</i> .  | 23     |
| 14     | <i>A. tumefaciens</i> como vehículo para transformar plantas.          | 24     |
| 15     | Diagrama de flujo del procedimiento general.                           | 31     |
| 16     | Representación esquemática de la mezcla FPC.                           | 34     |
| 17     | Plásmido pHBc.   | 35     |
| 18     | Análisis por digestión enzimática del plásmido pHBc-FPC.               | 37     |
| 19     | Plásmido pHBV33.   | 38     |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 20 | Ilustración de las bandas correspondientes a los plásmidos pHBc-FPC y pHBV33.               | 39 |
| 21 | La representación esquemática del plásmido pHBc-FPC por el paquete informático Vector NT1®. | 45 |
| 22 | Análisis de ADN de <i>E. coli</i> transformadas con pHBc-FPC.                               | 46 |
| 23 | Análisis del ADN de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con pHBV33-FPC.               | 49 |
| 24 | Verificación de la presencia del gen quimérico HBc-FPC.                                     | 50 |
| 25 | Transformación de explantes de <i>N. tabacum</i> vía <i>A. tumefaciens</i> .                | 52 |
| 26 | Crecimiento de plantas transformadas con pHBV33 y pHBV33-FPC.                               | 53 |
| 27 | Verificación de la integridad del ARN vegetal.  | 54 |
| 28 | Análisis de las líneas transformantes de <i>N. tabacum</i> .                                | 55 |

## RESUMEN

La fiebre porcina clásica es una enfermedad viral altamente contagiosa de difícil erradicación. Aunque la mayoría de los Estados en México están declarados libres de la presencia de dicha enfermedad, existen brotes aislados que han resultado positivos en los ensayos serológicos de rutina ocasionados por virus pertenecientes a la misma familia del virus de la fiebre porcina clásica, debido a la homología que tiene con la diarrea viral bovina,. En México no existe una metodología molecular específica para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de la fiebre porcina clásica. En el presente trabajo se inició con el desarrollo de una plataforma que permitiera el reconocimiento específico de anticuerpos contra la proteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica. Para este propósito, se planeó una estrategia que consiste en la generación de partículas tipo virus quimérico que exponen de manera superficial una secuencia altamente conservada entre las cepas del virus de la fiebre porcina clásica, la cual no se encuentra en las cepas de diarrea viral bovina. Se transformaron explantes de *N. tabacum* con un plásmido binario que posee un gen quimérico formado por el antígeno de nucleocápside del virus de la hepatitis B y la secuencia TAVSPTTLR de la proteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica y se demostró la presencia de transgén mediante la técnica de PCR. Asimismo, se determinó la expresión del transgén mediante RT-PCR. Ambas pruebas demuestran que se pudieron obtener líneas estables de tabaco que poseen y expresan el gen quimérico. Las líneas obtenidas de este trabajo pueden ser aprovechadas para el desarrollo de un diagnóstico diferencial de fiebre porcina clásica, así como para la generación de una vacuna que permita la distinción entre animales vacunados e infectados.

## I. INTRODUCCION

Desde la aparición de la fiebre porcina clásica (FPC) en la década de 1830 en los Estados Unidos de América, esta enfermedad ha sido una de las que más pérdidas económicas han provocado a la porcicultura mundial y juega un rol muy importante en la apertura o cierre de mercados de sus productos. En México existe una campaña de control y erradicación de la FPC basada en la vacunación intensiva, la cuarentena y el sacrificio de los animales infectados.

La FPC es una enfermedad viral altamente contagiosa y es considerada la enfermedad más importante del cerdo, por lo que es una de las 16 en la lista de enfermedades de la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE). Afecta a los cerdos de todas las edades y puede presentarse en una forma aguda, subaguda, crónica, atípica o inaparente. Aquellos animales infectados de una forma persistente con el virus de la FPC son la principal causa del mantenimiento de la infección y solo puede ser diagnosticado en laboratorios especializados.

El término *pestivirus* (del latín *pestis*) fue acuñado en 1973 para agrupar a los virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) y el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), que afectan porcinos y bovinos, respectivamente; posteriormente, se incluyó en este grupo al virus de la enfermedad de la frontera (VEF), que afecta los ovinos. Estos *pestivirus* tienen en común características en su genoma, morfología y la relación antigénica; mientras su posición taxonómica los agrupa dentro de la familia *Flaviviridae*.

El VFPC y el VDVB son patógenos para rumiantes, pero el VDVB puede también infectar el ganado porcino causando en ocasiones infecciones con cuadro clínico y lesiones similares a la enfermedad de FPC. Se ha comprobado que ciertas cepas del VFPC inducen anticuerpos neutralizantes frente al VDVB, y que cerdos inoculados con VDVB pueden ser inmunizados parcialmente frente a VFPC.

Las mayores diferencias antigénicas entre VFPC y otros *pestivirus* se encuentran sobre la glicoproteína E2, como lo demuestran distintos estudios realizados utilizando anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos frente a diferentes epítopes de esta proteína. Esta glicoproteína está altamente conservada entre los *pestivirus* y es esencial para generar una reacción en el animal produciendo anticuerpos policlonales neutralizantes contra dicho virus.

Actualmente se utilizan partículas tipo virus (PTV's) no infecciosas para exponer secuencias de aminoácidos provenientes de agentes infecciosos, generando una respuesta de anticuerpos de manera específica. Estas partículas son un método viable para exponer una secuencia corta de la glicoproteína E2 del VFPC en un sistema biológico de interés, para ser utilizado en el diagnóstico clínico de la enfermedad FPC.

La infección de los cerdos por los *pestivirus* puede ser un problema para el diagnóstico serológico, ya que la homología antigénica y genética, así como los anticuerpos inducidos por la infección tanto del VDVB como del VEF pueden dar falsos positivos. En México no se ha desarrollado la metodología de tipo molecular para un diagnóstico altamente específico de la FPC. Debido a esto, el presente trabajo pretende establecer una plataforma para el desarrollo de un diagnóstico único que cubra la necesidad de las técnicas complementarias y confirmatorias, eliminando, de esta manera, falsos positivos que origina la reacción cruzada de anticuerpos contra los antígenos de otros *pestivirus*.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 La Fiebre Porcina Clásica

La fiebre porcina clásica (FPC) es una enfermedad vírica que afecta al ganado porcino. Fue descrita por vez primera en Ohio, estados Unidos de América (EUA) a principios del siglo XIX, apareciendo luego en Europa en 1862. (Sánchez-Vizcaíno, 2003). Hoy en día está ampliamente distribuida en los cinco continentes.

La FPC es la enfermedad viralmente infecciosa más importante del cerdo, es altamente contagiosa y tiene una gran importancia como enfermedad transfronteriza, por lo que está incluida en la lista A de la Organización Mundial de Sanidad Animal (Moennig, 2000), jugando un papel importante en la apertura y cierre de mercados de productos porcinos causando importantes pérdidas económicas a esta industria (Pinto, 2003).

El agente causal de esta enfermedad es el virus de la fiebre porcina clásica (VFPC), un miembro del género *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* (Chen y col., 2008). Su hospedero natural son los animales que pertenecen a la familia *Suidae*, siendo susceptibles no solo el cerdo doméstico sino también el silvestre (Moening, 2000). El virus es capaz de replicarse en otras especies animales como jabalíes, venados, conejos y animales de experimentación, provocando una reacción febril, prácticamente asintomática (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

#### II.1.1 Patogenia y transmisión

La FPC es una enfermedad de carácter hemorrágico que se puede manifestar en su forma aguda, subaguda o crónica y suele penetrar en el organismo por ingestión, inhalación, piel o semen (Van Oirschot, 2003; Toledo y col., 2007).

El virus se replica en amígdalas, lo que se conoce como infección oronasal, o en los ganglios linfáticos (vaginal o piel). Tras una primera fase de replicación, el virus pasa a la sangre produciendo viremia y se concentra en órganos diana (bazo, ganglios, riñón, pulmón, médula ósea) donde se producen nuevas replications víricas (Figura 1) y las lesiones características de carácter hemorrágico (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

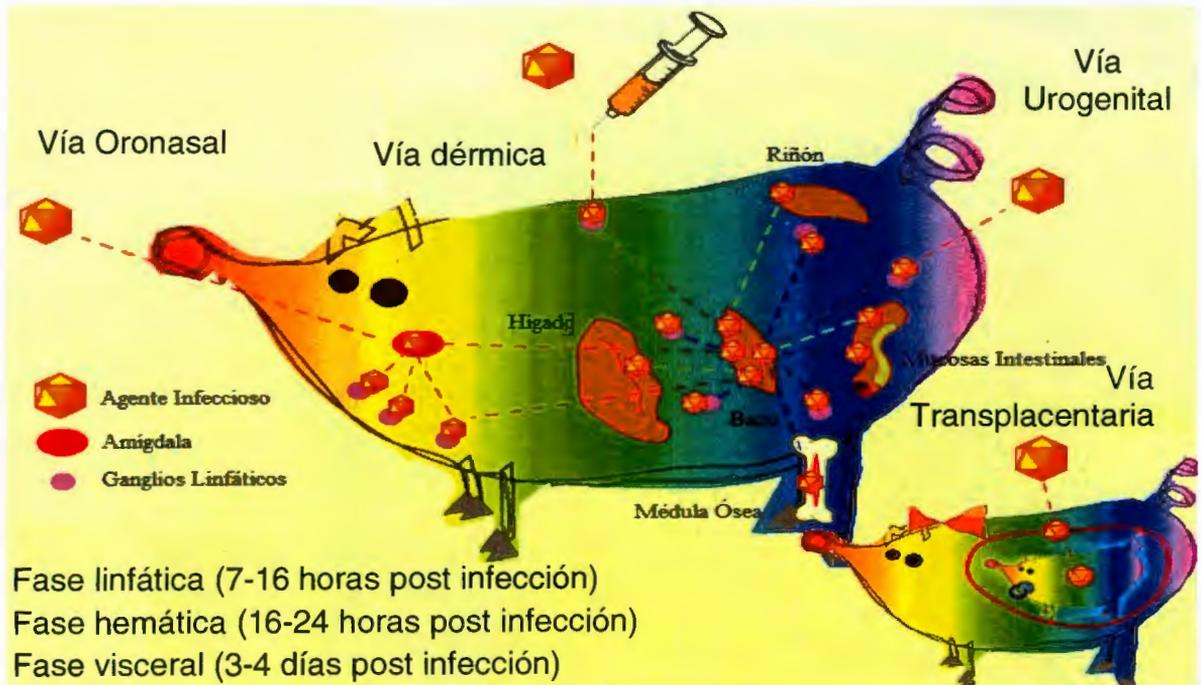


Figura 1. Principales vías de infección de la fiebre porcina clásica (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

Es importante destacar la transmisión de madres portadoras en la infección transplacentaria (Figura 1), ya que el virus es capaz de atravesar la placenta de las cerdas gestantes e infectar el feto. Las consecuencias de esta infección pueden ser abortos o crías muertas al nacer; en dependencia del tiempo de gestación en que ocurre la infección, pueden nacer crías inmunotolerantes al virus, debido a que puede ocurrir una infección a través de la madre (Moening, 2000). Las crías

permanecen infectadas y virémicas hasta su muerte, lo que genera un foco estable de diseminación del virus en la población (Toledo y col., 2007).

### II.1.2 Control y erradicación de la FPC en México

Los primeros casos de la FPC en México datan de 1876 y fueron atribuidos a la importación de ganado porcino de los EUA. Desde entonces, la enfermedad se tornó enzoótica, y no fue hasta 1973 cuando se estableció un programa para el control de la FPC y en 1980, una campaña para el control y la erradicación de la FPC en todo el país (Morilla, 1994).

Actualmente, la campaña nacional contra la fiebre porcina clásica para erradicar la enfermedad en el territorio nacional tiene como base la NOM-037-ZOO-1995 (SAGARPA, 2007) y se ha permitido dividir el país en tres zonas: la libre, la erradicación y la de control (Figura 2).



Figura 2. Situación actual en la erradicación y control de la FPC en México (SAGARPA, 2007).

En zonas en control, la vacunación se realiza utilizando una cepa china, PAV-250 mantenida en conejos, en la porcicultura tecnificada y de traspatio, verificación

de granjas libres de la enfermedad, control del patógeno a través de autorización para su comercialización, así como control en la movilización de cerdos, productos y subproductos mediante previa autorización (Morilla, 1994). En zonas libres se utiliza el control de la movilización de cerdos, sus productos y subproductos, así como la vigilancia epidemiológica activa mediante monitoreos estatales. Se está promoviendo la aplicación de vacuna contra FPC en forma masiva en Estados en control con el fin de elevar las coberturas de vacunación y eliminar la enfermedad en estas zonas (SAGARPA, 2007).

No obstante, la FPC seguirá siendo probablemente una grave amenaza en todo el mundo a causa de la globalización y la intensificación del comercio y transporte del cerdo, el aumento en la densidad de rumiantes en muchas zonas, el aumento de cerdos silvestres que actúan como reservorios del virus y la alimentación inadecuada con alimentos contaminados (Van Oirschot, 2003).

## II.2 Virus de la Fiebre Porcina Clásica

La enfermedad de la FPC es altamente contagiosa y es causada por un virus perteneciente al género *pestivirus* de la familia *Flaviviridae*, denominado virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) (Chen y col., 2008). Es un virus con envoltura, de un diámetro de 40 a 60 nm y una nucleocápside de simetría hexagonal (Sánchez-Vizcaíno, 2003; Toledo y col., 2007), tal como lo muestra la Figura 3.

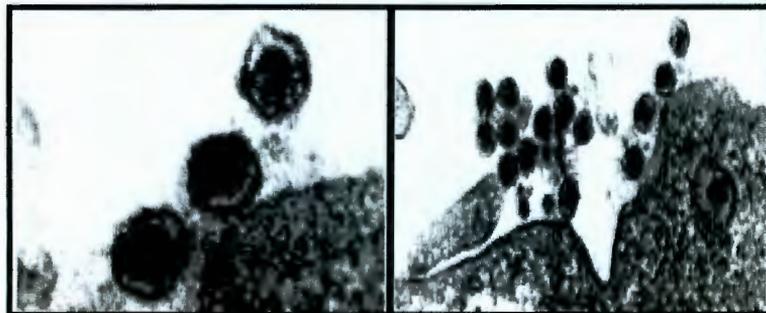


Figura 3. Virus de la fiebre porcina clásica (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

El VFPC infecta principalmente las células presentadoras de antígenos, como células endoteliales, macrófagos y células dendríticas, y al mismo tiempo provoca apoptosis en linfocitos B y T que no están directamente infectadas por el virus (Ganges, 2007). Es estable en un rango de pH entre 8 y 9 y la presencia de lipoproteínas en su envoltura hace que el virus se inactive rápidamente con disolventes orgánicos, como cloroformo y éter, así como detergentes (Moennig, 2000).

### II.2.1 Relación antigénica y genética

El VFPC se encuentra estrechamente relacionado, tanto antigénica como genéticamente, con otros dos virus integrantes del mismo género *pestivirus*, el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) (Rümenapf y col., 1993). Estos dos virus son patógenos para los rumiantes, vacas y ovejas respectivamente, aunque el VDVB puede también infectar el ganado porcino, causando en ocasiones infecciones con cuadro clínico y lesiones similares a la FPC (Rivera, 1994). Se ha comprobado que ciertas cepas de VFPC inducen anticuerpos neutralizantes frente al VDVB, y que cerdos inoculados con VDVB pueden ser inmunizados parcialmente frente a VFPC (Moennig, 2000).

Por otra parte, estudios comparativos de secuencias entre distintos aislados de VFPC y VDVB han demostrado la presencia de zonas de alta homología entre ambos virus, tanto en sus proteínas como en su genoma, siendo esta homología del 66 al 74 % en nucleótidos y hasta de un 85 % en aminoácidos, dependiendo de las cepas estudiadas (Sánchez-Vizcaíno, 2003). Las mayores diferencias antigénicas y genéticas entre el VFPC y otros *pestivirus* se encuentran sobre la proteína E2, como lo demuestran distintos estudios realizados utilizando anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos frente a diferentes epítopes de esta proteína (Lin y col., 2000)

## II.2.2 Genoma

El genoma del VFPC ha sido clonado y secuenciado en su totalidad, conociéndose su distribución y localización (Dong y Chen, 2006). Es de tipo lineal y no segmentado, formado por una molécula de ARN viral de cadena simple y polaridad positiva, y una longitud de 12,284 nucleótidos (12.3 kb), aproximadamente (Chen y col., 2008).

Los terminales 5' de *Flavivirus* presentan un cap de nucleótido metilado, mientras que otros miembros de esta familia no lo tienen y codifican un punto de entrada ribosómico (Lin y col., 2000; Sánchez-Vizcaíno, 2003); tal es el caso del VFPC, donde el inicio de la traducción de su poliproteína se produce como resultado de la unión ribosomal de ~350 nucleótidos al segmento de entrada interna ribosomal, el IRES (Sizova y col., 1998). Los *Flaviviridae* carecen de un extremo 3' poliadenilado (Lin y col., 2000; Sánchez-Vizcaíno, 2003).

El virus contiene una fase de lectura abierta (ORF) de gran tamaño que codifica para una poliproteína de aproximadamente 3,900 aminoácidos, que es procesada posteriormente por proteasas celulares y virales para dar lugar a las proteínas virales maduras. El ORF está flanqueado por una región 5' no codificante (5'UTR) de aproximadamente 400 nucleótidos y una región 3' no codificante (3'UTR) de alrededor de 200 nucleótidos (Lin y col., 2000; Sánchez-Vizcaíno, 2003; Risatti y col., 2005; Chen y col., 2008).

La distribución y localización de los productos de los genes presentes en el ORF se ve ilustrado en la Figura 4 y posteriormente descritos en el Cuadro 1. Donde las regiones Npro, p7 y NS2 a NS5B son seis proteínas no estructurales y las regiones Core, E<sub>ms</sub>, E1 y E2 son proteínas codificadas con funciones estructurales (Risatti y col., 2005; Chen y col., 2008).

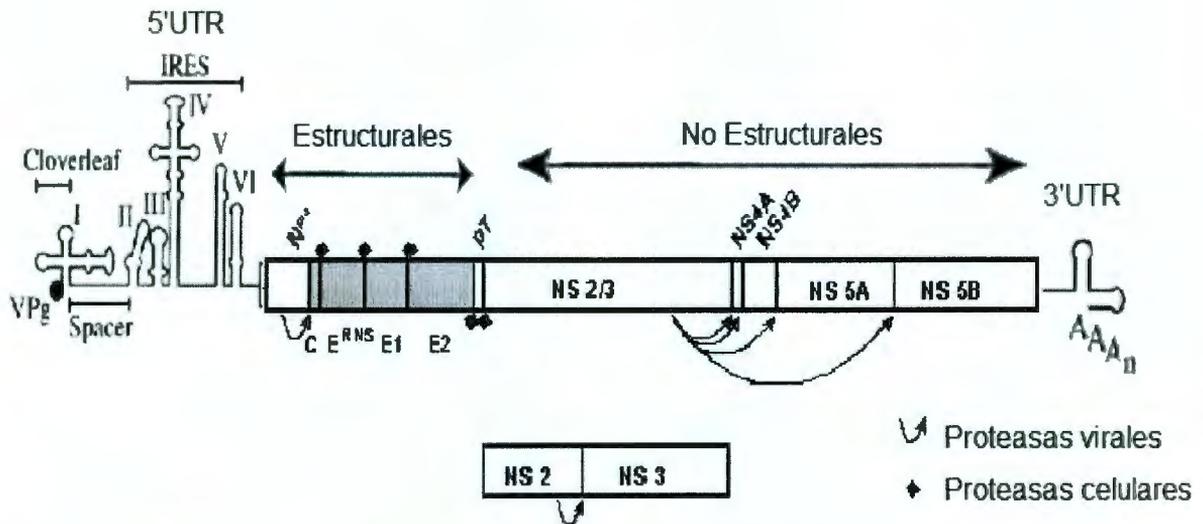


Figura 4. Organización del genoma presente en el ORF del VFPC (Sizova y col., 1998; Risatti y col., 2005).

### II.2.3 Componentes virales

En la secuencia del genoma del VFPC se tiene caracterizado cuatro proteínas estructurales del virus (Figura 5), la proteína C no glicosilada (core) o proteína p14, que es un componente de la nucleocápside que rodea al virus y gran parte de su secuencia es altamente conservada en todas las cepas del VDVB y VEF; las otras tres son glicoproteínas: la proteína E1 (gp 55), la proteína E2 (gp 44) y la E<sub>ms</sub> (gp 33) (Rivera, 1994; Lin y col., 2000)

La proteína E<sub>ms</sub> está localizada en la superficie del virion como homodímero y también es secretada al medio extracelular. Las proteínas E1 y E2 están presentes en la envoltura viral como heterodímero E1-E2, aunque la E2 se encuentra también en forma homodimérica (Risatti y col., 2005).

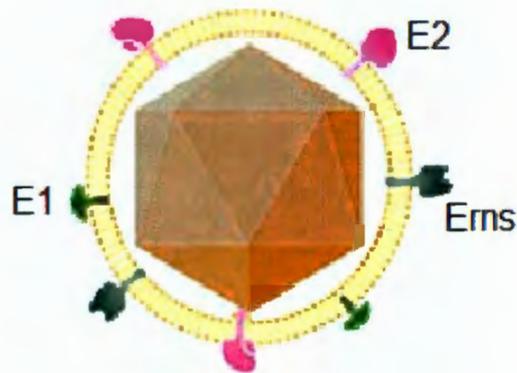


Figura 5. Representación de las proteínas estructurales del VFPC (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

La proteína E2 es la más inmunogénica del virus y junto con la E<sub>ms</sub> inducen anticuerpos neutralizantes (Risatti y col., 2005). Existe una marcada variabilidad antigénica entre los distintos aislados de VFPC, probablemente asociada a determinadas regiones situadas en la región N-terminal de la proteína E2, y también sobre E1 (Chen y col., 2008).

Cada uno de los genes virales de la secuencia codificante del VFPC se ven descritos en el Cuadro 1, en el que se especifica cada una de las funciones que desempeñan en el procesamiento de la poliproteína de este pestivirus.

#### II.2.4 Glicoproteína E2

La proteína E2 es una de las tres glicoproteínas de envoltura del VFPC y es la región más variable entre las cepas de pestivirus, desempeñando múltiples funciones en el ciclo celular del virus (Chen y col., 2008).

Se le ha implicado como uno de los determinantes de la virulencia ya que por sí sola induce la respuesta inmune durante la infección produciendo anticuerpos neutralizantes que confieren inmunidad protectora al cerdo (Lin y col., 2000).

Cuadro 1. Descripción funcional de las secuencia del genoma del VFPC (Rümenapf y col., 1993).

| Secuencia genómica                         | Funcionalidad  |
|--|--|
| Región 5' no codificante (5'UTR)           | No codifica ninguna proteína pero es esencial en la traducción, ya que adopta una estructura 3D necesaria para el anclaje del ribosoma.  |
| Npro (p23)                                 | Auto proteinasa no estructural   |
| Región Core (p14)                          | Se produce una proteína que forma la nucleocápside del virion, rodea el ARN y tiene actividad antigénica.  |
| Región E <sub>ms</sub> (gp 33)             | Glicoproteína que junto a E2 producen anticuerpos neutralizantes.  |
| Región E1-E2<br>(E1: gp 55)<br>(E2: gp 44) | Son dos glicoproteínas de envoltura. El gen E2 tiene una región hipervariable expuesta a la superficie y contiene epítopes para producir anticuerpos neutralizantes.                     |
| Región NS2-NS3                             | Codifica para proteasas que intervienen en el procesamiento de la proteína viral.<br>NS2: autoproteasa<br>NS3: Proteasa helicasa   |
| Región NS4A y NS4B                         | Actúa como cofactor de la actividad proteasa.  |
| Región NS5A y NS5B                         | NS5A: codifica dos productos fosforilados para el mecanismo de replicación viral.<br>NS5B: contiene el dominio ARN polimerasa dependiente esencial para la replicación del genoma viral. |
| Región 3' no codificante (3'UTR)           | Contiene un codón de paro en la replicación, pero se desconocen sus funciones exactas.   |

Debido a su alta inmunogenicidad, se ha convertido en el punto de acceso en el desarrollo de nuevas vacunas, incluidas las vacunas de subunidades, péptidos, vacunas de DNA y vacunas basadas en vector viral (Chen y col., 2008).

La glicoproteína E2 tiene un tamaño de 55 kDa y puede formar dímeros (Rümenapf y col., 1993). Su extremo N-terminal contiene cuatro dominios neutralizantes (A, B, C, D), con tres subdominios en el dominio A, y se halla hacia la superficie de la partícula viral (Chen y col., 2008). Por otra parte, el extremo C-terminal está contenido en la región transmembranal (Figura 6) (Ganges, 2007).

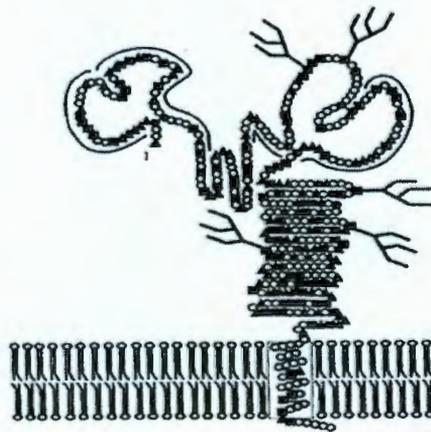


Figura 6. Glicoproteína E2 del VFPC (Ganges, 2007).

La región N-terminal de E2 es también una de las regiones más variables en el genoma del VFPC. El análisis filogenético (Figura 7), sobre la base de los 190 nucleótidos de esta región, es utilizado para la clasificación de los VFPC en tres grupos principales y un número de subgrupos (Chen y col., 2008).

Las mayores diferencias antigénicas entre VFPC y otros pestivirus se encuentran sobre esta glicoproteína, por lo que la infección de los cerdos puede ser un problema para un diagnóstico serológico (Toledo y col, 2007).

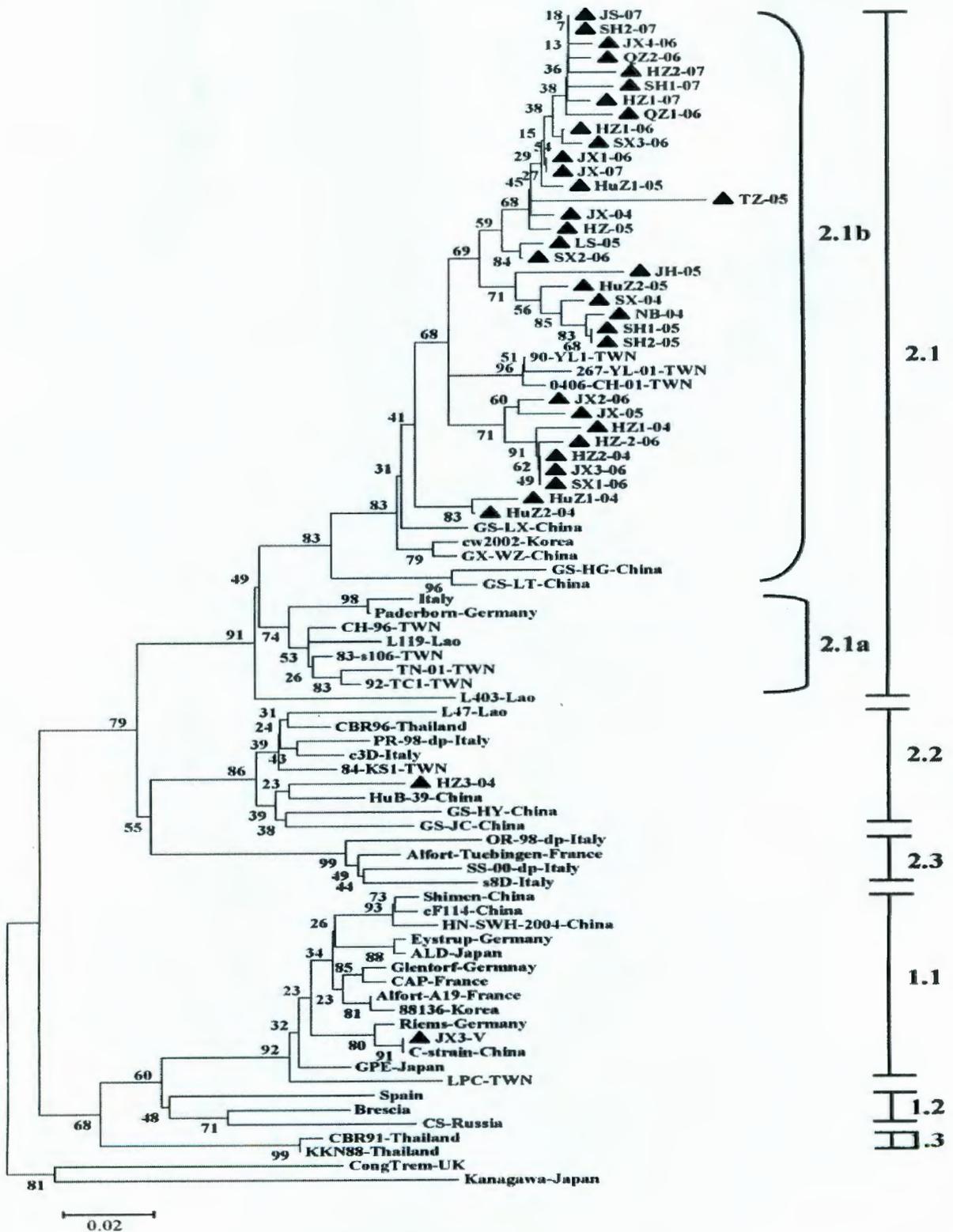


Figura 7. Árbol filogenético basado en la región E2 (190 nt) del VFPC (Chen y col., 2008).

Los anticuerpos inducidos por la infección del VDVB y VEF pueden dar resultado positivo en los análisis de la fiebre porcina clásica porque tienen antígenos comunes que generan una reacción cruzada, por lo que requieren pruebas diferenciales de confirmación (Sánchez - Vizcaíno, 2003).

|                 |                       |                          |                                 |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|
| CSFV Alfort/187 | P I G W T G V I E - C | <b>T A V S P T T L R</b> | T E V V K T F R R D K P F P     |
| Weybridge       | . . . . .             | - . . . .                | . . . . . E . . . . .           |
| Brescia         | . . . . .             | - . . . .                | . . . . . E . . . . .           |
| GPE-            | . . . . .             | - . . . . T . . . .      | . . . . .                       |
| ALD             | . . . . .             | - . . . .                | . . . . .                       |
| Taiwan P97      | . . . . .             | - . . . .                | . . . . . E . . . . .           |
| BVDV SD-1       | . . . . . T V S - .   | M L A N R D . .          | D . A . . R . Y . . S R . . .   |
| NADL            | . . . . . T V S - .   | . . S F N M D . .        | A . T . . R . Y . . S . . . .   |
| Osloss          | . . . . . T V S L .   | H W S N K D . .          | A M T . . R . Y K . H R . . .   |
| Oregon C24V     | . . . . . T V S - .   | M L A N R D . .          | D . A . . R . Y . . S R . . .   |
| BDV BD78        | . Q . . . . R . . - . | . . L A N Q D . .        | D . T . . R . Y . . T T . . Q   |
| X818            | . Y . . V . R V . - . | . . T . . K S . .        | A . . . . I Y K K T . . . . .   |
| L83/84          | . Y . . V . R V . - . | . . T . . K D . .        | A . . . . R V Y K K T . . . . . |
| R27/27          | . . . . . T V S - .   | M L . N R D . .          | D . A . . R V Y . . S . . . . . |

Figura 8. Comparación de la secuencia E2 del VFPC en torno a la región TAVSPTTLR con otras cepas de los *pestivirus* VDBV y VEF (Lin y col., 2000).

Estudios recientes por Min Lin y col. (Figura 8) indican que la región TAVSPTTLR está altamente conservada entre las cepas del VFPC y es muy variable entre las cepas del VDVB y VEF. Además, se tiene la hipótesis que un mínimo de la región E2 es suficiente para la producción de anticuerpos policlonales en un animal infectado por el virus, eliminando o reduciendo significativamente reacciones cruzadas entre los *pestivirus*, obteniéndose un inmunodiagnóstico más específico para la enfermedad de fiebre porcina clásica (Lin y col., 2000).

### II.2.5 Ensayos de inmunodiagnóstico para FPC

La replicación del VFPC en las diferentes líneas celulares no produce efecto citopático en la célula infectada, impidiendo observar cambios bioquímicos y

moleculares, morfológicos y de variabilidad celular durante el ciclo de replicación viral, por lo que su detección se debe vigilar por distintas técnicas serológicas (Van Oirschot, 2003), como las que se presentan en el Cuadro 2.

Como en otras enfermedades infecciosas, este diagnóstico se puede establecer por la detección de virus o antígeno viral, detección de ácidos nucleicos o detección de anticuerpos.

Cuadro 2. Métodos utilizados para el diagnóstico de laboratorio del FPC (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

| Aislamiento viral                   |                             |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Detección de virus o antígeno viral | Inmunofluorescencia directa |
|                                     | Inmunoperoxidasa directa    |
|                                     | ELISA de captura            |
| Detección del ácido nucleicos viral | RT-PCR                      |
| Anticuerpos específicos             | Seroneutralización          |
|                                     | ELISA                       |

### II.2.5.1 ELISA

Las técnicas de enzimoimmunoensayo ELISA, para la detección de anticuerpos de la FPC que se utilizan hoy en día, son técnicas rápidas, sensibles, específicas, de fácil ejecución y permiten analizar un gran número de muestras a la vez, por lo que son las utilizadas en los rastreos epidemiológicos, sirviéndonos de las técnicas de seroneutralización para la confirmación de aquellos sueros que han resultado positivos o dudosos en la técnica de ELISA (Ganges, 2007).

Los métodos más utilizados son los ELISA's de bloqueo, de competición o indirectos, debiendo detectar anticuerpos frente a todas las cepas del virus de FPC pero a su vez evitar reacciones cruzadas con otros Pestivirus. Como antígeno se emplean proteínas virales recombinantes, o bien, cepas de virus de FPC (Sánchez-Vizcaíno, 2003):

#### ELISA de competencia:

Trata de un ELISA de captura-competencia que emplea dos anticuerpos monoclonales (AcM) específicos frente a dos epítopes diferentes de la proteína estructural E2, uno de ellos tapizando las placas (anticuerpo de captura) y el otro conjugado con peroxidasa (anticuerpo detector). Como antígeno utiliza una proteína recombinante obtenida mediante el sistema de baculovirus (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

#### ELISA de bloqueo:

Este tipo de ELISA emplea placas tapizadas con antígeno de FPC; los anticuerpos presentes en la muestra bloquearían la posibilidad de unión de un AcM conjugado con peroxidasa específico frente a la proteína E2 del VFPC que se añade en un paso posterior. En caso de que la muestra sea negativa el antígeno permanecerá libre, por lo que podrá unirse a AcM conjugado con peroxidasa, unión que se detectará mediante el color producido debido a la reacción de la peroxidasa con el substrato añadido a continuación (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

Otros ELISA's de bloqueo no emplean ni AcM ni proteínas recombinantes. Las placas se encuentran sensibilizadas con antígeno del virus de la FPC purificado e inactivado y como antisuero utilizan un suero hiperinmune anti-virus de FPC producido en conejo o cerdo y conjugado con peroxidasa. En este caso las posibles reacciones cruzadas con la diarrea viral bovina no desaparecen completamente al tratarse de un conjugado policlonal (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

## ELISA indirecto

Las placas de se encuentran tapizadas con un antígeno del VFPC, y tras la incubación con el suero a probar, la reacción se pone de manifiesto utilizando como conjugado proteína A-peroxidasa (Sánchez-Vizcaíno, 2003).

El gran inconveniente de los tres métodos descritos es que no permiten diferenciar los anticuerpos producidos por la enfermedad de aquéllos producidos por una vacuna.

## II.3 Partículas Tipo Virus

Las partículas tipo virus (PTV's) consisten en proteínas virales derivadas de las proteínas estructurales de un virus. En algunos casos, estas proteínas están ancladas dentro de una bicapa lipídica. Estas partículas se asemejan al virus del que derivan pero carecen del ácido nucleico viral, lo que significa que no son infecciosas (Santi, 2006). Las PTV's usadas como vacunas a menudo son muy eficaces en provocar respuestas inmunes tanto en linfocitos T como en linfocitos B. Las vacunas contra el virus del papiloma humano (HPV) y hepatitis B (VHB) son las primeras partículas tipo virus aprobadas por la FDA (Huang y col., 2005).

### II.3.1 Plásmido HBcAg

El antígeno de nucleocápside (HBcAg) del virus de la Hepatitis B (Figura 9) es una proteína de 21 kDa con partículas subvirales dentro de la nucleocápside, empaquetando la polimerasa viral y el ARN pre-genómico durante la infección del VHB. Los individuos afectados por VHB generan de manera rápida respuestas extensas y con altos títulos anti-HBcAg. La extremadamente alta inmunogenicidad de HBcAg probablemente se debe a la presencia en su secuencia primaria de un número de potentes epítopes de linfocitos T cooperadores, a su habilidad de activar directamente linfocitos B y la presencia de ácidos nucleicos en la cápside. Previamente, se encontró que las células T cooperadoras específicas de HBcAg

pueden ayudar a las células B a producir anticuerpos contra un antígeno separado (Sathl y Murray, 1999; Huang y col., 2005).

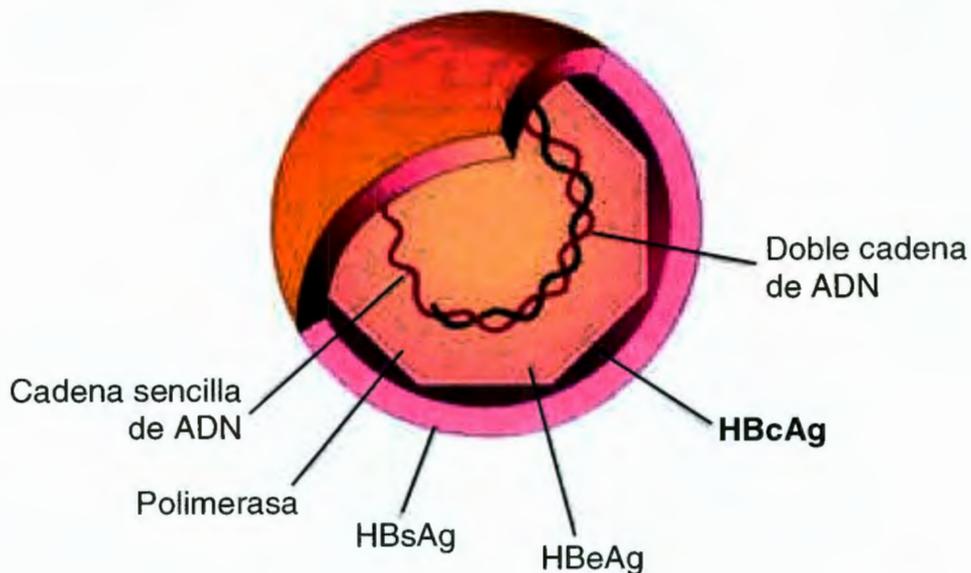


Figura 9. Antígeno de nucleocápside (HBcAg) del virus de la hepatitis B (Huang y col., 2005).

Los monómeros de HBcAg se reúnen en una partícula tipo virus (PTV) de dos tamaños diferentes, compuesta de 180 a 240 subunidades con un arreglo de simetría icosaédrica de  $T=3$  o  $T=4$ , por lo que es un portador atractivo para la presentación de alta densidad de epítopes exteriores. La fusión de proteínas HBcAg a varios epítopes exteriores de células B y células T mantienen la habilidad de formar PTV's quiméricas y estimula los altos niveles de inmunogenicidad de las células B y T de epítopes exteriores, especialmente cuando son insertados en la punta de los picos de las partículas de HBcAg (Belnap y col., 2003; Huang y col., 2005).

HBcAg recombinante o fusión de HBcAg (Figura 10) se pueden producir en diversos sistemas de expresión, incluyendo levadura, cultivos celulares de mamíferos, vacuna de virus y bacterias como *Escherichia coli* (Huang y col., 2005).

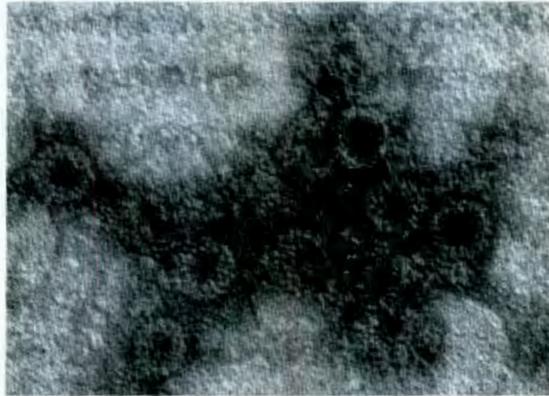


Figura 10. Microscopía electrónica de la partícula tipo virus en *E. coli* (Belnap y col., 2003).

Las plantas transgénicas también se han utilizado para la producción de HBcAg (Huang y col., 2005) y se ha observado que los antígenos HBcAg son altamente inmunogénicos cuando se ensamblan en estructuras con múltiples subunidades, concluyendo que estas estructuras pueden actuar como acarreadores para diferentes epítopes (Salas y col., 2003). En la planta transgénica que expresa el HBcAg, se ensambla en PTV's y muestra propiedades serológicas comparables a la producida en *E. coli* (Huang y col., 2005), lo que aumenta la expresión de antígenos y su acumulación a un nivel razonable.

#### II.4 El tabaco como modelo para expresar proteínas

La aplicación de plantas como sistema de producción de proteínas es amplia y variada, dependiendo de la disponibilidad de la secuencia codificante de ADN y la construcción de un plásmido de expresión apropiado para transformarla (Fernandez, 2001). La primera expresión de un antígeno vacunal en plantas ocurrió en 1990 cuando Curtiss y Cardineau expresaron la proteína de superficie del antígeno A del *Streptococcus mutans* en tabaco. Este trabajo fue seguido por la expresión en plantas del antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) (Salas y col., 2003).

Las primeras plantas que expresaron genes heterologos fueron plantas de tabaco, *N. tabacum*, transformadas mediante vectores bacterianos para lograr la integración permanente en el ADN nuclear. Esta planta se ha usado para la producción de vacunas, ya que ofrece la ventaja experimental en la extracción de antígeno y transformación, además de que se conoce su secuencia genómica y hay experiencia en su manipulación (Fernández, 2001, Salas y col., 2003). El posterior desarrollo de métodos de transformación basados en explantes regenerables como hojas, brotes y raíces contribuyó significativamente a la transformación fácil y rutinaria que se usa hoy en muchas especies (Fernández, 2001).

## II.5 Técnicas para expresar proteínas heterologas en plantas

El primer método que se ensayó con éxito para obtener plantas transgénicas fue el de agroinfección, el cual combina las capacidades de los vectores virales y del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Valderrama y col., 2005). Esta bacteria contiene en su plásmido la secuencia de ADN de transferencia (T-ADN), que se exporta a las células de la planta por su mecanismo de transferencia para expresar proteínas heterologas (Gelvin, 2003).

La necesidad de ampliar la gama de especies vegetales transformables, permitió desarrollar métodos alternativos de transferencia directa de ADN basados en procedimientos de naturaleza química, fisicoquímica, o mecánica (Escatel y col., 2002). La biobalística, es un bombardeo con micropartículas que permite transferir ADN desnudo, sin mediación de vectores biológicos, a plantas que no se han podido transformar con *A. tumefaciens* (Jouve, 2007).

### II.5.1. *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* es una  $\alpha$ -proteobacteria gram negativa, de la familia *Rhizobiaceae*, que provoca tumores por transformación en células vegetales; lo que se conoce como la enfermedad de la agalla. Normalmente, los tumores se forman

en la parte baja del tallo, sobre todo en plantas dicotiledóneas (Gelvin, 2003). La capacidad infectiva de la bacteria se debe al plásmido Ti que induce tumoración, siendo completamente avirulentas las cepas que carecen del plásmido (Isidoro, 2008).

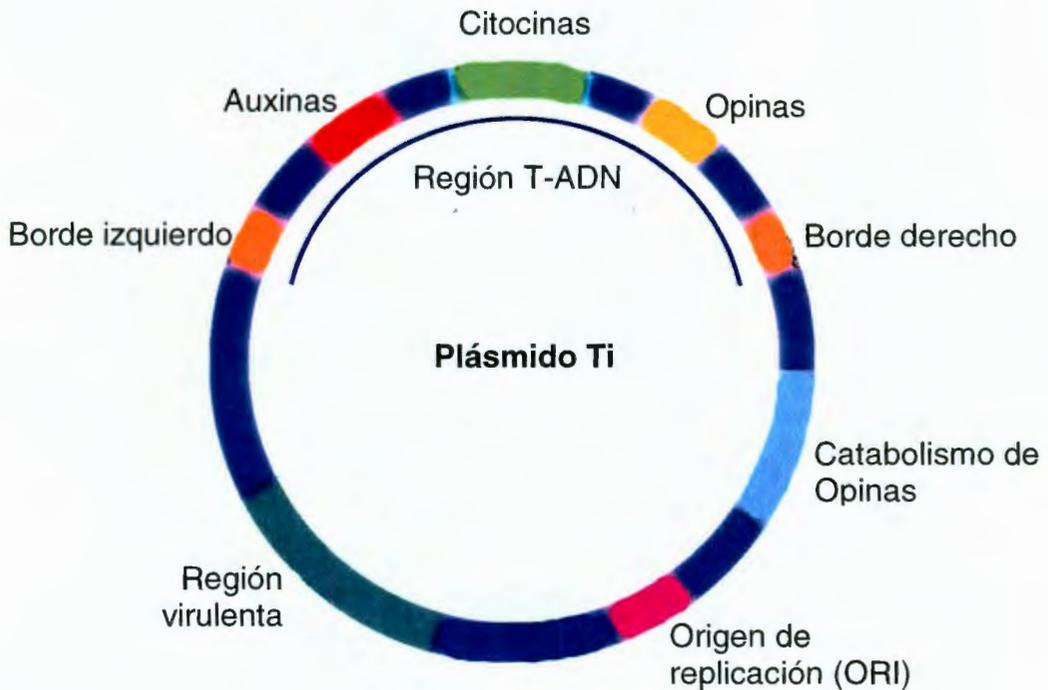


Figura 11. Esquema del plásmido Ti con la región T-ADN de *Agrobacterium* (Isidoro, 2008).

*Agrobacterium* ha sido llamada “la naturaleza de la ingeniería genética” al transferir una pequeña porción de su ADN (T-ADN) en el genoma nuclear de la planta huésped (Valderrama y col., 2005). La mayoría de la maquinaria necesaria para transferir el T-ADN se encuentra en el plásmido Ti (Figura 11), el cual incluye el T-ADN propio, delimitado por 25 pb repetidas conocidas como borde derecho (BD) y borde izquierdo (BI), que definen los límites entre el T-ADN y los 35 genes de virulencia (Vir), agrupados en una región Vir (Hellens y col., 2000).

El T-ADN contiene los genes que inducen la formación de tumores (Figura 12) y la síntesis de opinas; si se remueven estos genes no se impide la habilidad de *Agrobacterium* para transferir su ADN pero sí previene la formación de tumores (Hellens y col., 2000; Zhu y col., 2000); por consecuencia, la región T-ADN puede ser sustituida por algún gen de interés que se desee sea expresado por la planta.

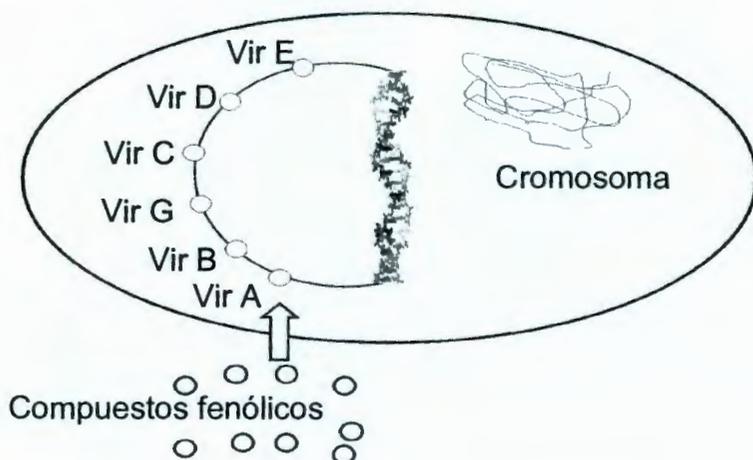


Figura 12. Genes de virulencia de *A. tumefaciens* (Zhu y col., 2000).

### II.5.1.1 Proceso de infección

El mecanismo de infección del *A. tumefaciens* (Figura 13) se basa en captar señales de tipo fenólico por el receptor Vir A contenido en la región *vir* del plásmido Ti, lo que le indica a la bacteria que se encuentra frente a una planta susceptible de ser transformada (Valderrama, 2005).

La región *vir* contiene genes que codifican para proteínas usadas por *Agrobacterium* para producir su T-ADN y liberar dentro de la planta (Gelvin, 2003). Los genes VirA presenta actividad serina cinasa y al unirse a su ligando, fosforila con gasto de ATP a VirG. Una vez fosforilado, VirG actúa como factor de transcripción para el resto de genes de virulencia (*virB*, *virC*, *virD*, *virE*). Por acción conjunta de VirD1 y VirD2 se escinde el T-ADN del resto del plásmido de la cadena

que va de 5' a 3'. Simultáneamente, se transcribe una zona complementaria que se separa del plásmido. VirD2 se coloca en el extremo derecho del T-ADN. El T-ADN sale de la bacteria a través de un poro formado por VirB. Mientras va saliendo, VirD4 incorpora un complejo formado por VirE1 y VirE2, a lo largo del T-ADN. El complejo formado por VirD2, VirE1-VirE2 y T-ADN, entra en la célula vegetal, a través de un mecanismo poco conocido (Tzfira y Citovsky, 2006).

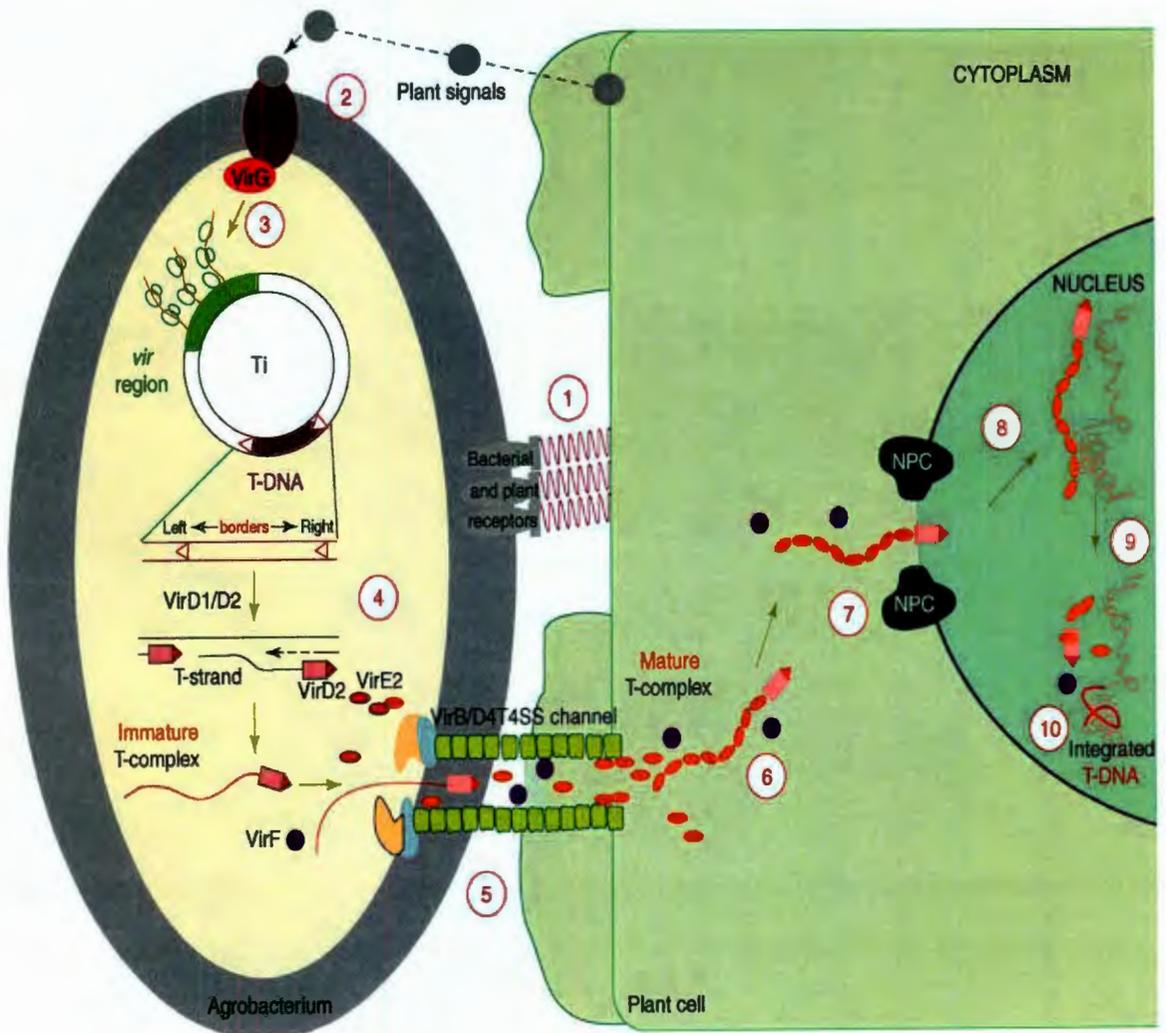


Figura 13. Modelo de transformación genética mediada por *A. tumefaciens* (Tzfira y Citovsky, 2006).

Una vez que el T-ADN se encuentra en el núcleo, se integra dentro del genoma vegetal. La integración no es al azar, existen zonas de integración preferencial. Cada célula vegetal infectada, incorpora de una a cuatro regiones de T-ADN de distintas bacterias. El T-ADN se mantiene estable una vez integrado en el cromosoma vegetal (Tzfira y Citovsky, 2006).

### II.5.2 Agroinfección

El método de agroinfección se basa en la transferencia de ADN de un plásmido bacteriano al genoma de una planta dicotiledónea huésped, aprovechando la relación de simbiosis entre una bacteria del suelo, llamada *Agrobacterium tumefaciens* y numerosas especies de plantas (Figura 14).

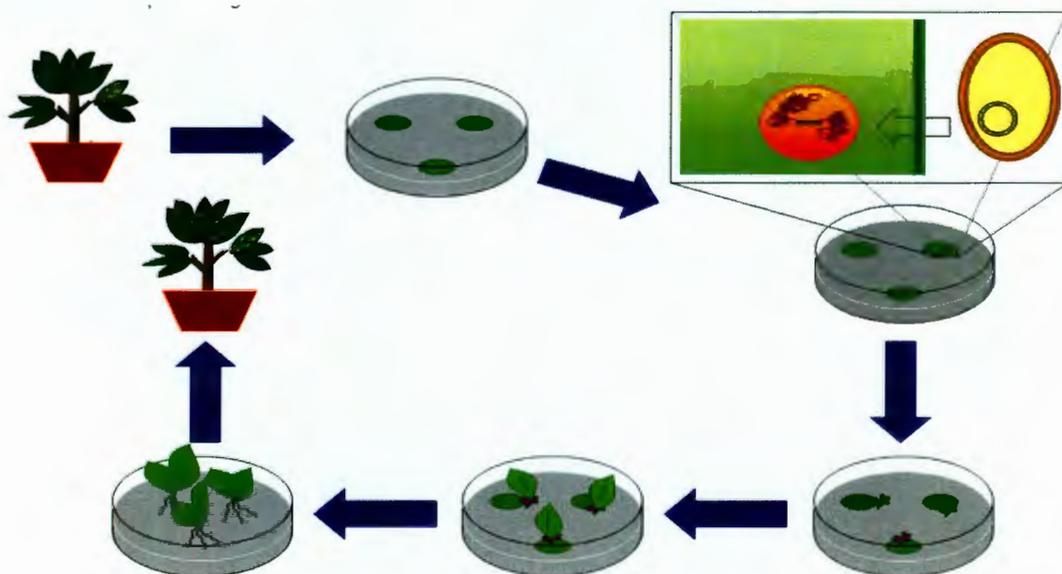


Figura 14. *A. tumefaciens* como vehículo para transformar plantas.

La infección puede realizarse *in vitro*, sobre fragmentos de tejidos de la planta, que después se depositan en un medio nutritivo. Las bacterias infectan las células de la planta y canalizan unos segmentos de ADN del plásmido Ti al genoma de la

planta huésped. El último paso, consiste en regenerar plantas adultas que hayan incorporado el segmento T con el ADN y, como consecuencia, la posible obtención de la planta transgénica (Fernández, 2001; Jouve, 2007).

### II.5.3. Tipos de transformación

Los derivados del patógeno *A. tumefaciens* han mostrado ser vehículos eficientes y versátiles para la introducción de genes en plantas y células vegetales. Básicamente, se emplean dos tipos de vectores desarrollados a partir del sistema *A. tumefaciens*-plásmido Ti: los llamados vectores de cointegración (sistemas cis) y los vectores binarios (sistemas trans) (Lee y Gelvin, 2008).

Los vectores de cointegración con sistema *cis* clonan el segmento propio T-DNA en *Escherichia coli*. El T-ADN del plásmido aislado se escinde con enzimas de restricción, lo que permite la introducción de fragmentos del ADN exógeno que se desea transferir al genoma de la planta. Los recombinantes se vuelven a clonar en *E. coli* (Wong y col., 1997). Cuando estos plásmidos son introducidos por conjugación en una cepa de *Agrobacterium* portadora del pTi silvestre, la recombinación homóloga dentro de las células permite la transferencia del segmento de T-ADN que contiene el inserto a la región T-ADN del pTi completo (Fernández, 2001).

El vector binario con sistema *trans* aprovecha la distinción entre funciones *cis* y *trans* que existe en el plásmido. El vector binario utiliza dos plásmidos, es de tipo lanzadera, capaz de replicarse en *E. coli* y en un amplio rango de otras bacterias, incluyendo *Agrobacterium*, que contiene los dos segmentos de 25 pb correspondientes a los límites del T-ADN. En *E. coli*, mediante procedimientos rutinarios de clonaje, se preparan derivados del vector que contienen la secuencia que se desea transferir a la planta flanqueados por los bordes izquierdo y derecho (los 25 pb) (Xiang y col., 1999; Fernández, 2001; Lee y Gelvin, 2008).

Estos plásmidos recombinantes son transferidos directamente a células de *Agrobacterium* de una cepa portadora del pTi silvestre que contiene solo los genes de virulencia *vir*. Los plásmidos recombinantes son capaces de replicarse en el nuevo hospedero, el cual le proporciona en *trans* las funciones *vir* requeridas para la inserción del ADN en el genoma de la planta. Las células vegetales que son posteriormente infectadas por estas bacterias recombinantes contienen copias integradas del T-ADN silvestre, del T-ADN recombinante o de ambos (Xiang y col., 1999; Fernández, 2001; Santi y col., 2006; Lee y Gelvin, 2008).

### II.5.3.1 Estructura de los vectores binarios

Incorporando un marcador de selección al inserto, como el gen de resistencia a la kanamicina de *E. coli*, las células de *A. tumefaciens* portadoras del pTi recombinante pueden ser seleccionadas fácilmente (Hellens y col., 2000).

Si se asocia al T-ADN recombinante un gen marcador y una secuencia de regulación de la transcripción que sea activa en la planta, puede expresarse el producto génico funcional correspondiente en la planta transgénica (Tzfira y Citovsky, 2006).

Los dos componentes principales para transferir los genes mediante *Agrobacterium*, que son el T-ADN y la región *vir*, pueden estar en plásmidos separados (Hellens y col., 2000). De esta forma, éstos constituyen la base de los vectores modernos del plásmido Ti, denominados vectores binarios Ti. La mayoría de las construcciones genéticas utilizan *E. coli* para técnicas de manipulación y consecuentemente el vector binario Ti se replica tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium* (Lee y Gelvin, 2008).

Algunos de los tipos más importantes de vectores binarios Ti disponibles se enlistan en el Cuadro 3. El marcador de selección más comúnmente usado es el que confiere resistencia a kanamicina. *Agrobacterium* es marcado con un gen que

le confiere resistencia a un antibiótico y que está localizado en el cromosoma o en el plásmido Ti (Hellens y col., 2000).

Cuadro 3. Selección de el vector binario Ti (Hellens y col., 2000).

| Vector    | Tamaño (kb) | Sitios únicos de restricción en T-DNA | Selección bacteriana | Sitio del Marcador seleccionable | Origen de replicación |                | Movilización |
|-----------|-------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------|--------------|
|           |             |                                       |                      |                                  | <i>Agrobacterium</i>  | <i>E. Coli</i> |              |
| pBIN19    | 11 777      | 9                                     | Kanamicina           | RB                               | pRK2                  | pRK2           | Si           |
| pC22      | 17 500      | 2                                     | Ampicilina           | RB                               | pRi                   | ColE1          | Si           |
| pGA482    | 13 200      | 7                                     | Tetraciclina         | RB                               | pRK2                  | ColE1          | Si           |
| pPCV001   | 9 200       | 6                                     | Ampicilina           | RB                               | pRK2                  | ColE1          | Si           |
| pCGN1547  | 14 440      | 5                                     | Gentamicin           | LB                               | pRi                   | ColE1          | Si           |
| pJJ1881   | 25 700      | 4                                     | Tetraciclina         | LB                               | pRK2                  | pRK2           | Si           |
| pPZP111   | 8 909       | 9                                     | Cloramfeni           | LB                               | pVS1                  | ColE1          | Si           |
| pGreen029 | 4 632       | 18                                    | Kanamicina           | LB                               | pSa                   | pUC            | No           |

El vector binario Ti de *E. coli* puede ser transferido a *Agrobacterium* vía conjugación bacterial o electroporación.

#### II.5.4 Electroporación

Durante el clonaje molecular, se requiere la transformación de *E. coli* para multiplicar la construcción genética deseada, para lo cual, existen distintos métodos. La electroporación es un método que se basa en la aplicación de elevado voltaje a las células durante un periodo de tiempo muy corto. Durante ese tiempo, las células despolarizan sus membranas y forman pequeños orificios por los que penetran el ADN y/o moléculas que se encuentran alrededor. Pasada la despolarización, más del 90% de células sufren daños irreparables y mueren, pero el 10% se recuperan e incorporan las moléculas deseadas. Se obtiene una eficiencia de entrada de moléculas cercanas al 100% de las células que sobreviven.

### **III. HIPÓTESIS**

Es posible obtener líneas estables de tabaco que contengan y expresen la secuencia TAVSPTTLR del péptido específico de la proteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica fusionada a la secuencia codificante del antígeno de la nucleocápside del virus de la hepatitis B.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Obtener líneas transgénicas de tabaco que contengan la fusión genética del antígeno de nucleocápside del virus de la hepatitis B y el péptido específico de la proteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica.

### IV.2 Específicos

- Incorporar la secuencia TAVSPTTLR en la secuencia codificante del antígeno de nucleocápside del virus de la hepatitis B para producir partículas tipo virus quiméricas en plantas de tabaco.
- Construir un plásmido binario que expresa la proteína quimérica constituida por el antígeno de nucleocápside del virus de la hepatitis B y la secuencia TAVSPTTLR.
- Transformar explantes de tabaco mediante la técnica de agroinfección con el plásmido binario para generar líneas transgénicas estables de tabaco.
- Demostrar la presencia del transgen en las líneas de tabaco transformantes mediante PCR.

## V. METODOLOGÍA

La metodología experimental que se utilizó en el presente trabajo se describe en la Figura 15. A grandes rasgos, se diseñaron los oligonucleótidos que corresponden a la secuencia codificante de la glicoproteína E2 del VFPC, se incorporó ésta secuencia del péptido TAVSPTTLR en la región hidrofílica del HBcAg (pBluescript II KS (+/-)), que forma de manera espontánea partículas tipo virus, de forma tal que cuando se formaron tales partículas, se expuso el péptido de FPC en su superficie, generando partículas quiméricas. El gen HBcAg es un gen sintético optimizado para la expresión en tabaco, por lo que se clonó el gen quimérico, que contiene el gen HBcAg y el péptido TAVSPTTLR, en un plásmido binario para la transformación de tabaco vía *A. tumefaciens*. Finalmente, se verificó la presencia del transgén en líneas transformantes de tabaco mediante la técnica de RT-PCR.

### V.1. Ubicación del ensayo

Los trabajos de construcción molecular, análisis de las secuencias y transformación de la planta de tabaco se realizaron en los laboratorios de la División de Biotecnología del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ A.C.); mientras que el trabajo de invernadero se llevó a cabo en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (U. de G.) en Guadalajara, Jalisco.

### V.2. Materiales

#### V.2.1. Plásmidos utilizados.

Los plásmidos utilizados corresponden al antígeno core del virus de la hepatitis B (pHBc) incorporado al plásmido pBluescript II KS (+/-), un plásmido recombinante del virus de la hepatitis B (pHBV33) y un plásmido fusión.

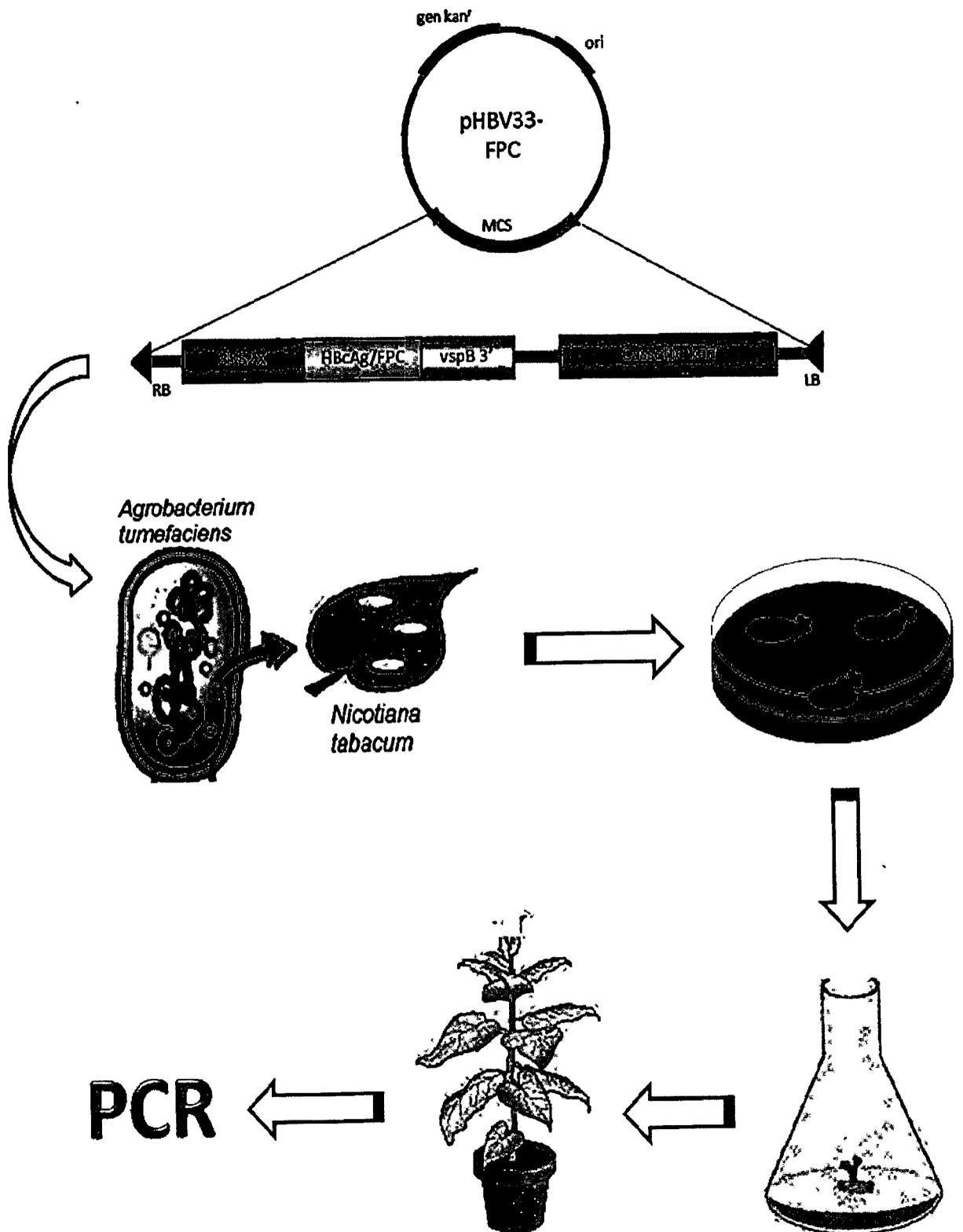


Figura 15. Diagrama de flujo del procedimiento general.

El plásmido fusión, denominado pHbc-FPC, contiene incorporado al plásmido pHbc la secuencia codificante del epítipo E2 del VFPC.

### V.2.2. Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos, los cuales fueron clasificados en los Cuadros 4, 5 y 6, según el tipo de uso en el laboratorio.

Cuadro 4. Reactivos de uso general.

| Reactivos          |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| Medios de cultivo* | Medio MS                      |
|                    | Medio LB                      |
|                    | Medio YEB                     |
| Agua desionizada   | Agua destilada                |
| Nitrógeno líquido  | Cloroformo alcohol isoamílico |

\* Formulación de los medios de cultivo en el ANEXO 1

Cuadro 5. Reactivos de uso molecular.

| Reactivo                                 | Marca      |
|--|------------|
| Enzimas de restricción                   | Invitrogen |
| Amortiguador para enzimas de restricción | Invitrogen |
| Enzima de Ligación T4                    | Invitrogen |
| Bromuro de etídio                        | Invitrogen |
| Syber Safe                               | Sigma      |
| mPM de 1 kb plus ladder                  | BioRad     |

Cuadro 6. Reactivos para métodos de selección y crecimiento.

| Método                   | Reactivo    | Concentración |
|--------------------------|-------------|---------------|
| Antibiótico de selección | Ampicilina  | 100 mg/mL     |
|                          | Kanamicina  | 50 mg/mL      |
|                          | Rifampicina | 50 mg/mL      |
|                          | Cefotaxima  | 100 mg/mL     |
| Crecimiento              | BAP         | 100 mg/mL     |

### V.2.3. Material biológico.

El material biológico utilizado fue una cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  como hospedero para las clonaciones, una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 para realizar la agroinfección y *Nicotiana tabacum* como modelo de expresión de las partículas químicas.

### V.2.4. Equipos

| Equipo                                | Modelo                      |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Orbital (incubadora y shaker).        | Modelo G25 Incubator Shaker |
| Centrifuga de mesa.                   | Centrifuge 5414D eppendorf  |
| Incubadoras                           | Felisa® y Precision         |
| Baño recirculador con refrigeración.  | Julabo F25                  |
| Incubadora con iluminación controlada | -                           |
| Vortex.                               | Vortex-2 Genie              |
| Refrigerador a 4, -20 y -70°C.        | -                           |
| Espectrofotómetro (NANO-DROP).        | ND-1000 spectrophotometer   |
| Transiluminador                       | White/2UV transilluminator  |
| Analizador de imágenes.               | Universal Hood II           |

### V.3. Métodos

#### V.3.1. Diseño y alineación de la secuencia TAVSPTTLR del epítipo de la glicoproteína E2 del VFPC.

Se utilizó el paquete informático vector NT1® de Invitrogen para diseñar los oligonucleótidos (sentido y anti-sentido) de la secuencia TAVSPTTLR del epítipo E2 del VFPC, así como los oligonucleótidos usados en la identificación del mismo.

La alineación de los oligonucleótidos (sentido y anti-sentido) de la secuencia TAVSPTTLR, denominada mezcla FPC, se llevó a cabo tomando 1.6 nmol/ $\mu$ L de cada uno y disolviéndolos en 2  $\mu$ L de solución amortiguadora específica para la actividad de las enzimas de restricción XbaI y BamHI (Figura 16). Posteriormente, se incubó la mezcla FPC en un baño recirculador por 10 min a una temperatura de 82°C, la cual corresponde a 10°C por encima de la  $T_m$  (50 mM Na<sup>+</sup>) de los oligos.

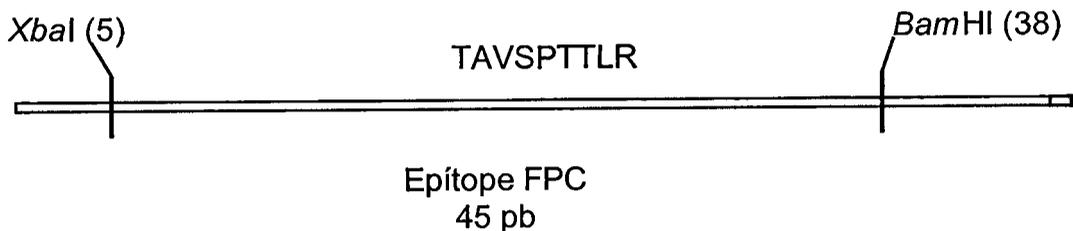


Figura 16. Representación esquemática de la Mezcla FPC.

#### V.3.2. Inserción de la región codificante del epítipo de VFPC en el gen del antígeno de la nucleocápside del VHB.

La fusión de la región TAVSPTTLR del epítipo de VFPC en el plásmido pHbC del virus de la hepatitis B se obtuvo sometiendo a digestión con las enzimas de restricción XbaI y BamHI la mezcla FPC (Figura 16) y el plásmido pHbC (Figura 17),

incorporado a pBluescript II KS (+/-) previo a este trabajo, tal como se describen en los Cuadros 7 y 8, respectivamente.

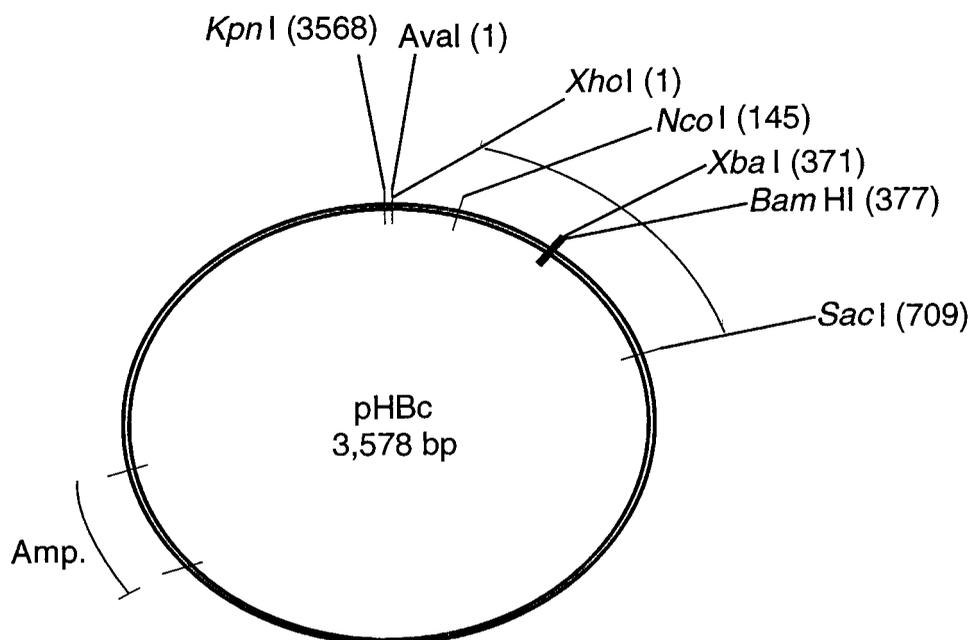


Figura 17. Plásmido pHbC.

Cuadro 7. Tratamiento de digestión realizada a la Mezcla FPC.

| Digestión | Reacción  | Tratamiento   |
|-----------|---|---|
| Primera   | 26 $\mu$ L Mezcla FPC<br>1 $\mu$ L XbaI<br>3 $\mu$ L Sol. amortiguadora               | Incubación a 37°C por 1 h.<br>Purificación y concentración de ácidos nucleicos. |
| Segunda   | 26 $\mu$ L de la primera digestión<br>1 $\mu$ L BamHI<br>3 $\mu$ L Sol. amortiguadora | Incubación a 37°C por 1 h.<br>Purificación y concentración de ácidos nucleicos. |

Cuadro 8. Tratamiento de digestión realizada al plásmido pHBc.

| Digestión | Reacción  | Tratamiento  |
|-----------|---|--|
| Primera   | 2 $\mu$ L pHBc<br>1 $\mu$ L XbaI<br>2 $\mu$ L Sol. amortiguadora<br>15 $\mu$ L agua desionizada | Incubación a 37°C por 1 h.<br>Purificación del ADN con QIAquick<br>PCR purification kit protocol.  |
| Segunda   | 26 $\mu$ L de la primera digestión<br>1 $\mu$ L BamHI<br>3 $\mu$ L Sol. amortiguadora           | Incubación a 37°C por 1 h.<br>1 $\mu$ L Bap (Invitrogen) e incubación a<br>65°C por 1 h.<br>30 $\mu$ L Cloroformo alcohol isoamílico,<br>extraer la fase orgánica.<br>Purificación y concentración de ácidos<br>nucleicos. |

Posteriormente, la secuencia TAVSPTTLR se ligo al plásmido pHBc, denominado pHBc-FPC, con 1  $\mu$ L de ADN ligasa T4 a 16°C toda la noche en una baño recirculador.

Basados en el método de electroporación se transformaron células electrocompetentes de *E. Coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pHBc-FPC y un control que no contiene la mezcla FPC. Las células transformadas se cultivaron en medio LB sólido y ampicilina como antibiótico de selección a 37°C por 18 h.

#### V.3.2.1. Verificación de la presencia de la región codificante TAVSPTTLR.

El análisis de las colonias transformadas con la región codificante TAVSPTTLR se realizó por patrón de bandas. Primeramente, se extrajo el ADN

plasmídico usando el protocolo “Plasmid DNA purification using the QIAprep spin Miniprep kit and microcentrifuge” de Invitrogen; enseguida, se realizó el tratamiento de digestión enzimática con 1  $\mu$ L del juego de enzimas BamHI/NcoI (azul) ó XbaI/SacI (verde) a 37°C por 1 h, tal como se ejemplifica en la Figura 18.

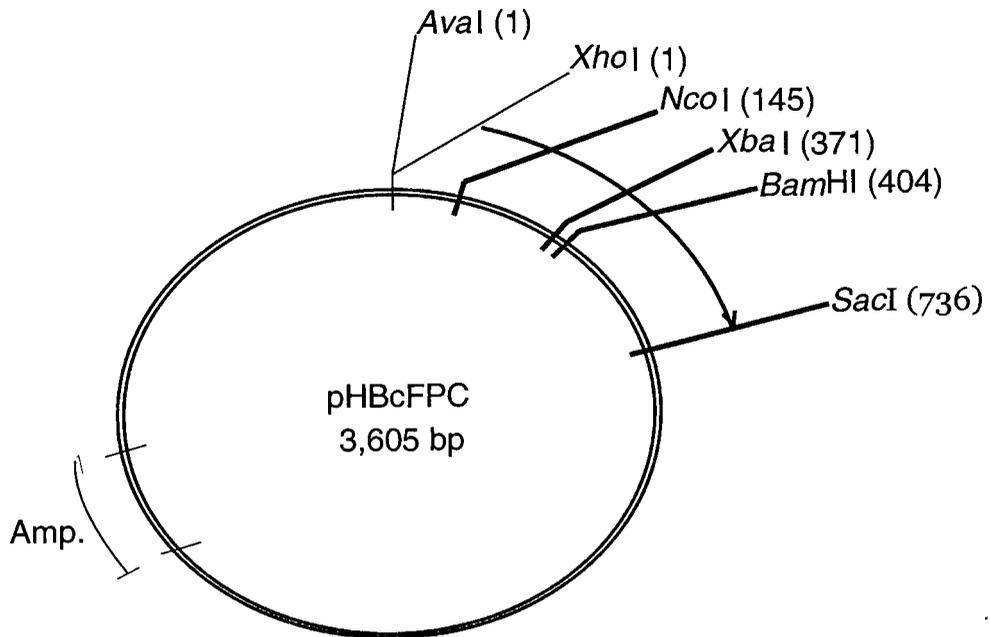


Figura 18. Análisis por digestión enzimática del plásmido pHbC-FPC

La verificación de la presencia de la región codificante del epítipo de la proteína E2 del VFPC se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa, que fue retratado en un analizador de imágenes en presencia del programa informático Quantity One®.

Las colonias que presentaron la región codificante TAVSPTTLR, se les cuantificó la cantidad de ADN en un espectrofotómetro (NANO-DROP). Finalmente las muestras de ADN positivas se mandaron secuenciar, mientras que las colonias correspondientes de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas se almacenaron en el cepario del CIATEJ a -70°C.



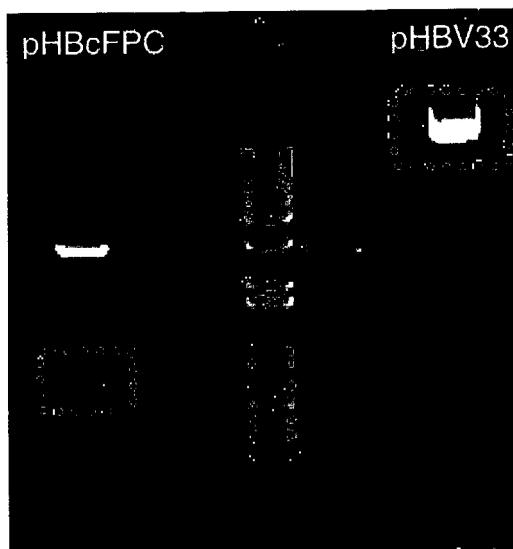


Figura 20. Ilustración de las bandas correspondientes a los plásmidos pHbCFPC y pHBV33.

Las bandas seleccionadas se purificaron utilizando el protocolo “QIAquick gel extraction kit protocol” de Invitrogen y se evaluó la cantidad de ácidos nucleicos espectrofotométricamente para determinar la relación en proporción 1:4 de cada uno. Posteriormente, las secuencias se ligaron con 1  $\mu$ L de ADN ligasa T4 a 16°C toda la noche, tomando 8  $\mu$ L del plásmido pHbCFPC y 3  $\mu$ L del plásmido pHBV33.

El plásmido se denominó pHBV33-FPC y se transformó de igual manera en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por electroporación y se inocularon en medio LB y kanamicina como antibiótico de selección a 37°C por 18 h.

El análisis de las células transformadas, se realizó con el mismo patrón de digestión enzimática con el que se analizó al plásmido pHbCFPC, utilizando el juego enzimático BamHI/NcoI o XbaI/SacI.

### V.3.3.1. Verificar el gen quimérico HBc-FPC.

La presencia de la región codificante en el plásmido pHBV33-FPC se verificó, de igual manera, por patrón de bandas en un gel de electroforesis, utilizando ambos juegos de enzimas XbaI / SacI y BamHI / NcoI, tal como lo muestra el Cuadro 9; se utilizó un plásmido de pCambia (PBS CASS1 35S) como control.

Cuadro 9. Análisis del gen quimérico por digestión del plásmido pHBV33-FPC.

| XbaI / SacI         |                  | BamHI / NcoI        |                   | Tratamiento                   |
|---------------------|------------------|---------------------|-------------------|-------------------------------|
| Muestras            | Control          | Muestras            | Control           |                               |
| 16 µL<br>pHBV33-FPC | 3 µL BS<br>CASS1 | 16 µL<br>pHBV33-FPC | 3 µL PBS<br>CASS1 | Incubación a<br>37°C por 1 h. |
| 1 µL XbaI           | 1 µL XbaI        | 1 µL BamHI          | 1 µL BamHI        |                               |
| 1 µL Sac I          | 1 µL Sac I       | 1 µL NcoI           | 1 µL NcoI         |                               |

Las colonias de *E. coli* DH5α transformadas con el plásmido pHBV33-FPC se almacenaron en el cepario del CIATEJ a -70°C.

### V.3.4. Transformación en planta de tabaco

#### V.3.4.1. Transformación de *A. tumefaciens*

La transformación de células electrocompetentes de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* con el plásmido pHBV33-FPC se llevó a cabo por el método de electroporación, de la siguiente manera:

Cuadro 10. Ensayos de transformación de *A. tumefaciens*.

| Tratamiento           | Muestra     | Control (+) | Control (-) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| pHBV33-FPC            | 2 $\mu$ L   |             |             |
| pHBV33                |             | 1 $\mu$ L   |             |
| <i>A. tumefaciens</i> | 100 $\mu$ L | 100 $\mu$ L | 100 $\mu$ L |

Las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB sólido con kanamicina y rifampicina como antibiótico de selección a 30°C por 48 h. Las colonias de *A. tumefaciens* LBA4404 obtenidas se almacenaron en el cepario del CIATEJ a -70°C.

#### V.3.4.2. Transformación de *N. tabacum* por *A. tumefaciens*

Previo a la transformación, se propagaron semillas de tabaco de la especie *N. tabacum* en medio MS y se incubaron a 28°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Se cultivó una colonia de LBA4404 de *A. tumefaciens* transformada de cada uno de los ensayos correspondientes en 3 mL de medio YEB líquido con kanamicina como antibiótico de selección a 28°C toda la noche con agitación constante en un orbital. Después, el pre-inoculo se cultivó en 50 mL de medio YEB con kanamicina y se incubó con las mismas condiciones.

Posteriormente, los cotiledones de la planta de tabaco se disecaron en una caja petri con agua desionizada estéril a tamaño aproximado de 1 cm<sup>2</sup>, eliminando la nervadura central. Se colocaron 10 explantes por ensayo en una nueva caja petri y se les añadió el medio de cultivo con *A. tumefaciens* transformada correspondiente, cubriendo los explantes e incubándolos durante 5 min a temperatura ambiente con agitación constante.

En seguida, se separaron las bacterias de los explantes y se pasaron a un medio MS sólido que contiene 0.5 mg/L de BAP en oscuridad a 28°C por 48 h. Después, los explantes se pasaron a un medio selectivo sólido con medio MS 0.5 mg/L BAP, 100 mg/L Kanamicina, 500 mg/L Cefotaxima y se incubaron a 28°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, por un periodo de aproximadamente un mes o hasta la aparición de callos en los explantes.

Finalmente, se separaron los brotes de callos de los explantes y se colocaron en un nuevo medio sólido MS con 100 mg/L Kanamicina y 500 mg/L Cefotaxima, incubándolos a 28°C con el mismo fotoperiodo, hasta la aparición de la raíz; pasada esta etapa se comprobó si las plantas estaban transformadas y se pasaron a invernadero.

#### V.3.5. Análisis molecular de líneas transformantes.

El análisis molecular de las líneas transformantes de tabaco se realizó utilizando hojas de los siguientes tratamientos, siendo del control negativo hojas de la planta inicial usada para la transformación:

|                       |                     |
|-----------------------|---------------------|
| Líneas transformantes | pHBV33-FPC          |
|                       | pHBV33              |
|                       | Control sin epítoto |

A las líneas transformantes se les aisló el ARN genómico basados en el protocolo "Concert™ Plant RNA Reagent" de Invitrogen, para verificar su transformación por la técnica de RT-PCR. Para ello, se utilizó oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento de aproximadamente 500 pb, que responde al gen del antígeno de nucleocápside del VHB (ANEXO 2), obteniendo fragmentos de 157 pb para el pHbC y 174 pb para e<sub>μ</sub>l que contiene la región codificante de la proteína E2 del VFPC, denominado pHbC-FPC.

Primeramente, se verificó la integridad del ARN genómico vegetal de hojas de *N. tabacum* transformadas de invernadero por electroforesis en gel agarosa y posteriormente se realizó el análisis por PCR y RT-PCR (Cuadro 11) para verificar la presencia de la proteína E2 del VFPC. El análisis por PCR se basó en el protocolo “Platinum® PCR SuperMix High Fidelity” y para RT-PCR se utilizó el protocolo “SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix\*”, ambos de Invitrogen.

Cuadro 11. Condiciones para las reacciones en PCR y RT-PCR.

| PCR   |                            | RT-PCR                                      |                            |
|---|----------------------------|---|----------------------------|
| Reactivos                                     | Condiciones para 40 ciclos | Reactivos                                   | Condiciones para 45 ciclos |
| 45 µL de Platinum® PCR SuperMix High Fidelity | 95°C / 3 min               | 2X Reaction Mix                             | 45°C / 30 min              |
| 1 µL del oligonucleótido sentido.             | 95°C / 30 s                | 2 µL SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix* | 95°C / 3 min               |
| 1 µL del oligonucleótido anti-sentido.        | 50°C / 30 s                | 1 µL del oligonucleótido sentido.           | 95°C / 30 s                |
| Solución del ADN a amplificar                 | 68°C / 20 s                | 1 µL del oligonucleótido anti-sentido.      | 50°C / 30 s                |
|   | 68°C / 5 min               | Solución del ARN a amplificar               | 68°C / 20 s                |
|   | 4°C / ∞                    |   | 68°C / 5 min               |
|   |                            |   | 4°C / ∞                    |

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Diseño de oligonucleótidos para la secuencia TAVSPTTLR.

La estrategia en el diseño de oligonucleótidos (sentido y anti-sentido) se enfocó en diseñar en el programa Vector NT1® la secuencia de la región codificante del epítipo de la proteína E2 del VFPC, la cual se constituye de una secuencia sentido 5'- TAT TCT AGA GAC TGC TGT TTC TCC AAC TAC TCT TAG GGA TCC TAT -3' y una anti-sentido 5'- ATA GGA TCC CTA AGA GTA GTT GGA GAA ACA GCA GTC TCT AGA ATA -3', que corresponden a TAVSPTTLR; así como en diseñar oligonucleótidos que identifiquen el transgén en líneas transformantes de tabaco por PCR y RT-PCR, constituidos por una secuencia sentido 5'-CTCACCTCACCATACTGC-3' y una anti-sentido 5'-GATCTTCAAACCCACATTAG-3', que reconocen regiones río arriba y río abajo de la región del epítipo.

Todos los diseños obtenidos a partir del paquete informático Vector NT1® fueron sintetizados por la empresa Invitrogen, la cual reporta en el certificado de análisis la información descrita en el ANEXO 3.

### VI.2 Incorporación de la región TAVSPTTLR del VFPC en el plásmido pHbC.

El resultado de la inserción de la secuencia codificante TAVSPTTLR para la glicoproteína E2 del VFPC en el plásmido pHbC<sub>Ag</sub> fue el plásmido denominado pHbC-FPC (Figura 21). Esto se realizó mediante una digestión con las enzimas de restricción XbaI y BamHI y la subsecuente incorporación de la secuencia del epítipo de la proteína E2 de tan solo 33 pb al plásmido pHbC de 3,578 pb. La representación esquemática del plásmido pHbC que contiene la región codificante

de la proteína E2 del VFPC se desarrolló en el paquete informático Vector NT1® y está representada en la Figura 21.

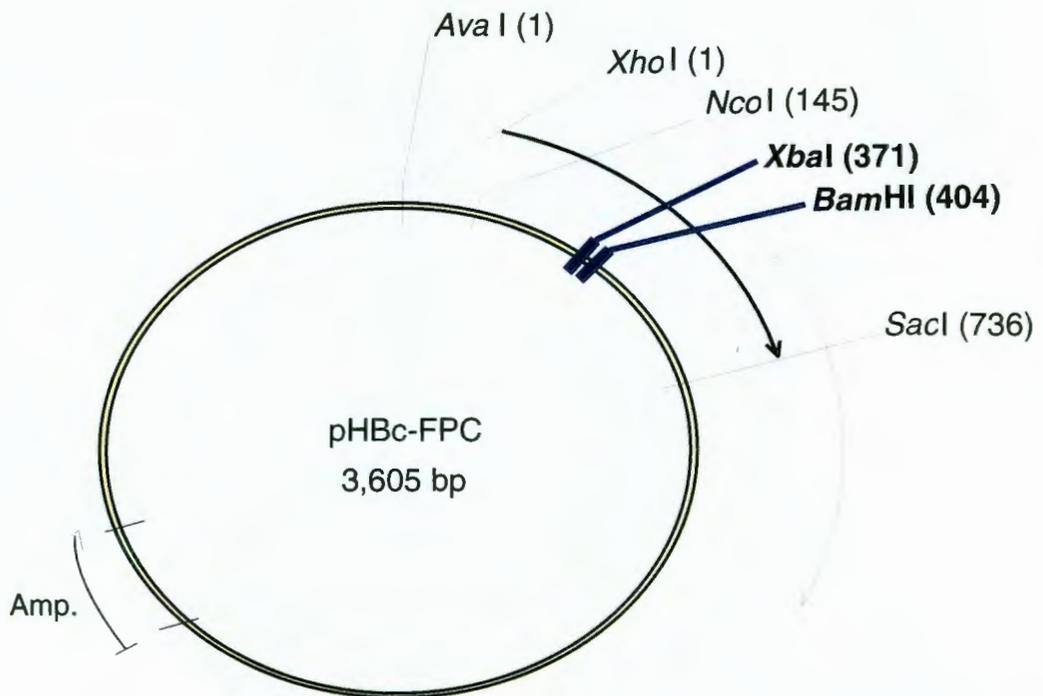


Figura 21. La representación esquemática del plásmido pHBcFPC por el paquete informático Vector NT1®. El color azul en la imagen del plásmido pHBcFPC indica el sitio de corte de las enzimas XbaI / BamHI y su localización en el ORF.

Las colonias de *E. coli* DH5α transformadas con el plásmido pHBc-FPC se seleccionaron en medio adicionado con ampicilina para su posterior análisis. Dicho análisis consistió en confirmar que la región codificante TAVSPTTLR se encontrara totalmente incorporada en el plásmido que contiene el antígeno de nucleocápside del virus del hepatitis B; por lo tanto, el ADN plasmídico de las colonias de *E. coli* DH5α transformadas se analizó con digestión enzimática, usando XbaI / SacI ó BamHI / NcoI, ya que ambos juegos de enzimas se encuentran en el mismo marco de lectura y permite detectar la presencia de la región codificante a partir de la

diferencia entre pares de bases y su peso molecular, donde el primero da una diferencia de 259 pb y el segundo de 365 pb, respectivamente (Figura 18).

Se obtuvieron 11 colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pHBc-FPC, donde el ADN digerido se visualizó en un gel de agarosa al 3% (Figura 22), utilizando bromuro de etidio como reactivo de revelado y un marcador de peso molecular de 1 kb.

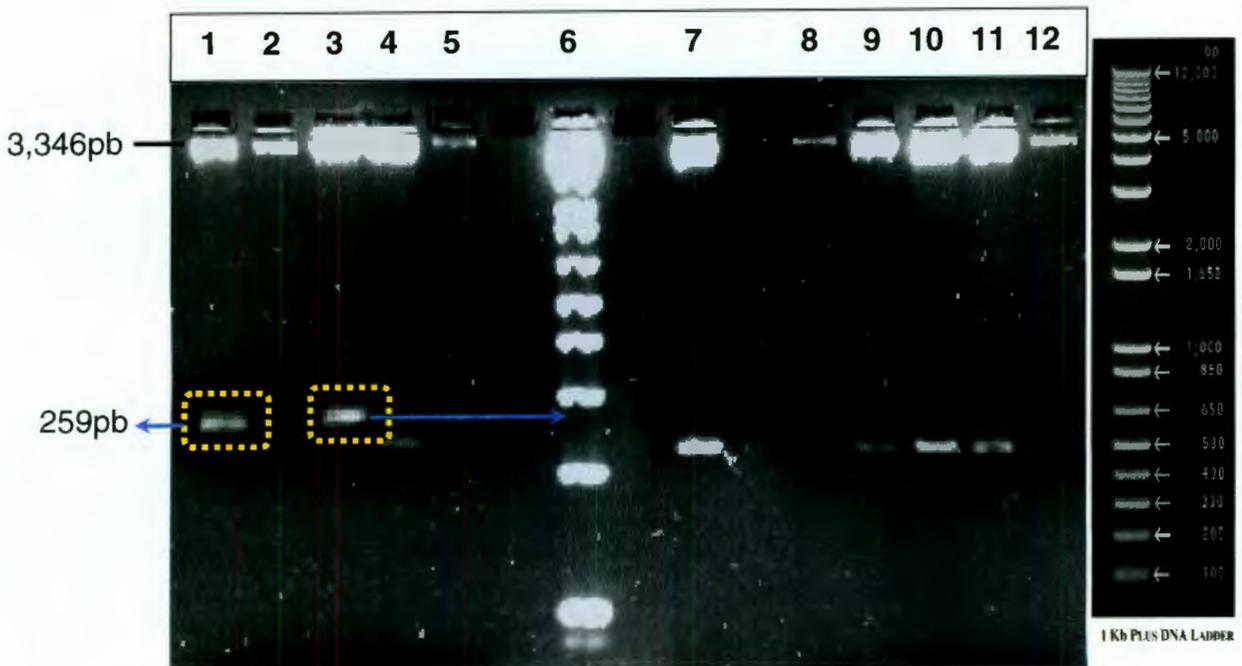


Figura 22. Análisis de DNA de *E. coli* transformadas con pHBc-FPC. Los carriles del 1-5 y 7-12 corresponden a colonias transformadas con el plásmido pHBc-FPC; mientras el carril 6 se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb plus ladder, el cual se ejemplifica en el extremo derecho de la figura.

La Figura 22 muestra que las colonias 1 y 3 de *E. coli* DH5 $\alpha$  se transformaron con la secuencia codificante TAVSPTTLR, al presentar ambas un peso molecular deseado de 259 pb, correspondiente al corte que generan las enzimas de

restricción NcoI / BamHI en el plásmido pHbc-FPC de 259 pb para la fracción que contiene la secuencia del VFPC y 3,346 pb para el resto del plásmido.

### VI.3 Confirmación de la secuencia parcial del plásmido pHbc-FPC por secuenciación.

El Cuadro 12, representa la determinación de la concentración de los ácidos nucleicos de las colonias transformadas 1 y 3 de *E. coli* DH5 $\alpha$ , medida espectrofotométricamente, mostrando que se cumplió con el requisito mínimo de 120 ng /  $\mu$ L de ácidos nucleicos requeridos para secuenciar las muestras de DNA de dichas colonias; además de registrar una relación  $A_{260}/A_{280}$  próxima a 1.8, que indica un grado de pureza del DNA aislado óptimo para la secuenciación.

Cuadro 12. Concentración de ácidos nucleicos de las colonias transformadas de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ | Ácidos nucleicos [ng / $\mu$ L] | Relación $A_{260}/A_{280}$ |
|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Colonia 1                   | 120.3 ng / $\mu$ L              | 1.8                        |
| Colonia 3                   | 156.35 ng / $\mu$ L             | 1.75                       |

La secuenciación se llevó a cabo en el CINVESTAV Campus Irapuato, Guanajuato. Los cromatogramas del ANEXO 4, muestran que las colonias 1 y 3 de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas con la región codificante TAVSPTTLR de la glicoproteína E2 del VFPC, al mostrar la presencia de la secuencia TCT AGA GAC TGC TGT TTC TCC AAC TAC TCT TAG GGA TCC diseñada en el programa informático Vector NT1® anteriormente.

#### VI.4 Incorporar la fusión genética HBcAg-TAVSPTTLR en el plásmido pHBV33.

El plásmido recombinante del virus de la hepatitis B (pHBV33) contiene una región específica que codifica para la proteína de su nucleocápside. En este trabajo anteriormente, se fusionó la región de la nucleocápside (HBc) con la región codificante del epítipo del VFPC (TAVSPTTLR o FPC), obteniendo el plásmido que contiene el gen quimérico (pHBc-FPC), el cual se trasladó al plásmido binario pHBV33.

Para esto, la digestión enzimática de los plásmidos pHBV33 y pHBc-FPC con las enzimas de restricción XhoI / SacI arrojaron fragmentos de 12,430 pb y 736 pb, respectivamente, que corresponden a los fragmentos deseados que se usaron para fusionar el gen quimérico al plásmido binario. Los fragmentos fueron cuantificados espectrofotométricamente (Cuadro 13) para usar una relación 1:4 (HBcFPC : pHBV33) durante su ligación.

Cuadro 13. Concentración de ácidos nucleicos de las secuencias obtenidas en la digestión con las enzimas XhoI / SacI.

| Secuencias | Concentración<br>[ng / $\mu$ L] | Peso molecular<br>(pb) |
|------------|---------------------------------|------------------------|
| pHBcFPC    | 15.5 ng / $\mu$ L               | 735                    |
| pHBV33     | 33.9 ng / $\mu$ L               | 12, 438                |

La transformación efectiva del plásmido pHBV33-FPC a células de *E. coli* DH5 $\alpha$  se mostró por selección negativa en medio adicionado con kanamicina. Se

analizaron los plásmidos de ocho colonias transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  por digestión enzimática con enzimas de restricción *SacI* / *XhoI*. Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 23), utilizando Syber Safe como reactivo de revelado y un marcador de peso molecular de 1 kb.

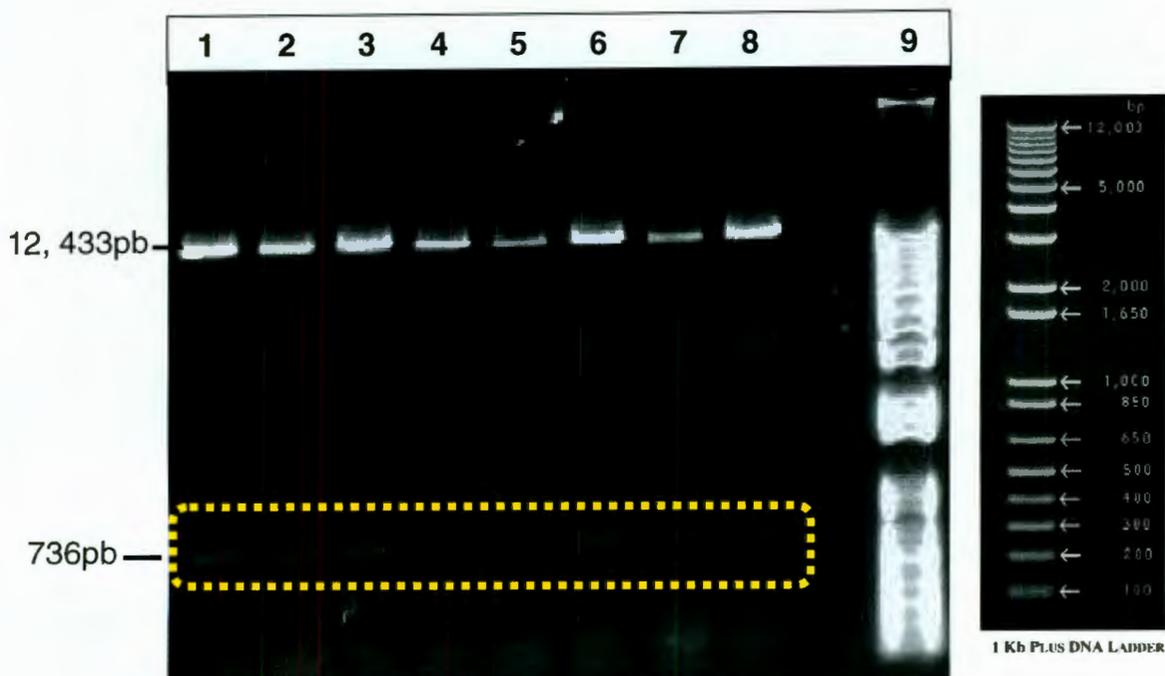


Figura 23. Análisis del DNA de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con pHBV33-FPC. Los carriles del 1 al 8 corresponden a colonias transformadas con el plásmido pHBV33-FPC, mientras el carril 9 se ubica el marcador de peso molecular de 1 kb plus ladder.

La Figura 23 muestra que todas las colonias analizadas fueron transformadas eficientemente con el plásmido pHBV33-FPC, al presentar un peso molecular de 735 pb que corresponde a la secuencia pHBc-FPC que fue insertada en el plásmido binario pHBV33.

#### VI.4.1 Verificación del plásmido binario pHBV33-FPC por patrón de bandas.

La presencia de la secuencia pHbCFPC en el plásmido pHBV33 se verificó realizando una digestión del ADN de las colonias de *E. coli* DH5α transformadas, esperando obtener de la digestión con las enzimas XbaI / SacI y BamHI / NcoI un peso molecular de 365 pb y 259 pb, respectivamente (Figura 18).

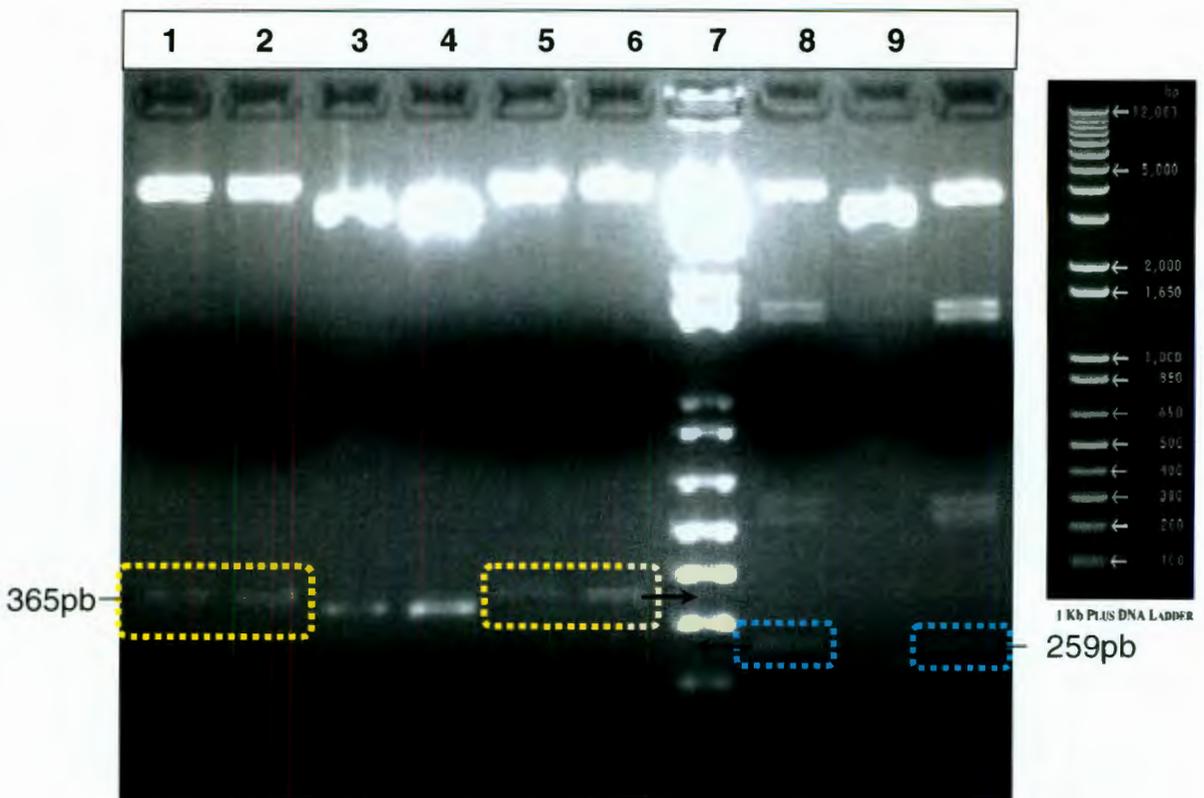


Figura 24. Verificación de la presencia del gen quimérico HBC-FPC. Carriles 1,2,5 y 6 corresponden a colonias de *E. coli* con el plásmido pHBV33 y digeridas con las enzimas XbaI / SacI. Carriles 8 y 10 corresponden a colonias de *E. coli* con el plásmido pHBV33 pero digeridas con las enzimas NcoI / BamHI. Los carriles 3,4 y 9 es un control positivo de PBS CASS1 35S, digeridos con XbaI / SacI carriles 3 y 4 y con NcoI / BamHI el carril 9. El carril 7 es el mPM de 1 kb Plus ladder.

En el análisis de la Figura 24, donde las enzimas XbaI / BamHI flanquean la región codificante TAVSPTTLR y las enzimas SacI / NcoI cortan a los extremos de la región codificante, se verificó que las colonias de *E. coli* DH5α efectivamente estaban transformadas con el plásmido pHBV33-FPC, ya que ambas digestiones mostraron el peso molecular correspondiente a su corte enzimático

#### VI.5. Expresión del plásmido pHBV33-FPC en hojas de *N. tabacum*.

Se utilizaron plantas de *N. tabacum* como modelo de expresión del gen quimérico Hbc-FPC presente en el plásmido binario pHBV33 y el cual fue introducido en la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* mediante electroporación. La presencia del plásmido pHBV33-FPC en *Agrobacterium* se confirmó por selección al crecer las bacterias en medio adicionado con kanamicina.

Las plantas de tabaco se transformaron utilizando *A. tumefaciens* que contiene el plásmido pHBV33-FPC; así como un control positivo, el cual solo tiene el plásmido pHBV33 sin la región codificante de la proteína E2 del VFPC, además de un control negativo que no contiene ninguno de los plásmidos anteriores.

En la transformación de los explantes de tabaco (Figura 25) de los diferentes tratamientos, se evitó que los explantes se deshidrataran a las 48 h posterior a su tratamiento con *A. tumefaciens* y se logró obtener explantes libres de bacteria, por la presencia de la cefotaxima. Los explantes transformados con el plásmido pHBV33-FPC y pHBV33 se seleccionaron al presentar resistencia a kanamicina (Figura 25a), obteniendo una eficiencia del 80% para el plásmido pHBV33-FPC y un 90% para el control positivo; mientras que los explantes correspondiente al control negativo comenzaron a presentar clorosis a las 48 h posterior al proceso de transformación, demostrando que la transformación con *A. tumefaciens* se desarrollo de una manera eficiente.

Control Negativo

Control Positivo

Epítotope pHBV33-FPC

a) Transformación



b) Inducción de tejido calloso



Figura 25. Transformación de explantes de *N. tabacum* vía *A. tumefaciens*. En el proceso de transformación los explantes de tabaco se seleccionaron para dar paso a la generación de tejido calloso en medio MS.

Se obtuvo de los explantes transformados con los plásmidos pHBV33-FPC y pHBV33 una organogénesis indirecta al generar en los explantes tejido calloso a seis semanas posterior a la transformación (Figura 25b). Se desarrolló un mayor número de callos en explantes transformados con el plásmido pHBV33 que aquellos transformados con el plásmido pHBV33-FPC. El control positivo generó ocho tejidos callosos, mientras que el tratamiento pHBV33-FPC generó únicamente

cinco tejidos callosos y en el control negativo no hubo generación de callos al no resistir la kanamicina presente en el medio de formación de regeneración.



Figura 26. Crecimiento de plantas transformadas con pHBV33 y pHBV33-FPC. La planta se creció en MS hasta su enraizamiento y de ahí se paso a invernadero.

Los brotes de callos se separaron de los explantes a medio MS nuevo, dejando crecer hasta la aparición de raíces (Figura 26a) por un periodo de dos semanas, después la nueva planta se colocó en maceta y se dejó crecer en invernadero a una temperatura de 25°C (Figura 26b). Se tomaron hojas de una sola

planta de cada tratamiento seleccionada al azar para su posterior análisis, mientras que se tomaron hojas de la planta de tabaco inicial que se utilizó para la transformación como control negativo.

#### VI.6 Análisis de la presencia de la región codificante de la proteína E2 del VFPC en líneas celulares de tabaco.

Antes de hacer el análisis de las líneas transformantes, se verificó la integridad del ARN del material biológico vegetal en un gel no-desnaturalizante de agarosa al 1.2%, usando Syber Safe como reactivo de revelado.

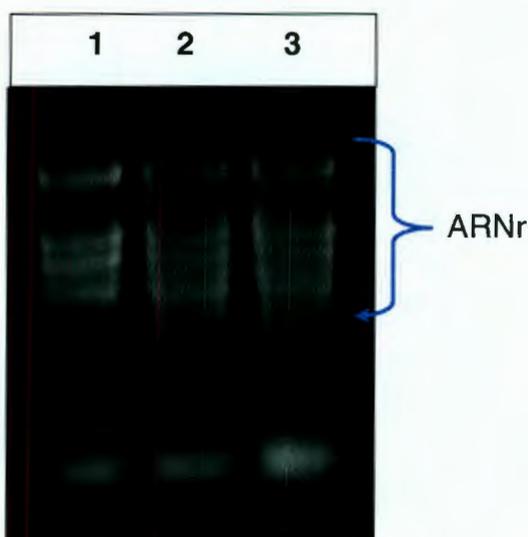


Figura 27. Verificación de la integridad del ARN vegetal. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden al ARN extraído de las hojas de las plantas de tabaco *N. tabacum* sin transformar, con el plásmido pHBV33 y con el plásmido pHBV33- FPC respectivamente. Las bandas representan en ARN ribosomal de cada planta.

En la Figura 27, se observó que el ARN ribosomal de las muestras de hoja de tabaco se encuentra íntegro, lo cual indica que puede ser utilizado para el análisis de la expresión por RT-PCR.

Posteriormente, se hizo el análisis molecular de las líneas transformantes por PCR y RT-PCR utilizando oligonucleótidos diseñados para identificar la región codificante al antígeno de la nucleocápside del virus de la hepatitis B que contiene la secuencia para el epítipo de la proteína E2 del VFPC (ANEXO 2), verificando su presencia en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando Syber Safe como solución de revelado y un marcador de peso molecular de 1 kb. Las muestras analizadas fueron tratadas previamente con la enzima DNAasa.

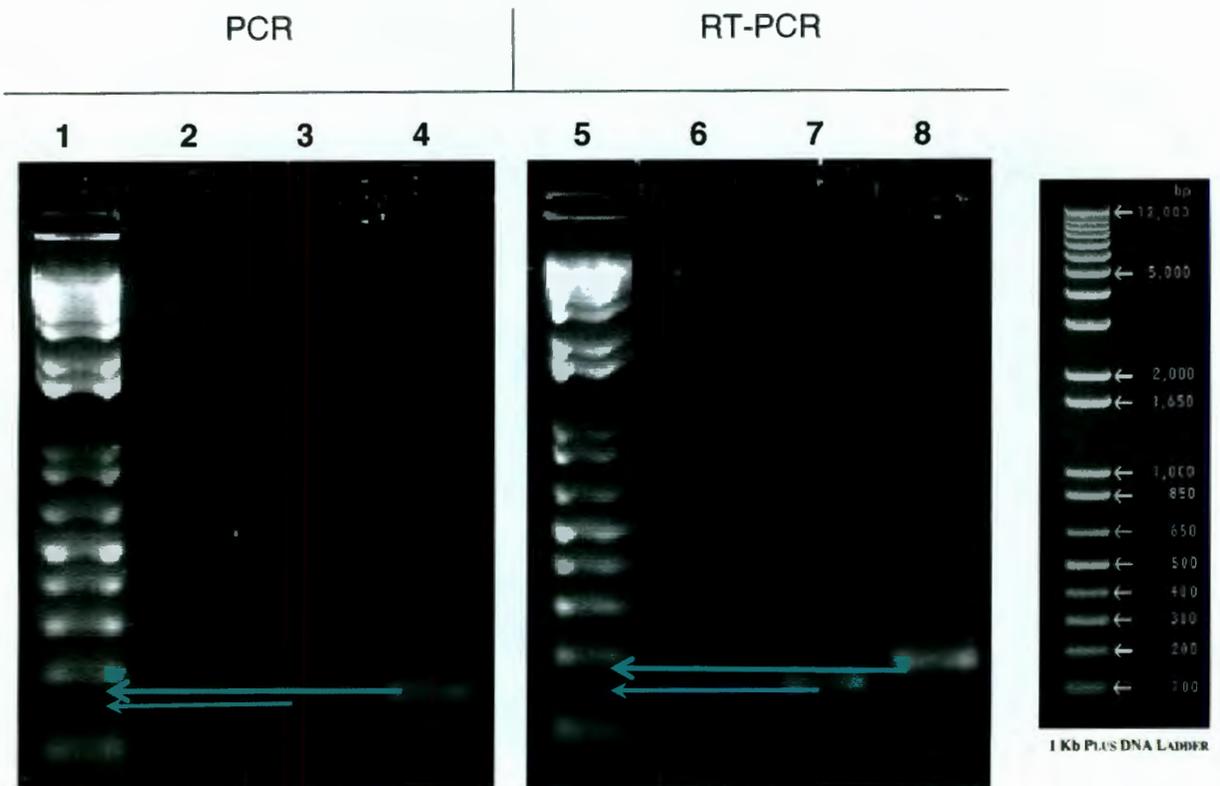


Figura 28. Análisis de las líneas transformantes de *N. tabacum*. Las muestras control se ven representadas en los carriles 2 y 6, las muestras con el plásmido pHBV33 son los carriles 3 y 7, mientras los carriles 4 y 8 corresponden al plásmido pHBV33-FPC, los carriles 1 y 5 son el marcador de peso molecular de 1kb Plus ladder. Los carriles 2-4 se trataron con la enzima DNAasa y se analizaron por PCR; los carriles 6-8 se trataron con la enzima DNAsa y se analizaron por RT-PCR.

En la Figura 28, se muestra el análisis realizado por PCR y RT-PCR, donde el control negativo, como se esperaba, ni presenta ninguna banda de amplificación; por otro lado, el control positivo, en flecha color azul, muestra un peso molecular de 157 pb y las muestras que contienen el plásmido pHBV33-FPC, en flecha verde, muestran un peso molecular de 174 pb, demostrando la presencia de la región codificante del epítipo de la proteína E2 del VFPC en las líneas transformantes de *N. tabacum*, así como su expresión.

## VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se buscó obtener líneas transgénicas de tabaco con la secuencia codificante del epítipo E2 del VFPC, la cual es una glicoproteína altamente inmunogénica que contiene los principales determinantes antigénicos que son conservados entre las diferentes cepas de virus del mismo género *pestivirus* (Wong y col., 1997). Para esto, primeramente se usaron partículas tipo virus como plataforma de exposición de la secuencia TAVSPTTLR, ya que han sido utilizados como excelentes sistemas de presentación de epítopes al tener la capacidad de inducir anticuerpos específicos contra la secuencia deseada (Santi y col., 2006); y posteriormente se expresó la partícula quimérica en plantas de tabaco transformadas mediante agroinfección. Los resultados obtenidos a partir de esta estrategia demostró la expresión del epítipo del VFPC en una línea transgénica de tabaco.

A lo largo de más de 10 años se han hecho estudios específicos alrededor de la glicoproteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica, enfocándose a regiones N-terminal o E<sup>ms</sup> que podrían ser utilizadas como vacunas (Risatti y col., 2004; Dong y Chen, 2006). De igual manera, se había realizado un estudio con la secuencia TAVSPTTLR, demostrando que es una región altamente conservada en cepas de VFPC pero altamente divergente entre cepas del VDVB y VEF (Lin y col., 2000), siendo este estudio una base para proponer esta región para un futuro diagnóstico molecular de la FPC.

El diseño de los oligonucleótidos de la secuencia codificante TAVSPTTLR de la glicoproteína E2 del VFPC en este trabajo consistió en usar oligonucleótidos (sentido y anti-sentido) fosforilados en el extremo 5' con extremos cohesivos en las secuencias consenso para los sitios de corte XbaI y BamHI, que permitían la incorporación directa al plásmido del antígeno de nucleocápside del virus de la

hepatitis B (pHBcAg). Sin embargo, la fosforilación de los oligonucleótidos con la cinasa T4, que cataliza la transferencia de un grupo fosfato al extremo 5', fue poco eficaz. Debido a esto, se rediseñó una secuencia de oligonucleótidos complementarios y anti-paralelos que al unirse contenían en sus extremos 5' y 3' sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción XbaI y BamHI, respectivamente, además de tres nucleótidos extra en cada extremo, con la finalidad de otorgarle una mayor eficiencia de corte a las enzimas de restricción utilizadas. Estas secuencias de oligonucleótidos posteriormente fueron alineadas (denominados Mezcla FPC), tal como se mostró en la sección de Metodología, e incorporadas al plásmido HBcAg por digestión enzimática.

El producto de este plásmido pHBcAg ha sido utilizado por ser altamente inmunogénico y tener la capacidad de producir anticuerpos contra el antígeno presente en su superficie. Estos monómeros pueden ensamblarse en partículas tipo virus y ser producidas en varios sistemas de expresión, como *E. coli* o plantas transgénicas (Huang y col., 2005; Park, 2006).

Sin embargo, debido a la cercanía de los sitios de restricción del plásmido pHBcAg para la incorporación de la secuencia TAVSPTTLR del epítipo E2 se tomaron dos medidas precautorias; la primera fue realizar las digestiones por separado y la segunda fue evitar una posible religación desfosforilando el plásmido. Considerando el impedimento estérico y la eficiencia de corte del 50 – 100% de las enzimas de restricción, se sometió a digestión el plásmido pHBcAg primeramente con la enzima XbaI, la cual necesita dos nucleótidos de reconocimiento para cortar del 50-100% de eficiencia; por otro lado, la enzima BamHI necesita sólo un nucleótido en el extremo para trabajar eficientemente. No obstante, posterior a la digestión se sometió al plásmido a una desfosforilación con la enzima fosfatasa alcalina de bacteria (Bap) para evitar que éste se religara en el caso probable de

que ambas enzimas no hayan cortado al 100%. Con esto se aseguró la inserción del epítotope en el plásmido HBcAg, obteniéndose el plásmido denominado HBcFPC.

La expresión de proteínas heterologas en *E. coli* se ha vuelto una de las técnicas estándar en biología molecular como sistema de expresión. A pesar de de que muchos sistemas son viables, el manejo del sistema del promotor T7 es uno de los sistemas más exitosos, debido en gran parte a su habilidad de controlar estrictamente niveles de expresión basal (Wong y col., 1997).

Los plásmidos que contienen la región TAVSPTTLR se transformaron en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por el método físico de electroporación, ya que es una técnica que asegura que todas las células tienen la misma posibilidad de ser transformadas en un único evento (VWR BioMARKE, 2006); sin embargo, el éxito de esta técnica depende en gran medida de la pureza de la solución del plásmido (Huang y col., 2005), especialmente en su contenido de sal, que puede causar un arco voltaico, lo que conduce a la muerte de las células. Por consiguiente, cada una de las secuencias durante las digestiones, tanto del plásmido pHbCag como la Mezcla FPC, se sometió a purificación y concentración de ácidos nucleicos que permitieron una eficiente transfección, haciéndose notable en el crecimiento de colonias resistentes a ampicilina.

La presencia codificante TAVSPTTLR en las colonias resistentes se verificó utilizando un análisis por patrón de bandas en vez de un análisis por PCR como comúnmente se ha analizado a la proteína E2, esto debido a que el análisis por PCR mostró posibles variables que afectan el rendimiento de la reacción, de las cuales se creyó pudieron ser por una ligera contaminación con ADN provenientes de las micropipetas de uso general (se usan las mismas para extracción o digestión de ADN) o por el uso de los oligonucleótidos diseñados para la región proteica TAVSPTTLR del VFPC como templado para amplificar la misma secuencia.

Visto los impedimentos en la técnica de PCR, se basó la estrategia de análisis en una digestión enzimática con endonucleasas NcoI / BamHI ó XbaI / SacI que liberan fragmentos de tamaños que son conocidos y que son analizados en un gel de agarosa por electroforesis. De los resultados positivos para las dos colonias transformadas con el epítipo E2 del VFPC, se secuenció la región de inserción del gen, corroborando la presencia de la región TAVSPTTLR con el paquete informático Chromas Lite. Los plásmidos se enviaron a secuenciar utilizando el oligonucleótido del promotor T7, lo que originó que la lectura fuera en la secuencia antiparalela debido a la posición de las enzimas SacI y XhoI utilizadas para transferir inicialmente la secuencia codificante HBcAg al plásmido pBluescript II KS (+/-).

Previo a este trabajo, se movilizó la secuencia codificante del antígeno de la nucleocápside del virus de la hepatitis B (HBcAg) al plásmido pBluescript II KS (+/-) con ayuda de las enzimas XhoI y SacI; esto con la finalidad de trabajar primeramente en un plásmido más pequeño de 3,578pb, que permitiera de manera más fácil y segura incorporar la secuencia TAVSPTTLR de tan solo 33 pb y para posteriormente transferirlo al vector original pHBV33 de 13,138 pb, el cual es un vector binario usado para la transformación de plantas que contienen la región T-DNA con el gen de interés y sitios de replicación para bacterias como *A. tumefaciens* (Xiang y col., 1999; Lee y Gelvin, 2008).

El uso de *A. tumefaciens* como vehículo de transformación genética en explantes de *N. tabacum*, se basó considerando la capacidad que tiene la bacteria de transferir su T-ADN al genoma de plantas dicotiledóneas (Hellens y col., 2000), con la finalidad de facilitar la clonación y análisis funcional de nuevos genes. Sin embargo, un primer ensayo realizado mostró una baja generación de callos, en enraizamiento, así como su sucesivo crecimiento en medio de cultivo; en un segundo ensayo, se transformó un mayor número de explantes para aumentar la

probabilidad de obtener un número mayor de callos generados; en este ensayo se mostró un mayor rendimiento en todos los aspectos anteriormente mencionados. Este comportamiento pudo haberse debido al fondo genético del plásmido binario y/o la agresividad del tipo de cepa utilizada, al comparar notablemente el crecimiento acelerado y un estado óptimo de explantes de tabaco que fueron transformados al mismo tiempo que el primer ensayo, pero con un plásmido binario, pCambia, y una cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Los resultados sugieren que el plásmido pHBV33 y la cepa LBA4404 son menos eficientes para la obtención de líneas transgénicas de tabaco.

Estas líneas transgénicas se analizaron para verificar la presencia de la región TAVSPTTLR que codifica para la glicoproteína E2 del VFPC por la técnica de PCR, así como su expresión por la técnica de RT-PCR. Ambas han sido establecidas como pruebas complementarias para el diagnóstico de la fiebre porcina clásica en México, ya que son altamente sensibles en la detección temprana de la enfermedad (Escatel y col., 2002).

Por lo anterior, podemos asegurar que poseemos una línea transformante con la secuencia TAVSPTTLR de la glicoproteína E2 del VFPC que puede ser utilizada para un diagnóstico diferencial que permita discriminar animales vacunados de infectados y que sustituya a las técnicas complementarias y confirmatorias que se usan para detectar la FPC; además de convertirse en una posible vacuna específica de fácil acceso para el porcicultor.

## VIII. CONCLUSIÓN

Fue posible obtener líneas transgénicas de tabaco que contienen la región codificante del péptido específico de la glicoproteína E2 del VFPC mediante la transformación vía *A. tumefaciens*.

La construcción del plásmido binario logró expresar la proteína quimérica constituida por el antígeno de nucleocápside del virus de la hepatitis B y la secuencia TAVSPTTLR para la transformación de plantas.

La técnica de RT-PCR permitió detectar de manera rápida y específica el ARN mensajero del gen quimérico presente en hojas de la planta de tabaco transformada, demostrando la presencia de la región TAVSPTTLR.

Estas líneas transgénicas de tabaco tienen la ventaja de permitir la expresión del gen que codifica para la región de la glicoproteína E2 del VFPC, a gran escala y con bajo costo de producción; además, tienen el potencial de aumentar los niveles de expresión de esta proteína mediante la selección de líneas homocigotas.

El presente trabajo tiene el potencial de ser utilizado para desarrollar un diagnóstico diferencial, ya que la región TAVSPTTLR se encuentra conservada únicamente entre las cepas del VFPC.

## IX. PERSPECTIVAS

Se utilizará el anticuerpo WH303 para evaluación inmunogénica y determinar la especificidad de la región codificante TAVSPTTLR.

A partir de la secuencia del péptido TAVSPTTLR se evaluará la habilidad con que el anticuerpo específico WH303 se une a la partícula quimérica formada por el HBcAg y el péptido específico de FPC en una prueba de ELISA competitivo para comprobar la especificidad con que el epítipo de la secuencia E2 puede ser reconocido.

Se realizarán pruebas con ratones que serán inmunizados con estas partículas quiméricas que contienen la región E2 del VFPC y se determinarán los títulos de anticuerpos mediante Western blot, además de evaluar su especificidad en una prueba de inmunodiagnóstico.

La mejor aplicación de las partículas tipo virus quiméricas que se generen a partir de este estudio es su incorporación en vacunas, ya que se tienen datos que demuestran que el epítipo TAVSPTTLR puede inducir una respuesta inmune antiviral y no representa un riesgo de infección, a diferencia de las vacunas vivas atenuadas, lo cual es una ventaja para el diseño de una vacuna segura para la prevención de la fiebre porcina clásica.

## X. BIBLIOGRAFÍA

**Belnap D.**, Watts N., Conway J., Cheng N., Stahl S., Wingfield P., Steven A., **2003**. Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus. PNAS. Vol. 100: 10884 – 10889.

**Dong X.**, Chen Y. **2006**. Spying the neutralizing epitopes on E2 N-terminal by candidate epitope-vaccines against classical swine fever virus. Elsevier. Vol. 24: 4029–4034.

**Chen N.**, Zhang Z., Shuai J., Jiang L., Fang W. **2008**. Genetic diversity of the envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus: Recent isolates branched away from historical and vaccine strains. Elsevier. Vol. 127: 286–299.

**Dong X.** y Chen Y. **2006**. Spying the neutralizing epitopes on E2 N-terminal by candidate epitope-vaccines against classical swine fever virus. Elsevier. Vol. 24: 4029 – 4034.

**Escatel G.**, Vargas F., Salas E., García M., Díaz C., González A. **2002**. Establecimiento de la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de la fiebre porcina clásica en México. Técnica pecuaria en México. Vol. 41: 105 – 110.

**Fernández A.** **2001**. Ingeniería genética en plantas. <http://www.segenetica.es/docencia/inggenplan.txt> (Septiembre 2008).

**Ganges E.** **2007**. Papel de la respuesta celular frente a la peste porcina clásica. [http://www.uab.es/PDF/PDF\\_1192707520927\\_es.pdf](http://www.uab.es/PDF/PDF_1192707520927_es.pdf) (Septiembre 2008).

**Gelvin S.** **2003**. *Agrobacterium* - mediated plants transformation: the biology behind the “gene – jockeying” tool. Microbiology and molecular biology reviews. Vol. 67: 16-37.

**Hellens R.**, Mullineaux P., Klee H. **2000**. Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vector. Elsevier. Vol. 5: 446-450

**Huang Z.**, Santi L., LePore K., Kilbourne J. **2005**. Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. Elsevier. Vol. 24: 2506–2513.

- Isidoro J., 2008.** Plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. <http://isidoromarcam.blogspot.com/2008/01/plsmido-ti-de-agrobacterium-tumefaciens.html> (Agosto 2008).
- Jouve N., 2007.** Transgénesis y terapia génica. Editorial Universidad de Alcalá.
- Lee L. y Gelvin S. 2008.** T-DNA binary vectors and systems. *Plant physiology*. Vol. 146: 325 – 332.
- Lin M., Lin F., Mallory M., Clavijo A. 2000.** Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *Journal of Virology*. Vol. 74: 11619–11625.
- Moennig V. 2000.** Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. Elsevier. Vol. 73: 93–102.
- Morilla A. 1994.** Control y erradicación de la fiebre porcina clásica. *Ciencia Veterinaria*. Editado por R. Moreno chan. Publicado por UNAM, México, D.F. vol. 6: 173-200
- Park S. 2006.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tobacco (*nicotiana tabacum* L.) leaf disks: evaluation of the co-cultivation conditions to increase  $\beta$ -glucuronidase gene activity. Seoul, Korea. Korea University. Thesis of Master of Science. 10-12.
- Pinto C.J. 2003.** Plan continental para la erradicación de la fiebre porcina clásica en las Américas: Estimación del impacto de la peste porcina en sistemas productivos porcinos en América latina. Santiago, Chile.
- Risatti G. R., Borca M. V., Kutish G. F., Lu Z., Hlinka L. G., French R. A., Tulman E. R., Rock D. L., 2005.** The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine. *Journal of virology*. Vol. 79: 3787 – 3796.
- Rivera H. 1994.** Cólera porcino: Una revisión. *SISBIB*. Vol. 7. No. 2.
- Rümenapf T., Unger G., Strauss J., Thiel H., 1993.** Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *Journal of virology*. Vol. 67: 3288 – 3294.

- SAGARPA. 2007.** Campaña Nacional contra la fiebre porcina clásica. (Agosto 2008).
- Salas F., Rigano M., Barbante A., Basso B., Walmsley A., Castiglione S. 2003.** Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspective. Elsevier. Vol 21: 803-808.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2003.** Curso de introducción a la inmunología porcina. 2da Edición, Editorial Hipra. Capítulo 9.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2003.** Curso digital de enfermedades infecciosas porcina. <http://www.sanidadanimal.info/curso>. ISBN: 84-688-1585-3. (Agosto 09 de 2008).
- Santi L., Huang Z., Mason H. 2006.** Virus like particles production in green plants. National institutes of health. Vol. 40: 66 – 76.
- Sizova D., Kolupaeva V., Pestova T., Shatsky I., Hellen C., 1998.** Specific Interaction of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 with the 5' Nontranslated Regions of Hepatitis C Virus and Classical Swine Fever Virus RNAs. Journal of virology. Vol.72: 4775-4782.
- Stahl S. y Murray K. 1999.** Immunogenicity of peptide fusions to hepatitis B virus core antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 86: 6283 – 6287.
- Toledo A., Sánchez O., Barrera M., Figueroa N., Prieto Y., Rodríguez M., Frias M., Borroto C., González S., 2007.** Chimeric vaccine antigens against classical swine fever virus. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2007098717&IA=WO2007098717&DISPLAY=STATUS> (Octubre 2008).
- Tzfira T., Citovsky V., 2006.** *Agrobacterium*. Mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Elsevier. Vol. 17: 147-154.
- Valderrama F., Arango I., Afanador K., 2005.** Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería genética natural aplicada". Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Vol. 59: 2569 – 2585.
- Van Oirschot J.T. 2003.** Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. Elsevier. Vol. 96: 367–384.

**VWR BioMarke. 2006.** Electroporation. VWR International. Vol. 16: 14 – 15.

**Wong M., Liu J., Chang Y., Chang T. 1997.** Expression of the glycoprotein E2 of the classical swine fever virus in *Escherichia coli*. Department of veterinary medicine, National Chung – Hsing University. Vol. 60: 541 – 544.

**Xiang C., Hen P., Lutziger I., Wang K., Oliver D. 1999.** A mini binary vector series for plant transformation. Plant Molecular Biology. Vol 40: 711 – 717.

**Zhu J., Oger P., Sherrammeijer B., Hooykaas P., Farrand S., Winans S., 2000.** The bases of crown gall tumorigenesis. Journal of biotechnology. Vol. 182: 3885 – 3895.

## ANEXO 1

### FORMULACIÓN PARA PREPARAR MEDIOS DE CULTIVO.

#### Medios de cultivo bacteriano

- Medio MS (Murashige and Skoog)

|                     |                |        |
|---------------------|----------------|--------|
| Para 1 L se añaden: | Sales MS*      | 4.0 g  |
|                     | Sacarosa       | 30.0 g |
|                     | Agar           | 8.0 g  |
|                     | Agua destilada | 1.0 L  |

Ajustar el pH a 5.8 y aforar a 1 L. Adicionar el agar en polvo. Esterilizar en autoclave (15 min a 121°C). Dejar enfriar a ~55°C para adicionarle el antibiótico de selección, si fuera necesario.

\* Murashige y Skooh (MS) medio basal modificado. Phytotechnology®.

- Medio LB (Luria-Bertani)

|                     |                         |      |
|---------------------|-------------------------|------|
| Para 1 L se añaden: | Extracto de levadura    | 10 g |
|                     | Peptona caseína         | 10 g |
|                     | Cloruro de sodio (NaCl) | 5 g  |
|                     | Agua destilada          | 1 L  |

Esterilizar en autoclave (15 min a 121°C). Dejar enfriar a ~55°C para adicionarle el antibiótico de selección, si fuera necesario.

- Medio YEB

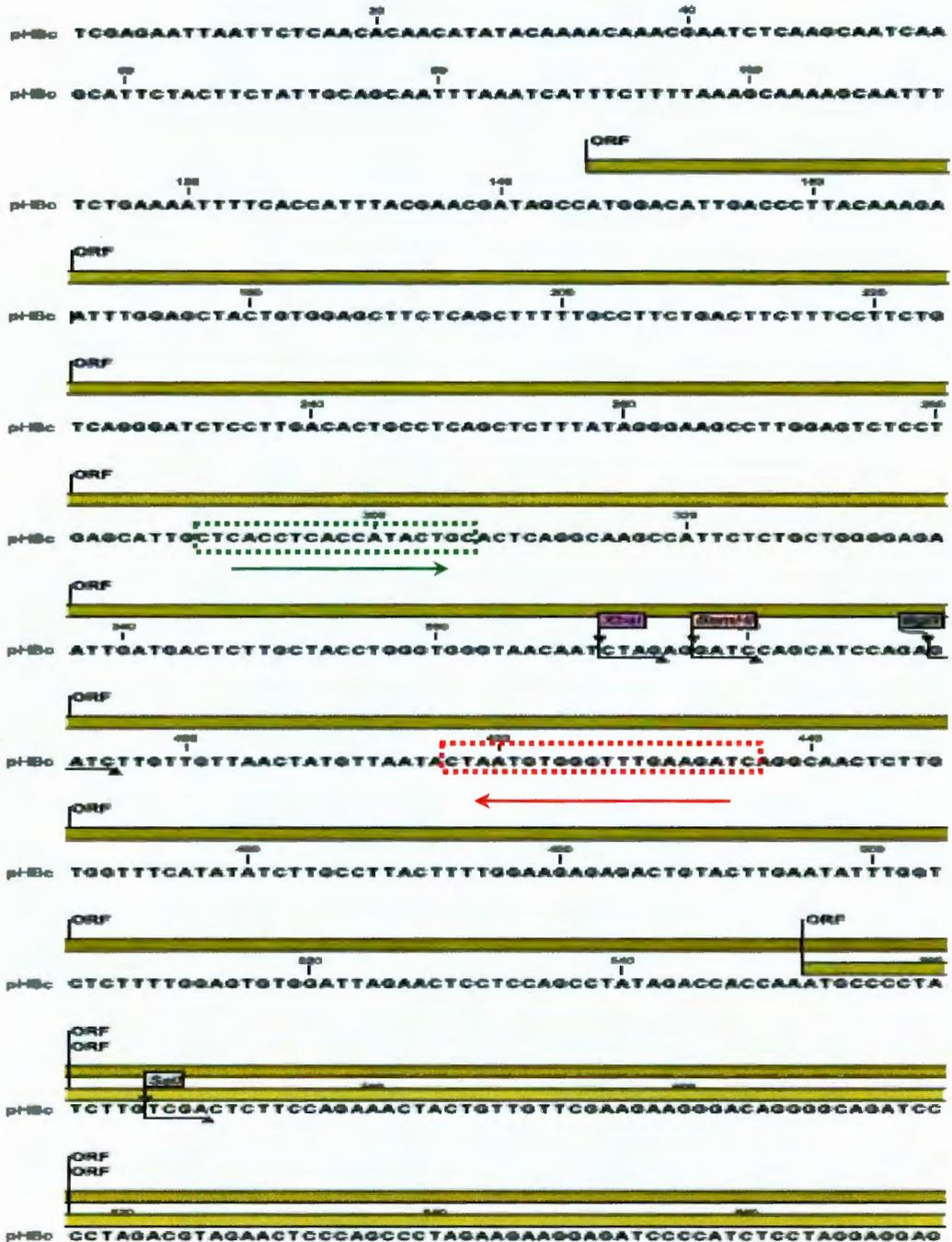
|                     |   |       |
|---------------------|---|-------|
| Para 1 L se añaden: | Extracto de levadura  | 1 g   |
|                     | Extracto de carne   | 5 g   |
|                     | Peptona   | 5 g   |
|                     | Sacarosa  | 5 g   |
|                     | Sulfato de magnesio<br>heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | 42 mg |
|                     | Agua destilada  | 1 L   |

Esterilizar en autoclave (15 min a 121°C). Dejar enfriar a ~55°C para adicionarle el antibiótico de selección, si fuera necesario.

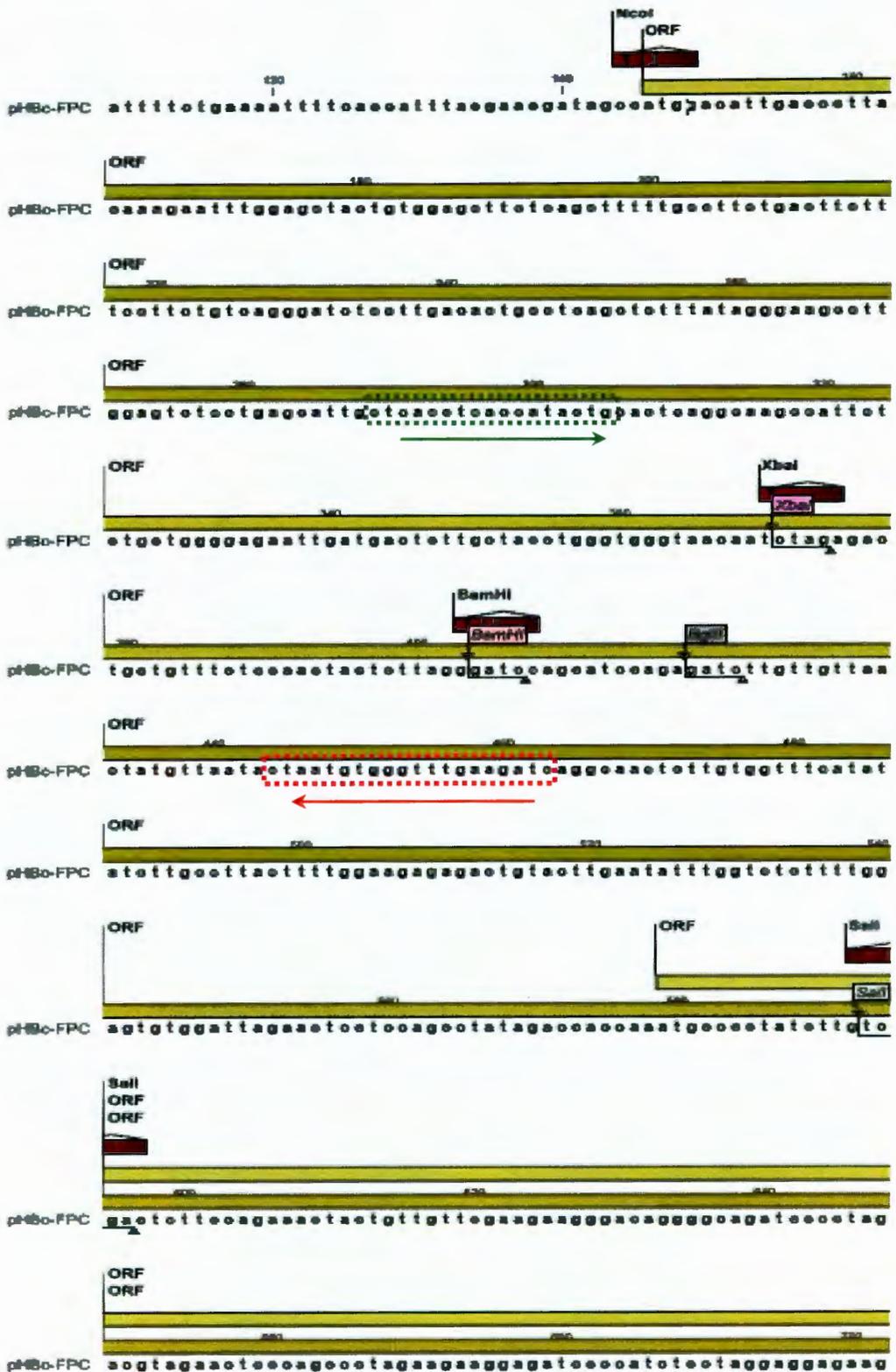
## ANEXO 2

### SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pHbC Y pHbCFPC

#### Plásmido HbC



# Plásmido HBcFPC



### ANEXO 3

#### CERTIFICADO DE ANÁLISIS EXPEDIDO POR INVITROGEN PARA LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS POR EL VECTOR NT1®.

Síntesis del oligonucleótido sentido de la secuencia TAVSPTTLR.

| Secuencia (5'- 3')                              |           | (ADN)- TAT TCT AGA GAC TGC TGT TTC TCC AAC TAC TCT<br>TAG GGA TCC TAT |        |
|---|-----------|---|--------|
| Peso molecular ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ): | 13, 728.0 | $\mu\text{g}$ por OD:   | 28.89  |
| Coef. de extinción milimolar:                   | 475.1     | nmoles por OD:  | 2.10   |
| Pureza  | Desalt    |   |        |
| $T_m$ (1M $\text{Na}^+$ )                       | 94.00     | OD's  | 16.08  |
| $T_m$ (50 mM $\text{Na}^+$ )                    | 72.00     | $\mu\text{g}$ 's  | 464.49 |
| % GC  | 40.00     | nmoles  | 33.8   |

Síntesis del oligonucleótido anti - sentido de la secuencia TAVSPTTLR.

| Secuencia (5'- 3')                              |           | (ADN)- ATA GGA TCC CTA AGA GTA GTT GGA GAA ACA<br>GCA GTC TCT AGA ATA |        |
|---|-----------|---|--------|
| Peso molecular ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ): | 13, 951.0 | $\mu\text{g}$ por OD:   | 26.09  |
| Coef. de extinción milimolar:                   | 534.7     | nmoles por OD:  | 1.87   |
| Pureza  | Desalt    |   |        |
| $T_m$ (1M $\text{Na}^+$ )                       | 94.00     | OD's  | 17.71  |
| $T_m$ (50 mM $\text{Na}^+$ )                    | 72.00     | $\mu\text{g}$ 's  | 461.97 |
| % GC  | 40.00     | nmoles  | 33.8   |

Síntesis del oligonucleótido sentido HBcFPC-F para análisis del transgén.

| Secuencia (5'- 3') (ADN)- CTCACCTCACCATACTGC    |          |                       |        |
|---|----------|-----------------------|--------|
| Peso molecular ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ): | 5, 340.0 | $\mu\text{g}$ por OD: | 30.21  |
| Coef. de extinción milimolar:                   | 176.8    | nmoles por OD:        | 5.66   |
| Pureza  | Desalt   |                       |        |
| $T_m$ (1M $\text{Na}^+$ )                       | 74.00    | OD's                  | 8.73   |
| $T_m$ (50 mM $\text{Na}^+$ )                    | 52.00    | $\mu\text{g}$ 's      | 263.66 |
| % GC  | 56.00    | nmoles                | 49.4   |

Síntesis del oligonucleótido anti-sentido HBcFPC-R para el análisis del transgén.

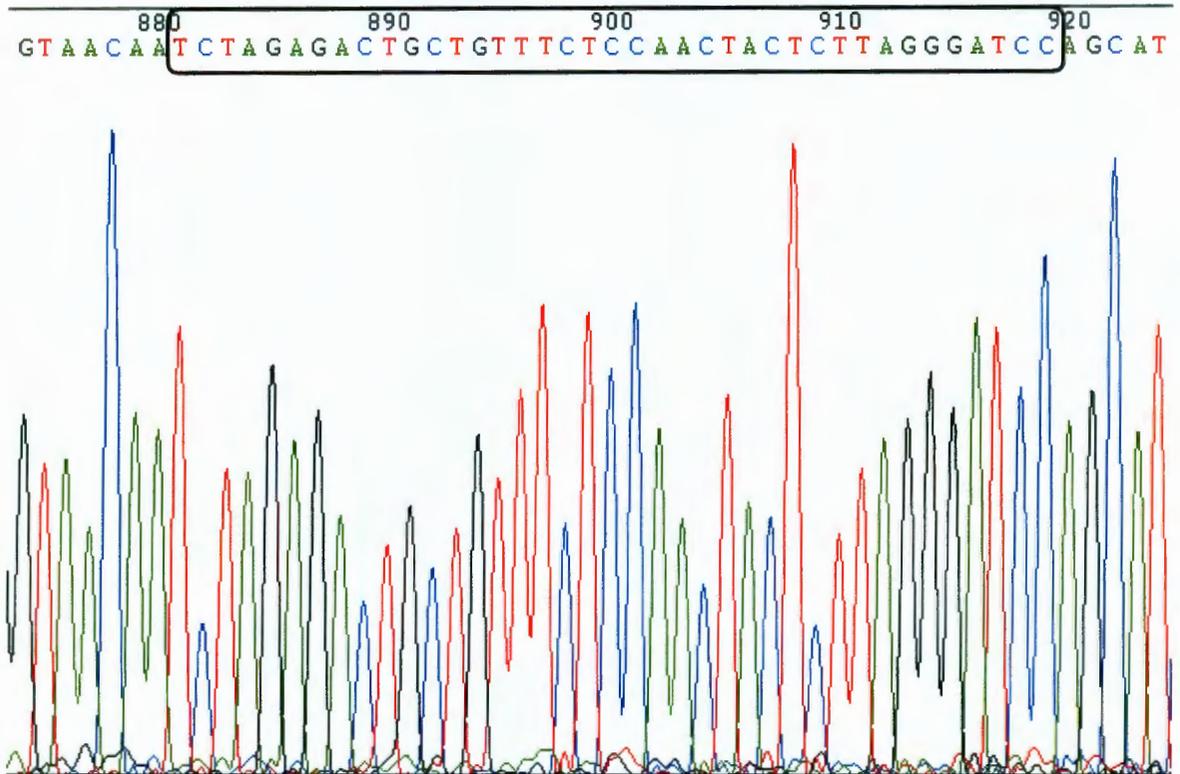
| Secuencia (5'- 3') (ADN)- GATCTTCAAACCCACATTAG  |          |                       |        |
|---|----------|-----------------------|--------|
| Peso molecular ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ): | 6, 046.0 | $\mu\text{g}$ por OD: | 27.28  |
| Coef. de extinción milimolar:                   | 221.6    | nmoles por OD:        | 4.51   |
| Pureza  | Desalt   |                       |        |
| $T_m$ (1M $\text{Na}^+$ )                       | 74.00    | OD's                  | 9.59   |
| $T_m$ (50 mM $\text{Na}^+$ )                    | 52.00    | $\mu\text{g}$ 's      | 261.51 |
| % GC  | 40.00    | nmoles                | 43.2   |

## ANEXO 4

### CROMATOGRAMAS DE LAS COLONIAS TRANSFORMANTES DE *E. coli* DH5 $\alpha$ CON EL PLÁSMIDO pHBc-FPC.

Cromatograma de la colonia #1

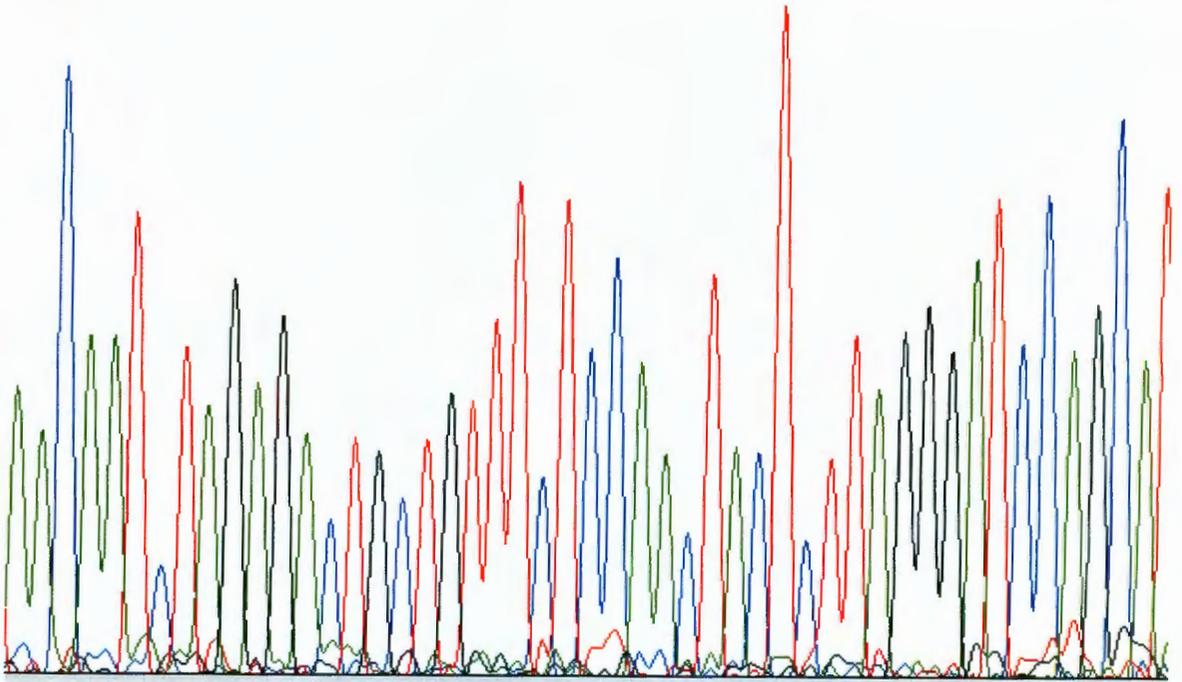
TAVSPTTLR



Cromatograma de la colonia #3

TAVSPTTLR

930 940 950 960 970  
A A C A A T C T A G A G A C T G C T G T T T C T C C A A C T A C T C T T A G G G A T C C A G C A T



## ANEXO 5

### ABREVIATURAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| °C              | grados centígrados                                       |
| ∞               | infinito   |
| %               | porcentaje   |
| μL              | microlitros  |
| AcM             | anticuerpos monoclonales                                 |
| BAP             | Benziladenina  |
| BD              | Borde derecho  |
| BI              | Borde izquierdo  |
| cm <sup>2</sup> | centímetro cuadrado                                      |
| ADN             | Ácido Desoxirribonucleico                                |
| ARN             | Ácido ribonucleico                                       |
| ARNr            | Ácido ribonucleico ribosomal                             |
| FDA             | Food and Drug Administration                             |
| FPC             | Fiebre Porcina Clásica                                   |
| g               | gramos   |
| HBcAg (HBc)     | Antígeno de la nucleocápside del virus de la Hepatitis B |
| h               | hora   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| kb              | kilo base  |
| kDa             | kilo Daltones  |
| L               | litros   |
| LB              | Luria Bertani  |
| M               | Molar  |
| mg              | miligramos   |
| min             | minutos  |
| mL              | mililitros   |
| mM              | miliMolar  |
| mPM             | Marcador de peso molecular   |
| MS              | Murashige and Skoog  |
| Na <sup>+</sup> | ión sodio  |
| ng              | nanogramos   |
| nmol            | nanomol  |
| OIE             | Organización Internacional de Sanidad Animal                         |
| ORF             | fase de lectura abierta  |
| pb              | pares de bases   |
| PCR             | Reacción en cadena de la polimerasa                                  |
| pH              | Potencial de Hidrógeno   |
| pHBc (pHBcAg)   | Plásmido de antígeno de la nucleocápside del virus de la Hepatitis B |

|                |  |
|----------------|--|
| pHBV33         | Plásmido del virus de la Hepatitis B                         |
| pTi            | Plásmido Ti  |
| PTV's          | Partículas tipo virus  |
| RT-PCR         | Reacción en cadena de la polimerasa y transcripción reversa. |
| s              | segundos   |
| T-ADN          | ADN de transferencia   |
| T <sub>m</sub> | Temperatura de fusión  |
| VDVB           | virus de la diarrea viral bovina                             |
| VEF            | virus de la enfermedad de la frontera                        |
| VFPC           | virus de la fiebre porcina clásica                           |
| VHB            | virus de la hepatitis B                                      |