



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Expresión de antígenos de fiebre aftosa en
amplicones virales basados en el virus X de la
papa.**

Nº 62

Erika Stiefel

Tutor: Alicia Zelada*

**Departamento de Investigación
Agosto 2003**

* Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI-CONICET

Agradecimientos

Primeramente, quisiera agradecer enormemente a mi directora de tesis, la Dra. Alicia Zelada, quien confió en mí desde el primer momento y me apoyó durante este proyecto de trabajo hasta el final.

También quiero dar las gracias al director del INGEBI Dr. Héctor Torres, quien me brindó la posibilidad de ingresar al Instituto y trabajar en él.

Al Dr. Alejandro Mentaberry, director del laboratorio de Virología Vegetal y Biotecnología, que permitió mi permanencia en el mismo para realizar mi tesis.

Agradezco a quienes gentilmente me brindaron las construcciones pPVX2aA, pPVX2aVP1 y pPVX2aP1 para comenzar con el proyecto: Gabriela Calamante, Oscar Taboga y Cecilia Tami.

Alguien que fue importante para ayudarme con el trabajo en el día a día fue la Lic. Natalia Módena, que no me abandonó cuando más lo necesitaba.

A quienes me rodearon con su presencia en el transcurso del año, mis compañeros de laboratorio, quiero agradecerles por su compañía que siempre resultó ser oportuna.

Mis compañeras de facultad fueron y son imprescindibles para recorrer cada uno de mis pasos por la Universidad, ellas han sido un gran soporte emocional en todos los momentos.

Y por último, no puedo dejar de mencionar a quienes me dieron la oportunidad de vivir esta experiencia, quienes creyeron en mí desde hace mucho tiempo y están a mi lado para apoyarme y guiarme, mi querida familia.

Gracias a todos!!!!

Indice

Resumen	7
Introducción	9
1. Importancia de la fiebre aftosa en Argentina	9
2. Fiebre Aftosa: características	9
2.1 Definición	9
2.2 Vías de contagio	9
2.3 Síntomas	9
2.4 Situación en el hombre	9
2.5 Distribución geográfica	10
3. Vacunas y fiebre aftosa	10
4. Producción de vacunas en plantas en general	10
5. Virus X de la papa (PVX)	11
6. Vectores virales: características generales	12
7. Amplicones virales	14
Objetivos	15
Resultados	15
1. Obtención de los amplicones virales que expresan los antígenos del virus de aftosa en fusión con la cápside viral	15
1a. Subclonado de los genoma virales conteniendo los antígenos de aftosa en el vector pBSPVX	15
1b. Clonado de los amplicones virales quiméricos en el vector binario pGreen base	17
2. Análisis de la expresión de los genomas virales en plantas de tabaco	19
2a. Obtención de cepas transformantes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que expresen los amplicones virales	19
2b. Agroinfiltración de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	20
2c. Análisis por Western blot de los antígenos fusionados a la cápside viral	21
3. Análisis de la expresión transitoria de los amplicones quiméricos en protoplastos de tabaco	22
3a. Puesta a punto de la técnica de transformación de protoplastos por electroporación y por PEG utilizando GFP como gen reportero	22
3b. Transformación con PEG de protoplastos con los amplicones quiméricos	22
Discusión	23
Materiales y Métodos	24
1. Líneas de plantas	24
2. Virus	24
3. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	24
4. Métodos de ingeniería genética	24
5. Vectores	24
6. Ligado a vectores	25
7. Preparación de bacterias <i>E.coli</i> (DH10B) competentes	25
8. Transformación de bacterias <i>E.coli</i> competentes por electroporación	25
9. Transformación de bacterias <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competentes	25
10. Preparación de ADN plasmídico	25
11. Digestión enzimática del ADN plasmídico	25
12. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	26
13. Reacción de desfosforilación	26
14. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
15. Agroinfiltración	26
16. Electroforesis	26
17. Western blot	27
18. Extracción de proteínas	27
19. Preparación de protoplastos a partir de la línea celular BY-2 de tabaco	27
20. Electroporación de protoplastos	28

21. Transformación con PEG 28
 22. Infección con carborundum 28
 Bibliografía 29

Abreviaturas

bp	Pares de bases
cADN	ADN copia
CaMV	Virus del mosaico del coliflor
cm	Centímetro/s
CP	Proteína de cápside
CPMV	Virus del mosaico del frijol
dpi	Días post inoculación
DO600	Densidad óptica de 600 nanómetros
FA	Fiebre aftosa
g	Gramo/s
gARN	ARN genómico
h	Hora/s
kb	Kilo base
kDa	Kilo Daltons
kV	Kilo Volts
L	Litro/s
LB	Borde izquierdo
m	Metro/s
mARN	ARN mensajero
min	Minuto/s
ml	Mili litros
miliseg	Mili segundos
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogramos
ORF	Marco abierto de lectura
pB	Plásmido BlueScript
Psg	Promotor subgenómico
pT7	Promotor del fago T7
PVX	Virus X de la papa
RB	Borde derecho
REP	Replicasa viral
rpm	Revoluciones por minuto
sgARN	ARN subgenómico
TB	Triple bloque de genes
U	Unidades
UV	Ultra violeta
µg	Microgramos
µl	Microlitros
v	Volúmen

Resumen

El presente trabajo de Tesis propone el desarrollo de vectores para la expresión de antígenos de aftosa en amplicones virales utilizando sistemas no integrativos. El objetivo general es establecer sistemas de expresión eficientes que puedan luego ser utilizados para la producción de plantas transgénicas que expresen virus quiméricos. El sistema de expresión no integrativo se basa en la utilización de una copia completa del genoma del virus PVX cuya expresión se encuentra dirigida por el promotor 35S de CaMV. Se construyeron amplicones recombinantes que permiten expresar los diferentes antígenos de aftosa (A, VP1 y P1) como proteína de fusión a la cápside viral produciendo viriones quiméricos. La capacidad replicativa de dichos amplicones se evaluó por agroinfiltración de plantas de tabaco. La expresión de la cápside viral fusionada a los antígenos se analizó por Western blot con anticuerpos anti-cápside y anti-epitope A de aftosa. La estabilidad genética de los amplicones virales se evaluó a través de sucesivas infecciones de plantas de tabaco con los viriones quiméricos analizando la capacidad de retención de la secuencia insertada en el genoma viral. Los resultados obtenidos permitieron determinar que el tamaño máximo de la secuencia que puede ser expresada como fusión a la cápside viral es de 800pb. Los amplicones recombinantes que contienen los antígenos A y VP1 como fusión a la cápside viral fueron capaces de replicarse y de producir viriones quiméricos estables, no así el amplicón conteniendo el antígeno P1 que sufrió recombinación perdiendo la secuencia insertada.

Por último, se obtuvieron las herramientas necesarias para desarrollar un sistema de expresión transitoria en protoplastos de una línea celular de tabaco utilizando como gen reportero el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) del aguaviva *Aequorea victoria*.

Los resultados obtenidos demuestran que PVX puede ser utilizado como un sistema de presentación de antígenos de aftosa permitiendo en un futuro su utilización para la producción de vacunas en plantas.

Introducción

1. Importancia de la fiebre aftosa en Argentina

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad viral extremadamente contagiosa que afecta al ganado doméstico. Es una de las enfermedades económicamente más relevantes debido a las pérdidas que produce entre los ganaderos y a las trabas que crea sobre las exportaciones del país que la posee (Pereyra HG, 1981). La FA, también denominada "foot-and-mouth disease", ha sido la enfermedad dominante en Sudamérica. Sin embargo, en las últimas décadas la incidencia de la enfermedad ha cambiado significativamente, especialmente en el cono sur, como consecuencia de exhaustivas campañas de vacunación. Algunos países son libres de FA sin vacunación (Chile y Uruguay); otros son libres de FA con vacunación (Argentina, Paraguay y los 3 estados del sur de Brasil) mientras que el resto de los países presenta la enfermedad en forma endémica (Kitching RP, 1998). Para un país libre de FA es prioridad evitar la introducción del virus, puesto que las consecuencias de un brote de la enfermedad serían devastadoras para la economía del país.

El riesgo de reaparición de la enfermedad por reintroducción del virus desde regiones endémicas es mayor cuando la enfermedad está presente en países fronterizos, como es la situación en la frontera norte y noroeste de nuestro país. En efecto, este podría ser el caso de las anteriores reapariciones de la enfermedad en la Argentina (König G et al., 1993-1994).

2. Fiebre aftosa: características

2.1 Definición: La fiebre aftosa es una enfermedad viral, de curso agudo, que afecta animales ungulados como bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, jabalís, ciervos, llamas y vicuñas, entre otros. Cursa con gran número de enfermos (alta morbilidad) y escasa mortalidad.

La enfermedad es causada por un enterovirus de la familia Picornaviridae aislado por primera vez en 1897. Contiene un solo filamento central de ácido ribonucleico cubierto por una capa proteica compuesta por 32 capsómeros formando una cápsula icosaédrica simétrica. Existen 7 tipos de virus distintos inmunológica y serológicamente, identificados como tipos O, A y C; tipos de territorios sudafricanos (SAT-1, SAT-2, SAT-3) y Asia-1. Además de los 7 tipos se han distinguido por lo menos 65 subtipos por medio de pruebas de fijación de complemento.

La frecuencia de mutación del virus de la fiebre aftosa para un carácter dado, indica que nuevas progenies mutantes se forman continuamente en la población viral (Pringle CR, 1964). En el campo, nuevos subtipos inmunológicos pueden surgir por selección de mutantes como resultado de las condiciones favorables del medio ambiente. En este sentido juega un papel preponderante el grado inmunológico de la población hospedadora, como ya fue demostrado en condiciones experimentales (Federer KE, 1967). Existe inmunidad cruzada entre los diversos subtipos encuadrados en un mismo tipo, pero el grado de inmunidad no es idéntico para todos ellos, éste varía en intensidad y en duración, que será más prolongada para el subtipo homólogo que para los heterólogos guardando relación con sus diferencias inmunológicas y antigénicas (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa 1996 y 1999).

2.2 *Vías de contagio*: los aerosoles formados por las secreciones respiratorias pueden transmitir al virus, incluso a gran distancia; además, puede transmitirse por vía oral y por contacto, a través de las células epiteliales. La aspiración de virus determina la infección de la mucosa del tracto respiratorio a partir de la cual se disemina por todo el organismo. El período de incubación viene influenciado por los factores típicos, como la cepa del virus y la dosis de viriones transmitidos, pero, por término medio, dura entre 2 y 14 días.

2.3 *Síntomas*: La sintomatología clásica suele iniciarse con pérdida de apetito y una drástica disminución de la producción de leche en vacas, cabras y ovejas. Prosigue con aumento de la salivación y formación de vesículas en la oro-faringe (lengua y paladar), que pueden extenderse a los labios y el hocico de los animales infectados, así como en las áreas interdigitales de las pezuñas, donde causan dolor, por lo que los animales son reacios a levantarse y andar, las células epiteliales que forman las vesículas se necrotizan, apareciendo erosiones que pueden sobre-infectarse con bacterias. En los casos más graves, la afección de las vías respiratorias y del miocardio tiene consecuencias fatales.

2.4 *Situación en el hombre*: La fiebre aftosa en el hombre es una enfermedad benigna. El período de incubación dura de 2 a 4 días, pero puede prolongarse hasta ocho días. El tipo de virus que se aísla con mayor frecuencia del hombre es el O, en segundo término el C y raramente el A. Los grupos de riesgo son las personas que trabajan con los animales enfermos o consumen leche cruda de animales afectados. La supervivencia del virus depende del lugar en que esté alojado. En los fardos de pastos, puede sobrevivir en verano 4 semanas y en invierno 12 semanas. En el suelo en verano una semana y en invierno 12 semanas. En el calzado de cuero entre 30 y 35 días, en las botas de goma 100 días, en la leche no tratada 1 día y en la carne vacuna de acuerdo a la temperatura puede sobrevivir entre 70 y 190 días.

2.5 Distribución geográfica: La FA está presente en la mayoría de los grandes países ganaderos del mundo, excepto en Norteamérica y Centroamérica, Australia, Nueva Zelanda, Japón e Irlanda. Varios países europeos en especial Inglaterra y algunos de los países escandinavos tuvieron muy esporádicamente brotes de esta enfermedad.

3. Vacunas y Fiebre aftosa

En los países donde la enfermedad es enzoótica, la incidencia de la enfermedad es controlada por programas de vacunación. En un creciente número de países la vacunación es obligatoria, en otros es voluntaria. En los países que generalmente están libres de FA, ésta es erradicada por el sacrificio del ganado y una total desinfección de los predios. En estos casos, los animales sacrificados son generalmente eliminados por incineración o enterramiento. Económicamente, éste ha sido el método más efectivo para combatir un brote. A pesar de estas medidas, se han reportado brotes de la enfermedad en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Las desastrosas consecuencias económicas de la enfermedad han impulsado la investigación sobre vacunas que puedan proteger al ganado.

Hasta el momento de la erradicación de la FA en Argentina se utilizaban vacunas preparadas con viriones enteros e inactivadas químicamente cuya producción involucraba la manipulación del agente patógeno. Estas vacunas se siguen administrando al ganado en forma preventiva, debido a que últimamente se han presentado algunos brotes esporádicos. Dicha vacuna posee algunas desventajas debido al riesgo que implica la probabilidad de una inactivación incompleta de los lotes vacunales y al elevado costo económico de las vacunaciones masivas. Esto, agravado por la necesidad de revacunar periódicamente cada 6 o 9 meses ya que la inmunidad inducida es de corta duración. La vacuna actualmente utilizada para las campañas de emergencia (Aftogen Óleo, Lab Biogénesis) es una vacuna bivalente formulada según indicaciones del SENASA, que incluye virus inactivados A24 (cepa aislada en Argentina en el año 2000) y O1 Campos.

En esta etapa del país libre de fiebre aftosa, aunque con eminentes campañas preventivas, es sumamente importante detectar y controlar posibles brotes de la enfermedad, tanto con la vigilancia epidemiológica como disponiendo de vacunas alternativas seguras y efectivas. De esta forma, el esfuerzo se concentra en el desarrollo de nuevas vacunas mediante el uso de técnicas de ingeniería genética, para evitar la manipulación del agente patógeno.

Al elaborar vacunas frente a la FA, hay que tener presente que existen varios tipos de Aftovirus, que, aunque causen la misma enfermedad, tienen entre sí diferencias antigénicas suficientes como para que la inmunidad frente a uno de ellos no proteja frente a otro. Para mayor dificultad, dentro de un mismo serotipo hay variantes (subtipos) con escasa protección cruzada. Esta variabilidad antigénica ya mencionada, es típica de los virus con genoma de ARN y supone una grave limitación para las vacunas que deben incorporar los antígenos de las variantes más frecuentes en cada epidemia.

Desde hace años se trabaja en el desarrollo de vacunas de subunidad, que están constituidas por péptidos o macromoléculas que inducen una respuesta inmune protectora contra el patógeno (Blanco E et al., 2001). Desafortunadamente el costo de producción de estas vacunas es muy elevado y no son estables al calor. La clave para conseguir la neutralización del virus reside en una de las proteínas de la cápside (VP1) la que se une a los receptores de la superficie de las células susceptibles a la infección; los anticuerpos dirigidos contra la parte inmunodominante de esta proteína han sido capaces de anular la infectividad del virión en animales experimentales (Carrillo C et al., 2001; Dus Santos MJ et al., 2002). Muchos estudios han demostrado que esta proteína estructural posee regiones críticas responsables de la inducción de anticuerpos. La inmunización con VP1 o con péptidos sintéticos que representan parte de su secuencia aminoacídica, han demostrado inducir protección contra hospedadores naturales y experimentales (Brown F, 1992).

4. Producción de vacunas en plantas en general

Las plantas son actualmente utilizadas como un sistema heterólogo seguro y de bajo costo para la expresión de biomoléculas. La producción de proteínas recombinantes en plantas tiene muchas ventajas potenciales para generar compuestos farmacéuticos de importancia en medicina clínica. En primer lugar los sistemas vegetales son más económicos que la infraestructura utilizada en sistemas de fermentación o en biorreactores. En segundo lugar, ya está disponible la tecnología para cosechar y procesar plantas y sus productos a escala industrial. En tercer lugar, el requisito para la purificación del compuesto puede ser eliminado cuando el tejido de la planta que contiene la proteína recombinante se utiliza como alimento (en el caso de vacunas comestibles). En cuarto lugar, se puede dirigir a las proteínas recombinantes a determinados compartimentos intracelulares o expresarlos directamente en tales compartimentos. Finalmente, los riesgos a la salud que se presentan por posible contaminación con patógenos humanos son mínimos.

El uso de virus de plantas como transporte de antígenos ha tenido mucho interés en los últimos años aunque empezaron a utilizarse en 1993, cuando un antígeno de fiebre aftosa (FA) fue expresado en la superficie de CPMV (cowpea mosaic virus) (Usha et al., 1993). Los virus de plantas quiméricos fueron efectivamente probados como transporte de proteínas para antígenos en 1994 luego de que ratones produjeran una respuesta inmune contra partículas de CPMV quiméricas purificadas expresando antígenos derivados de rinovirus humano 14 (HRV-14) y HIV-1. Además se verificaron numerosos ensayos sobre virus de plantas como una alternativa efectiva para la expresión de antígenos, entre los cuales se utilizaron antígenos de HIV-1, de la zona pelúcida de ratón y a partir de virus de la rabia y en todos los ratones inyectados se produjo producción de anticuerpos en forma eficiente (Walmsley AM y Arntzen C, 2000). Más recientemente, se expresó en forma soluble el antígeno VP1 de aftosa utilizando el virus del mosaico del tabaco (TMV) como vector viral. Los extractos de plantas infectadas con el TMV-VP1 indujeron una respuesta inmune protectora en ratones (Wigdorovitz A et al., 1999).

5. Virus X de la papa (PVX)

El PVX es el miembro tipo del grupo de los Potexvirus. Cada virión contiene una molécula de ARN genómico de simple cadena, de polaridad positiva. La cápside viral está compuesta por monómeros de una única proteína, dispuestos en un arreglo helicoidal.

El ARN genómico del virus tiene 6435 nucleótidos y posee 5 marcos de lectura abiertos (ORFs: Open Reading Frame) organizados en un patrón altamente conservado. Los ORFs se numeran de 1 a 5 en dirección 5'-3' y codifican polipéptidos de 166 (ORF1), 24 (ORF2), 12 (ORF3), 8 (ORF4) y 25 kDa (ORF5), respectivamente (Figura 1). El producto del ORF 1 (comúnmente denominado "replicasa viral") juega un papel multifuncional en el proceso de replicación del virus y el ORF5 codifica la proteína de la cápside viral. Los ORFs 2, 3 y 4 comprendidos en el denominado TB (triple bloque viral) codifican proteínas involucradas en el movimiento viral y tienen la característica de hallarse parcialmente superpuestos. El virus es transmitido por inoculación mecánica y por contacto entre plantas pero no ocurre lo mismo a través de semillas o polen. Las infecciones de los potexvirus inducen la formación de mosaicos, moteado, manchas en forma de anillos y necrosis. También se ha observado clareamiento y bandeo de nervaduras. Los síntomas que produce PVX en papa y tabaco varían desde una completa latencia hasta un bandeo necrótico severo de acuerdo con la cepa viral, el genotipo y el estado fisiológico del hospedador.

En nuestro laboratorio (Laboratorio de Virología Vegetal y Biotecnología-INGEBI) se ha efectuado la secuenciación completa del gARN de la cepa CP de PVX (Orman et al., 1990). El PVX-CP es un aislamiento obtenido en el Centro Internacional de la Papa (Lima, Perú) que se encuentra presente sólo en la región sudamericana.

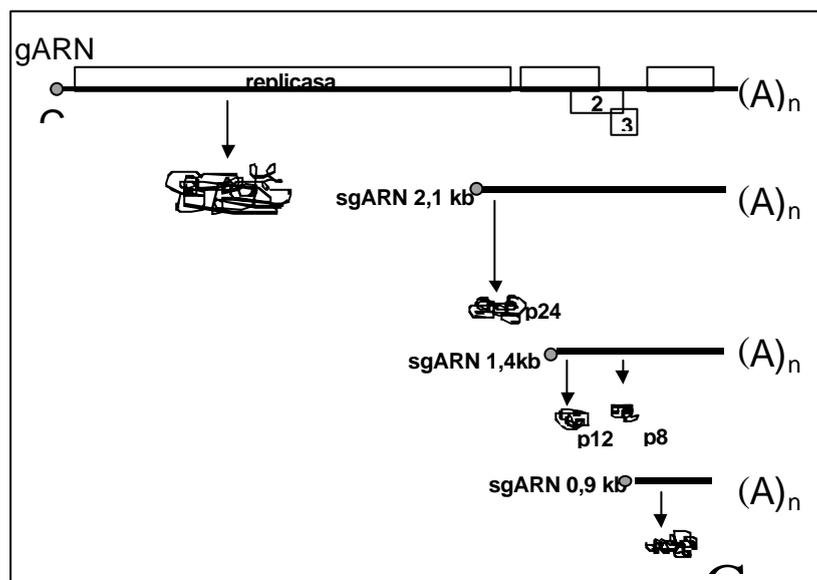


Figura 1. Esquema de organización genómica de PVX y de su estrategia de expresión génica.

6. Vectores virales: características generales

La expresión de genes foráneos en plantas puede obtenerse a partir de secuencias de ADN integrados al genoma de la planta (plantas transgénicas) o a partir de segmentos de ADN extracromosomal (vectores de expresión transitoria).

La producción de plantas transgénicas requiere de un largo período de cultivo de tejidos y de selección de líneas de transgénicas, en cambio, los vectores de expresión transitoria son simples, no poseen limitaciones de los sistemas transgénicos y pueden ser utilizados para un análisis rápido de la función de un determinado gen *in vivo*. Además, la expresión de genes heterólogos puede ser inducida en una etapa de desarrollo avanzado, lo cual evita cualquier efecto negativo que pueda surgir en el desarrollo de la planta y puede optimizar el rendimiento del producto deseado (Scholthof H, 1996).

Las ventajas de los sistemas de expresión basados en vectores virales de plantas son varias:

- * seguridad: los virus vegetales no son infectivos para mamíferos.
- * termoestabilidad: no es necesario mantener una cadena de frío.
- * económicos: evitan el trabajo en esterilidad y los costos que representa la producción utilizando cultivos celulares.
- * alta producción: mayores niveles de expresión comparados con los obtenidos a nivel nuclear, además en general los antígenos se expresan como fusiones a las proteínas de cápside (CP). La CP es la proteína viral más abundante alcanzando valores de hasta 2 g/kg de tejido vegetal.
- * fácil purificación y almacenamiento de los viriones quiméricos.
- * requerimientos mínimos de tiempo para ensayar nuevas construcciones utilizando manipulaciones sencillas de ingeniería genética como ser clonado de vectores, amplificación en bacterias e inoculación mecánica de plantas.

El éxito depende principalmente de la elección del antígeno y del conocimiento detallado de la proteína de la cápside del virus determinándose en qué sitios es posible insertar los péptidos para que queden posicionados correctamente sin interferir con la formación de los viriones (Featherson C, 1996). Las desventajas que presenta la utilización de vectores virales lo constituyen la inestabilidad genética de las secuencias foráneas introducidas y la inducción de síntomas en la planta hospedadora.

En nuestro laboratorio, se obtuvo una versión infectiva de PVX (Figura 2) dentro de un vector de la serie BlueScript en la cual la transcripción del genoma viral se encuentra bajo el promotor T7 (pPVX3, Calamante G, 1998). El vector viral infectivo pPVX3 se denominará en este trabajo como pBT7PVX.

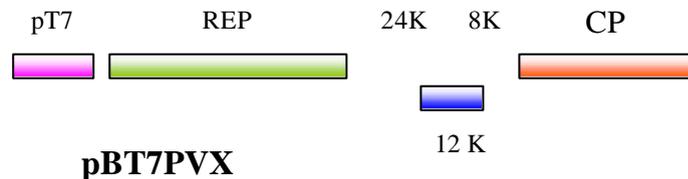


Figura 2. Vector viral infectivo derivado de PVX. pT7: promotor fago T7; REP: replicasa; CP: cápside; 24K, 12 K, 8K: proteínas del triple bloque.

Dentro de un proyecto de colaboración INGEBI-INTA, se diseñó un sistema de presentación de antígenos foráneos en la superficie de PVX. De esta manera se obtuvo un vector viral en el cual el péptido 2a (proteasa autoclivable de 16 aminoácidos) del virus de la FA se expresó como una fusión traduccional al amino-terminal del antígeno y al carboxi-terminal de la cápside (Figura 3), similar al modelo propuesto por Santa Cruz (Santa Cruz et al., 1998). Para la obtención de un virus quimérico capaz de ensamblar su cápside con CP fusionadas se requiere la presencia de CP libre en la célula. Esta proteasa requiere para su activación la presencia de un residuo prolina posterior a su secuencia. Dado que este contexto se encuentra modificado en la fusión CP-2a-antígeno la eficiencia de clivaje disminuye en aproximadamente un 80% permitiendo la expresión a partir del virus quimérico tanto de CP libre como de CP-2a-antígeno y 2a-antígeno.

En el Instituto de Biotecnología del CICVyA-INTA (Castelar) se han caracterizado ampliamente dos antígenos que corresponden al sitio A de la proteína VP1 y la poliproteína P1 (VP1, VP2, VP3 y VP4) del virus de la fiebre aftosa. La respuesta inmune inducida por estos antígenos ha sido estudiada extensivamente tanto en el modelo murino (Berinstein et al., 1991) como bovinos, el huésped natural más importante (Samuel AR, 2000). Además, estos polipéptidos han sido expresados como proteínas de fusión en bacterias y baculovirus (Giavedoni et al., 1991; Tami et al., 1996) y en plantas transgénicas.

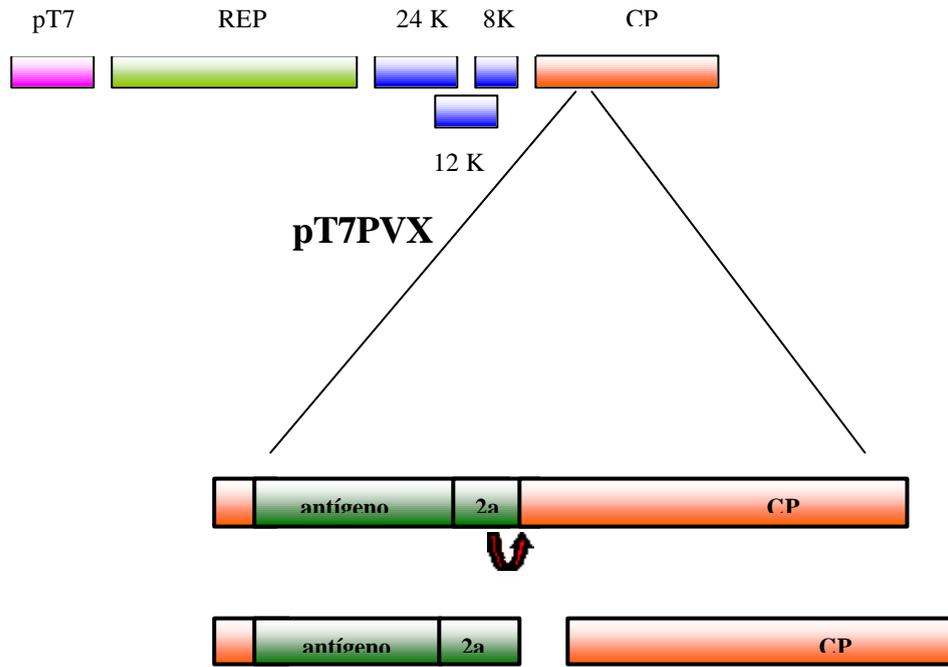


Figura 3. Construcción del vector viral infectivo conteniendo la proteína autoclivable 2a.

En una primera etapa de la colaboración, las secuencias correspondientes al sitio antigénico A del virus de la FA se subclonaron en el plásmido intermediario, como fusión a 2a-CP. Esta construcción fue posteriormente introducida dentro del clon de copia completa de PVX. Las mismas construcciones fueron llevadas a cabo con los antígenos VP1 y P1 obteniéndose los vectores pPVX2aA, pPVX2aVP1 y pPVX2aP1 (Figura 4). Los vectores virales fueron ensayados por infección de plantas con ARN viral obtenido por transcripción in vitro. De esta manera se obtuvo un PVX que expresaba el sitio antigénico A en su superficie (Calamante G, 1999).

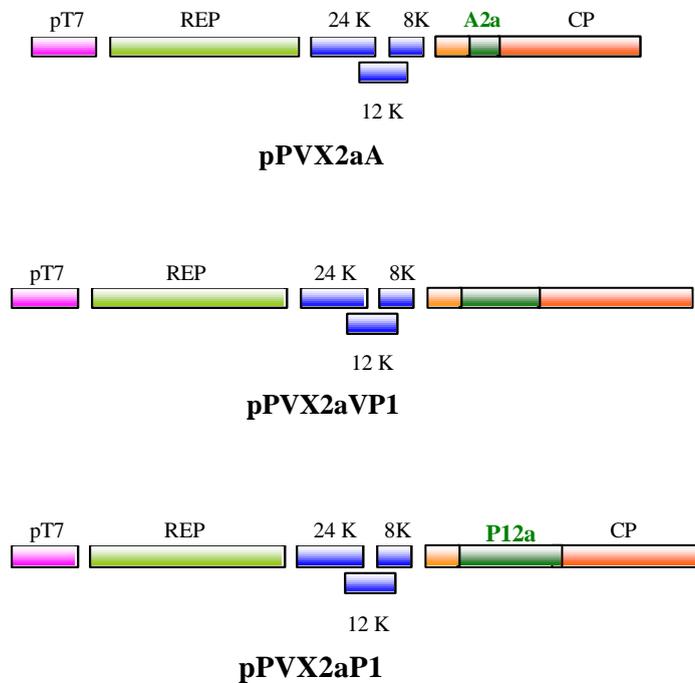


Figura 4. Vectores virales conteniendo los antígenos de aftosa. Todos los antígenos fueron insertados en un sitio BamHI en la posición 5683 del PVX dentro de la cápside. Cada antígeno está unido a la secuencia 2a correspondiente a la proteasa autoclivable la cual libera al antígeno en el momento de la replicación dentro de la célula de la planta. A: en esta versión se insertó la secuencia de la poliproteína de aftosa P1 de 64kDa (aprox. 2200nt); B: se insertó el antígeno VP1 de 22kDa (aprox. 800nt); C: se insertó la secuencia correspondiente al antígeno A de 6 kDa (aprox. 200 nt). (Calamante G., 1999).

7. Amplicones virales

Se define como amplicón viral a la construcción genética en la cual el transgen que es expresado bajo un promotor vegetal (por ej: 35S de CaMV) consiste en una copia infectiva de ADN del genoma viral (Figura 5). La secuencia del gen que se desea expresar puede ser insertada dentro del genoma viral. La expresión transgénica del amplicón es iniciada por el promotor 35S CaMV siguiendo la vía normal. Luego, el ARN mensajero es transportado del núcleo al citoplasma donde es traducido expresando la replicasa viral. La replicasa viral reconoce entonces al mRNA como la copia infectiva del virus y comienza el paso de amplificación del ARN por sucesivos ciclos de replicación del virus observándose niveles superiores de expresión comparados con los niveles obtenidos por las técnicas convencionales de expresión transgénica (Figura 6).

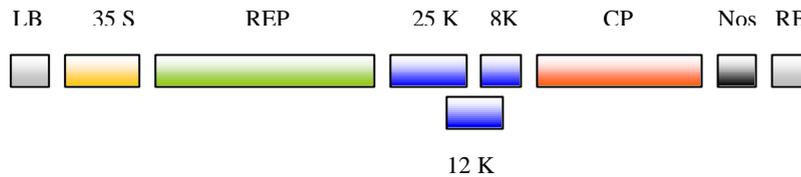


Figura 5. Amplicón viral basado en PVX.

El uso de amplicones virales surge como una alternativa que combina las estrategias de los sistemas integrativos y no integrativos de expresión de un transgen en plantas. Este tipo de sistemas permite combinar el alto nivel de expresión asociado a la amplificación viral con la fidelidad transcripcional propia de la expresión nuclear. Esta estrategia eliminaría también la necesidad de realizar inoculaciones masivas necesarias y disminuiría los costos de la producción de ARN viral in vitro, desventajas que presenta el uso de vectores virales infectivos, ya que con los amplicones es posible obtener plantas transgénicas que expresan el virus integrado al genoma de la planta. En el caso de virus ARN, esta estrategia es particularmente conveniente, pues contribuye a minimizar los errores originados en la transcripción ARN dependiente y ya ha sido implementada con éxito para algunos virus con genoma dividido.

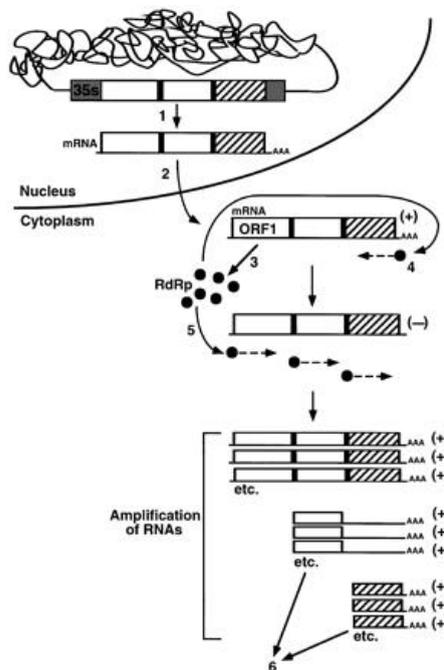


Figura 6. Expresión de amplicones de PVX. Representación esquemática del inicio del ciclo de replicación de PVX a partir de la expresión del amplicón. RdPp: replicasa, en rayado se indica el gen de interés (Angell SM, 1997).

De acuerdo a los alentadores resultados y basándonos en las ventajas y desventajas de la expresión en vectores virales se propone en este trabajo desarrollar una estrategia de producción de amplicones que expresen los antígenos de FA fusionados a la cápside viral. El propósito es trabajar con los 3 péptidos correspondientes a la región inmunogénica del virus de la fiebre aftosa: P1 (64 kDa) precursora de VP1 y VP4; VP1 (22 kDa) proteína estructural y A (6 kDa) sitio antigénico inmunodominante que contiene motivos altamente conservados involucrados en el reconocimiento del receptor celular. En el sistema de expresión elegido se construirán versiones que permitan expresar dichos péptidos como proteínas de fusión a la cápside viral produciendo amplicones virales donde el gen foráneo estará flanqueado por secuencias derivadas de PVX. En los vectores pT7PVX, pBPVX y pGPVX el gen foráneo es expresado a partir del promotor subgenómico (Psg) de la cápside viral y la proteína expresada es una proteína de fusión amino-terminal con la CP.

Inicialmente el sistema de expresión es no integrativo ya que sólo se utilizará el PVX como vector y no como amplicón viral integrable al genoma nuclear de la planta. Se evaluará la capacidad de replicación de los virus quiméricos por agroinfiltración en plantas de tabaco como paso previo a la obtención de plantas transgénicas.

Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo consiste en el desarrollo y evaluación de amplicones virales que expresen antígenos específicos del virus de la fiebre aftosa utilizando el virus PVX como vector de expresión en plantas.

Objetivos secundarios.

1. Obtención de los PVX quiméricos que expresen los antígenos A, VP1 y P1 en su superficie como proteínas de fusión a la cápside.
2. Evaluación de la capacidad replicativa de los amplicones virales quiméricos por ensayos de agroinfiltración y Western blot.
3. Determinación del tamaño mínimo del gen foráneo que es capaz de ser replicado por el virus.
4. Puesta a punto de la técnica de transformación de protoplastos de la línea celular de tabaco BY-2 como una alternativa rápida y no costosa para la evaluación de la replicación de amplicones quiméricos.

Resultados

1. Obtención de los amplicones virales que expresan los antígenos del virus de aftosa en fusión con la cápside viral.

Uno de los objetivos de la tesis fue determinar el tamaño mínimo del gen foráneo que puede ser replicado por el virus a través de la expresión transitoria en plantas de tabaco. Con tal fin, se desarrollaron amplicones virales derivados de PVX que expresan en su superficie antígenos de FA de diferentes tamaños como proteínas de fusión de la cápside viral.

1a. Subclonado de los genomas virales conteniendo los antígenos de aftosa en el vector pBPVX.

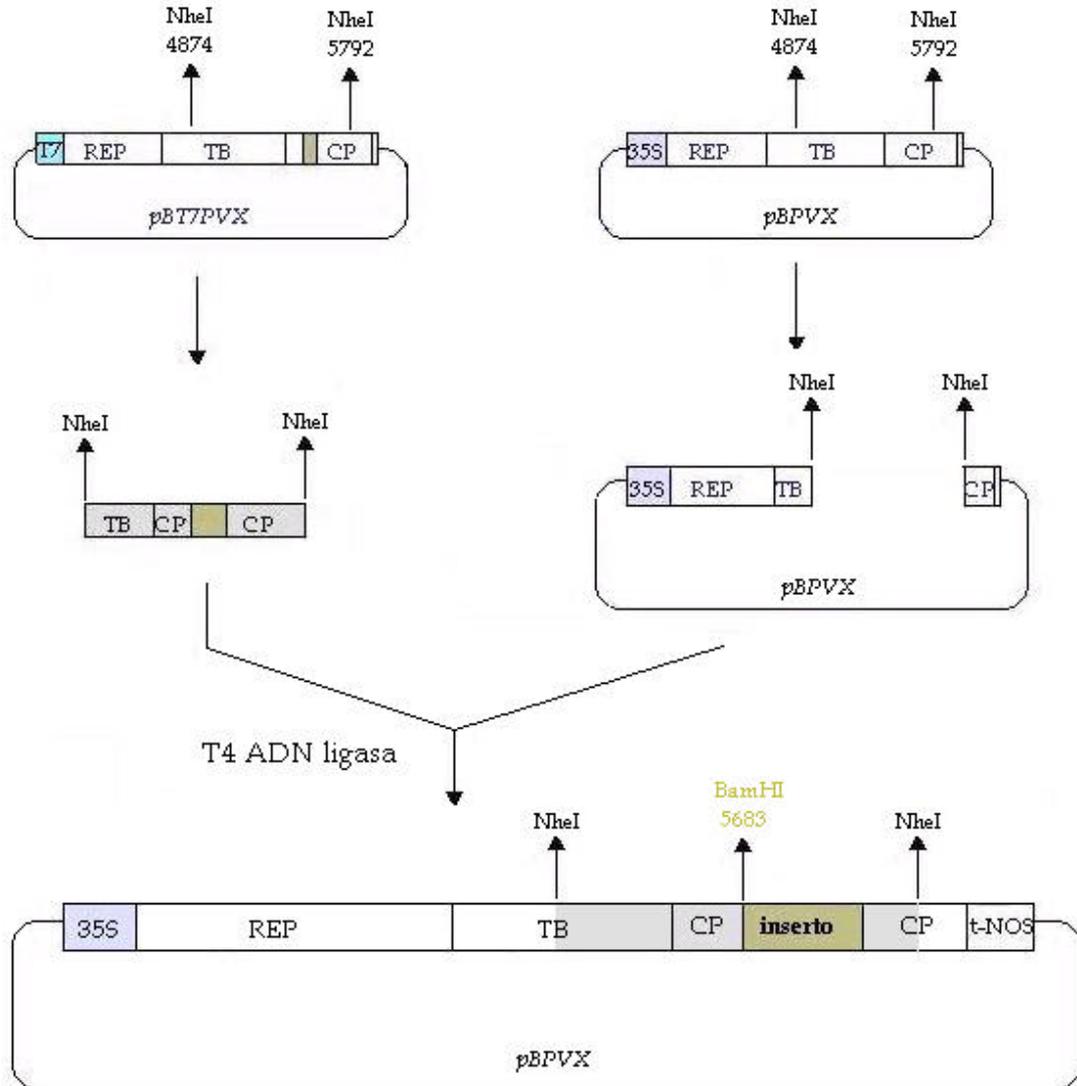
Para el clonado de los amplicones virales que expresen los antígenos de FA se partió de los vectores virales quiméricos previamente obtenidos en el Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar. (figura 4, Introducción). Dichos vectores virales quiméricos expresan el genoma de PVX a partir del promotor T7 (pT7PVX2aA, pT7PVX2aVP1 y pT7PVX2aP1). En dichas copias, los antígenos de aftosa (A, VP1 y P1, respectivamente) fueron insertados dentro del sitio BamHI en la posición 5683 del genoma de PVX de manera de quedar fusionados con la cápside viral. Entre la secuencia del antígeno y de la cápside se encuentra insertada la secuencia de la proteasa 2a del virus de aftosa, que como ya se explicó tiene la capacidad de autoproteolizarse (figura 4, Introducción).

Se subclonó el fragmento de restricción de NheI de los vectores virales quiméricos en el amplicón viral pBPVX digerido con la misma enzima. De esta manera se obtuvieron amplicones virales quiméricos que se expresan a partir del promotor 35S de CaMV y que contienen los antígenos de aftosa fusionados a la cápside bajo la regulación de proteasa 2a (pBPVX2aA, pBPVX2aVP1 y pBPVX2aP1) (figura 1a, panel A). El primer paso consistió en la obtención de los insertos NheI obtenidos a partir de la digestión de los vectores pT7PVX2aA, pT7PVX2aVP1 y pT7PVX2aP1 (figura 1a, panel B) y en la preparación del vector pBPVX por digestión con NheI y consecuente desfosforilación.

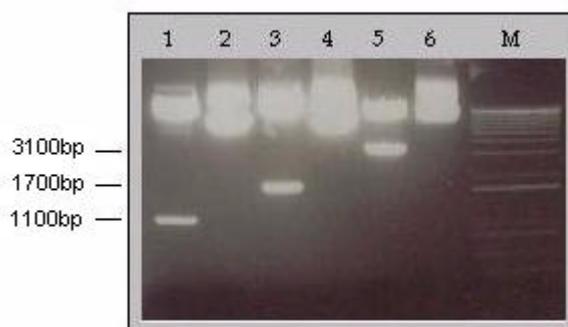
Luego de la reacción de ligación, se transformaron bacterias E.coli DH10B por electroporación y se plaquearon en medio LB conteniendo ampicilina. A partir de las colonias obtenidas se preparó ADN plasmídico y se analizó por restricción con la enzima BamHI para P1

y VP1 y con HindIII para A. Ambas enzimas tienen sitios de corte dentro de la secuencia de PVX y no poseen sitios dentro del vector. Las bandas esperadas para la digestión con BamHI son de: 800bp (correspondiente al antígeno), 1660bp, 2723bp y > 6000bp para el caso de VP1 y de 1660 bp, 2200bp (antígeno), 2723bp y > 6000bp para P1. Para la digestión con HindIII las bandas esperadas son: 1100bp (indica corte dentro de la secuencia de A), 1500bp, y >6000bp. De los tres experimentos realizados se analizaron 10 colonias de las cuales 7 resultaron positivas para VP1 y A. En el caso de P1, 5 colonias mostraron tener el inserto correspondiente. En la figura 1a, panel C se muestran los resultados obtenidos para un experimento.

A)



B)



C)

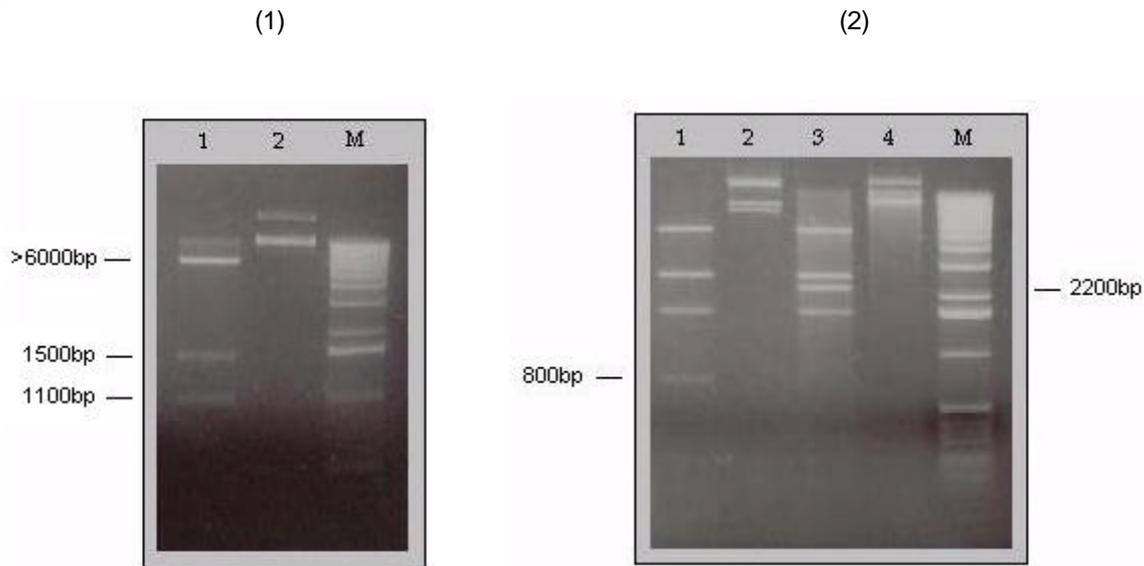
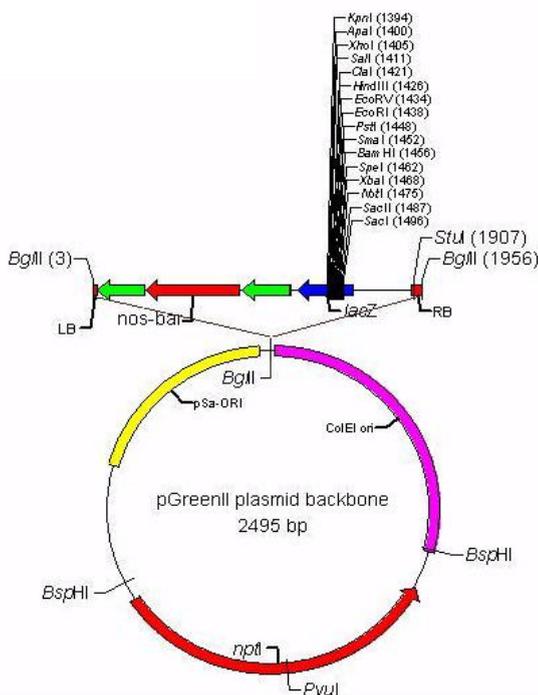


Figura 1a. Subclonado de los antígenos de FA en el amplicón viral pBPVX. A) Estrategia de subclonado en el vector pBPVX. REP: replicasa, TB: triple bloque, CP: cápside B) Digestión de los clones pBT7PVX con la enzima NheI. pBT7PVX2aA cortado (1), sin cortar (2); pBT7PVX2aVP1 cortado (3), sin cortar (4); pBT7PVX2aP1 cortado (5), sin cortar (6); M: marcador de peso molecular 1kb Ladder. C) Chequeo de las transformantes. C(1): pBPVX2aA cortado con HindIII (1), sin cortar (2). C(2): Digestión con BamHI: pBPVX2aVP1 cortado (1), sin cortar (2); pBPVXP1 cortado (3), sin cortar (4). Todos los fragmentos de restricción se analizaron en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

1b. Clonado de los amplicones virales quiméricos en el vector binario pGreen base.

Con el propósito de obtener amplicones quiméricos que puedan ser replicados y expresados en plantas, los amplicones virales pBPVX2aA, pBPVX2aVP1 y pBPVX2aP1 fueron subclonados en el vector binario pGreen el cual posee dos orígenes de replicación: uno para E.coli, organismo donde la manipulación genética es más sencilla y otro para Agrobacterium, posibilitando la infección de plantas. En este vector el gen de la replicasa RepA (necesario para la replicación del plásmido) se encuentra deletado de manera de generar un plásmido de tamaño más reducido para facilitar los clonados. El nuevo vector denominado pGreen base, necesita como complemento en la transformación de células de Agrobacterium, la co-transformación con el plásmido pSoup el cual aporta el gen RepA en trans (figura 1b).

Para el clonado, los amplicones virales fueron digeridos con la enzima KpnI y subclonados en el vector pGreen base previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. Se transformaron bacterias E.coli DH10B y se plaquearon en medio LB con kanamicina como agente de selección. En todas las placas se obtuvieron un alto número de colonias y ninguna en el control de la ligación, analizándose 5 colonias para cada una de las construcciones resultando todas positivas (figura 1c). De esta manera se obtuvieron los amplicones quiméricos pGPVX2aA, pGPVX2aVP1 y pGPVX2aP1.



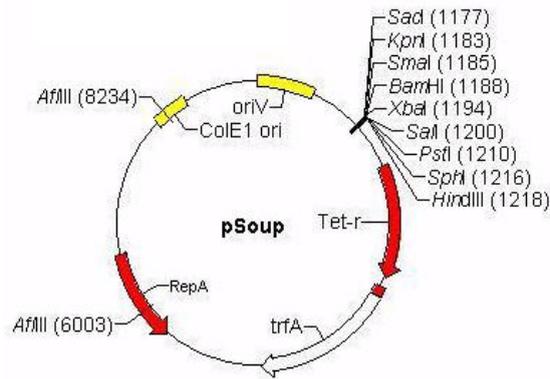
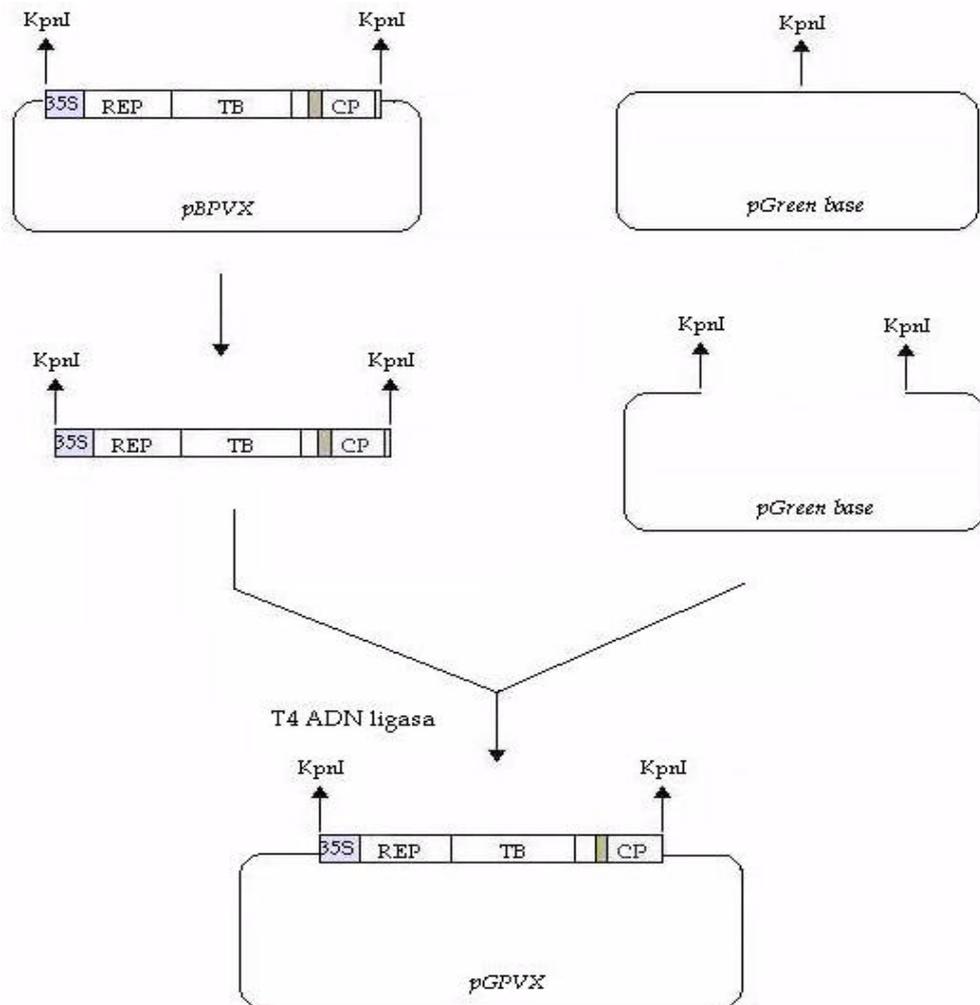


Figura 1b. Vector binario pGreen y vector pSoup.

A)



B)

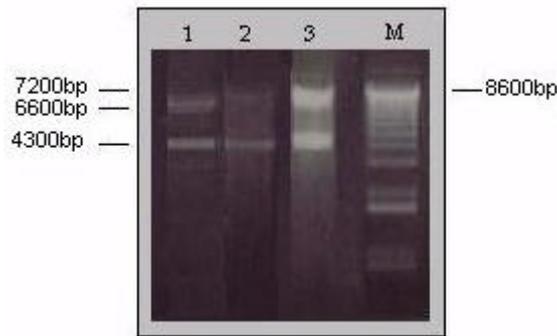


Figura 1c. Clonado de los amplicones quiméricos en el vector binario pGreen. A) Estrategia de clonado en el vector pGreen base. B) Chequeo de las transformantes con la enzima KpnI. En todos los casos se observan dos bandas correspondientes a pGreen (4300bp) y PVX quimérico (>6000 bp): pGPVX2aA (1), pGPVX2aVP1 (2), pGPVX2aP1 (3), M: marcador de peso molecular 1 kb Ladder.

2. Análisis de la expresión de los amplicones virales en plantas de tabaco.

2a. Obtención de cepas transformantes de *Agrobacterium tumefaciens* que expresen los amplicones virales.

Debido a que la agroinfiltración fue el método utilizado para determinar la expresión transitoria de los amplicones, resultó necesario transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores quiméricos.

Se utilizó la técnica de electroporación para transformar las células de *A.tumefaciens*, según se describe en Materiales y Métodos. La cepa utilizada GV3101 posee resistencia a los antibióticos rifampicina y gentamicina. Debido a que el plásmido pGreen tiene delecionada una porción de su genoma que corresponde a las proteínas de la replicación, se debió co-transformar con el plásmido pSoup portador de la secuencia necesaria para la replicación de pGreen. En este caso pGreen posee resistencia al antibiótico kanamicina y pSoup a tetraciclina, por lo tanto las transformaciones debieron ser chequeadas en placas de LB conteniendo los cuatro antibióticos. En todas las placas se observaron de 4 a 8 colonias las cuales fueron verificadas por PCR.

Como se observa en la figura 2a todos los segmentos amplificados corresponden a una porción dentro PVX de aproximadamente 700bp a los que se le suma en los distintos casos el tamaño del antígeno fusionado, correspondiendo para el antígeno A una banda amplificada de 900bp, para VP1 de 1700bp y para P1 de 3900bp respectivamente.

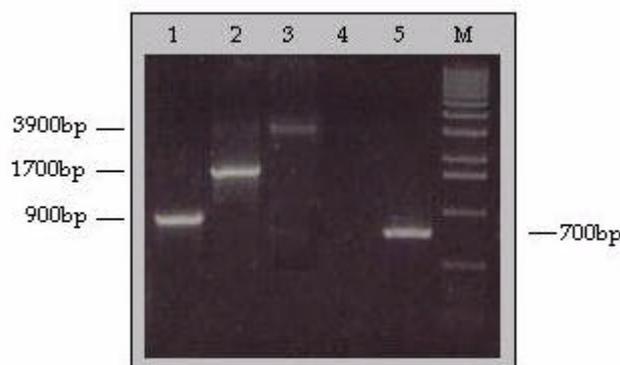


Figura 2a. Determinación de la presencia de los amplicones virales en la cepa GV3101 por PCR. Los fragmentos de PCR fueron analizados en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio: pGPVX2aA (1), pGPVX2aVP1 (2), pGPVX2aP1 (3), GV3101 como control negativo (4), pGPVX como control positivo (5).

2b. Agroinfiltración de hojas de *Nicotiana tabacum* cv. *samsun*

Luego de chequear que la transformación de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* fue positiva, las colonias transformantes fueron crecidas en medio LB en presencia de los antibióticos correspondientes durante toda la noche a 28°C. A partir de estos cultivos se reinocularon medios LB conteniendo los siguientes componentes: sacarosa 0,5%, MgSO₄ 2mM, MES pH 5,6 10mM y acetosiringona 2mM y se dejaron crecer toda la noche. Los cultivos fueron resuspendidos en MMA y acetosiringona 200mM hasta una DO₆₀₀ = 2, y se inocularon hojas de plantas jóvenes con jeringas de 1ml sin aguja. En todos los casos la agroinfiltración se realizó en el segundo par de hojas de cada planta y en cuatro puntos distantes dentro de la hoja. Se realizaron dos controles negativos: en el primero se inoculó con agua y en el otro con la cepa GV3101 de *Agrobacterium*. El control positivo se realizó inoculando hojas con la construcción pGPVX. Las mismas construcciones fueron analizadas por agroinfiltración en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Entre los 5-7 días post-inoculación (dpi) se pudo observar la presencia de síntomas en las hojas inoculadas del control positivo (pGPVX), los cuales a través de los días fueron propagándose a las hojas nuevas estableciendo una infección sistémica. En el caso de las plantas agroinfiltradas con los amplicones virales los primeros síntomas aparecieron en las hojas inoculadas con pGPVX2aA (10-12 dpi) y para los amplicones pGPVX2aVP1 y pGPVX2aP1 los síntomas aparecieron en forma más tardía (15-17 dpi). Los controles de plantas inoculadas con agua o GV3101 nunca presentaron síntomas. En todos los casos los síntomas se presentaron inicialmente como un clareamiento de las nervaduras y posterior formación de anillos amarillentos. A pesar que todos los amplicones quiméricos fueron capaces de establecer una infección sistémica ésta nunca fue tan severa que matara a la planta. Comparadas con las plantas controles las plantas infectadas demoraron su crecimiento como consecuencia de la infección viral (Figura 2b).

A)

A) Planta agroinfiltrada



B) Planta control



B)

h. inoculada

h. control

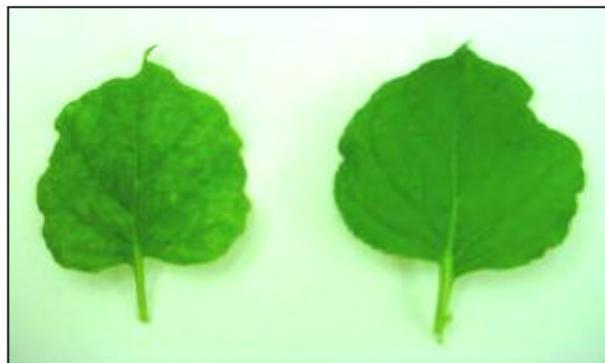


Figura 2b. Observación de síntomas de infección viral en plantas *N. benthamiana*. A) Comparación de plantas infectada y no infectada. Planta control donde no aparecieron síntomas y de crecimiento normal (A). Se observa la presencia de síntomas en hojas de *N. benthamiana* luego de 30 días post-infección B) Comparación de hojas de plantas infectada y no infectada observar las diferencias en tamaño y la presencia de anillos amarillentos.

2c. Análisis por Western blot de la expresión de los antígenos fusionados a la cápside viral.

En todas las plantas se tomaron muestras (2 discos de hoja) a los 5 dpi en las hojas inoculadas y a los 15 dpi en hojas superiores para analizarlas por Western blot con los anticuerpos específicos. Todas las muestras se homogeneizaron en buffer de siembra para proteínas y se calentaron a 100°C durante 5 min para desnaturalizar todas las proteínas; luego se sembraron en geles de poliacrilamida 12%.

Para detectar la presencia de PVX se utilizó un anticuerpo policlonal levantado contra virus purificado que reconoce específicamente la CP de PVX. Para detectar la presencia de los antígenos de FA se utilizó un anticuerpo monoclonal levantado contra el antígeno A. La presencia de la proteasa 2a en el amplicón permitirá la observación de: CP libre, CP fusionado al antígeno y el antígeno libre unido a la proteasa.



Figura 2c: Análisis por Western blot de la expresión de los amplicones quiméricos en planta de *N. benthamiana*. Se extrajeron 2 discos de hojas superiores de cada planta agroinfiltrada con los distintos amplicones, se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se realizó un Western blot como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizó un anticuerpo anti-CP de PVX y otro anti-A de FA. En todos los casos se sembraron 15 ml de muestra. A) Revelado anti-CP: pGPVX (1), pGPVX2aA (2), pGPVX2aVP1 (3), pGPVX2aP1 (4), GV3101 (5), M: Marcador de peso molecular para proteínas. B). Revelado anti-A de las mismas muestras analizadas con anti-CP.

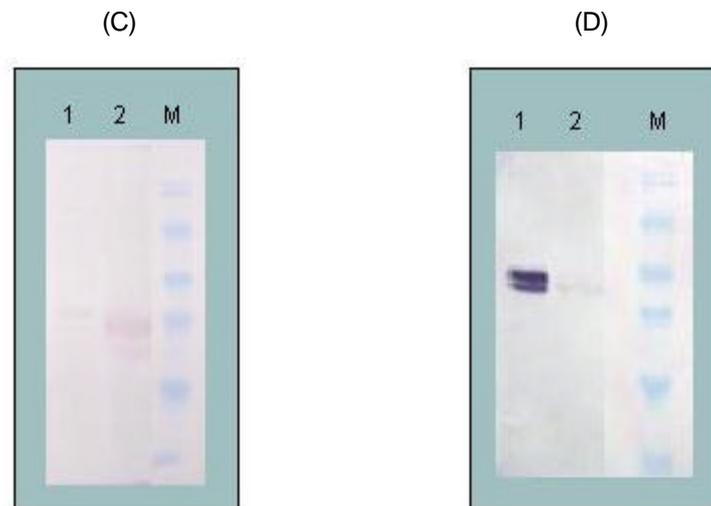


Figura 2d. Comparación de la expresión temporal en hojas inoculadas de plantas infectadas con el amplicón pGPVX-VP1. 1) hoja inoculada 10 dpi 2) hoja inoculada 20 dpi. Revelado anti-CP (C), revelado anti-A (D).

A través del análisis de Western blot con los anticuerpos anti-CP y anti-A pudimos determinar que los 3 amplicones quiméricos fueron capaces de producir CP libre, sin embargo sólo los amplicones conteniendo A y VP1 fueron capaces de expresar la CP fusionada a los antígenos correspondientes. Como se puede ver en la figura 2b, el anticuerpo anti-CP revela 2 bandas proteicas principales de aproximadamente 28 kDa tanto en el control de plantas inoculadas con pGPVX como en las plantas inoculadas con los amplicones

quiméricos. En los controles negativos estas bandas no fueron observadas lo que confirma la especificidad del reconocimiento inmunológico. Actualmente se sabe que la CP de PVX es fosforilada in vivo por lo tanto las 2 bandas podrían corresponder a diferentes isoformas de fosforilación de CP. En el caso de la detección con anti-A observamos que tanto las plantas inoculadas con el amplicón pGPVX2aA como el pGPVX2aVP1 muestran la presencia de 1 o 2 bandas de aproximadamente 48-51 kDa que corresponderían a la CP fusionada a los antígenos correspondientes. En el caso del amplicón pGPVX2aP1 nunca se observó en la plantas infectadas reacción inmunológica contra el anticuerpo anti-A. Sin embargo cuando el anticuerpo anti-CP fue utilizado se detectaron siempre dos bandas proteicas y una tercera levemente mayor. Las dos bandas podrían corresponder a la CP libre y la tercera a una CP fusionada a una pequeña parte de P1 la cual correspondería a una región que no posee el sitio antigénico A y por lo tanto no sería reconocida inmunológicamente por el anticuerpo anti-A.

El modelo de expresión con la proteasa 2a predice que una muy baja proporción de las CP expresadas quedará fusionada a los antígenos, por lo tanto la CP libre siempre se encuentra en exceso con respecto a la CP fusionada. En el caso de los amplicones A y VP1 la observación de CP fusionada con el anticuerpo anti-CP fue muy dificultosa debido a por un lado la cantidad de CP fusionada es mucho menor que la de la CP libre y por el otro el anticuerpo comercial es altamente específico pero muy poco sensible ya que ha sido levantado contra otra cepa de PVX. Aún así en algunos de los experimentos fue posibles observar la presencia de CP fusionada con anti-CP.

El efecto de la acción de la proteasa 2a se observa claramente en la figura 2c. En dicha figura se muestra la expresión de un amplicón pGPVX2aVP1 a distintos tiempos post-inoculación. A los 10 post-inoculación se pueden observar dos intensas bandas proteicas que reaccionan con el anticuerpo anti-A. Dichas bandas corresponden a CP fusionada sin embargo la misma muestra proteica prácticamente no muestra reacción al anticuerpo anti-CP, indicando que la presencia de CP libre es muy baja. Las muestras tomadas a partir de la misma planta a los 20 días post-inoculación muestran la presencia de CP libre y una marcada disminución en la cantidad de CP fusionada.

Los resultados presentados en las figuras 2c y 2d corresponden a infecciones de plantas *N. benthamiana*, resultados similares se obtuvieron con plantas *N. cv samsun*.

La estabilidad y viabilidad de los amplicones quiméricos A y VP1 fue confirmada por sucesivas reinoculaciones de plantas de tabaco con virus quiméricos obtenidos de plantas agroinfiltradas. Se llevaron a cabo 3 pasajes sucesivos por reinoculación de virus aislados de plantas infectadas y en todos los casos se observó que los viriones mantenían la capacidad de expresar CP fusionada a los antígenos.

3. Análisis de la expresión transitoria de los amplicones quiméricos en protoplastos de tabaco.

3a. Puesta a punto de la técnica de transformación de protoplastos por electroporación y por PEG utilizando GFP como gen reportero.

A partir de una suspensión de la línea celular BY-2 de tabaco se prepararon protoplastos por degradación de la pared celular con enzimas líticas. Luego de este tratamiento y previo a la transformación se determinó el número de protoplastos viables que resultó ser de un 95 a 100% y se ajustó la concentración de la muestra 1×10^6 células/ml. En la figura 4a se puede observar la morfología de las células antes y después del procedimiento de protoplastización.

Se evaluaron dos métodos de transformación: electroporación y transformación con polietilenglicol (PEG). En ambos casos el gen reportero utilizado fue el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein). Se llevaron a cabo 4 experimentos independientes para cada método, en la tabla 1 se presentan los datos obtenidos a partir de un experimento representativo. Como se puede observar en el caso de la electroporación la cantidad de protoplastos viables luego del pulso eléctrico fue alta (50%) sin embargo la eficiencia de transformación de estos protoplastos viables fue muy baja (2%). Por el contrario la transformación con PEG resultó en una alta mortalidad de los protoplastos sin embargo un alto porcentaje de los mismos (50%) resultó transformado. Por otro lado, los resultados con PEG resultaron más reproducibles. En la figura 4b se muestra una muestra de protoplastos transformados expresando GFP. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió adoptar la técnica de transformación con PEG para evaluar la expresión transitoria de los amplicones quiméricos.

3b. Transformación con PEG de protoplastos con los amplicones quiméricos.

Los experimentos iniciales de transformación de protoplastos con los amplicones quiméricos no dieron resultados positivos. La detección de protoplastos transformados en el caso de los amplicones se lleva a cabo por Western blot que es una técnica mucho menos sensible que la observación de GFP en el microscopio. Por esta razón suponemos que la cantidad total de protoplastos transformados no es suficientemen-

te alta como para detectar la expresión de CP. En principio lo más importante sería aumentar el número de protoplastos viables ya que la eficiencia de transformación del PEG es alta. Particularmente pensamos ensayar con PEG de mayor calidad, dado que la experiencia de otros laboratorios ha determinado que la calidad del PEG utilizado es esencial para la viabilidad de los protoplastos.

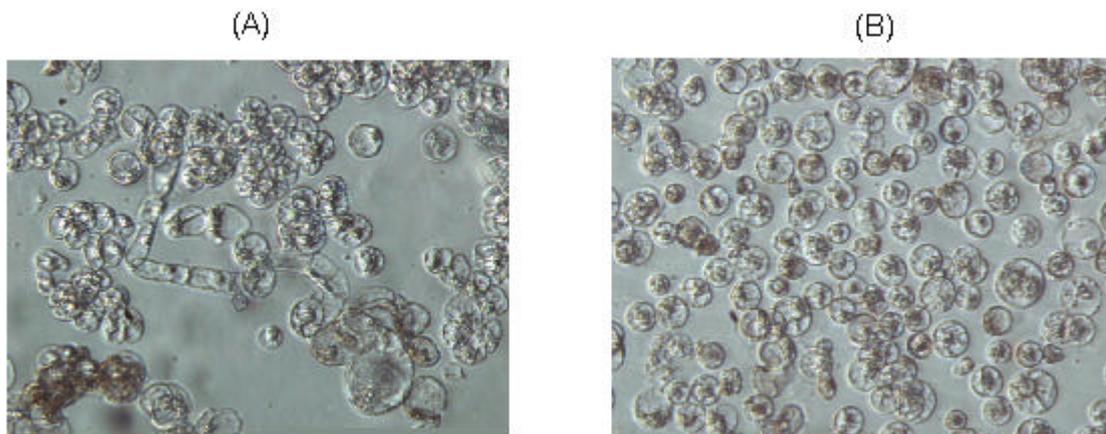


Figura 4a. Morfología de la línea BY-2 antes y después del tratamiento con enzimas líticas. Se partió de un cultivo de 100ml de células de la línea BY-2 de tabaco, se centrifugó y resuspendió en 5ml de la mezcla de enzimas (0.01% celulasa y 0.001 % pectoliasa) y se dejó en agitación 2 h para degradar la pared celular. Los protoplastos se resuspendieron en buffer PIM (para electroporación) o en W5 (para PEG). Línea celular BY-2 antes del tratamiento con enzimas (A). Protoplastos (B).

Tabla 4b. Transformación de protoplastos de BY-2 por electroporación y PEG.

Tipo transformación	Protoplastos totales	P. Viables	P. Transformados	Eficiencia transformación
PEG	1 millón/ml	2×10^5	5×10^4	50%
Electroporación	1 millón/ml	5×10^5	1×10^4	2%

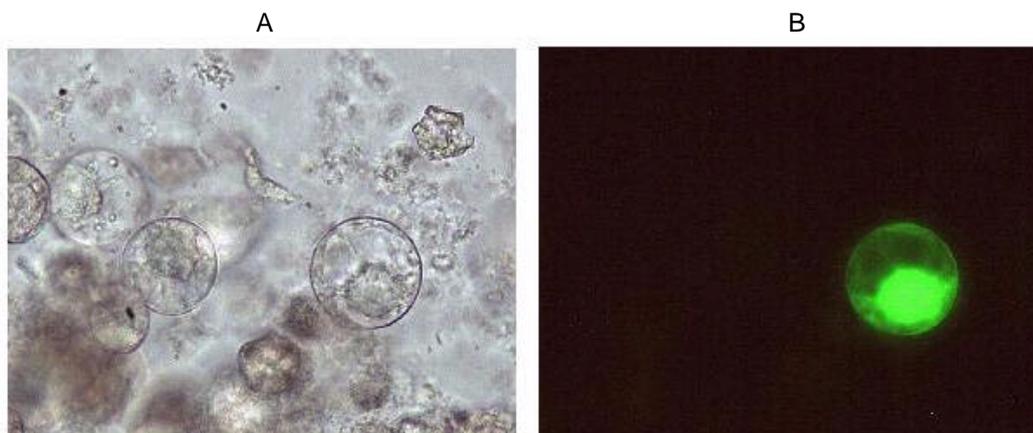


Figura 4c. Chequeo de la transformación de protoplastos, utilizando GFP como gen reportero. Observación de protoplastos luego de la transformación (usando ambas técnicas) en microscopio de luz (A) y en microscopio de fluorescencia (B).

Discusión

En la primera etapa del trabajo se obtuvieron amplicones virales que expresan los antígenos de FA a partir de los vectores virales infectivos desarrollados previamente en el laboratorio. Estos amplicones fueron clonados en un vector binario con el propósito de transformar células de *A. tumefaciens*. Se inocularon mecánicamente hojas de tabaco, y la expresión de la CP de PVX y de los diferentes antígenos de FA se detectó por ensayos de Western blot.

La CP se detectó en las hojas inoculadas con todos los amplicones obtenidos a partir de PVX. En estas plantas también se detectó la expresión de CP en las hojas superiores (infección sistémica) y se observaron los síntomas característicos de PVX (anillos amarillentos y clareamiento de las nervaduras).

La presencia del antígeno de FA fusionado a la cápside viral se detectó en el caso de A y VP1 pero no en P1. Esto puede ser debido al gran tamaño que posee la poliproteína que impediría la replicación del virus. En los experimentos con P1 se observó que la aparición de síntomas era siempre tardía y que la CP que se expresaba era mayoritariamente una proteína con un tamaño ligeramente mayor que la CP del virus normal. Estos resultados sugieren que en el caso del amplicón pGPVX2aP1 podrían ocurrir eventos de recombinación dentro de la secuencia de la CP que darían como resultado un virus capaz de replicarse pero que conserva sólo una pequeña región de la poliproteína P1.

Se demostró que los amplicones pGPVX2aA y pGPVX2aVP1 son capaces de replicarse en plantas de tabaco y que la información genética contenida en los virus quiméricos es estable a través de las sucesivas reinfecciones.

Por otro lado los resultados obtenidos sugieren que el tamaño máximo de un gen foráneo que puede expresar PVX como fusión a la cápside viral es de aproximadamente 800bp, correspondiente al tamaño de VP1.

El sistema de expresión transitoria en plantas de tabaco constituyó una herramienta muy valiosa para el estudio de los amplicones quiméricos en una forma rápida y económica como paso previo a la realización de plantas transgénicas. Sin embargo el método de la agroinfiltración tiene como limitante la cantidad de plantas con las que se pueden contar en un tiempo determinado y el tiempo de crecimiento de la misma. Con el objetivo de desarrollar un sistema de expresión más rápido que nos permitiera realizar ensayos de expresión semanalmente y a mayor escala, se iniciaron los estudios para establecer las condiciones de transformación con ADN de protoplastos por la técnica de electroporación y transformación con polietilenglicol. A pesar de haber obtenido resultados positivos utilizando el gen reportero GFP los experimentos realizados con los amplicones derivados de PVX no dieron resultados satisfactorios. En base a la experiencia de otros laboratorios estamos estudiando los parámetros que podrían afectar la eficiencia de transformación. Están siendo actualmente evaluado en el laboratorio diferentes calidades y grados de polimerización del PEG y la posibilidad del aumento del número de protoplastos transformados por ensayo.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, hemos iniciado la obtención de plantas transgénicas que expresan los péptidos antigénicos A y VP1 del virus de la fiebre aftosa, lo que permitirá la utilización potencial en la producción de vacunas de interés en medicina veterinaria.

Materiales y Métodos

1. Líneas de plantas

Se utilizaron plantas y *Nicotiana Benthamiana* y *Nicotiana tabacum* cv. Sansum.

2. Virus

Se utilizó la cepa infectiva CP2 de PVX (Calamante G, 1998) aislada en el Centro Internacional de la Papa (Lima, Perú).

3. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Escherichia coli: Se utilizó la cepa DH10B. Todos los cultivos se realizaron en medio LB (triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L). En los medios sólidos, se agregó ágar hasta una concentración final de 1,5%. Los antibióticos utilizados fueron los siguientes: ampicilina (100mg/ml), kanamicina (50mg/ml) y tetraciclina (3mg/ml). La temperatura de crecimiento fue de 37°C con una agitación de 200 rpm.

Agrobacterium tumefaciens: se utilizó la cepa GV3101 resistente al antibiótico rifampicina (100mg/ml) que porta el plásmido pMP90RK el cual contiene el gen de resistencia al antibiótico gentamicina (50mg/ml). El crecimiento se realizó en medio LB a una temperatura de 28°C y con una agitación de 150rpm.

4. Métodos de ingeniería genética

Las técnicas de ADN recombinante se efectuaron de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1984). Las enzimas empleadas se compraron a New England Biolabs y se utilizaron según las especificaciones del fabricante.

5. Vectores

Los plásmidos comerciales utilizados fueron: pBlueScript SK+ (Invitrogen), pGreen y pSoup (John Innes Centre, UK). El vector pGreen fue modificado por delección de todos los sitios de restricción presentes en el sitio de clonado múltiple a excepción del sitio para la enzima KpnI. Esta versión modificada se denominó pGreen base (pGB).

La construcción del vector de copia completa e infectiva pPVX3 fue previamente obtenida en nuestro laboratorio por la Dra. Gabriela Calamante (Calamante G., 1998) y en este trabajo se la denominó pT7PVX. Los vectores PVX2aA; pPVX2aVP1 y pPVX2aP1 fueron obtenidos y gentilmente cedidos por los Dres. Calamante G., Tami C. y Taboga O. del Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar.

6. Ligado a vectores

En cada reacción de ligación se utilizaron entre 20 y 100ng de vector. Los volúmenes de reacción fueron de 20ml, utilizando 0,5ml/U de la enzima T4 ADN ligasa y 4 ml de buffer de ligación 5X. Las ligaciones se realizaron durante toda la noche a 16°C. Se incluyó siempre un control sin inserto, para poder estimar el aporte del vector no cortado o religado al número total de colonias obtenidas luego de la transformación. Se llevaron a cabo varias reacciones, manteniendo constante la masa de vector y variando la cantidad de inserto.

7. Preparación de bacterias E.coli (DH10B) competentes

Se inocularon 100ml de medio de cultivo LB con 1ml de E.coli DH10B en fase estacionaria de crecimiento. Se creció a 37°C con agitación (200-300 rpm) hasta $DO_{600}=0,5-1$. Se mantuvo 20 min en hielo y se centrifugó a 3000 rpm, durante 15 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 1L de agua milli Q fría y se volvió a centrifugar. Este paso se repitió lavando con 500ml de agua. El precipitado obtenido se resuspendió en 20 ml de glicerol 10% frío y se centrifugó. Finalmente el precipitado se resuspendió en 2-3ml de glicerol 10% (frío) y se dividió en alícuotas de 50-60ml, las cuales se guardaron a -70°C hasta el momento de ser utilizadas.

8. Transformación de bacterias E.coli competentes por electroporación

Las bacterias E.coli competentes mantenidas a -70°C se descongelaron rápidamente y se dejaron en hielo. Se tomaron 2ml de muestra de ADN plasmídico y se mezcló con las células de E.coli. Se introdujo la mezcla en un cubeta de electroporación de 0,2cm (BioRad) y se aplicó un pulso eléctrico con los siguientes parámetros: 2.5kV y 5 miliseg. Inmediatamente se le agregó medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucosa). Luego de incubar 1h a 37°C se plaqueó en medio LB con el agregado de los antibióticos correspondientes.

9. Transformación de bacterias Agrobacterium tumefaciens competentes

Similar a la transformación de bacterias E.coli. En este caso se utilizó un programa de electroporación con los siguientes parámetros: 2.2kV y 5 milliseg y cubetas de electroporación de 0,1cm según las especificaciones del fabricante.

10. Preparación de ADN plasmídico

10.1 Minipreparación de ADN plasmídico (purificación rápida para el análisis de recombinantes)

Se obtuvo ADN plasmídico a partir de cultivos de bacterias crecidas en agitación durante toda la noche. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue resuspendido en 300ml de solución P1, agitando vigorosamente en vórtex. Se agregaron 300ml de solución P2, se mezcló por inversión y luego de un reposo de 4 min se le agregó 300ml de solución P3 fría, luego de mezclar se dejó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo de microcentrífuga limpio. Se adicionaron 0,7 volúmenes de isopropanol 100% y se centrifugó a 13000rpm durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con un volumen igual de etanol 70%, se centrifugó por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar y por último se resuspendió el ADN plasmídico en 20-30ml de agua milliQ. Solución P1: Tris-HCl 25mM pH8, glucosa 50mM, EDTA 10mM, RNAsa (100mg/ml). Solución P2: 0.2N NaOH, 1% SDS. Solución P3: AcK 3M pH 5,2.

10.2 Utilizando kits comerciales

En el caso de las transformaciones de protoplastos, el ADN plasmídico se preparó utilizando los kits comerciales (Midi-prep, QIAGEN) para la obtención de ADN plasmídico de alta calidad, siguiendo las especificaciones de los fabricantes.

11. Digestión enzimática del ADN plasmídico

Para verificar la presencia de los insertos correspondientes, el ADN plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción adecuadas en un volumen final de 30ml utilizando 0.5 U de enzima y el buffer indicado por el fabricante.

12. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Se utilizó el kit Magic PCR Preps DNA Purification System (Promega) para la purificación de insertos y vectores digeridos. Se realizó un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x. El protocolo de purificación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

13. Reacción de desfosforilación

La reacción de desfosforilación se realizó en vectores para evitar el religado antes de realizar las reacciones de ligación con los insertos. En todos los casos se utilizaron 1U/mg ADN de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) y el buffer de reacción correspondiente (New England Biolabs), se incubó 2 h a 37°C. El vector desfosforilado se purificó por el kit detallado en el punto 12.

14. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50µl. Las concentraciones finales utilizadas fueron: buffer de PCR 1x, MgCl 1,5mM, dNTPs 0,2mM, Taq polimerasa 1U y oligonucleótidos 3C y 3D 1mM. La cantidad de ADN molde agregada varió de 1 a 3 µl.

Se utilizó el siguiente programa de amplificación:

desnaturalización inicial	10 min a 94°C
	desnaturalización 45 seg a 94°C
33 ciclos	anillado de los oligos 45 seg a 50°C
	polimerización 3 min a 72°C
polimerización final	2min a 72°C

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se detalla a continuación:

Oligo 3C: 5'-AAAGGGCCCGGCGCGCCCGGGATCAAGGCTCTGGCTAATCT-3'

Oligo 3D: 5'-GGTAGTGAAACAACACTGCTTCTGCAACAGTCGT-3'

15. Agroinfiltración

Se utilizó el protocolo modificado de Van der Hoorn, 2000.

Día 1: Se largaron preinóculos de 3ml de placas frescas de *Agrobacterium* en LB con el agregado de los antibióticos correspondientes y se crecieron toda la noche a 28°C con agitación (200 rpm).

Día 2: Se inocularon 250ml de cultivo en 25ml de LB más antibióticos y los siguientes agregados: sacarosa 0.5%, MgSO₄ 2mM, MES pH 5,6 10mM y acetosiringona 2mM. Se dejó toda la noche en agitación a 28°C.

Día 3: Luego de chequear que el cultivo llegó a una OD₆₀₀ = 0,6 a 1,2, se cosecharon las células por centrifugación (10 minutos a 3000 rpm). Se resuspendió en medio MMA hasta una DO₆₀₀ final de 2 y se agregó acetosiringona a una concentración de 200mM. Se dejaron reposando las células por 2 h y se agroinfiltraron las hojas con jeringas de 1ml descartables sin aguja.

MMA (1L) pH 5,6: 5g MS, 1,95g MES, 20% sacarosa.

16. Electroforesis

Geles de agarosa: Se utilizaron geles de agarosa de 1 y 1,5%. El buffer utilizado fue TAE (Tris-acetato 40mM pH 8,5, EDTA 2mM). Los geles contenían 0,5mg/ml de bromuro de etidio. En general, las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm y a temperatura ambiente. La composición del buffer de siembra 10x utilizado fue: glicerol 50%, Azul de bromofenol (BPB) 1%. Los geles fueron fotografiados utilizando luz UV de 365nm en Image Master trans-illuminator (Amershan Pharmacia).

Electroforesis de proteínas: Se realizaron geles planos de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE, según Laemmli, 1970) de 10x10 cm y 0,75 a 1,5 mm de espesor, utilizando el sistema Mini-Protean II™ (Hoeffer). Antes de sembrar las muestras se calentaron a 100°C durante 3 min en buffer de siembra para proteínas (Tris-HCl 250mM, pH 6,8, SDS 0,5%, glicerol 5%, b-mercaptoetanol 1% v/v, BPB 0,05 mg/ml). La corrida electroforética se realizó a 100V y los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de Western blot.

La composición de los geles y soluciones utilizadas fue la siguiente:

Gel separador 12 % (7.5 ml):

Acrilamida-bisacrilamida 30% (30:1)	3 ml
Tris-HCl 1.5M, pH 8.8	1,9 ml
Agua destilada	2.5 ml
SDS 10%	75 ml
Persulfato de amonio 10%	75 ml
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina	3 ml

Gel concentrador 5 % (3 ml):

Acrilamida/bisacrilamida 30 % (30:1)	300 ml
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	720 ml
H ₂ O destilada	1,9 ml
SDS 10 %	100 µl
Persulfato de amonio 10 %	31 µl
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina	3.5 µl

Buffer de corrida:

Buffer Tris-HCl, pH 8,8	25 mM
glicina	190 mM
SDS	0,1 %

Los geles se prepararon según el protocolo detallado en (Ausubel et al.,1984).

17. Western blot

Se utilizó el sistema Mini Trans-Blot™ (BioRad). Luego de la corrida electroforética, el gel se sumergió en buffer de electrotransferencia (Tris-HCl 50mM pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20 %). Se cortó un trozo de nitrocelulosa (BA 85 0,45 (m Schleicher & Schuell) del tamaño del gel y se lo dejó hidratar unos minutos en el buffer. Se colocaron, ordenadamente y evitando la formación de burbujas, 1 esponja tipo Scotch Brite (BioRad), 1 hoja de papel filtro Whatman 3MM, el gel, la membrana de nitrocelulosa, otra hoja de papel de filtro Whatman 3MM y otra esponja tipo Scotch Brite (BioRad). Todo esto se ensambló en el cartucho de transferencia y se colocó dentro de la cuba de electrotransferencia (BioRad), que luego se llenó de buffer. La transferencia se llevó a cabo a 60 V (voltaje constante) durante 45 min, siempre en frío. Una vez transferida, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (TTBS [Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 150mM (TBS), Tween 20 0,05-0,1 %] y 5 % de leche descremada en polvo) durante toda la noche en frío, y se hicieron 3 lavados de 5 min con TTBS. Se incubó con el primer anticuerpo a la dilución adecuada disuelta en solución de bloqueo durante 60 min a temperatura ambiente con agitación. Se lavó 2 veces durante 5 min con TTBS y 1 vez con TBS. Se incubó con un segundo anticuerpo anti-conejo o anti-ratón (según fuera el revelado de CP o A respectivamente) conjugado a fosfatasa alcalina (BioRad), preparado en solución de bloqueo, durante 45 min. Se lavó 3 veces con TBS durante 5 min cada vez, a temperatura ambiente. Se lavó una vez con buffer fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se reveló utilizando la solución de revelado de BCIP-NBT, preparada de la siguiente manera: 66 ml de BCIP (bromo-cloro-indoil-fosfato 60 mg/ml en dimetil formamida 100%), 66ml de NBT (nitro-blue-tetrazolium 50mg/ml en dimetil formamida 70%) y buffer fosfatasa hasta 10ml.

Antisueros utilizados

El antisuero anti-CP de PVX comercial (Adgen S.A.).

Los antisueros anti-A de FMDV fueron gentilmente cedido por la Dra. Gabriela Calamante, INTA Castelar.

18. Extracción de proteínas

Se tomaron 2 discos de hojas utilizando la tapa de un tubo de microcentrífuga a modo de sacabocado. Las muestras se homogeneizaron inmediatamente en 100ml de buffer de siembra para proteínas. Se calentaron a 100°C durante 5 min y se sembraron inmediatamente en un gel de poli-acrilamida de proteínas, o se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

19. Preparación de protoplastos a partir de la línea celular BY-2 de tabaco

Se partió de un cultivo de 100ml de células de la línea celular de tabaco BY-2. Se centrifugó todo el cultivo y las células se resuspendieron en 5ml de la mezcla de enzimas (0.01% celulasa y 0.001 % pectoliasa) y se dejó en agitación 2 h para digerir la pared celular.

Luego se lavó con buffer PIM (250mM Manitol, 12mM Acetato de Na pH5,8, 50mM de CaCl_2) o W5 (154mM Manitol, 125mM CaCl_2 , 5mM KCl, 2mM MES pH 5,7) 3 veces según se utilizara para electroporación o transformación con Polietilen Glicol (PEG), respectivamente. Finalmente se resuspendió en 5ml de buffer de electroporación (200mM Manitol, 150mM NaCl, 5mM CaCl_2 , 10mM Hepes pH 7,2) o de MMg (0,4M Manitol, 15mM MgCl_2 , 4mM MES pH 5,7) en el caso de transformación con PEG. Se tomaron 99ml de la solución de protoplastos y se tiñeron con 0,1% de azul de metileno para contar y determinar la viabilidad. Se agregó el volumen necesario del buffer para obtener una concentración de 1×10^6 células/ml.

20. Electroporación de protoplastos

Se colocó 1ml de protoplastos en una cubeta de electroporación de 0,4cm y se dejó en hielo por 5 min. Se agregó el ADN (20-25mg), se mezcló por inversión y se dejó 5 min en hielo. Se aplicó un pulso eléctrico con los siguientes parámetros: capacitancia: 250mFD, voltaje: 150volts. Luego se mezcló por inversión y se incubó 10 min en hielo. Por último se pasó todo el contenido a un tubo con 10ml de medio BY-2 Manitol (0,2M Manitol en medio BY-2) y se incubó en oscuridad durante 24 h a temperatura ambiente.

21. Transformación con PEG

Todos los pasos se llevaron a cabo a una temperatura ambiente. A 200ml de protoplastos se le agregaron 20mg de ADN (20-40mg de ADN plasmídico) y se mezcló bien. Luego se agregó 220ml de la solución de PEG/Ca 40% v/v (4g PEG 4000, 3ml agua, 2,5ml 0,8M Manitol, 1ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ o ClCa_2), se mezcló varias veces y se incubó a 23°C por 5-30 min. Se realizó un lavado con W5 y se centrifugó para eliminar el PEG. Finalmente se resuspendió en 100ml de W5 (154mM NaCl, 125mM CaCl_2 , 5mM KCl, 2mM MES pH5,7).

22. Infección con carborundum

Se eligieron 2 hojas bien desplegadas por planta y se espolvoreó carborundum desde aproximadamente 30-35cm. En general se inoculó una preparación de hojas infectadas homogeneizadas con el agregado de 80-100ml de Na_2PO_4 20mM (pH 7). En cada hoja se puso la mitad del preparado en gotitas que cubrían toda la superficie de la hoja. Se distribuyó con el dedo (usando guantes) muy suavemente, sin dañar las nervaduras principales. Se dejó secar durante 15 min y se lavó muy bien la hoja con agua corriente para eliminar los restos del abrasivo.

Bibliografía

- Angell SM, Baulcombe, DC (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J*; 16: 3675-84.
- Berinstein A, Piatti P, Gaggino OP, Schudel AA, Sadir AM (1991). Enhancement of the immune response elicited with foot-and-mouth disease virus vaccines by an extract of the *Mycobacterium sp. wall*. *Vaccine*; 9: 883-888.
- Biogénesis Laboratorios Argentina. Ruta Panamericana km 38,2 (B1619IEA), Garín, Provincia de Buenos Aires.
- Blanco E, Garcia-Briones M, Sanz-Parra A, Gomes P, De Oliveira E, Valero ML, Andreu D, Ley V y Sobrino F (2001). Identification of t-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol*; 75: 3164-3174.
- Brown F (1992). Vaccination against foot and mouse disease virus. *Vaccine*; 10: 1022-1026.
- Calamante G (1998) Tesis doctoral: Utilización del virus x de la papa como vector de expresión transitoria en plantas. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) FCEyN, UBA CONICET.
- Calamante G, Taboga O, Tami C, Verna F, Kobayashi K, Palma E L and Mentaberry A. (1999) "Expression of antigenic site A of foot-and-mouth disease virus on the surface of the potato virus X particle". 18th Annual Meeting of the American society for Virology. Amherst, MA., USA.
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, Dus Santos MJ, Castanon S, Sadir AM, Ordas R, Escribano JM, Borca MV (2001). Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunology*; 14: 49-57.
- Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Situación de los Programas de Control de la Fiebre Aftosa, América del Sur, 1995. PANAFTOSA/OPS/OMS,1996.
- Centro Panamericano de Fiebre Aftosa . Situación de los Programas de Control de la Fiebre Aftosa, América del Sur, 1998. PANAFTOSA, OPS/OMS, 1999.
- Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, Ríos RD, Franzone PM, Gil F, Moreno J, Carrillo C, Escribano JM, Borca MV (2002). A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine*; 20: 1141-1147.
- Featherson C (1996). Vaccines by agriculture. *Molecular Medicine Today* : 278-281.
- Federer KE, Alonso Fernández A (1967). Developpement d'un nouveau sous – type du virus de la fièvre aphteuse per passages en series sur bovins partiellement immuns. *Symp. Series Imm. Stand*; 8: 65-72.
- Giavedoni LD, Kaplan G, Marcovecchio F, Piccone ME, Palma EL, (1991). Protection conferred by TrpE fusion proteins containing portions of the C-terminal region of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*; 72: 967-71.
- John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney. Norwich, NR4 7UH, UK.
- Kitching RP (1998). A recent history of foot and mouth disease. *J. Comp. Path*; 118: 89-108.
- König G, Blanco C, Feigelstock D, Chimeno Zoth S, Pereda A, Palma EL, Maradei E, Piccone ME. Caracterización molecular de cepas del virus de la fiebre aftosa aisladas durante los años 1993-1994 en la Argentina. Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA, CC 77, 1708 Morón.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature*; 227: 680-685.
- Orman B, Celnik R, Mandel A, Torres H y Mentaberry A, (1990). Complete cDNA séquense os a South American isolate of potato virus X. *Virus Res*; 16: 293-306.
- Pereyra HG (1981). Foot and mouth disease. *Virus disease of Food Animals*, Academic Press, New York; 2: 333-363.
- Pringle CR (1964).Genetic aspects of the thermal inactivation properties of foot-and-mouth disease virus strains. *Bull. Off. int. Epizool*; 61: 619-628.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis TT (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Samuel AR (2000). Genetically diverse isolates of type O foot-and-mouth disease virus exhibit remarkable amino acid conservation at their neutralising antigenic sites. *Institute for Animal Health*; 7: 67-79.
- Santa Cruz S, Smolenska L, Roberts IM, Learmonth D, Porter AJ, Harris WJ, Wilson MA (1998). Production of single chain antibody attached to the surface of a plant virus. *FEBS Letters*; 441: 379-382.
- SENASA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Av. Fleming 1653, 1640 Martínez, Pcia de Buenos Aires, Argentina.
- Scholthof H, Scholthof K, and Jackson A (1996). *Annu. Rev. Phytopathol*; 34: 299-323.

- Tami J, Evens RP (1996). Evaluation of biotechnology products. *Pharmacotherapy*; 16:527-36.
- Usha R, Rohll JB, Spall VE, Shanks M, Maule AJ, Johnson JE, Lomonosoff JP (1993). Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology*; 197: 366-374.
- Van der Hoorn RAL, Laurent F, Roth R, and De Wit PJGM (2000). Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analysis of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Mol. Plant-Microbe Interact*; 13: 439–446.
- Walmsley AM and Arntzen Charles J (2000). Plants for delivery and edible vaccines. *Current opinion in Biotechnology*; 11: 126-129.

