

Expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas transgénicas

M.J. Dus Santos ⁽¹⁾ & A. Wigdorovitz ⁽²⁾

(1) Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, INTA-Castelar, C.C. 77, Castelar (1712), Buenos Aires, Argentina

(2) Consejo Nacional e Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Avda. Rivadavia 1917, C.P. C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina

Resumen

El virus de la fiebre aftosa produce una de las enfermedades más temidas del ganado debido a su amplia distribución geográfica y a su naturaleza altamente contagiosa.

La vacuna utilizada actualmente es polivalente y con virus inactivado. Las investigaciones relativas a la producción de vacunas antiaftosas están dirigidas hacia la obtención de vacunas de elaboración más fácil y económica y que eviten la manipulación de grandes cantidades de virus.

El uso de plantas transgénicas como sistema de expresión de antígenos relevantes ha sido evaluado para la producción de vacunas. El grupo de trabajo de los autores ha trabajado con el virus de la fiebre aftosa como modelo para evaluar la posibilidad de utilizar plantas transgénicas como sistema de expresión de antígenos virales y para desarrollar vacunas experimentales.

El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados del grupo en la expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas transgénicas.

Palabras clave

Antígeno – Fiebre aftosa – Planta transgénica – Vacuna – Virus.

Introducción

El virus de la fiebre aftosa produce una de las enfermedades más temidas del ganado debido a su amplia distribución geográfica y a su naturaleza altamente contagiosa.

Actualmente no hay incidencia de la enfermedad en Europa, América Central y del Norte, pero la fiebre aftosa sigue siendo un grave problema en Sudamérica, Asia y África. Argentina no ha presentado focos de la enfermedad desde 2003, y tiene el estatus de país libre de fiebre aftosa con vacunación. No obstante, existe un riesgo de introducción de virus infeccioso debido a la proximidad geográfica con zonas endémicas.

La infección por el virus de la fiebre aftosa induce una respuesta celular y humoral en el hospedador, siendo el elemento más importante de la respuesta la producción de

anticuerpos neutralizantes (AcN) específicos contra las proteínas estructurales del virus.

La vacuna utilizada actualmente es polivalente y con virus inactivado, y aunque ha demostrado ser una herramienta eficaz para la prevención de la enfermedad, su producción es costosa y de alto riesgo debido a la manipulación de cantidades masivas de virus infeccioso que puede resultar en su diseminación (5). Por ello, las investigaciones relativas a la producción de vacunas antiaftosas están dirigidas hacia el logro de vacunas de elaboración más fácil, económica y seguras.

Con ese fin, los autores han investigado el desarrollo de métodos alternativos de producción de vacunas antiaftosa, utilizando plantas transgénicas como vectores.

Desde tiempos muy remotos se han utilizado las plantas como fuente de compuestos medicinales que han sido de

gran utilidad desde el punto de vista sanitario. No obstante, nuevos desarrollos en biotecnología han vuelto a hacer pensar en las plantas como productos de utilidad terapéutica o preventiva. El uso de plantas transgénicas como sistema de expresión de antígenos relevantes ha sido ampliamente evaluado, dada la posibilidad de utilizar plantas modificadas genéticamente para la producción de vacunas (2, 6, 7, 16, 18, 23, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40). Se piensa que las vacunas a base de plantas serán más baratas y más fáciles de elaborar en grandes cantidades. Estas vacunas se podrían producir en países en desarrollo sin necesidad de instalaciones sofisticadas y costosas como las que se necesitan en la actualidad. Por otra parte, estas vacunas eliminarían el riesgo de virus contaminantes que conllevan las vacunas producidas en líneas celulares de mamíferos, ya que los posibles virus de plantas contaminantes no constituyen un peligro potencial ni para el hombre ni para los animales. Adicionalmente, las plantas transgénicas que expresen antígenos en sus tejidos comestibles podrían ser usadas como sistemas de producción de vacunas orales a muy bajo costo (2, 16, 18, 23, 35, 36, 39).

La transferencia de genes a plantas se puede realizar por métodos directos, vectores virales y vectores bacterianos.

Los métodos directos incluyen cocultivo con ácido desoxirribonucleico (ADN), electroporación, biolístico, microinyección, fibras de siliconas y siliconas.

Los virus vegetales son vectores atractivos para la introducción de genes en plantas. Su principal ventaja radica en que están evolutivamente adaptados para expresar sus proteínas virales en la planta infectada. Se pueden construir genes quiméricos fusionando un fragmento de ADN que codifica para un epítope determinado a un gen de la cápside del virus de planta. El virus recombinante se utiliza para infectar plantas de modo que la replicación y propagación del mismo permiten la expresión transitoria de la proteína quimérica. Las partículas virales que expresan el epítope foráneo en su superficie se purifican a partir de las plantas infectadas.

El sistema de transferencia de genes basado en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* es el más empleado para introducir ADN foráneo en plantas. Durante la infección por *A. tumefaciens*, un segmento de ADN llamado ADN de transferencia (ADN-T) es transferido desde la bacteria a la célula vegetal (Fig. 1) (42). El ADN-T contiene el gen de interés asociado a secuencias regulatorias y un gen marcador de selección que en general codifica para la resistencia a un antibiótico.

La integración del ADN-T en el cromosoma vegetal ocurre por recombinación ilegítima, siendo el sitio de integración azaroso. El gen de interés es, entonces, establemente integrado en el cromosoma nuclear de modo que las

plantas resultantes expresan el antígeno foráneo en todos o algunos de los tejidos vegetales. Las plantas así obtenidas pueden ser utilizadas para la extracción y purificación del antígeno o como alimento directo.

El grupo de los autores ha utilizado el virus de la fiebre aftosa como modelo para evaluar la posibilidad de usar plantas transgénicas como sistema de expresión de antígenos virales y para el desarrollo de vacunas experimentales.

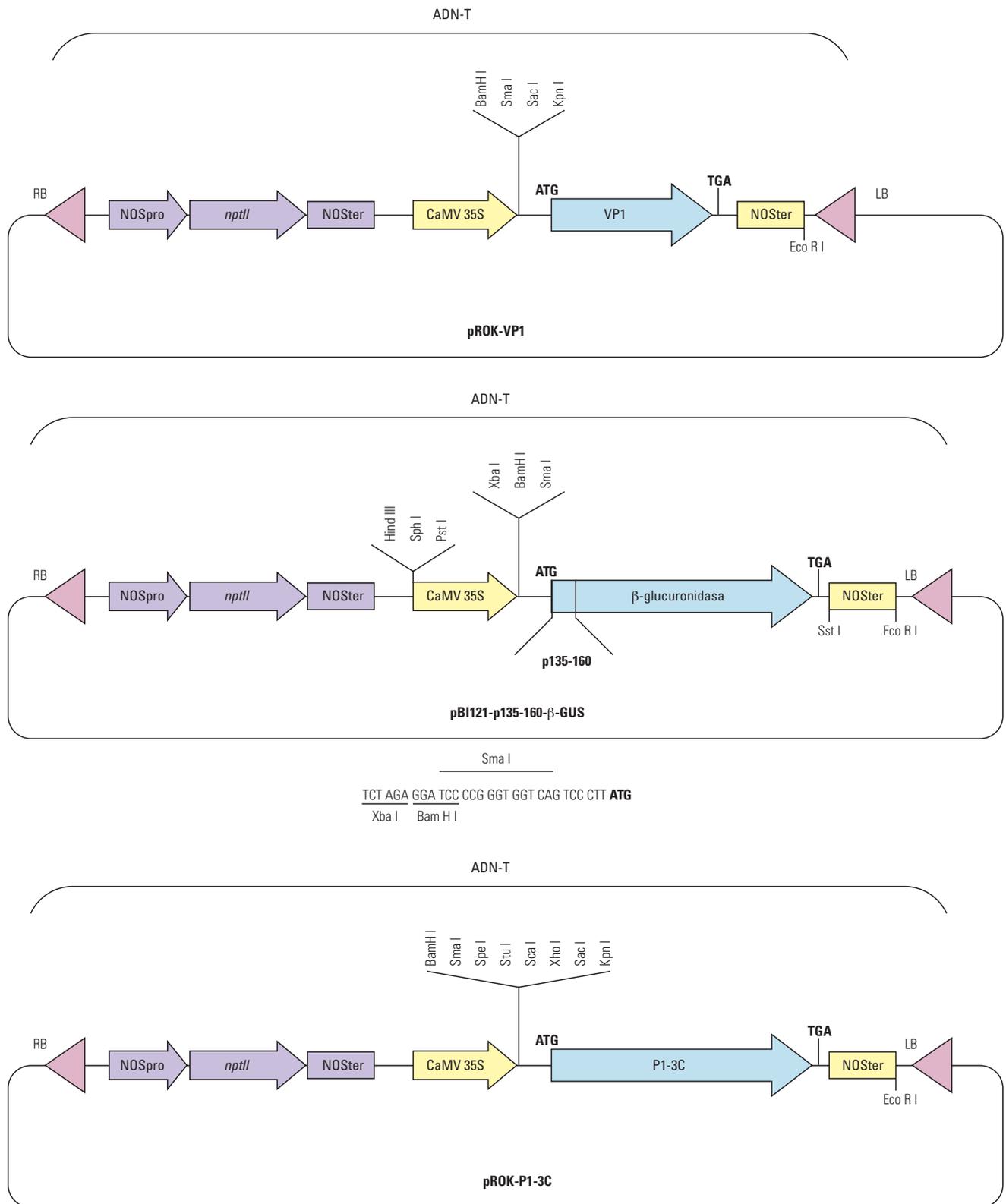
El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados obtenidos en la expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas transgénicas.

Evaluación de la utilización de plantas transgénicas para la expresión de antígenos

Inicialmente se utilizó la proteína VP1 para evaluar la posibilidad de usar plantas modificadas genéticamente como fuente de producción de antígenos. La proteína estructural VP1 posee los epítopos responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes (AN) y ha resultado un inmunógeno efectivo al ser expresada en sistemas procariotas y eucariotas (10, 15, 21, 41). Se ha demostrado que la inmunización con VP1 o péptidos sintéticos que representan parte de su secuencia aminoacídica induce una protección frente al desafío viral, tanto en el modelo murino como en el hospedador natural (5).

El vector utilizado para la incorporación de los genes foráneos en el genoma vegetal (pROK-VP1) es un plásmido binario que contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) para dirigir la expresión constitutiva de los genes de interés. También contiene un marcador seleccionable (*nptIII*) el cual permite la selección de las plantas transformadas en un medio que contiene kanamicina. Tanto el gen viral como *nptIII* se ubican en la región del plásmido denominada ADN-T (Fig. 1). Utilizamos el método de *A. tumefaciens* para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* (especie modelo para la generación de plantas transgénicas), en papa y en alfalfa (forrajera por excelencia para la obtención de carne, leche y lana).

En las tres especies estudiadas, se evaluó la presencia de la proteína VP1 recombinante por método inmunoenzimático (ELISA). Aproximadamente, el 10% de las plantas de *A. thaliana*, 65% de papa y el 60% de las plantas de alfalfa fueron claramente positivas. Estas plantas se utilizaron para inmunizar ratones con extractos crudos por la vía parenteral. Todos los animales inmunizados desarrollaron una fuerte y específica respuesta inmune. El efecto protector de la VP1 producida en plantas fue evaluado mediante el desafío de los ratones inmunizados con virus infeccioso. Los animales vacunados con las



ADN-T: ácido desoxirribonucleico de transferencia

Fig. 1
Esquemas de los vectores binarios utilizados

plantas que expresaban la VP1 resultaron protegidos, mientras que los controles inmunizados con plantas que expresaban un gen no relacionado resultaron infectados con virus de la fiebre aftosa (Cuadro I).

Evaluación de la utilización de plantas transgénicas como inmunógenos orales

Muchos agentes infecciosos colonizan o invaden membranas epiteliales; éstos incluyen bacterias y virus que se transmiten en comida o agua contaminada o por contacto sexual. Para ser efectivas contra estas infecciones, las vacunas deberían estimular el sistema inmune de mucosas a fin de producir inmunoglobulina A (IgA) secretoria en superficies de mucosa tales como el epitelio intestinal y respiratorio. En general, la respuesta inmune en mucosa es más efectiva cuando la inmunización se realiza por vía oral que parenteralmente. En comparación con la vía intraperitoneal, la inmunización oral requiere una mayor masa de antígeno para generar una respuesta inmune. El reconocimiento del antígeno por las células M es el primer paso para la inducción de una respuesta inmune en mucosas. Estas células se ubican en tejidos linfoides de las mucosas tales como las placas de Peyer. Así, las células M vehiculizan el antígeno a los tejidos adyacentes donde las células presentadoras de antígeno procesan y presentan el antígeno, activando, con ayuda de las células T "helper", a células B.

Los antígenos expresados en plantas tienen la ventaja de sobrevivir al transporte a través del estómago, ya que la pared celular de las células vegetales proporciona

protección frente a las secreciones gástricas. De modo que, cuando esta barrera finalmente se rompe en el intestino, las células gradualmente liberan el antígeno, el cual es captado por las células M.

Está bien documentado que las vacunas comestibles a base de plantas inducen una respuesta inmune sistémica y de mucosas (2, 13, 17, 18).

El grupo ha utilizado plantas de alfalfa que expresan la VP1 para evaluar su efectividad como inmunógeno oral. Es importante destacar que, cuando se alimentó a ratones con hojas frescas de dicha alfalfa, estos animales desarrollaron una respuesta inmune sistémica al virus de la fiebre aftosa la cual resultó protectora frente a la descarga con virus infeccioso por la vía parenteral, siendo ésta la primera vez que un antígeno expresado en plantas, que no pertenece a un microorganismo que habita el tracto digestivo, induce protección en un modelo animal.

La elección de la especie vegetal para evaluar la producción de antígenos recombinantes constituye un punto crítico que se ha de evaluar, especialmente cuando se piensa en la posibilidad de una vacuna de administración oral. En este sentido, la planta debería poder comerse cruda para evitar la desnaturalización del antígeno durante la cocción y tener naturalmente un alto contenido proteico para permitir un elevado nivel de expresión del transgen. En el área veterinaria, las plantas forrajeras utilizadas para el pastoreo constituyen un blanco óptimo para desarrollar vacunas animales a base de plantas transgénicas. En particular, en Argentina, la alfalfa constituye una de las principales fuentes de forraje para la obtención de carne,

Cuadro I

Evaluación del efecto protector de los antígenos del virus de la fiebre aftosa producidos en plantas, mediante desafío de ratones inmunizados con virus infeccioso

Planta utilizada para la inmunización y vía de administración	ISN ^(a)	Porcentaje de protección ^(b)	Ref.
<i>Arabidopsis thaliana</i> – pROK VP1 (n = 14), i.p.	ND	100	6
<i>A. thaliana</i> – pROK (n = 6), i.p.	ND	0	6
Alfalfa – pROK VP1 (n = 20), i.p.	ND	80	38
Alfalfa – pROK VP1 (n = 8), oral	ND	75	38
Alfalfa – pROK (n = 6), i.p.	ND	0	38
Alfalfa – pROK (n = 6), oral	ND	0	38
Papa – pROK VP1 (n = 26), i.p.	ND	87	7
Papa – pROK (n = 10), i.p.	ND	0	7
Alfalfa – pBI121VP-β-GUS (n = 10), i.p.	1,95 ± 0,16	100	11
Alfalfa – pBI121 (n = 10), i.p.	<1,1	0	11
Alfalfa – pROK P1.3C (planta A) (n = 13), i.p.	2,18 ± 0,096	100	
Alfalfa – pROK P1.3C (pool otras plantas) (n = 10), i.p.	ND	90	
Alfalfa – pROK (n = 10)	<1,1	0	

i.p. : vía intraperitoneal

a) Índice de seroneutralización. El título de anticuerpos neutralizantes se determinó mediante el método de suero fijo-virus variable

b) Los ratones inmunizados fueron descargados con 10⁴ DIRM (dosis infecciosa ratón lactante) 50% de virus de la fiebre aftosa, cepa O1C, por la vía i.p.

leche y lana y además es un elemento fundamental para el mantenimiento y recuperación de la productividad de los suelos. Es por ello que, luego de haber logrado resultados positivos en las tres especies (*A. thaliana*, papa y alfalfa), el grupo eligió a esta especie como sistema para la expresión de genes de interés.

Optimización de los niveles de expresión

Uno de los principales problemas que posee este sistema de expresión es que los niveles de proteína obtenida en las plantas transgénicas son relativamente bajos, lo cual hace difícil su generalización en una vacuna de aplicabilidad real.

Una posible alternativa para solucionar dicho inconveniente consiste en identificar a aquellos individuos que presentan niveles excepcionalmente altos de la proteína recombinante. Dado que la inserción del transgen en el genoma vegetal ocurre al azar, resultaba imprescindible desarrollar una metodología que permitiera evaluar un gran número de individuos a fin de seleccionar de modo sencillo y rápido aquéllos con mayores niveles de expresión.

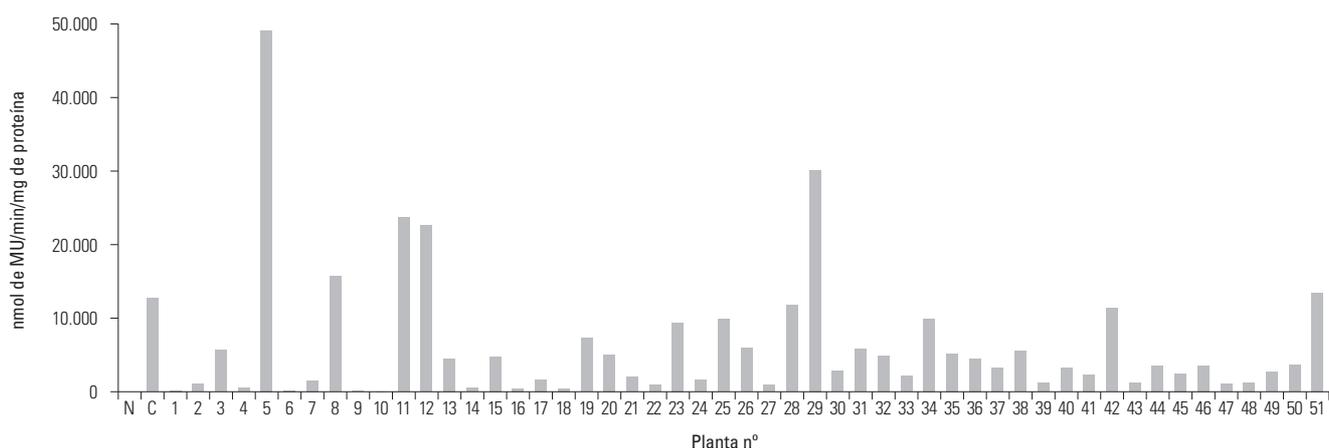
Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el grupo desarrolló una metodología que le permitió evaluar un gran número de individuos y seleccionar de un modo fácil y rápido aquéllos que presentan mayores niveles de expresión de la proteína recombinante. Esta metodología

se basó en la expresión del gen de interés fusionado a un gen reportero, codificante para la enzima β -glucuronidasa (β -GUS), cuya presencia puede ser detectada cuantitativamente por colorimetría. Utilizamos como antígeno un péptido que comprende la zona más inmunogénica (residuos 135 a 160) de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa para generar la proteína de fusión con la enzima β -GUS.

La secuencia nativa del gen fue adaptada al uso de codones de plantas con el fin de optimizar la expresión del antígeno de interés. El fragmento p135-160 fue clonado en el plásmido binario pBI121 (Clontech). El vector así obtenido (pBI121-p135-160- β -GUS) codifica para una proteína de fusión que contiene en el extremo 5' el gen p135-160 seguido por la secuencia completa del gen *gusA* (Fig. 1).

La introducción de los transgenes se realizó mediante el cocultivo de embriones y peciolos de alfalfa con *A. tumefaciens* recombinante, obteniéndose 51 plantas transformadas con pBI121-p135-160- β -GUS.

La selección de las plantas que presentan mayor nivel de expresión de p135-160- β -GUS, se evaluó por la actividad de β -glucuronidasa en todas las plantas resistentes a kanamicina. Se pudo observar una gran variedad en los valores de actividad enzimática entre los individuos evaluados que van desde valores básicos hasta los máximos niveles alcanzados (8% de los individuos) (Fig. 2). Esto se debe a que la inserción del ADN-T en el genoma vegetal se produce al azar y por lo tanto la expresión del transgen



N: plantas transformadas con un gen no relacionado
C: plantas transformadas con pBI121

Fig. 2

Expresión de la proteína de fusión p135-160- β -GUS en alfalfa. Detección de la actividad β -GUS en las plantas transgénicas

La actividad enzimática de β -glucuronidasa (β -GUS) fue cuantificada mediante un ensayo fluorimétrico siguiendo el protocolo descrito por Dus Santos y col. (11). Para ello, se maceraron 100 mg de hoja fresca en presencia de N_2 líquido y se resuspendió el macerado en buffer de extracción GUS. Este extracto, que contiene la enzima, se incubó con el sustrato 4-metil-umbiliferil- β -D-glucurónido (MUG). La actividad enzimática está expresada como nanomol de 4-metil-umbeliferone (MU) producido/min/mg de proteína total

varía en cada planta. Aquellas plantas que presentaron los mayores niveles de actividad enzimática (plantas nº 5, 11, 12 y 29) fueron seleccionadas para analizar la expresión de p135-160. En estas plantas se analizó por Western blot la expresión del péptido p135-160- β -GUS. Las plantas nº 5 y 29 presentaron los mayores niveles de acumulación de p135-160 (Fig. 3). Se estimó que la concentración de p135-160 expresada en la planta nº 5 fue de 0,5-1 mg/g de proteína soluble total (PST). En esta planta también se evaluó el patrón de expresión de la proteína de fusión mediante un ensayo histoquímico de actividad enzimática. La presencia de β -GUS pudo detectarse en los distintos tejidos (Fig. 4).

Con el fin de estudiar la estabilidad del producto expresado en alfalfa, se analizó la expresión de la proteína de fusión en la planta nº 5 a lo largo del tiempo y en diferentes plantas obtenidas por reproducción vegetativa de la misma. Todas las plantas fueron evaluadas mediante el ensayo de actividad β -GUS. La expresión de p135-160- β -GUS se mantuvo estable tanto a lo largo del tiempo evaluado (26 meses), como en los 14 individuos multiplicados vegetativamente.

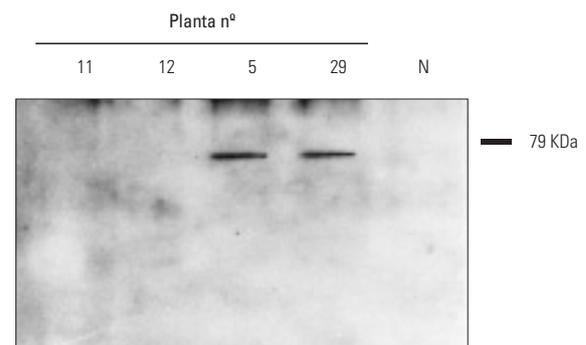
La capacidad inmunogénica de p135-160 expresado como proteína de fusión en plantas se evaluó inmunizando a ratones con una vacuna formulada utilizando extracto foliar de la planta nº 5. Se pudo observar que, luego de tres inmunizaciones, todos los animales desarrollaron una importante respuesta de anticuerpos, demostrado por su reactividad en ELISA tanto frente a p135-160 como frente a partículas virales completas y en Western blot utilizando virus purificado como antígeno. Además y más importante, la inmunización indujo una respuesta de anticuerpos neutralizantes que resultó completamente protectora frente al desafío con virus infeccioso (Cuadro I).

Expresión de estructuras virales

Hasta el momento, la mayoría de los antígenos expresados en plantas transgénicas consisten en péptidos, proteínas únicas o estructuras muy simples. Sin embargo, la producción de antígenos vacunales en sistemas heterólogos requiere, en muchos casos, la expresión de estructuras antigénicas complejas.

Los resultados obtenidos al expresar la proteína VP1 o un péptido interno de la misma, nos llevaron a intentar desarrollar en plantas de alfalfa transgénicas una vacuna de aplicabilidad real.

En el caso del virus de la fiebre aftosa, una alternativa a las vacunas convencionales es la preparación de cápsidas vacías que expresan y procesan la poliproteína precursora en un sistema de expresión heterólogo. Los resultados obtenidos hasta ahora al expresar cápsidas vacías del virus



N: planta transformada con un gen no relacionado

Fig. 3
Expresión de la proteína de fusión p135-160- β -GUS en alfalfa.
Detección de p135-160- β -GUS en las plantas transgénicas seleccionadas

Extractos de hoja fueron fraccionados por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y luego analizados por Western blot utilizando un suero de ratón anti p135-160

de la fiebre aftosa en sistemas heterólogos, con relación a la seguridad y conservación de epitopes protectivos, las convierten en antígenos candidatos para la formulación de vacunas (1, 3, 4, 8, 12, 20, 24, 25, 26, 27, 28). Sin embargo, aún no se ha logrado un método de expresión masiva de un inmunógeno eficaz que pueda ser utilizado a campo, ya que los sistemas desarrollados hasta ahora resultan costosos y poco aplicables a gran escala.

La construcción genética utilizada involucra la poliproteína P1.2A (precursora de las cuatro proteínas estructurales del virión), un fragmento de 2B (que funciona como conector), 3B y la proteasa 3C (junto con unos pocos aminoácidos de 3D). Se ha observado que la expresión de P1.2A junto con 3C, en distintos sistemas de expresión, ha permitido obtener cápsidas vacías conformacionalmente correctas (1, 12). El fragmento de ADN que contiene los genes necesarios para la formación de cápsidas vacías fue clonado en un vector binario (pROK), quedando su transcripción determinada por el promotor 35S (Fig. 1). Las plantas de alfalfa transgénica se obtuvieron por el método de *A. tumefaciens*. Con estas plantas (que contienen 0,005-0,01% de PST) se inmunizaron ratones, quienes luego de cuatro dosis, desarrollaron una respuesta inmune específica confirmada por ELISA contra el péptido p135-160 y partículas virales completas.

Estos resultados permitieron seleccionar una planta (denominada A) para continuar con el análisis antigénico e inmunogénico del producto expresado en alfalfa. Se pudo observar que ratones inmunizados con extractos de esta planta desarrollaron anticuerpos contra las cuatro proteínas estructurales del virus de la fiebre aftosa, mostrando en un Western blot que utiliza virus de la fiebre aftosa purificado como antígeno, el mismo patrón de

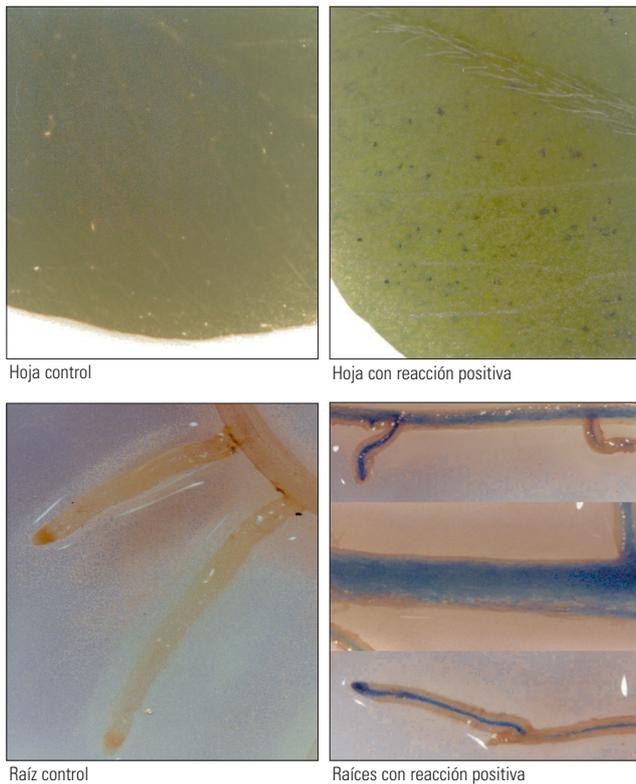


Fig. 4
Expresión de la proteína de fusión p135-160-β-GUS en alfalfa.
Ensayo histoquímico

Se realizó un ensayo histoquímico para detectar la expresión de β-GUS folíolos y raíces de las plantas n° 5, 11, 12 y 29. La presencia de actividad enzimática se visualizó por la aparición de una coloración azul en los tejidos, generada por el producto insoluble que se obtiene en la reacción. Como control se utilizaron explantes de una planta transformada con un gen no relacionado. Se muestran fotos representativas de los resultados obtenidos en todas las plantas

reactividad que sueros de animales infectados experimentalmente con el virus. Además, la inmunización con el producto expresado en alfalfa indujo respuesta de anticuerpos neutralizantes. La eficacia de la respuesta inmune generada quedó comprobada por los niveles de protección obtenidos al desafiar a los ratones inmunizados con virus de la fiebre aftosa infeccioso: animales vacunados con la planta A presentaron una protección completa (100%), mientras que ratones vacunados con un pool de otras plantas tuvieron un nivel menor de protección (90%) (Cuadro I). Estos resultados indican que los epitopes neutralizantes, responsables de proteger al ratón contra la infección por el virus de la fiebre aftosa están conservados en las proteínas expresadas en alfalfa transgénica.

Discusión y perspectivas

Teóricamente, cualquier proteína puede ser expresada en plantas utilizando la tecnología del ADN recombinante y la

transferencia de genes por *A. tumefaciens*. La planta transformada puede, entonces, considerarse como un biorreactor en el cual el proceso de producción involucra únicamente el consumo de luz solar, tierra y agua. El incremento en la producción estaría únicamente limitado por la disponibilidad de tierra y la capacidad de procesamiento del material, a diferencia de los fermentadores que emplean cultivos de tejidos y de células, para los cuales se requiere una inversión de capital muchísimo mayor.

Las ventajas de este sistema de expresión son las siguientes:

- la posibilidad de administración oral: los antígenos expresados en plantas serían capaces de sobrevivir al transporte a través del estómago gracias a la presencia de la pared celular;
- el tejido vegetal puede utilizarse fresco o liofilizado, alternativamente, los antígenos pueden ser parcial o totalmente purificados para su administración;
- no se necesita cadena de frío;
- los antígenos expresados en plantas transgénicas son capaces de inducir respuesta inmune sistémica y de mucosas;
- el costo de producción se vería reducido entre 100 y 1.000 veces con respecto a los métodos convencionales. Se estima que los costos para producir IgG en alfalfa en un invernadero de 250 m² oscilan entre U\$S 500-600/g, mientras que la producción en hibridomas es de U\$S 5.000/g (14)
- la existencia de protocolos de manipulación genética establecidos para la generación de plantas transgénicas; adicionalmente, la expresión de transgenes puede ser optimizada mediante la acumulación del antígeno en compartimentos intracelulares (microsomos, cloroplastos);
- la facilidad de producción y la posibilidad de aumentar la producción, dado que las plantas modificadas genéticamente se pueden almacenar en semillas;
- la ausencia de contaminación con patógenos animales;
- las plantas transgénicas son ideales para un uso veterinario.

Los resultados obtenidos al cabo de más de 10 años de investigación avalan el concepto de utilizar plantas transgénicas como sistema innovador y seguro para la producción de vacunas. El hecho que ratones inoculados parenteralmente con plantas transgénicas que expresan antígenos recombinantes, y más aún, alimentados con hojas frescas, generen una respuesta inmune protectora, demuestra claramente la factibilidad del empleo de plantas transgénicas para la expresión y presentación de antígenos (6, 7, 11, 38).

Sin embargo, algunas consideraciones se han de tener en cuenta a la hora de utilizar plantas para la producción de productos farmacéuticos en general. La distribución de plantas y semillas debe someterse a los mismos controles que cualquier droga. Las plantas deben crecer en condiciones controladas para prevenir la contaminación de productos alimenticios y para garantizar la contención del material genético. En este sentido sería oportuno usar especies que dispongan de variedades masculinas estériles para prevenir la propagación de los transgenes vía polinización. También sería ventajoso emplear plantas que puedan propagarse clonalmente, como es el caso de la papa, banana y alfalfa. Por otro lado, un punto de discusión en relación al cultivo de plantas modificadas genéticamente es la presencia de genes de resistencia a antibióticos (usados como marcadores de selección). Por ello, se están desarrollando estrategias para generar plantas transgénicas que no lleven tales genes (9, 22).

Si bien este sistema de expresión constituye una alternativa interesante a los métodos convencionales, su principal inconveniente radica en la baja concentración del antígeno expresado. El grupo de los autores se enfrentó con ese problema al buscar la expresión de antígenos virales en alfalfa, siendo esto evidente por la dificultad de detectar la proteína recombinante en el tejido vegetal así como por la necesidad de realizar múltiples vacunaciones para generar la respuesta inmune deseada.

Se han evaluado distintas estrategias para incrementar los niveles de expresión, que involucran el mejoramiento de la construcción genética por la adición de secuencias regulatorias (1, 23, 29, 39), la utilización de genes sintéticos optimizados para la expresión en la célula vegetal (11, 18) o el uso de secuencias que permiten la acumulación del antígeno en compartimentos intracelulares o en tejidos específicos (35).

Alternativamente, los autores presentaron una metodología que permite producir plantas transgénicas que expresan altos niveles de proteína recombinante, mediante la optimización de la selección de los individuos que producen mayor cantidad de proteína recombinante. Los niveles de p135-160- β -GUS encontrados en la planta nº 5 resultaron diez veces más altos que los observados en plantas transgénicas de alfalfa desarrolladas previamente, que expresaban VP1 y otras proteínas virales. Consecuentemente, los títulos de anticuerpos alcanzados en el modelo murino fueron marcadamente mayores que los obtenidos previamente en animales inmunizados con VP1 expresada en alfalfa, *A. thaliana* y papa (11). Además, el número de dosis necesarias para obtener dicha respuesta fue menor. Es importante destacar que los epitopes del virus de la fiebre aftosa incluidos en la proteína de fusión p135-160- β -GUS, presentaron la misma eficiencia, en términos de inducción de una respuesta inmune protectora, que cuando son administrados en forma de péptido sintético (41).

Además, se pudo observar que los niveles de expresión en la planta nº 5 seleccionada permanecen estables, tanto a lo largo del tiempo como en ciclos de reproducción asexual. Esto es fundamental para poder mantener un suministro continuo y constante del antígeno de interés.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los antígenos expresados en plantas transgénicas constituyen proteínas o estructuras simples. El antígeno de superficie del virus de hepatitis B (23, 29), la proteína de la cápside del virus Norwalk (31) y la proteína de la cápside del virus de papiloma humano (34) son las únicas estructuras antigénicas con cierto grado de complejidad expresadas en plantas transgénicas. Sin embargo, el uso práctico de este sistema de expresión para la producción de antígenos vacunales necesitará en muchos casos la producción de estructuras antigénicas complejas. Teniendo en cuenta esto y a los fines de desarrollar una vacuna antiaftosa de aplicabilidad real, el grupo obtuvo la expresión en alfalfa de la poliproteína precursora de las cuatro proteínas componentes de la cápside viral (P1) y la proteasa (3C) necesaria para su procesamiento. La producción de cápsides vacías del virus de la fiebre aftosa requiere el procesamiento proteolítico de P1 por 3C para generar las proteínas estructurales, las cuales se autoensamblan formando la cápside (Fig. 5).

Las vacunas antiaftosa con virus inactivado constituyen una herramienta efectiva para la prevención de la enfermedad. Sin embargo, su producción es costosa y existe riesgo de diseminación viral debido al manejo de cantidades masivas de virus infeccioso (5). Además, la respuesta inmune a la vacuna interfiere con la habilidad de detectar a animales vacunados que se han infectado y pueden hospedar y diseminar virus, creando así un obstáculo para la recuperación del estatus de libre de la enfermedad en regiones donde se vacuna para controlar posibles brotes. Muchos ensayos diagnósticos se basan en la detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales, las cuales se encuentran en baja concentración en las vacunas convencionales contra la fiebre aftosa, siendo, además, poco inmunogénicas. La producción de cápsides vacías como antígeno vacunal constituye la estrategia más atractiva para solucionar estas dificultades (8, 19).

La poliproteína P1 expresada en plantas de alfalfa fue capaz de generar en un modelo experimental una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes, que son en definitiva los responsables de la protección frente a la infección viral. Consecuentemente, los ratones inmunizados presentaron protección completa al ser desafiados con virus infeccioso, indicando que el producto expresado en alfalfa conservó los epitopes protectores. Resultados preliminares obtenidos del análisis de folíolos por microscopía electrónica revelaron la presencia de estructuras esféricas con un tamaño de 30 nm en la planta

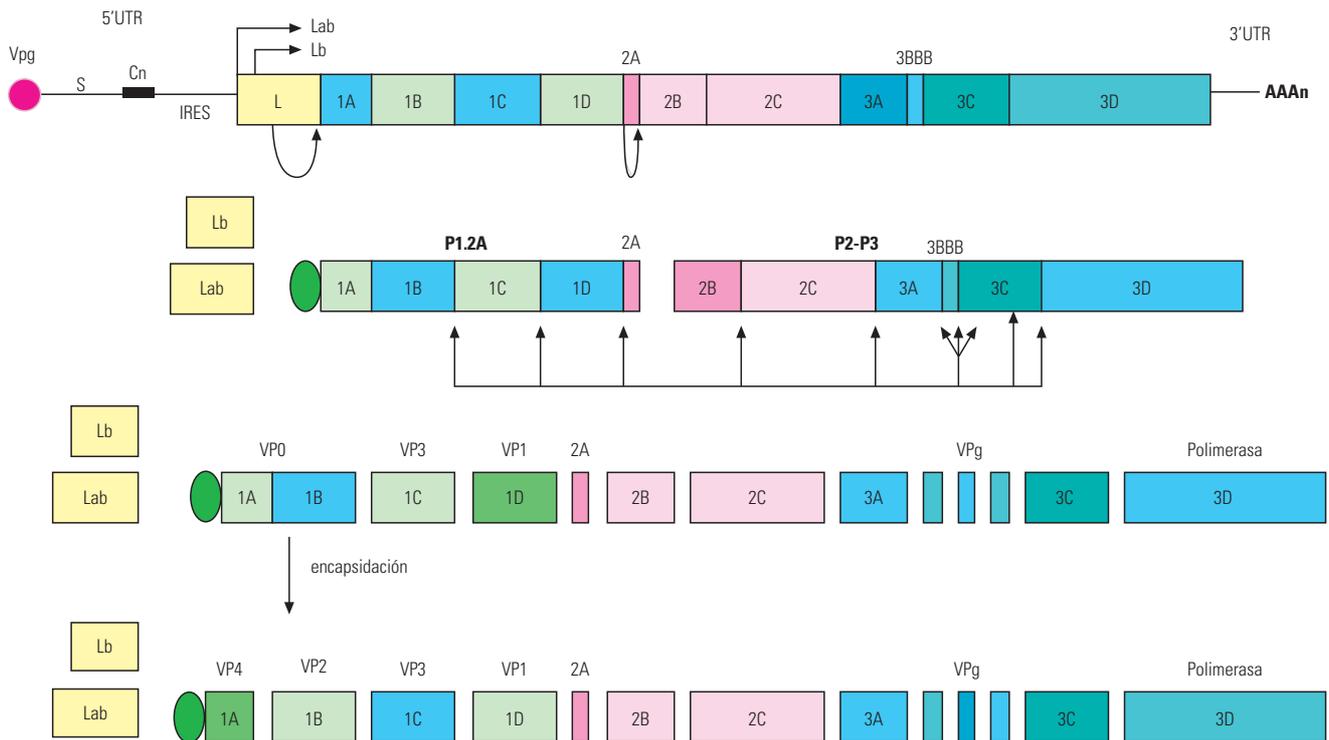


Fig. 5
Representación esquemática de la expresión del genoma del virus de la fiebre aftosa

que expresan P1. Dichas partículas no se encuentran en el testigo y por su morfología y tamaño podrían corresponder a cápsides vacías de *Picornavirus*.

Los resultados obtenidos al expresar P1 y 3C en alfalfa sugieren que la expresión de cápsides vacías del virus de la fiebre aftosa podría realizarse empleando este sistema de expresión. Sin embargo, la cantidad de producto expresado aún es escasa y no es aplicable al desarrollo de una vacuna experimental. Es por ello que seguimos abocados a la optimización de los niveles de expresión en alfalfa transgénica.

Por comunicación personal de Deborah Samac, investigadora del grupo de transformación de alfalfa del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América – Universidad de Minesota, el grupo tomó conocimiento de que el promotor del virus del mosaico variegado de la casava (CsVMV) tiene en alfalfa un nivel de expresión superior al del promotor 35S del CaMV y sus derivados. Ensayos realizados por el grupo de los autores para realzar la expresión en alfalfa mediante la expresión de la proteína de fusión p135-160-β-GUS mostraron que efectivamente el promotor de CsVMV presenta un nivel de expresión significativamente superior al del 35S. Este promotor constitutivo abre una interesante perspectiva para mejorar la expresión de transgenes nucleares en

alfalfa. Hemos obtenido recientemente plantas de alfalfa transgénicas que expresan P1 y 3C bajo la dirección de este promotor. Resultados preliminares mostraron que fue posible detectar la proteína foránea en el 40% de las plantas, obteniéndose hasta el momento un máximo nivel de expresión de 0,01% PST.

El grupo de los autores es el único, hasta el momento, que ha obtenido la expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas transgénicas. Los resultados obtenidos y las perspectivas de futuro sugieren fuertemente que las plantas de alfalfa pueden ser vectores para la producción de antígenos vacunales para el virus de la fiebre aftosa, así como otros patógenos humanos y animales.

Las investigaciones futuras indicarán si las vacunas a base de plantas cumplen los requerimientos de calidad (pureza, potencia, seguridad y eficacia) definidos por la Organización Mundial de la Salud. Asimismo, habrá que abordar las etapas de ensayos clínicos, proceso de elaboración, certificación y comercialización. Algunos ensayos clínicos prometedores se han realizado en humanos (30, 31, 32). El proceso de elaboración requiere que la planta produzca niveles altos de proteína foránea y que se defina la forma de administración de la vacuna. Con respecto al incremento en los niveles de expresión, se han investigado y se están evaluando distintas estrategias

tendientes a lograr ese gran objetivo. Inicialmente, la idea fue utilizar la planta fresca como vacuna comestible, pero actualmente este concepto se está dejando de lado debido a la dificultad de estandarizar la concentración de antígeno en distintas producciones. Además, los productos frescos son perecederos. La tendencia actual consiste en utilizar productos secos que podrían ser administrados como pellet. Finalmente, en muchos países del mundo, las plantas transgénicas generadas con fines biofarmacéuticos están reguladas por las mismas leyes que las plantas modificadas genéticamente con fines agronómicos, lo cual dificulta la certificación y comercialización de las mismas.

Aunque esta metodología se encuentra aún en etapas tempranas de desarrollo, el conocimiento obtenido y la demostración experimental claramente presagian que las vacunas a base de plantas pueden ser una realidad en los próximos años. ■

En el caso del virus de la fiebre aftosa, si logramos expresar las cápsides vacías en niveles significativos, se contará con una vacuna segura, marcadora y con una amplia potencialidad de utilización en condiciones de campo.

Agradecimientos

Los autores agradecen especialmente al Dr. M.V. Borca, quien comenzó esta línea de trabajo y fue responsable del grupo hasta el año 2000.

Este trabajo fue subsidiado por 1201/OC-AR PICT 6194 de SECYT-CONICET y PICT 08-08178 de SECYT-CONICET. ■

Expression of foot and mouth disease virus antigens in transgenic plants

M.J. Dus Santos & A. Wigdorovitz

Summary

Owing to its geographical distribution and its highly contagious character, the foot and mouth disease (FMD) virus is responsible for one of the most dreaded of all livestock diseases.

The currently-used vaccine is polyvalent and is based on an inactivated virus. Current research on FMD vaccines focuses on the creation of vaccines that are easier and cheaper to produce, and that avoid manipulation of large quantities of virus.

The use of transgenic plants to express relevant antigens has been evaluated for the purpose of vaccine production. The authors' working group has taken the FMD virus as a model to evaluate the feasibility of using transgenic plants to express viral antigens and to develop experimental vaccines.

The purpose of this paper is to set forth the working group's results in the expression of FMD antigens in transgenic plants.

Keywords

Antigen – Foot and mouth disease – Transgenic plant – Vaccine – Virus. ■

Expression d'antigènes du virus aphteux dans des plantes transgéniques

M.J. Dus Santos & A. Wigdorovitz

Résumé

Le virus de la fièvre aphteuse est responsable de l'une des maladies du bétail les plus redoutées, en raison de sa large distribution géographique et de son caractère hautement contagieux.

Le vaccin actuellement utilisé est polyvalent et préparé à partir de virus inactivés. Les études relatives à la fabrication des vaccins visent à simplifier et à rentabiliser la production, tout en évitant la manipulation de grandes quantités de virus.

Le recours à des plantes transgéniques a été évalué pour exprimer des antigènes intéressants dans la fabrication des vaccins. Les auteurs et leur équipe ont utilisé le virus de la fièvre aphteuse comme modèle pour évaluer la possibilité d'utiliser ce type de plantes comme systèmes d'expression d'antigènes viraux et pour développer des vaccins expérimentaux.

L'objectif de cet article est de présenter les résultats du travail des auteurs qui sont parvenus à exprimer des antigènes du virus aphteux dans des plantes transgéniques.

Mots-clés

Antigène – Fièvre aphteuse – Plante transgénique – Vaccin – Virus.



Bibliografía

- Abrams C., King A. & Belsham G. (1995). – Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J. gen. Virol.*, **76**, 3089-3098.
- Arakawa T., Chong D. & Langridge W. (1998). – Efficacy of a food plant based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnol.*, **16**, 292-297.
- Beard C., Ward G., Rieder E., Chinsangaram J., Grubman M. & Mason P. (1999). – Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J. Biotechnol.*, **20** (73), 243-249.
- Belsham G., Brangwyn J., Ryan M., Abrams C. & King A. (1990). – Intracellular expression and processing of foot-and-mouth disease virus capsid precursors using vaccinia virus vectors: influence of the L protease. *Virology*, **176**, 524-530.
- Brown F. (1992). – Vaccination against foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, **10**, 1022-1026.
- Carrillo C., Wigdorovitz A., Oliveros J., Zamorano P., Sadir A., Gómez N., Salinas J., Escribano J. & Borca M. (1998). – Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J. Virol.*, **72**, 1688-1690.
- Carrillo C., Wigdorovitz A., Trono K., Dus Santos M., Sadir A., Parra E., Ordas R., Martinez Escribano J. & Borca M. (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 Immunol.*, **14** (1), 49-57.
- Chinsangaram J., Beard C., Mason P.W., Zellner M.K., Ward G. & Grubman M.J. (1998). – Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J. Virol.*, **72** (5), 4454-4457.
- Daniell H., Mthukumar B. & Lee S. (2001). – Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic resistance genes. *Curr. Genet.*, **39**, 109-116.

10. DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T. & Mowat N. (1986). – Protection in cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, **232**, 639-647.
11. Dus Santos M., Wigdorovitz A., Trono K., Gil E., Rios R., Franzone P., Moreno J., Sadir A., Carrillo C., Escribano J. & Borca M. (2000). – A novel methodology to develop a FMDV peptide based vaccine in transgenic plants. *Vaccine*, **20** (7-8), 1141-1147.
12. Grubman M., Lewis S. & Morgan D. (1993). – Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine*, **11**, 825-829.
13. Haq T., Mason H., Clements J. & Arntzen C. (1995). – Oral immunization with recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, **268**, 714-716.
14. Khoudi H., Laberge S., Ferello J.M., Bazin R., Darveau A., Castonguay Y., Allard G., Lemieux R. & Vezina L.P. (1999). – Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol. Bioengin.*, **64**, 135-143.
15. Kleid D., Yansura D., Small B., Dowbenko D., Moore D., Grubman M., McKercher P., Morgan D., Robertson B. & Bachrach H. (1981). – Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science*, **214**, 1125-1129.
16. Martin-Alonso J., Castanon S., Alonso P., Parra F. & Ordas R. (2003). – Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Transgenic Res.*, **12** (1), 127-130.
17. Mason H., Ball J., Jian-Jian S., Xi J., Estes M. & Arntzen C. (1996). – Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **93**, 5335-5340.
18. Mason H., Haq T., Clements J. & Arntzen C. (1998). – Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*, **16** (13), 1335-1342.
19. Mason P., Chinsangaram J., Moraes M., Mayr G. & Grubman M. (2003). – Engineering better vaccines for foot-and-mouth disease. *Dev. Biol.*, **114**, 79-88.
20. Mayr G., Chinsangaram J. & Grubman A. (1999). – Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*, **263**, 496-506.
21. Morgan D. & Moore D. (1989). – Protection in cattle and swine against foot-and-mouth disease (FMD) with biosynthetic peptide vaccine. *Am. J. vet. Res.*, **15**, 473-497.
22. Puchta H. (2000). – Removing selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends Plant Sci.*, **6**, 219-226.
23. Ritcher L., Thanavala Y., Arntzen C. & Mason H. (2000). – Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnol.*, **18**, 1167-1171.
24. Roosien J., Belshman G., Ryan M., King A. & Vlaskin J. (1990). – Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insected cells using baculovirus expression vectors. *J. gen. Virol.*, **71**, 1703-1711.
25. Sáiz J., Cairó J., Medina M., Zuidema D., Abrams C., Belshman G., Domingo E. & Vlaskin J. (1994). – Unprocessed foot-and-mouth disease virus capsid precursor displays discontinuous epitopes involved in viral neutralization. *J. Virol.*, **68** (7), 4557-4564.
26. Sanz-Parra A., Blasco R., Sobrino F. & Ley V. (1998). – Analysis of the B and T cell response in guinea pigs induced with recombinant vaccinia expressing foot-and-mouth disease virus structural proteins. *Arch. Virol.*, **143**, 389-398.
27. Sanz-Parra A., Vazquez B., Sobrino F., Cox S., Ley V. & Salt S. (1999). – Evidence of partial protection against foot-and-mouth disease in cattle immunized with a recombinant adenovirus vector expressing the precursor polypeptide (P1) of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J. gen. Virol.*, **80**, 671-679.
28. Sanz-Parra A., Jimenez-Clavero M., García-Briones M., Blanco E., Sobrino F. & Ley V. (1999). – Recombinant viruses expressing foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. *Virology*, **259**, 129-134.
29. Sojikul P., Buehner N. & Mason H. (2003). – A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **100** (5), 2209-2214.
30. Tacket C., Mason H., Losonsky G., Clements J., Levine M. & Arntzen C. (1998). – Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Med.*, **4**, 607-609.
31. Tacket C., Mason H., Losonsky G., Estes M., Levine M. & Arntzen C. (2000). – Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. infect. Dis.*, **182** (1), 302-305.
32. Thanavala Y., Mahoney M., Pal S., Scout A., Ritcher L., Natarajan N., Goodwin P., Arntzen C. & Mason H. (2005). – Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **102** (9), 3378-3382.
33. Valdes R., Reyes B., Alvarez T., García J., Montero J., Figueroa A., Gomez L., Padilla S., Geda D., Abrahantes M., Dorta L., Fernandez D., Mendoza O., Ramirez N., Rodríguez M., Pujol M., Borroto C. & Brito J. (2003). – Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **310** (3), 742-747.
34. Varsani A., Williamson A., Rose R., Jaffer M. & Rybicki E. (2003). – Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Arch. Virol.*, **148** (9), 1771-1786.
35. Walmsley A. & Arntzen C. (2000). – Plants for delivery of edible vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 126-129.

36. Walmsley A., Kirk D. & Mason H. (2003). – Passive immunization of mice pups through oral immunization of dams with a plant-derived vaccine. *Immunol. Lett.*, **86** (1), 71-76.
37. Walmsley A., Alvarez M., Jin Y., Kirk D., Lee S., Pinkhasov J., Rigano M., Arntzen C. & Mason H. (2003). – Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. *Plant Cell Rep.*, **21** (10), 1020-1026.
38. Wigdorovitz A., Carrillo C., Dus Santos M., Sadir A., Rios R., Franzone P., Escribano J. & Borca M. (1999). – Induction of a protective antibody response to foot-and-mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, **255**, 347-353.
39. Wu Y.Z., Li J., Mou Z., Fei L., Ni B., Geng M., Jia Z., Zhou W., Zou L. & Tang Y. (2003). – Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. *Virology*, **313** (2), 337-342.
40. Yu J. & Langridge W. (2001). – A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnol.*, **19**, 548-552.
41. Zamorano P., Wigdorovitz A., Perez-Filgueira M., Carrillo C., Escribano J., Sadir A. & Borca M. (1995). – A 10 amino-acid linear sequence of VP1 of foot-and-mouth disease virus (FMDV) containing B and T-cell epitopes induces protection in mice. *Virology*, **212**, 614-621.
42. Zupan J. & Zambryski P. (1995). – Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to plant cell. *Plant Physiol.*, **107**, 1041-1047.
-

