

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**Modificación genética nuclear de *Lactuca sativa*
transplastómica para la expresión del gen *cre* que codifica
para una recombinasa**

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE A LA OPCIÓN DE TITULACIÓN:
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTA:

Evian Marian González Hernández

DIRIGIDA POR:

Dra. María del Carmen Oliver Salvador
Dr. Elías Octavio Gómez Montes

Ciudad de México, Junio del 2018

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional
P r e s e n t e

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Evian Marian González Hernández, manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **MÓDIFICACIÓN GENÉTICA NUCLEAR DE LACTUCA SATIVA TRANSPLANTÓMICA PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN CRE QUE CODIFICA PARA UNA RECOMBINASA**, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales con el ojetivo de difundir el trabajo realizado a los estudiantes del IPN "La Tesis" por un periodo de 10 años contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México a 15 de Junio de 2018 .

Atentamente





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

ACTA DE TRABAJO ESCRITO

En la Ciudad de México el día 15 de Junio del 2018, siendo las 19:00 se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: MODIFICACIÓN GENÉTICA NUCLEAR DE LACTUCA SATIVA TRANSPLASTÓMICA PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN CRE QUE CODIFICA PARA UNA RECOMBINASA que presenta el alumno Evian Marian González Hernández con número de boleta 20133100486, aspirante a Ingeniería Biotecnológica.

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

COMISIÓN REVISORA.

Nombre y firma Director Externo

Nombre y firma Director Interno

Nombre y firma Evaluador 1

Nombre y firma Evaluador 2

Nombre y firma
Director de Programa Académico

Contenido

RESUMEN	6
Abstract	7
AGRADECIMIENTOS	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	11
2.2 Vacunas comestibles	13
2.3 Plantas como una plataforma para la producción de biofármacos	14
2.4 Modificación genética de cloroplastos para la producción de proteínas heterólogas	18
2.5 Transformación mediada por <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	19
2.6 Eliminación de marcadores de selección	21
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 MATERIALES	26
5.1.1 Procedencia de Reactivos	26
5.1.2 Medios y Soluciones para bacterias y cultivo de tejidos vegetales	26
5.1.3 Cepa bacteriana y plásmido	26
5.1.4 Material para el cultivo de tejidos vegetales	27
5.2 MÉTODOS	27
5.2.1 Preparación de <i>A. tumefaciens</i> y modificación nuclear de hojas de <i>Lactuca sativa</i>	27
6. ANÁLISI Y DISCUSION DE REUSLTADOS	29
7. Bibliografía	38

Índice de figuras

Figura 1 Estructura molecular del viron del VIH-1.....	12
Figura 2 Vista general del genoma del VIH-1	13
Figura 3. Mecanismo de acción de A.tumefaciens.....	21
Figura 4 Esquema del mecanismo de acción del sistema Cre-loxP.....	22
Figura 5 Resultado de primeros eventos de transformación.....	30
Figura 6. Resultados de experimento EMEO 14 días.	30
Figura 7. Resultados de experimento EMEO a los 28 y 42 días	31
Figura 8. Resultados del experimento EMEO con 4 rondas de selección	32
Figura 9. Verificación por PCR del gen cre en las plantas transformadas.....	33

RESUMEN

La biotecnología molecular de plantas mediante la modificación genética ha permitido la obtención de una gran variedad de proteínas heterólogas con diversas aplicaciones. Las plantas transplastómicas, en las cuales se ha modificado el genoma del cloroplasto, representan una alternativa atractiva a las plantas transgénicas convencionales ya que los cloroplastos no son heredados a través del polen con lo que se reduce el riesgo de dispersión de transgenes. Los vectores empleados para la modificación genética del cloroplasto están constituidos principalmente por los genes de interés y un gen marcador. Este último generalmente confiere resistencia a un antibiótico, lo cual permite seleccionar eficientemente las células transformadas. El uso de este tipo de marcadores de selección genera una preocupación científica y social por lo que es conveniente eliminarlos. Existen diversos sistemas para la eliminación del gen marcador, el más empleado en plantas es el sistema CRE/loxP, que consiste en expresar el gen de una recombinasa desde el genoma nuclear que posteriormente será exportada al cloroplasto, donde reconocerá los sitios loxP que flanquean al marcador de selección, escindiéndolo. El objetivo de este trabajo fue introducir en el núcleo de lechuga transplastómica (que expresa los genes *p24* y *nef* del VIH-1) el gen de una recombinasa para eliminar el gen marcador de selección *aadA*. Lo cual se pudo verificar en primera instancia por las rondas de selección que sufrieron las plantas y posteriormente con una PCR específica para el gen *cre*

Abstract

The plants molecular biotechnology through genetic modification has a great variety of heterologous proteins with diverse applications. Transplastomic plants, in which the chloroplast genome has been modified, represent an attractive alternative to transgenic plants, since chloroplasts are not inherited through the soil, which reduces the risk of dispersion of transgenes. The vectors used for the genetic modification of the chloroplast consist mainly of the genes of interest and a marker gene. The latter generally confers resistance to an antibiotic, which allows efficient selection of transformed cells. The use of this type of selection markers is a scientific and social concern for what it is. There are several systems for the elimination of the marker gene, the most used in plants in the CRE / loxP system, which consists in expressing the gene of a recombination from the nuclear genome that was exported to the chloroplast, where it recognizes the loxP sites that flank the marker of selection, splitting it. The objective of this work was to introduce into the nucleus of the transplastomic lettuce (which expresses the genes *p24* and *nef* of HIV-1) the gene of a recombination to eliminate the selection marker gene *aadA*. What could be verified in the first instance by the rounds of selection suffered by the plants and later with a PCR specific for the gene *cre*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres...

Gracias por su amor incondicional y los sacrificios que han llevado a lograr mis metas, por ser los promotores más grandes de mis sueños, por enseñarme el valor de la educación, por ayudarme a vencer los obstáculos y enfrentar mis miedos. Porque sin ustedes nada esto hubiera sido posible, gracias por ser mi más grande ejemplo a seguir.

A la doctora María del Carmen Oliver Salvador...

Quien sin dudar confió en mí para trabajar y brindó todo su apoyo para mejorar mis conocimientos, por enseñarme la paciencia, la habilidad de escuchar y de siempre luchar por ser mejor persona, por enseñarme el valor del presente.

A Elías Octavio Gómez Montes...

Porque la pasión por su trabajo y el amor por enseñar siempre fue una gran motivación para sacar el trabajo adelante, por el apoyo, enseñanza y paciencia para enseñarme y por dejarme ser parte de este proyecto.

A Sebastian Herrera...

Por dedicarme tu tiempo y conocimientos, por influir en gran medida en mi vida académica, por permitirme ser parte de tu vida y formar esta gran amistad. Sin duda mi estancia en el laboratorio no hubiera sido la misma sin tu apoyo incondicional, te quiero amigo.

A Erick González

Por siempre impulsarme a crecer, por todo tu cariño y amor que construyó nuestra relación, por ser un pilar fundamental en mi vida y por alentar mis sueños, apostando siempre por mí.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas se han vuelto un problema de salud pública para el mundo (ONU, 2016) y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es una de estas, en 1983 el virus fue aislado y posteriormente identificado como el agente etiológico del SIDA (Barré-Sinoussi, y otros, 1983). Por su parte el VIH es un lentivirus que pertenece a la familia Retroviridae. En la replicación de este, el primer paso es la entrada en la célula huésped, esto es importante pues determina el tropismo viral; por un lado, como todos los lentivirus, infecta las células de la estirpe macrofágica y por otro, presenta un tropismo especial por los linfocitos CD4 (Codina, Martín, & Ibarra, 2007). Posteriormente una serie de pasos complejos guían al VIH para entregar su genoma al citoplasma de la célula, al mismo tiempo, que evade la respuesta del sistema inmunitario del huésped. Para infectar las células, la envoltura proteica del VIH (Env) se une al receptor celular primario CD4 y luego a un correceptor celular. Esta unión secuencial desencadena la fusión del virus con las membranas celulares hospederas, iniciando la proliferación. (Wilén, Tilton, & Doms, 2012).

El genoma del VIH consta de dos copias de RNA monocatenario no operado situado dentro de una capsida proteica, este virus codifica para tres genes retrovirales como son *gag*, *pol* y *env*, y para siete genes reguladores *tat*, *rev*, *tev*, *vup*, *vpr*, *vif*, y *nef* (Flores Villanueva P., 1998). Dentro de los genes reguladores es importante mencionar a *nef* (negative factor), el cual es crítico para la persistencia viral eficiente y acelera en gran medida la progresión de la enfermedad, contribuyendo al mantenimiento de altas cargas virales asociadas con el desarrollo de la inmunodeficiencia. Estructuralmente la proteína VIH-1 *nef* es funcionalmente compleja y se ve reflejado en la superposición de los dominios efectores que interactúan con múltiples proteínas celulares. Estas interacciones llevan a cabo las asociaciones anormales de las proteínas de la célula huésped y que establecen un ambiente favorable para la replicación viral (Kirchhoff et al. 2008). Básicamente *Nef* interfiere en tres rutas importantes dentro de la célula: causa la disminución de las

células CD4 y la expresión del MHC clase I en la superficie celular y causa alteración de rutas de señales de transducción (Peter, 1998).

En la replicación de este virus, p24 forma parte de la cápside viral. Esta es el producto de escisión más grande y forma el núcleo de las partículas víricas del VIH-1, siendo el objetivo de las células T como respuesta inmune en pacientes primarios y con infección crónica. Por lo tanto, se espera que p24 sea un componente clave de cualquier vacuna contra el SIDA (Obregon, 2006). Es por esto que se han iniciado esfuerzos importantes por desarrollar estrategias de expresión que incluyan estos dos genes (*p24* y *nef*) y tantear la posibilidad de producir una vacuna comestible que active el sistema inmunológico y genere anticuerpos contra esta enfermedad (Ruf, 2001) (Wurbs, 2007). Aquí la biotecnología vegetal y el uso de tecnologías de ADN recombinante, han simplificado la producción de vacunas de subunidades y las plantas se han convertido en un prometedor sistema de expresión para la producción de estas. (Tremblay, Wang, Jevnikar, & Ma, 2009).

Anteriormente en el equipo de trabajo, se realizaron investigaciones para la producción de una vacuna que incluyera los genes *p24* y *nef* mediante la modificación genética de lechuga (*L. sativa*) en cloroplasto, los vectores empleados en dicha modificación están constituidos principalmente por los genes de interés (*p24* y *nef*) y un gen marcador. Este último, por lo general, le confiere resistencia a un antibiótico, lo cual permite seleccionar de manera eficiente las células transformadas. El uso de este tipo de marcadores de selección denota una problemática por la polémica sobre el uso de organismos que los contienen, lo cual es una limitante para el desarrollo de sistemas vegetales de producción de proteínas recombinantes; sin mencionar, que el mantener estos genes representa una carga genética innecesaria. Existen diversos sistemas para la eliminación del gen marcador, el más empleado en plantas es el sistema CRE/loxP, que consiste en expresar una recombinasa en núcleo que posteriormente será exportada a cloroplasto, donde reconocerá los sitios loxP que flanquean al gen marcador lo que permite su eliminación del genoma. Por esto, el objetivo de este trabajo consiste en la modificación genética nuclear de lechuga para la eliminación de estos genes marcadores.

2. ANTECEDENTES

2.1 Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

De acuerdo a la ONU hasta el año 2016 el VIH causó la muerte de 35 millones de personas, hasta ese año se reportaron otros 36 millones que viven con esta enfermedad y alrededor del 57% de los individuos viven bajo tratamiento antirretrovírico. Las naciones unidas suman esfuerzos con 193 países para tratar de erradicar esta enfermedad y buscan nuevas alternativas que mejoren los tratamientos (ONU, 2016).

El genoma del VIH (Figura 1) se compone de tres principales genes retrovirales: *gag* (antígeno específico de grupo), *pol* (polimerasa) y *env* (glicoproteína de la envoltura). El gen *gag* codifica para un precursor de poliproteína Pr55gag, el cual es escindido por la proteasa viral (PR) en las proteínas gag maduras: genes de la matriz (p17), cápside (p24), nucleocápside p7 y p6 (Figura. 1) (Binley JM, 1997); (Novitsky V, 2003). La proteína p24 es el producto más grande de escisión (Figura 2), constituye el núcleo cónico de las partículas virales de VIH-1 y es el objetivo de las células T de la respuesta inmune. (Obregon, 2006).

El gen accesorio, *nef* (Figura 2), se encuentra situado en el extremo 3' del genoma del virus que codifica para una proteína metilada accesoria de 27 kDa, esta proteína tiene un papel muy importante en la replicación viral y la patogenicidad. Kirchhoff descubrió que muchas de las actividades de Nef se conservan en diferentes linajes del VIH y del SIV (Virus de Inmunodeficiencia en Simios), sin embargo, también existen algunas diferencias, por ejemplo, la mayoría de los alelos *nef*, no causan enfermedad en huéspedes como monos, pero en los huéspedes de VIH-1 esto es diferente pues modulan al TCR-CD3 para suprimir la activación de las células T y la muerte programada. Esta es una pérdida evolutiva de una función específica de *nef* y puede contribuir a la alta virulencia del VIH-1 en humanos y no en monos (Kirchhoff, Schindler, Specht, & Münch, 2008).

El desarrollo de vacunas y terapias eficientes contra el VIH es un gran desafío, varios factores contribuyen a evitar el uso de este virus en formulaciones de vacunas vivas o atenuadas. La alta tasa de mutación del VIH-1 para evadir la respuesta inmune adaptativa celular y humoral resulta en un alto grado de diversidad genética que exige anticuerpos neutralizantes de reacción cruzada para prevenir la infección; la envoltura glicosilada Env y la presencia de regiones variables inmunodominantes, protegen los epítopes de los anticuerpos neutralizantes (bnAb) como respuesta inmune de las regiones conservadas, por esto ha sido arduo el camino para encontrar tratamientos o cura a este mal. (Barouch, 2008) (Wang, Mo, & Yang, 2015)

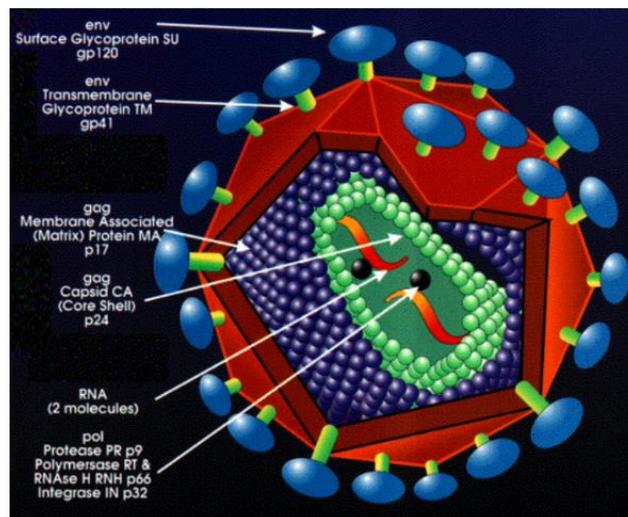
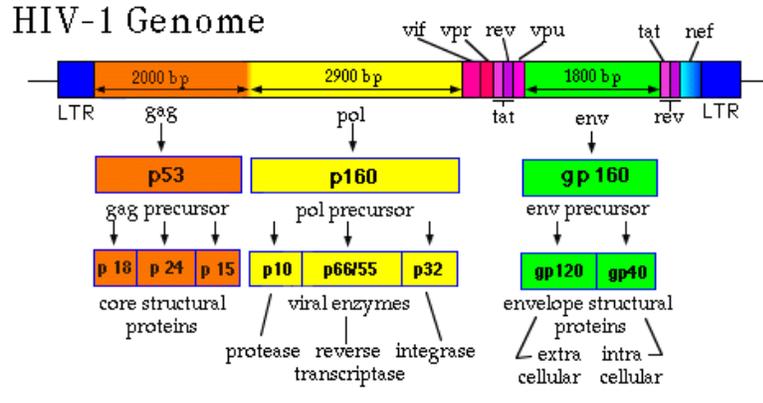


Figura 1 Estructura molecular del virión del VIH-1.

Consta de dos copias de RNA monocatenario no operado situado dentro de una nucleocapside proteica (p24), una membrana o matriz, y una membrana de glicoproteínas (envoltura)



ccz/95

Figura 2 Vista general del genoma del VIH-1.

Se muestran los tres genes retrovirales (*gag*, *pol*, *env*) que codifican para proteínas estructurales (*p53*, *p160*, *gp160*) y los siete genes reguladores (*tat*, *rev*, *tev*, *vup*, *vpr*, *vif*, y *nef*) (Flores Villanueva P., 1998)

2.2 Vacunas comestibles

La vacunación es el método más efectivo y económico que existe para prevenir enfermedades infecciosas y consiste en administrar un antígeno (vacuna) para producir inmunidad contra alguna enfermedad. Tradicionalmente, la vacuna administrada contiene formas vivas atenuadas de patógenos como bacterias o virus, sin embargo, pueden causar efectos secundarios sobre los individuos. El desarrollo de vacunas basadas en el uso de subunidades proteicas específicas de un virus o patógeno bacteriano, sugieren menos riesgo de reacciones adversas que las vacunas enteras bacterianas o de virus. Para la producción de estos antígenos se requieren de plataformas que produzcan proteínas complejas como puentes disulfuro, glicosilación u otras modificaciones post-traduccionales (Kwon KC, 2013). Es aquí donde el la biotecnología vegetal y el uso de tecnologías de DNA recombinante han simplificado la producción de vacunas de subunidades ya que se producen comúnmente en cultivos de células de *E. coli*, levadura o mamíferos, pero se limitan por la escala, la calidad del producto y el costo de producción (Tremblay, Wang, Jevnikar, & Ma, 2009). Biológicamente hablando este tipo de vacunas son termoestable y pueden ser modificadas para contener varios antígenos (Davoodi-

Semiromi, y otros, 2010) (Hefferon, 2013). Económicamente ofrecen múltiples ventajas de producción a gran escala, pues reducen el costo de sistemas complejos de producción como fermentación, purificación, almacenamiento en frío y transportación (Holaskova E, 2015) (Kwon KC, 2013).

Hasta la fecha se han producido un gran número de biofármacos en plantas (lechuga, alfalfa, zanahoria, tomate, papa, plátano, maíz, arroz y soya) (Ahmad P, 2012) y se dividen principalmente en tres áreas: anticuerpos, proteínas terapéuticas y vacunas (Giddings, 2001) consiguiéndose tratamientos preventivos para enfermedades como la fiebre aftosa, cólera, virus de la hepatitis B, virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), y vacunas candidatas contra varios tipos de cáncer (Tremblay, Wang, Jevnikar, & Ma, 2009).

2.3 Plantas como una plataforma para la producción de biofármacos.

En un principio el uso de las plantas como tratamientos medicinales alternativos dependían de los compuestos producidos naturalmente por estas, avances recientes han permitido modificar genéticamente las plantas como una plataforma para producir diversas moléculas que incluyen biofármacos, antibióticos y vacunas (Bains S, 2017).

Las plantas son un sistema muy atractivo para la producción de proteínas heterólogas. En la actualidad se han utilizado diferentes plantas para la expresión de diferentes moléculas, una de estas opciones es *L. sativa* que se ha utilizado en múltiples investigaciones para la producción de estas proteínas terapéuticas (Tabla 1). Las plantas revelan múltiples ventajas y la industria farmacéutica resulta ser la más beneficiada, debido a los bajos costos de producción, purificación, transporte y almacenamiento, pero con un alto rendimiento en la obtención de diferentes moléculas como enzimas, hormonas, anticuerpos y proteínas recombinantes (Giddings, 2001).

Estas proteínas se pueden producir mediante la expresión estable o transitoria de transgenes. Un sistema estable de producción, involucra la inserción de un gen externo dentro del núcleo o cloroplastos de la planta huésped resultando en la expresión de genes durante múltiples generaciones (Penney C, 2011).

En la expresión transitoria, no existe una integración de la secuencia codificante de interés en el genoma deseado (sin esta integración, las proteínas solo serán expresadas hasta la segunda generación de plantas) (Shih SMH, 2009)

Tabla 1. Expresión de proteínas heterólogas en (L. sativa) por transformación nuclear

Enfermedad	Proteína recombinante/rendimiento	Marcador de selección	Lettuce cultivar	Sistema promotor /señal de localización	Bibliografía
Antígenos Bacterianos					
Colera	sCTB/0.24% TSP	<i>bar</i>	N.R.	<i>pUbi/</i> ER-KDEL	Kim et al. (2006)
Colera	LTB/0.05% TSP	<i>npII</i>	Potosina, Green Wave	CaMV35S/SEKDEL	Martínez-González et al. (2011)
Enteritis	sLTB/1-2% TSP	<i>npII</i>	N.R.	CaMV35S/SEKDEL	Kim et al. (2007)
Diarrea Infecciosa	EspA/150 *mg mL ⁻¹	<i>npII</i>	N.R.	CaMV35S	Luan et al. (2009)
Antígenos Virales					
VIH	C4(V3)6/240 µg g ⁻¹ DW	<i>npII</i>	Green Wave	CaMV35S	Govea-Alonso et al. (2013)
Hepatitis B	HBsAg/1.0-5.5 ng g ⁻¹ FW	<i>npII</i>	Burpee Bibb	CaMV35S	Kapusta et al. (1999)

				Vitória de Verão		
Hepatitis B	HBsAg/N.R.	<i>npfl</i>	Vitória de Verão	CaMV35S/SEQDE L	Marcondes and Hansen (2008)	
Hepatitis B	S-HBsAg/5 µg g ⁻¹ FW	<i>bar</i>	Syrena	CaMV35S	Pniewski et al. (2011)	
Sarampión	MV-H/N.R.	<i>npfl</i>	Crystal	CaMV35S/KDEL	Webster et al. (2006)	
Influenza	NA/0.018-0.045% TSP	<i>npfl</i>	Grand Rapids TBR	CaMV35S	Liu et al. (2012)	
Expresión de proteínas terapéuticas						
Tratamiento de tumores, quimioterapia y agente de radioprotección	rTα1/1700 ng g ⁻¹ FW	<i>npfl</i>	Zhouye	CaMV35S	Cui et al. (2011)	
Antivirus, antiproliferación, inmunomodulador	HuIFN-beta/N.R.	<i>npfl</i>	Japanese Glass	**CaMV35S	Li et al. (2007)	
Deficiencias inmunes, trastornos autoinmunes	IgG1 k/20–80 mg Kg ⁻¹ FW	<i>npfl</i>	New Red Fire,	**(OCS)3Mas	Negrout et al. (2005)	
Deficiencia en la hormona de crecimiento humano	hGH/0.024-0.027 mg Kg ⁻¹ FW	<i>npfl</i>	N.R.	**CaMV35S	Sohi et al. (2005)	
Antígenos veterinarios						
Epidemia de diarrea porcina	sCTB-sCOE/0.026- 0.048% TSP	<i>npfl</i>	N.R.	<i>pUbi</i> /SEKDEL	Huy et al. (2009), (Huy et al. , 2011)	

Edema de cerdo	Stx2eB/ 0.2mg g ⁻¹ FW 2x Stx2eB/0.8 mg g ⁻¹ FW	<i>nptII</i>	Green wave	CaMV35S/HDEL	Matsui et al. (2009), (Matsui et al. , 2011)
Epidemia bubónica y neumónica	F1-V/0.08% TSP	<i>nptII</i>	Green wave	CaMV35S	Rosales-Mendoza et al. (2010)
Enfermedad de pies y boca	O and A epitopes/N.R.	<i>nptII</i>	Capata	CaMV35S	Deng et al. (2005), Deng and Chang (2007)
Tuberculosis	ESAT6/ N.R. and Ag85B/N.R.	<i>nptII</i>	Snezhinka, Rubinovie , Kruzhevo, Eralash	CaMV35S	Matvieieva et al. (2009)
Virus de la fiebre porcina clásica / Fasciolosis	E2 glycoprotein/160 µg g ⁻¹ DW <i>F. hepatica</i> protease/100 µg g ⁻¹ DW	<i>nptII</i>	N.R.	CaMV35S/KDEL CaMV35S	Legocki et al. (2005)
Virus de la estomatitis vesicular	ChIFN-α/0.0004% TSP	<i>nptII</i>	N.R.	**CaMV35S	Song et al. (2008)

2.4 Modificación genética de cloroplastos para la producción de proteínas heterólogas.

Las plantas transformadas en cloroplasto reciben el nombre de transplastómicas. Esta transformación junto con la de núcleo han sido muy empleadas en plantas superiores como tabaco, papa, lechuga, col y soya. Entre estas dos transformaciones existen ventajas significativas para la producción de proteínas.

Los cloroplastos son orgánulos conocidos como plástidos en las células vegetales y en algas eucariotas (Wang et al. 2009). Estos orgánulos cumplen múltiples funciones además de la fotosíntesis, pues realizan otras actividades metabólicas importantes incluyendo la producción de clorofila, almidón, ciertos aminoácidos, lípidos, pigmentos, vitaminas etc. Los cloroplastos poseen su propio genoma y la maquinaria completa de transcripción y traducción para expresar sus genes y producir sus propias proteínas (Singh ND, 2010). Cada célula vegetal puede contener hasta 100 cloroplastos cada uno de los cuales contiene alrededor de 100 copias del genoma en cada célula. Además, la mayoría de los genes del plástido tienen dos repeticiones invertidas, por lo tanto, la integración del transgen en esta región puede producir aproximadamente 20,000 copias por célula, lo que facilita la obtención de altos niveles de expresión de transgenes en las células vegetales, siendo la principal ventaja contra las transformaciones en núcleo. (Singh et al. 2009). Otra ventaja en la inserción de los genes del genoma del plástido es que ocurre de forma controlada, debido a las regiones homologas, esto no ocurre en transformación de núcleo, pues la inserción de genes es aleatoria pudiendo llegar a dañar algún gen con importancia metabólica; en la contención de genes los plástidos, no se encuentran en el polen de la mayoría de los cultivos comerciales evitando la propagación de transgenes en el campo a cultivos no transformados (Julie A. Z. Zedler, 2016).

Los primeros logros en la transformación genética de cloroplasto se llevaron a cabo en los años ochenta con la expresión de genes de bacterias y cianobacterias en plástidos in vivo (Daniell H, 1983) y con esto surgieron estudios que demostraron la

transformación de *Chlamydomonas* usando microproyectiles disparados a altas velocidades, siendo estos los primeros avances en biobalística. (Boynton, 1988)

Un vector para transformar cloroplastos se compone de: secuencias de acompañamiento o regiones homologas, un cassette de expresión específico para este plástido y por lo general, este cassette tiene un promotor fuerte, un marcador de selección y una región no codificante, con el fin de mejorar los niveles de traducción y transcripción del gen heterólogo. El promotor y los elementos regulatorios pueden ser directamente amplificados del ADN total de la célula, utilizando los iniciadores específicos basados en las secuencias disponibles del genoma del cloroplasto (Singh ND, 2010).

Por esto, el adecuado diseño y entendimiento del vector de transformación de cloroplasto con secuencias reguladoras apropiadas, juegan un papel importante en la eficiencia de transformación y en la expresión de los genes heterólogos integrados (Verma and Daniell 2007).

2.5 Transformación nuclear mediada por *Agrobacterium Tumefaciens*

Desde los años 70 la biotecnología de plantas ha crecido considerablemente y distintos avances han ayudado a resolver problemas de importancia agroindustrial, los descubrimientos que han revolucionado esta rama, se basan en la capacidad de poder regenerar plantas a partir de una célula vegetal y la transferencia de los genes deseados dentro del genoma de la planta. (H. Koprowski, 2001). *Agrobacterium tumefaciens* tiene la capacidad de transferir ADN entre diferentes organismos. El impacto de este hallazgo ha tenido grandes aplicaciones en diversos campos de la biología vegetal y agricultura. (Chilton M. D. et, 1977) Demostraron la presencia de un pequeño fragmento de ADN de la bacteria *A. tumefaciens* cuando aislaron tumores axénicos de la agalla de la corona en tabaco. Con estos experimentos se

demonstró la capacidad de esta bacteria para transferir ADN entre diferentes organismos

Durante el proceso de infección *A. tumefaciens* (Figura. 3) introduce en la célula vegetal una parte de su ADN (ADN-T) el cual es integrado dentro del genoma de la planta. Los genes del ADN-T son expresados en su hospedero e inducen la formación de tumores y la síntesis de unos derivados de aminoácidos llamados opinas los cuales son aprovechados por la bacteria. Este ADN se localiza en el plásmido Ti (Plásmido inductor de tumor), que además contiene los genes *vir* que son necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta. (Chilton M. D. et, 1977).

Este hallazgo fue crucial y permitió el diseño de vectores para la transformación genética de plantas mediante el uso de diferentes especies de *A. tumefaciens*. Pues sólo se necesita de las secuencias de los bordes del ADN-T para que la transferencia se lleve a cabo (Garfinkel, 1981); (Zambryzki, 1983). Algunos o todos los genes bacterianos del ADN-T pueden ser removidos originando vectores desarmados, los cuales pueden transformar células vegetales sin los síntomas generales de la infección bacteriana. La inserción de nuevos genes y sus elementos reguladores en el ADN-T ha permitido la transformación genética de plantas susceptibles con genes de importancia agronómica. Esto a su vez ha servido para el estudio de la función y expresión de genes, y para el desarrollo de plantas con nuevas características (Gelvin, 2003).

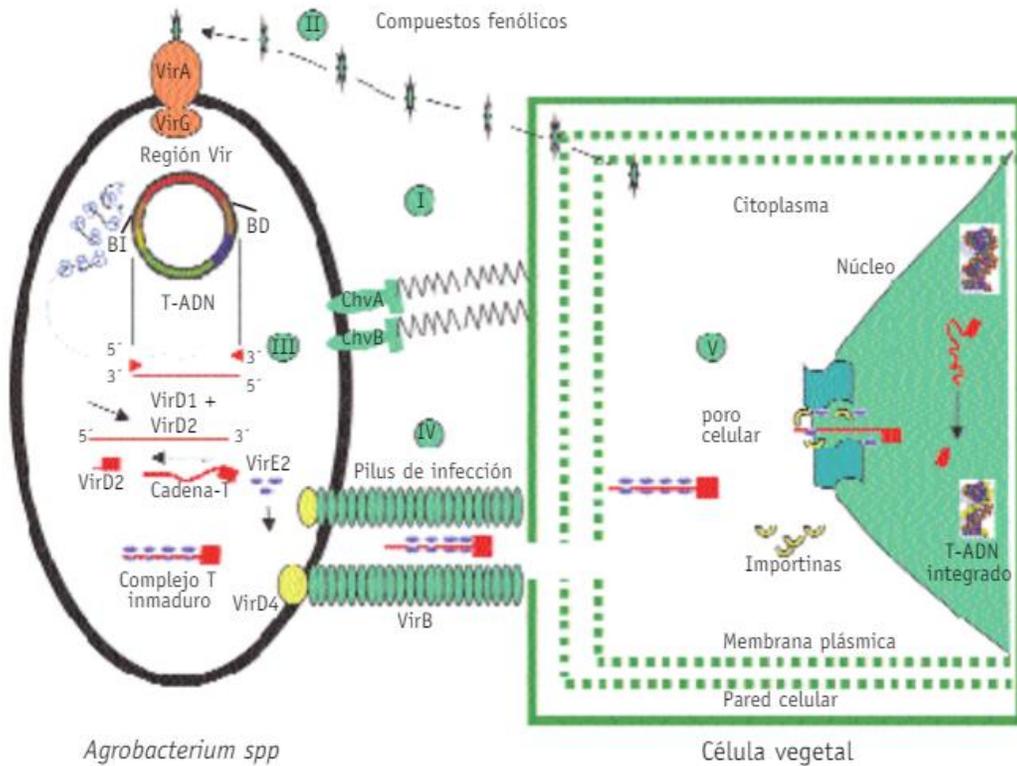


Figura 3. Mecanismo de acción de *A. tumefaciens*.
 I) Reconocimiento y adherencia; II) Identificación de señales de la planta y activación de genes vir; III) Generación del ADN-T; IV) Exportación del ADN-T hacia la planta; V) Importación del ADN-T dentro del núcleo de la planta e integración del ADN-T dentro del genoma del hospedero. (Tzfira y Citovsky.2000)

2.6 Eliminación de marcadores de selección.

Los marcadores de selección permiten discernir entre organismos transformados de los que no, generalmente estos marcadores incluyen genes de resistencia a ciertos antibióticos como el gene *nptII*, el cual confiere resistencia a la kanamicina, sin embargo existe cierto temor por parte de la población en general a que estos genes, sean transferidos de forma horizontal, por esto, se han desarrollado varios métodos para su eliminación, el más usado en plantas es el sistema Cre/loxP (Figura 4), en este sistema la expresión del gen *cre* causa la recombinación entre los sitios *loxP*. Si estos sitios se encuentran orientados en la misma dirección causara la escisión de la secuencia de nucleótidos que se encuentre entre estas. En cloroplasto esta estrategia se guía de los siguientes pasos: I) la integración del gen *aadA* (resistencia a la espectinomicina) flanqueado por los sitios *loxP* en el genoma de cloroplasto de la planta; II) Una vez que se confirma la inserción de estos genes y la expresión sea

estable, las plantas regeneradas se utilizan para ser transformadas en núcleo por *A. tumefaciens*, que contenga un vector binario con el gen de la CRE recombinasa, esta recombinasa es expresada en núcleo y cuando se transporte a cloroplasto catalizara la recombinación a través de los sitios *loxP* escindiendo el fragmento que contiene al gen *aadA*. Otra manera de introducir el gen *cre* a líneas transplastómicas es por medio de polinización y una vez que la escisión tome efecto, el gen *cre* se eliminará por segregación en las siguientes generaciones. (Maliga, 1993).

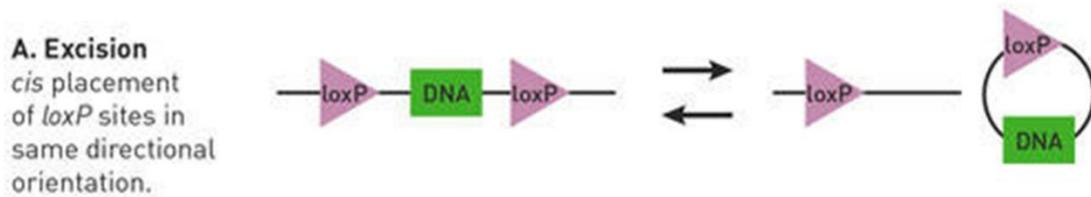


Figura 4 Esquema del mecanismo de acción del sistema Cre-loxP.

Los sitios loxP se encuentran orientados hacia el mismo lado esto provocará que la recombinasa Cre elimine el fragmento que se encuentre entre estos dos.

JUSTIFICACIÓN

Por siglos las enfermedades infecciosas han representado un problema de salud a nivel mundial y la vacunación ha sido el mejor tratamiento de prevención, sin embargo, en países en desarrollo la prevención es casi imposible y los tratamientos son prácticamente nulos. La ONU y otras organizaciones han sugerido el implemento de nuevas tecnologías para desarrollar tratamientos más eficientes que mejoren sus procesos de transportación y aplicación sobre el individuo. El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) aún no cuenta con una cura o tratamiento preventivo que ayude a eliminar esta enfermedad y por el contrario cada vez aumentan los porcentajes de mortandad. Es aquí, donde la biotecnología vegetal y sus múltiples aplicaciones tienen efecto, pues la transformación genética de plantas ayudaría en la creación de una vacuna comestible.

El uso de la biotecnología ha aumentado en los últimos años y con esto la transformación genética de plantas y el uso de técnicas que ayudan no solo a mejorar especies y conservar aquellas en peligro de extinción, sino también, a la producción de diferentes moléculas como enzimas, hormonas, anticuerpos y proteínas terapéuticas. La producción de estas moléculas implica el uso de la biotecnología a diversos niveles, incluyendo el control de expresión genética, selección de la proteína a expresar, su acumulación, estabilidad y la expresión en diversas plataformas.

Por su parte lechuga ha sido un modelo de estudio para la producción de proteínas heterólogas, principalmente por sus características de consumo, fácil cultivo (*in-vitro* y *ex-vitro*) y crecimiento, así como su amplia distribución y transporte. En ella se han estudiado diferentes tipos de proteínas para tratar enfermedades de origen viral, como el VIH. Por tano uno de los objetivos a largo plazo es la elaboración de una vacuna comestible contra este mal, utilizando genes (*p24* y *nef*) que participan en la activación y replicación de este virus. La FDA (Food Drug Administration), agencia que se dedica a la regulación de productos transgénicos en los Estados Unidos, se ha dedicado a evaluar estos productos desde 1990, y ha establecido una serie de requisitos en cuanto a: modificación genética, toxicidad, nutrientes, uso de nuevas sustancias y resistencia a antibióticos. Como sabemos en el uso de técnicas que involucran la transferencia de genes, solo un porcentaje de las transformaciones tienen efecto y para esto se utilizan genes marcadores que ayudan a los científicos a distinguir entre células transformadas de las que no. Sin embargo existe el

miedo a que estos genes sean transferidos de una especie a otra, y aunque no hay estudios que demuestren la transferencia de forma horizontal de estos genes, la FDA sugiere su eliminación. Es por lo cual el objetivo de este trabajo consiste en la eliminación del marcador de selección por medio de la transformación nuclear mediada por *A. tumefaciens*.

3. OBJETIVOS

a) **Objetivo general:**

Modificar el genoma nuclear de plantas de lechuga transplantómica con el sistema CRE loxP para eliminar el marcador de selección aadA.

b) **Objetivos Específicos:**

1. Estandarizar un protocolo de transformación nuclear de lechuga transplantómica (*Lactuca sativa*) con *Agrobacterium tumefaciens* usando el vector pROKCRE.
2. Comprobar la inserción de los genes nptII y CRE en el genoma nuclear de lechuga mediante PCR.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Procedencia de Reactivos

Todos los reguladores de crecimiento (AIB, ANA, BA, Vitamina B5) y la kanamicina usados en el protocolo, fueron suministrados por Sigma-Aldrich. La ampicilina, estreptomycinina y espectinomycinina se obtuvieron de los laboratorios de American-Bioanalytical. Las sales basales Murashige & Skoog provienen del laboratorio Caisson-Labs. La cefotaxima se obtuvo de laboratorios Amsa.

4.1.2 Medios y Soluciones para bacterias y cultivo de tejidos vegetales

Medio LB líquido: 1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 0.5% (p/v) NaCl (0.6% agar bacteriológico cuando el medio fue sólido). El medio fue esterilizado a 121°C 15 psi durante 15 min.

Medio MSR: 0.43% (p/v) sales basales Murashige & Skoog, 3% (p/v) sacarosa, 0.1 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 0.4 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BA). 0.6% (p/v) agar noble, pH ajustado a 5.7 con NaOH y HCl a 10N antes de añadir agar. El medio fue esterilizado a 121°C 15 psi durante 15 min.

Medio MS: 0.43% (p/v) sales basales Murashige & Skoog, 0.6% (p/v) agar noble, el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH y HCl a 10N antes de añadir agar. El medio fue esterilizado a 121°C 15 psi durante 15 min.

Medio MS1/2: 0.215% (p/v) sales basales Murashige & Skoog, 0.6% (p/v) agar noble, el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH y HCl a 10N antes de añadir agar. El medio fue esterilizado a 121°C 15 psi durante 15 min.

4.1.3 Cepa bacteriana y plásmido

Para el proceso de transformación, se contaba con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformada por electroporación con el plásmido pRok-Cre (donación del Dr. Tony Kavanagh y el Smurfit Institute of Genetics Trinity College, Dublin) este plásmido tiene como base el vector pBIN19 el cual contiene un cassette de expresión que codifica para un péptido señal RbcS fusionado con la proteína CRE.

De los cultivos proporcionados en medio LB líquido, se tomaron asadas para realizar estrías en medio LB sólido (Apartado 4.1.2) y se aislaron colonias de *Agrobacterium tumefaciens*.

4.1.4 Material para el cultivo de tejidos vegetales

Semillas de *Lactuca Sativa*, variedad Romana, transformadas en cloroplasto y obtenidas por el equipo de investigación, semillas silvestres de lechuga Romana. A continuación, se desinfectaron con etanol al 70% durante 1 min, posteriormente fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio 1% durante 10 min. Después de la desinfección las semillas fueron enjuagadas tres veces durante 1 min con agua destilada estéril. Seguido de esto se germinaron en cajas petri con medio MS adicionado con spectinomicina (100mg/ml) (Apartado 4.1.2) suplementado con 0.01 mg L⁻¹ de vitamina B5 en cuarto de cultivo a 25°C y fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$). Las plantulas de 7 días de cultivo, se transfirieron en cajas magenta con medio MS (Apartado 4.1.2) con las mismas condiciones ya mencionadas, para permitir el crecimiento de la planta y obtención de hojas verdaderas. Las hojas verdaderas obtenidas de entre 4-6 semanas se usaron para la transformación en núcleo mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparación de *A. tumefaciens* y modificación nuclear de hojas de *Lactuca sativa*.

De las colonias recuperadas de *A. tumefaciens* (Apartado 4.1.3), se inocularon tubos de vidrio con 5ml de medio LB líquido (Apartado 4.1.2) suplementado con estreptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) y kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$). El cultivo se incubó a 28°C en agitación constante (230 rpm) durante 12h. Posteriormente se inició el proceso de transformación; en una caja petri nueva y estéril se colocó el medio de los tubos inoculados, de las hojas verdaderas resultantes se cortaron con bisturí limpio y estéril explantes de 1-2 cm². Se colocaron de 25 a 30 explantes y se verificó que el medio cubriera por completo los explantes, se incubó durante 1h a 25°C agitando ocasionalmente. Después los explantes se retiraron y se colocaron en cajas Petri con el haz en contacto con el medio MS (Apartado 4.1.2) de recuperación sin antibióticos durante 24h. Finalmente, los brotes se recambiaron en medio MSR (Apartado 4.1.2) selectivo con kanamicina

(50µg/mL) y cefotaxima (200µg/mL) colocando de 10-15 explantes en cada caja, se realizaron recambios medio nuevo y fresco y selectivo cada 14 días. Los brotes resistentes a kanamicina se colocaron en medio MS^{1/2} (Apartado 4.1.2) con kanamicina (50mg/ml) suplementado con ácido indolbutírico AIB (3µg /ml) para la inducción de raíces.

4.2.2 Extracción de ADN genómico de plantas de Lechuga transgénicas

La extracción de ADN de plantas transplastómicas y/o transgénicas se realizó empleando el kit PROMEGA (No. De catálogo A1125) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La integridad del ADN genómico se verificó mediante un gel de agarosa al 1% de acuerdo a los procedimientos estándares reportados por Sambrook et al 1989. La concentración del mismo material genético se determinó por espectrofotometría en un Nano Drop 2000 (Thermofisher)

4.2.3 Verificación del gen cre

Para la verificación de la presencia del gen *cre* en el genoma de *L. sativa* transgénica se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerase de Thermo Scientific bajo las siguientes condiciones: 1x de *Taq* Buffer con KCl, 2mM de cada uno de los dNTP's, 0.2uM de cada uno los cebadores específicos para el gen *cre*, 2mM de MgCl₂, 100ng de muestra de ADN y 1U de la *Taq* DNA polimerase. Se completó con agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen de 20uL.

Perfil térmico utilizado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos que contenían una etapa de desnaturalización a 95°C por 30s, posteriormente un alineamiento a 58°C por 30 seg y finalmente una etapa de extensión a 72°C por 1.30 min. Terminados estos ciclos se adicionó una etapa de extensión a 72°C por 10 min.

Se verificó en un gel de agarosa al 1% 90V por 45 min.

5. ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Transformación de plantas transplastómicas por medio de *A. tumefaciens*

Para la transformación de las plantas transplastómicas por medio de la cepa *A. tumefaciens* LBA4404 que contenía el vector pRokCre (Anexo 1) con el péptido señal de la RbcS específico para tabaco, este gen es muy conservado en diferentes especies de plantas por lo que se espera que pueda ser reconocido por lechuga, además contiene el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina (Flores Villanueva P., 1998). Para la elaboración de un protocolo fue necesario probar diferentes variables de transformación como: densidad celular bacteriana, volumen del inóculo, cantidad de explantes por evento de transformación, lavado y secado de los mismos, tipo de corte, tiempo de recuperación de los explantes, medio selectivo usado para la selección de las plantas transgénicas, en el anexo 2 se pueden observar todas las variables evaluadas en este trabajo.

De los experimentos evaluados en el anexo 2, no se obtuvieron plantas transformadas, ya que se encontraron tres factores que afectaban en el proceso de infección y recuperación de los explantes; el primero era el tiempo de infección ya que en algunos casos era muy extenso causando la muerte prematura del tejido, en otros casos se observó muerte celular del tejido en los primeros siete días por un exceso en la contaminación por *A. tumefaciens* en el medio de recuperación y por último el explante se veía afectado dependiendo del método de corte ya que en algunos experimentos se cortaron explantes de forma circular de aproximadamente medio centímetro con el fin de abarcar mayor superficie de contacto con la bacteria, sin embargo a los siete días se comenzaba a observar la muerte y oxidación del tejido vegetal. Como se puede observar en la figura 5.

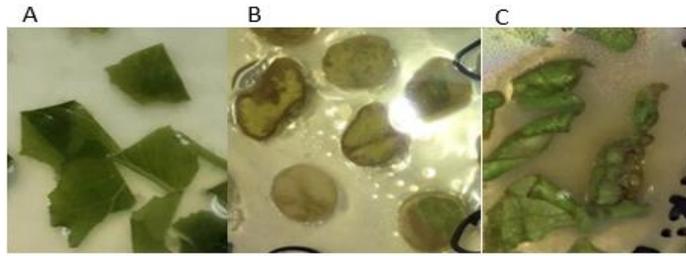


Figura 5 Resultado negativos de primeros eventos de transformación.

*Se puede observar los diferentes factores que afectaron la transformación de los explantes de lechuga, en la figura A se observa el tejido de vegetal sufrió daños por el exceso de medio liquido en el que se dejó incubando, en la figura B se muestran los explantes cortados en círculos los cuales sufrieron un exceso de daño mecánico y por último la figura C se muestran los explantes contaminados por *A. tumefaciens**

Posteriormente se realizaron las modificaciones en el experimento de transformación EMEO que se muestra en el Apartado 4.2.1 del cual se obtuvieron tres plantas transformadas como se muestra en la figura 6, 7 y 8. En el día 14 se observa en el control positivo el crecimiento de brotes y plantulas, mientras que en las plantas transformadas se observan los explantes con formación de callos, resultados que no se observan en el control negativo.



*Figura 6. Resultados positivos de evento de transformación nuclear de *L. sativa* con *A. tumefaciens* a 14 días.*

En el control positivo se puede observar los explantes de lechuga WT Romana sin infectar en medio MSR sin antibiótico a los días 1 y 14. En las plantas transformadas se observan los explantes en medio MSR suplementado con kanamicina a 50mg/ml y cefotaxima a 100mg/ml en los días uno y 14. Por último se puede observar el control negativo con los explantes de WT Romana en medio MSR selectivo con kanamicina a 50 mg/ml y cefotaxima a 100mg/ml.

En la figura 7 se observa que el control positivo se muestra plantulas que posteriormente fueron colocadas en medio MS1/2 para su posterior enraizamiento y mantener así la línea silvestre de lechuga romana, en las plantas transformadas se empieza a observar el crecimiento de brotes y la selección del tejido transformado, el cual se puede observar de color verde, del no transformado, el cual se observa en la figura de color café, estos brotes fueron cortados desde el tallo y pasados a medio MS ½ con kanamicina a 50 mg/ml y ácido indolbutirico AIB a 3 mg/ml para la inducción de raíces (Cui, Chakrabarty, Lee, & Paek, 2010). En este punto se puede suponer que la integración del ADN dentro del genoma nuclear se llevó a cabo, sin embargo se sugiere hacer más rondas de selección para corroborar este hecho. En el control negativo se observó la muerte del tejido.

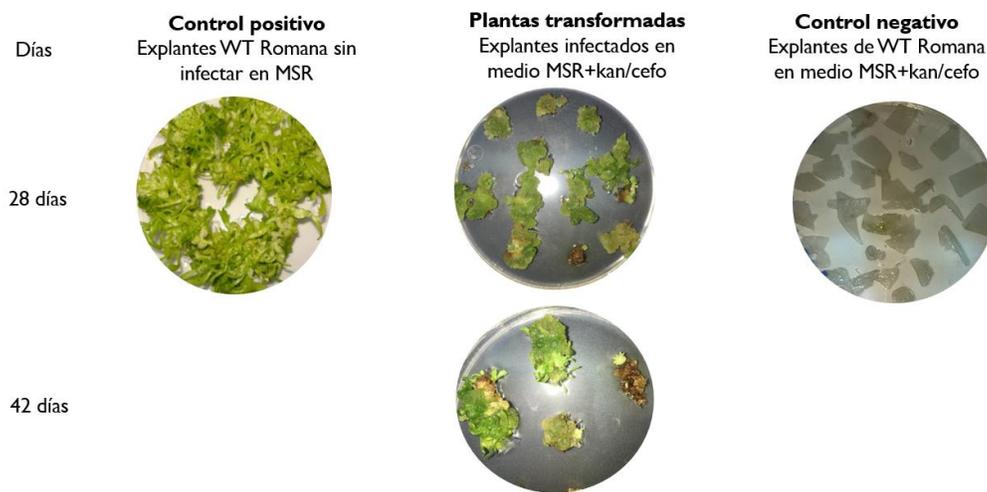


Figura 7. Resultados de experimento EMEO a los 28 y 42 días.

El control positivo muestra a los 28 días la formación de plantulas, en las plantas transformadas apenas se puede observar la formación de brotes y la selección de tejido transformado, el control negativo muestra la muerte completa del tejido vegetal

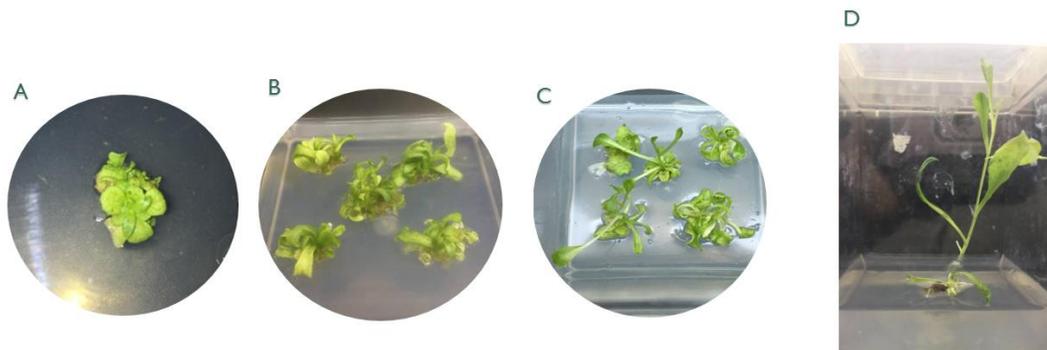


Figura 8. Resultados de transformación con cuatro rondas de selección
 En la figura A se observa uno de los brotes trasplantados a medio MS1/2 suplementado con kanamicina y ácido indolbutírico a los 70 días de transformación las figuras B y C muestran la formación de tallos en los brotes, en la figura D se observa el crecimiento de una planta completa y la formación de raíz en medio selectivo a los 94 días de la transformación

En la figura 8 se observa las etapas del crecimiento de los brotes la imagen A corresponde a los 70 días de la transformación, las imágenes B y C se tomaron a los 80 y 84 días respectivamente en esta última se observa la formación del tallo de la planta y en la imagen D tomada a los 94 días muestra la una planta completa con formación de raíz, en este punto han pasado 4 rondas de selección lo que sugiere categóricamente que las plantas tienen insertado dentro de su genoma nuclear el vector con los genes *cre* y *nptII* los cuales tendrán que ser confirmados por PCR.

5.2 Extracción de ADN y confirmación por PCR de la inserción de los genes *nptII* y *cre*

Para verificar la correcta transformación de las plantas de lechuga transgénicas se realizó la PCR dirigida contra los genes *cre*. Con este fin se realizó la extracción de ADN plasmídico y se verificó su integridad por un gel de agarosa al 1% (Figura 9). En la figura 9 B se puede observar una banda en los carriles p1, p2 y p3 del tamaño correspondiente a la proteína CRE (1401pb), mismo resultado que se observa en el control positivo del (carril CP) y ausente de la planta silvestre (carril WT) lo cual nos permite suponer que el gen de la recombinasa CRE se encuentra dentro del genoma nuclear de lechuga, obteniendo así plantas transgénicas.

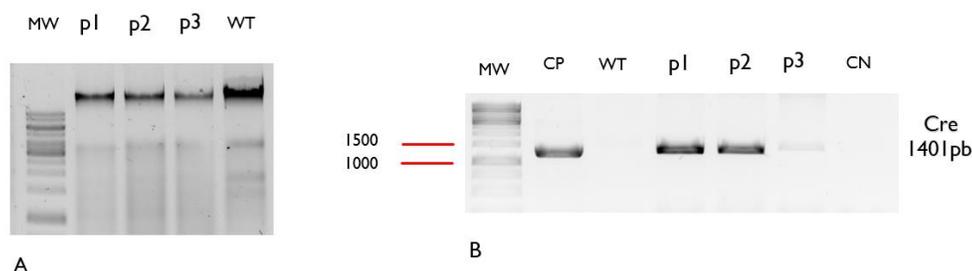


Figura 9. Verificación por PCR de la inserción del gen *cre* en las plantas transformadas.

Figura A gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del ADN genómico de las plantas estudiadas, Figura B se observa la PCR realizada de las muestras de ADN para la detección de la recombinasa CRE en las plantas transformadas. MW corresponde al marcador de peso molecular de 1kb, p1,p2 y p3 corresponde a la extracción de ADN de las plantas obtenidas de evento de transformación EMEO, WT la planta de lechuga Romana silvestre, CP corresponde al control positivo el vector que contenía al gen *cre*, CN que contenía la reacción de PCR con agua.

No se realizó PCR para confirmar los genes *nptII* sin embargo las plantas han sido seleccionadas y crecieron en medio MS $\frac{1}{2}$ suplementado con kanamicina los que nos indicaría que este gen se integró al genoma nuclear de las plantas confiriéndole resistencia a este antibiótico lo que no sucedió en los controles negativos de las Figuras 6 y 7.

6. Conclusiones

Se logró transformar las plantas de lechuga transplastómicas y obtener plantas transgénicas que contienen el gen que codifica para la recombinasa CRE, bajo las siguientes condiciones: usando explantes de aproximadamente 1cm², con 5ml de inóculo de *A. tumefaciens* con el vector pROKCre durante 1h, agitando ocasionalmente, posteriormente dejando en medio de recuperación sin antibióticos por 24h y pasando a medio selectivo con kanamicina (50mg/ml) y cefotaxima (100mg/ml) se obtuvieron brotes a los 28 días que después se pasaron a cajas magenta para enraizar en medio MS1/2 con 3mg/ml de ácido indolbutírico (AIB) con un fotoperiodo de 16/8.

7. Perspectivas

- Corroborar mediante PCR la inserción del gen *nptII* en genoma nuclear de lechuga transplastómica, así la como la presencia de los genes *p24* y *nef* en el genoma de cloroplasto.
- Comprobar la eliminación del marcador de selección *aadA* y la presencia de los genes *p24* y *nef* mediante Southern blot.

- Confirmar la expresión de los genes *CRE*, *p24* y *nef* mediante Northern blot.
- Verificar la producción de la proteína de fusión p24/nef por Western blot.
- Verificar la eliminación del marcador de selección *aadA* mediante una prueba de sensibilidad a espeticomicina de los explantes y semillas con la doble transformación genética.

ANEXO 2. Lista de Experimentos realizados

Experimento 965

Callos de lechuga (inducidos en medio MS1 o MS9) pasarlos a una caja Petri estéril y ahí realizar cortes de estos. Adicionar 5-10 mL del cultivo de *A. tumefaciens* e incubar 1 h. En un frasco Gerber estéril colocar agua destilada (aprox. 30 mL) y adicionarle 300 µL de AMP, pasar los callos al frasco y agitar 1 min. Retirar los callos con las pinzas (flameadas) y colocarlos en una caja Petri con papel absorbente, colocar los callos en medio MSR-X.

Experimento 966

Callos de lechuga (inducidos en medio MS1 o MS9) pasarlos a una caja Petri estéril y ahí realizar cortes de estos. Adicionar 5-10 mL del cultivo de *A. tumefaciens* e incubar 1 h. Pasar los callos a medio MSR líquido en un frasco Gerber estéril (con 20 mL de medio y 40 µL de AMP) incubar 30 min. Pasar los callos una a una a una caja Petri estéril con papel absorbente para secar los callos y finalmente colocar los callos en medio MSR-X

Experimento 967

Callos de lechuga (inducidos en medio MS1 o MS9) pasarlos a una caja Petri estéril y ahí realizar cortes de estos. Adicionar 5 mL del cultivo de *A. tumefaciens*, agitar para humedecer perfectamente los callos, inmediatamente pasar a medio MSR de recuperación e incubar por 5 h con fotoperiodo. Pasar los callos a medio MSR líquido en un frasco Gerber estéril (con 20 mL de medio y 40 µL de AMP) agitar 1 min. Colocar los callos en medio MSR-X.

Experimento 968

Callos de lechuga (inducidos en medio MS1 o MS9) pasarlos a una caja Petri estéril y ahí realizar cortes de estos. Adicionar 5-10 mL del cultivo de *A. tumefaciens*. Agitar para humedecer bien los callos, retirar el exceso del cultivo de agro sellar la caja Petri e incubar 5 h a 28 °C (incubadora para agro). En la campana abrir la caja y adicionar 10 mL de medio MSR líquido más 40 µL de AMP. Agitar 1 min retirar los callos y pasarlos a una caja Petri con papel absorbente para secar los callos. Finalmente pasarlos a medio MSR-X

Experimento 969. Seguir los protocolos anteriores y hacer experimentos con callos de las líneas p24/nef y WT de lechuga,

El medio MSR-X es medio MSR sólido (con agar) + antibióticos AMP 200mg/ml CEF 100 mg/ml KAN 50 mg/ml

Experimento 1.25x10³

Infestar explantes de lechuga p24/nef y WT por separado con agro (5-10 mL) incubar 5 h en fotoperiodo. Aproximadamente la mitad de los explantes pasarlos a una caja con papel absorbente para secarlos y pasarlos a medio MR-X. La otra mitad enjuagarlos en agua con 40 µL de AMP y pasarlos a medio MRS-X.

Experimento 1.26x10³

Hacer cortes en las hojas y sumergirlas en el cultivo de agro, pasar a medio MSR de recuperación (cuidar que las hojas queden en contacto con el medio) incubar 1 h a 28 °C. Enjuagar las hojas con agua con 40 µL de AMP. Hacer explantes grandes y pasas a medio MSR-X.

Experimento 1.27x10³

Infestar explantes de lechuga p24/nef y WT por separado con agro (5-10 mL) incubar 5 h en fotoperiodo. Pasar los explantes a medio MRS de recuperación e incubar en fotoperiodo 24 h. Enjuagar los explantes en agua con 40 µL de AMP y pasarlos a medio MRS-X.

8. Bibliografía

- Ahmad P, A. M.-Q. (2012). Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnol Adv.*, 524-540.
- Bains S, L. P. (2017). Plastid Molecular Pharming II. Production of Biopharmaceuticals by Plastid Transformation. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 1316-1330.
- Barouch, D. (2008). Challenges in the Development of an HIV-1 Vaccine. *Nature*, 455, 613–619.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., . . . al., e. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220, 868–871.
- Binley JM, K. P. (1997). Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env proteins of. *Journal of Virology*, 71:2799-2809.
- Boynton, J. E. (1988). Chloroplast transformation in Chlamy- domonas with high-velocity microprojectiles. *Science*, 240:1534–1538.
- Chilton M. D. et, a. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell Vol. 11*, 263-271.
- Codina, C., Martín, M. T., & Ibarra, O. (2007). La infección por el virus. En *FARMACIA HOSPITALARIA* (pág. 1493). Madrid: Diapasón.
- Daniell H, M. B. (1983). Uptake and expression of bacterial and cyanobacterial genes by isolated cucumber etioplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6349-6353.
- Davoodi-Semiromi, A., Schreiber M, N. S., D, V., ND, S., RK, B., D, C., & H, D. (2010). Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol J.*, 223-242.
- Flores Villanueva P., R.-T. J. (1998). CONCEPTOS ACTUALES ACERCA DE LA INFECCIÓN POR VIH Y SU EVOLUCIÓN A SIDA. *DERMATOLOGÍA PERUANA*, 1,2.
- Garfinkel, D. J. (1981). Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell. Vol. 27* , pag. 143-153.
- Gelvin, S. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the Biology behind the “GENE-Jockeying” TOOL. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 16-37.
- Giddings, G. (2001). Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol*, 12:450{454. 8, 15, 56, 91.
- H. Koprowski, V. Y. (2001). The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Elsevier*, 2735–2741.

- Hefferon, K. (2013). Plant-derived pharmaceuticals for the developing world. *Biotechnol J*, 1193-1202.
- Holaskova E, G. P. (2015). Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnol Adv*, 1005-1020.
- Julie A. Z. Zedler, D. G. (2016). Pilot-scale cultivation of wall-deficient transgenic *Chlamydomonas reinhardtii* strains expressing recombinant. *BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING*.
- Kirchhoff, F., Schindler, M., Specht, A., & Münch, N. A. (2008). Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-5.
- Kwon KC, V. D. (2013). Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 788-799.
- Maliga, P. C. (1993). Plastid engineering in land plants - a conservative genome is open to change. *Philos.Trans. Roy. Soc. B.,* 342:203{208.
- Novitsky V, e. a. (2003). Association between Virus-Specific T-Cell Responses and Plasma Viral Load in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C. *Journal of Virology*, 77:882-890.
- Obregon, P. C.-C. (2006). HIV-1 p24-immunoglobulin fusion molecule: a new strategy for plant-based protein production. *Plant Biotechnol. J.* , 195–207.
- ONU. (2016). *ONUSIDA*. Obtenido de Hoja informativa — Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de sida: <http://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>
- Penney C, T. D. (2011). Plant-made vaccines . *Millennium Development Goals Plant Cell Reports*, 30:789-798.
- Peter, F. (1998). HIV Nef: The Mother of All Evil? *Immunity*, Vol. 9, 433–437.
- Ruf, S. H. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. . *Nat. Biotechnol.* , 19, 870–875.
- Shih SMH, D. P. (2009). Foreign protein production using plant cell and organ. *Advantages and limitations Biotechnology Advances*, 27:1036-1042.
- Singh ND, D. H. (2010). Chapter 18 Chloroplast Genetic Engineering: A Novel. In: *Rebeiz C et al. (eds) The Chloroplast, vol 31. Advances in Photosynthesis*, 263-284.
- Tremblay, R., Wang, D., Jevnikar, A. M., & Ma, S. (2009). Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances*, 216-221.
- Wang, H., Mo, Q., & Yang, Z. (2015). HIV vaccine research: The challenge and the way forward. *J. Immunol Res.*, 503978.
- Wilen, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012). HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* , 1.

Wurbs, D. R. (2007). Contained metabolic engineer- ing in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J*, 49, 276–288.

Zambryzki, P. e. (1983). Ti-plasmid vector for Ti-plasmid vector for without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal*, pag 2143-2150.