



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EXPRESIÓN E INMUNOREACTIVIDAD DE LOS
ANTÍGENOS MAP1609C Y MAP0586C DE
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*
PRODUCIDOS EN ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Agricultura Sustentable)

Presenta

CRISTHIAN FRANCISCO SÁNDEZ ROBLEDO

La Paz, Baja California Sur, Junio de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 16 del Mes de Junio del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Expresión e Inmunoreactividad de los antígenos MAP1609c y MAP0586c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* producidos en Alfalfa (*Medicago sativa* L.)"

Presentada por el alumno:

Cristhian Francisco Sáñez Robledo

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

INSERTAR NOMBRE
DIRECTOR DE TESIS


Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Resumen.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente epidemiológico de la Paratuberculosis; una enfermedad crónica gastrointestinal en rumiantes. Los antígenos recombinantes MAP1609c y MAP0586c han demostrado inmunoprotección en el modelo murino frente a un reto infeccioso experimental con MAP. Se ha sugerido el desarrollo de vacunas orales basadas en antígenos recombinantes producidas en plantas como una alternativa potencial para el control enfermedades infecciosas. Con base a lo anterior se formuló la hipótesis: si los antígenos MAP1609c y MAP0586c de MAP son expresados correctamente, su inmunoreactividad podrá ser evaluada utilizando anticuerpos de animales infectados naturalmente. El objetivo de este trabajo fue analizar la producción e inmunoreactividad de los antígenos MAP1609c y MAP0586c en alfalfa. Los embriones de plantas transgénicas fueron individualizados y analizados mediante un bioensayo de generación de callo y PCR de punto final, estableciéndose 50 líneas con el gen MAP0586c y 24 líneas con el gen MAP1609c. La expresión de antígenos recombinantes en alfalfa se analizó utilizando anticuerpos de animales infectados naturalmente con MAP siendo la línea 20 (MAP1609c) y 41 (MAP0586c), las de mayor expresión. La inmunoreactividad de extractos proteicos de las líneas 20 y 41 de alfalfa se analizó con 35 sueros distintos de animales infectados naturalmente observando diferencias en los títulos de anticuerpos mediante ELISA indirecta. Se expresaron los antígenos en *Escherichia coli* y fueron analizados mediante Western blot y ELISA indirecta utilizando anticuerpos específicos producidos en ratón mediante inmunización con ADNp. Se observaron diferencias significativas frente a extractos proteicos de *E. coli* entre los grupos de ratones inmunizados, siendo el grupo inmunizado con el gen MAP1609c el de mayor producción de anticuerpos específicos. Los datos obtenidos se analizaron mediante Análisis de Varianza de Rangos Kruskal-Wallis de una vía, ANOVA de una o dos vías dependiendo del experimento. Las proteínas recombinantes expresadas en alfalfa fueron reconocidas por anticuerpos de animales infectados naturalmente, siendo la línea 41 y 20 las de mayor expresión. Los antígenos recombinantes expresados en *E. coli* fueron reconocidos por anticuerpos de animales infectados naturalmente, así como por anticuerpos de animales inmunizados. Los ratones inmunizados con el gen MAP1609c generaron una respuesta inmune de tipo Th2 (humoral) mientras que los ratones inmunizados con el gen MAP0586c pudieron haber generado una respuesta Th1 (celular).

Palabras clave: Paratuberculosis, Alfalfa, Vacuna.

Abstract.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the epidemiological agent of Paratuberculosis; a chronic ruminant gastrointestinal disease. Recombinant antigens MAP1609c and MAP0586c have conferred protection in the mouse model against an infectious challenge with MAP. Moreover, it has been suggested the development of edible vaccines based in recombinant antigens produced in plants as a potential alternative for control of infectious diseases. Based on the above hypothesis was formulated: if antigens MAP1609c and MAP0586c of MAP are expressed correctly, its immunoreactivity could be assessed using antibodies from naturally infected animals. The objective of this study was to analyze the production and immunoreactivity of recombinant antigens MAP1609c and MAP0586c in Alfalfa. Transgenic plant embryos were individualized and analyzed through a callus generating bioassay and PCR, and 50 and 24 plant lines with genes MAP0586c and MAP1609c, respectively, were established. Recombinant antigen expression was analyzed using antibodies from MAP naturally infected animals, lines 20 (MAP1609c) and 41 (MAP0586c) showed the highest expression. Immunoreactivity of alfalfa proteic extracts of lines 20 and 41 was analyzed using 35 different sera from naturally infected animals and antigen recognition was observed as well as differences in antibodies titles in sera in ELISA test. Antigens were expressed in *Escherichia coli* and then analyzed through Western blot and indirect ELISA using specific antibodies produced in pDNA immunized mice. Significant differences between immunized mice groups were observed using *E. coli* extracts, and MAP1609c immunized group showed the highest specific antibody production. Data was analyzed through one way Kruskal-Wallis Analysis of Variance of Ranks, and one or two way ANOVA, depending on the experiment. As conclusions, recombinant proteins expressed in alfalfa were recognized by naturally infected animals, and lines 41 and 20 showed the highest expression. Recombinant antigens expressed in *E. coli* were recognized by naturally infected and immunized animals antibodies. MAP1609c immunized mice developed a Th2 immune response (humoral) while MAP0586c immunized mice could have developed a Th2 immune response (cellular).

Key words: Paratuberculosis, Alfalfa, Vaccine.

A mi madre, te debo todo lo que soy
A mi padre y mi hermano gracias por estar siempre conmigo
A mi abuela Kika, la extraño demasiado
A toda mi familia

*“Ni el más sabio
conoce el fin de todos los caminos”*
J. R. R. Tolkien

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, Biología Vegetal y Patogénesis Microbiana del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y fue financiado por el proyecto: “Identificación y Evaluación de Vacunas Comestibles en Alfalfa para Prevenir la Paratuberculosis (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) de rumiantes domésticos de México SEP-CONACYT (No. 151818).

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer en primer lugar a la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro (Lab. De Biología Molecular de Plantas, CIBNOR) por aceptarme en aquel verano científico de 2010 lo cual incrementó mi interés por hacer ciencia y seguir en la investigación, así como todo su apoyo y consejo a lo largo del proyecto. Le agradezco enormemente al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle (Lab. de Patogénesis Microbiana, CIBNOR) por su invaluable orientación, por todas esas reuniones de comité con las cuales fuimos planeando las estrategias a seguir con los resultados generados, y por su gran paciencia. Al M. en C. Julio Antonio Hernández González (Lab. de Biología Molecular de Plantas, CIBNOR), quien a lo largo de mi recorrido por el CIBNOR no solo me ha brindado consejo, ayuda y ánimo, sino que fue la primer persona quien me brindó su amistad en la institución y la cual valoro muchísimo.

Al Tec. Arturo Pedro Sierra Beltrán (Lab. de Proteómica, CIBNOR) por su enorme e importante apoyo con toda la parte relacionada a inmunología y proteómica, por guiarme en una rama en la cual no tenía experiencia alguna, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme estar día y noche trabajando, y finalmente, por brindarme su amistad. Quiero agradecer enormemente a la Dra. Martha Reyes Becerril (Lab. Patogénesis Microbiana) quien me permitió trabajar día, noche e incluso fines de semana en su laboratorio, por tener la confianza de que este se encontraría intacto al día siguiente. Quiero agradecer de igual manera al Dr. Amaury Cordero (Bioterio, CIBNOR) por su orientación y disposición durante el bioensayo con los ratoncillos. A la Dra. Angélica Villaruel (UDG), con quien no tuve el placer de trabajar pero estuvo pendiente de los resultados. A la Dra. Kris Huygen (Scientific Institute of Public Health WIV-ISP, Bélgica) por donar las secuencias nucleotídicas de los antígenos usados en esta investigación. A la Dra. Virginie Roupie (Unit “Bacterial Zoonoses of livestock”, Operational Direction Bacterial Diseases, CODA-CERVA, Bélgica) quien estuvo al tanto de mis resultados y me facilitó los protocolos de sus técnicas. A la Dra. Sawako Hori (Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias-UABC) por donar los sueros de animales infectados naturalmente. También quiero

agradecer a la Lic. Osvelia Ibarra Morales y la Lic. Leticia González Rubio Rivera, por su apoyo y paciencia a lo largo de la maestría. Quiero agradecer también a CONACyT por la beca otorgada.

Al M. en C. Mario Arce Montoya, por la descomunal tarea de soportarme cuando andaba de buenas y de malas, de tener la paciencia al ayudarme con mis plantas inclusive en fines de semana, por su apoyo no tan solo en el ámbito científico sino personal, y brindarme su amistad la cual valoro muchísimo y espero y dure muchísimos años más. A mis compañeros de maestría por su sincera amistad y por todas las fiestas antiestrés (que eran obligatorias para no sufrir colapsos tan recurrentes), a mis compañeros de laboratorio con quienes es agradable trabajar, a Mario, Héctor, y Carlos, por esas salidas al Fritz a pasar un buen rato y que en verdad me ayudaron mucho. A mis amigos ajenos al CIBNOR quienes tenían que soportar mis caras de fastidio y cansancio constantes por el desgaste del trabajo durante la maestría. A mis tíos, tías, primos, primas, a mis abuelos por su cariño, disculpen mi ausencia durante este largo recorrido que fue la maestría.

A mis padres, por regalarme la vida, por apoyarme siempre, por creer en mi y amarme tanto, por levantarme la innumerable cantidad de veces que me sentí decaído, molesto y solo, por ser ustedes las personas que más amo en la vida, a las que les debo todo lo que soy y por quienes me esfuerzo constantemente para hacer sentir orgullosos, por ser las personas que más admiro en el mundo y que quiero tener a mi lado para siempre, soy afortunado en verdad por tenerlos a mi lado. A mi chamaco Johnny que me acompañó en mis desvelos, y se acostaba sobre la computadora para que me tomara un descanso.

Y finalmente quiero agradecer a la primer persona que hizo posible este trabajo, a la persona que siempre estuvo al tanto de mi progreso, de mis resultados, de los experimentos, que siempre se preocupó por mi no solo en el ámbito académico, sino en el personal, quien me está formando como investigador todos los días y que no solo me brindó su tutoría sino su sincera amistad. A esa persona a la que le agradeceré de por vida su apoyo, su sinceridad y su fé en mi (en las buenas y aun más en las malas), y a la que le agradeceré también por soportar todos mis defectos, de los cuales quiero deshacerme, por su inmesurable paciencia...esa persona es usted Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez (Lab. Patogénesis Microbiana, CIBNOR), mil gracias.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL GÉNERO <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 El complejo MAC.....	5
1.2 La enfermedad de Johne o Paratuberculosis.....	7
1.2.2 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	8
1.2.3 Distribución.....	10
1.2.4 Paratuberculosis en México.....	11
1.2.5 La enfermedad de Crohn.....	12
1.2.6 Patogénesis y respuesta inmune.....	13
1.3 Vacunación contra la Paratuberculosis.....	18
1.3.1 Bacterias vivas o muertas inactivadas.....	19
1.3.2 Vectores de expresión de subunidades proteicas.....	20
1.3.3 Vacunas basadas en subunidades protéicas.....	21
1.4 Vacunas producidas en plantas.....	24
1.4.1 Plataformas de expresión.....	28
1.4.2 Componentes moleculares generales que afectan la expresión de las proteínas recombinantes.....	30
2. ANTECEDENTES.....	34
3. JUSTIFICACIÓN.....	38
4. HIPÓTESIS.....	39
5. OBJETIVOS.....	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
6.1.1. Bioensayo de inducción de callo.....	40
6.2. Confirmación de transformación de alfalfa mediante PCR.....	41
6.2.1. Extracción de ADNg de alfalfa.....	41
6.2.3. Verificación de integridad de ADNg vegetal extraído mediante PCR.....	41
6.2.4. PCR de líneas de alfalfa transformantes con los genes MAP1609c y MAP0586c.....	42

6.3. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes MAP1609c y MAP0586c en <i>E. coli</i>	43
6.3.1 Crecimiento e inducción del cultivo.....	43
6.3.2 Extracción de proteína de <i>E. coli</i>	44
6.4. Identificación de líneas de alfalfa con mayor expresión de antígeno recombinante..	44
6.4.1. Extracción de proteínas de alfalfa.	44
6.4.2. ELISA indirecto de proteínas recombinantes de alfalfa.....	45
6.5 Producción de anticuerpos específicos contra las proteínas MAP1609c y MAP0586c.	45
6.5.1 Ratones.....	45
6.5.2 Purificación de ADNp con los genes MAP1609c y MAP0586c por lisis alcalina con SDS (Modificado de Sambrook and Russell).....	46
6.5.3 Inmunización de ratones.....	47
6.5.4 ELISA indirecta con sueros de ratones inmunizados.....	48
6.6 Análisis estadístico.....	49
7. RESULTADOS.....	50
7.1 Desarrollo y multiplicación de embriones de alfalfa con las construcciones MAP1609c y MAP0586c.....	50
7.1.1 Bioensayo de inducción de callo.....	52
7.2 Análisis molecular de transformantes de alfalfa con los genes MAP1609c y MAP0586c.....	53
7.3 Identificación de las líneas de alfalfa con mayor expresión de las proteínas recombinantes MAP1609c y MAP0586c.....	55
7.4 Inmunoreactividad de extractos proteicos de las líneas 20 y 41 transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c con sueros de animales infectados naturalmente con MAP.....	56
7.5 Expresión y purificación de proteínas recombinantes de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> en <i>Escherichia coli</i>	58
7.6 Inmunoreactividad de sueros de ratones inmunizados con ADN plasmídico con los genes MAP1609c y MAP0586c frente extractos de alfalfa transgénica.....	60
7.7 Inmunoreactividad de sueros de ratones inmunizados con ADN plasmídico con los genes MAP1609c y MAP0586c frente extractos de <i>E. coli</i> transformante.....	61

8. DISCUSIÓN.....	63
9. CONCLUSIONES.....	68
10. LITERATURA CITADA.....	69
ANEXO I. Material biológico.....	105
ANEXO II. Vectores de transformación.....	106
ANEXO III. Medios de cultivo, antibióticos y reguladores de crecimiento.....	108
ANEXO IV. Soluciones y reactivos.....	111
ANEXO V. Tabla resumen de bioensayo de regeneración de callo.....	114

Lista de figuras.

Figura 1. Representación esquemática de la pared celular micobacteriana.....	2
Figura 2 . Morfología característica de colonia de mycobacterias	3
Figura 3. Distribución mundial de la Paratuberculosis (Periodo Ene-Jun 2013).....	11
Figura 4. Tácticas de invasión de MAP hacia la pared intestinal y macrófagos	15
Figura 5. Modelo simplificado de la respuesta inmune contra la paratuberculosis.....	16
Figura 6. Desarrollo de embriones y conversión a planta.....	50
Figura 7. Proliferación celular de explantes foliares de alfalfas transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c.....	52
Figura 8. Amplificación de ADN genómico de líneas de alfalfa transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c.....	54
Figura 9. ELISA indirecta con líneas de alfalfa transformadas con los genes MAP1609c (85) y MAP0586c (86).....	55
Figura 10. ELISA indirecta con extractos protéicos de la línea 20 de alfalfa transformada con el gen MAP1609c.....	57
Figura 11. ELISA indirecto con extractos protéicos de la línea 41 de alfalfa transformada con el gen MAP0586c.....	58
Figura 12. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> transformadas con los plásmidos pQE-80L::MAP1609c y pQE-80L::MAP0586c.....	59
Figura 13. ELISA indirecta con sueros de ratones inmunizados con los plásmidos pV1J.ns-tPA::MAP1609c, pV1J.ns-tPA::MAP0586c frente a proteínas de alfalfa transgénicas y silvestre	61
Figura 14. ELISA indirecta con sueros de ratones inmunizados con los plásmidos pV1J.ns-tPA::MAP1609c y pV1J.ns-tPA::MAP0586c frente a extractos de <i>E. coli</i> DH5 α expresantes de las proteínas recombinantes MAP1609c y MAP0586c.....	62

Índice de tablas.

Tabla I. Características de vacunas de bacterias completas en aceite, contrastadas con una vacuna hipotética ideal contra MAP	18
Tabla II. Resumen de candidatos vacunales protéicos y de ADN evaluados en animales. Tomado de Paratuberculosis	22
Tabla III. Antígenos vacunales producidos en plantas que reportan inmunogenicidad o inmunoprotección.	25
Tabla IV. Comparación de producción de proteínas recombinantes en plantas, bacterias y sistemas de mamíferos.	27
Tabla V. Número de embriones desarrollados a partir de explantes de alfalfa transformada con los genes MAP1609c y MAP0586c.	51
Tabla VI. Bioensayo de inducción de callo con plantas de alfalfa transformadas con el gen MAP0586c	114
Tabla VII. Bioensayo de inducción de callo con plantas de alfalfa transformadas con el gen MAP1609c	116

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 EL GÉNERO *Mycobacterium*.

1.1.1 Generalidades.

El género *Mycobacterium* se compone de un número de bacterias aeróbicas Gram positivas y es el único miembro de la familia Mycobacteriaceae dentro del orden de los Actinomycetales (Saviola y Bishai, 2006). El género además comparte un inusual alto contenido genómico de G+C (62-70%) (Saviola y Bishai, 2006). Las micobacterias se han clasificado convencionalmente en 4 o 5 grupos taxonómicamente amplios en base a los siguientes criterios generales: patogenicidad para humanos y animales, velocidad de crecimiento a temperaturas óptimas, y el efecto de la luz visible en la producción de pigmentos (Good, 1985; Runyon, 1974; Timpe y Runyon, 1954). Estos microorganismos poseen forma de bastoncillo de aproximadamente 0.2-0.6 x 1.0-10 μm (Hartmans et al, 2006) y pueden ser teñidas mediante técnicas de ácido-alcohol; una mezcla del colorante fucsina con fenol (tinción Ziehl-Nielsen). Esta característica se debe a la presencia de lípidos llamados ácidos micólicos, los cuales se encuentran únicamente en las especies del género *Mycobacterium*. La envoltura está compuesta de una variedad de proteínas solubles, carbohidratos y lípidos y básicamente 3 componentes macromoleculares insolubles: arabinogalactano, peptidoglicano y ácido micólico (Fig. 1) (McNeil y Brennan, 1991). Los ácidos micólicos son un grupo complejo de lípidos hidroxilados de cadena ramificada conjugados covalentemente al peptidoglicano de la pared celular; confiriéndole una consistencia cerosa e hidrofóbica. Juntas, estas macromoléculas insolubles constituyen la cubierta de micolilarabinogalactanopeptidoglicano de la pared celular, uno de los dos lipopolisacáridos comunes de las micobacterias. Además, todas las micobacterias poseen un segundo lipopolisacárido como componente de su pared celular: lipoarabinomanano (Inderlied et al., 1993). Esta envoltura compleja hidrofóbica no permite una tinción rápida (como la tinción Gram) con colorantes de anilina, es debido a esto que se consideran Gram positivas.

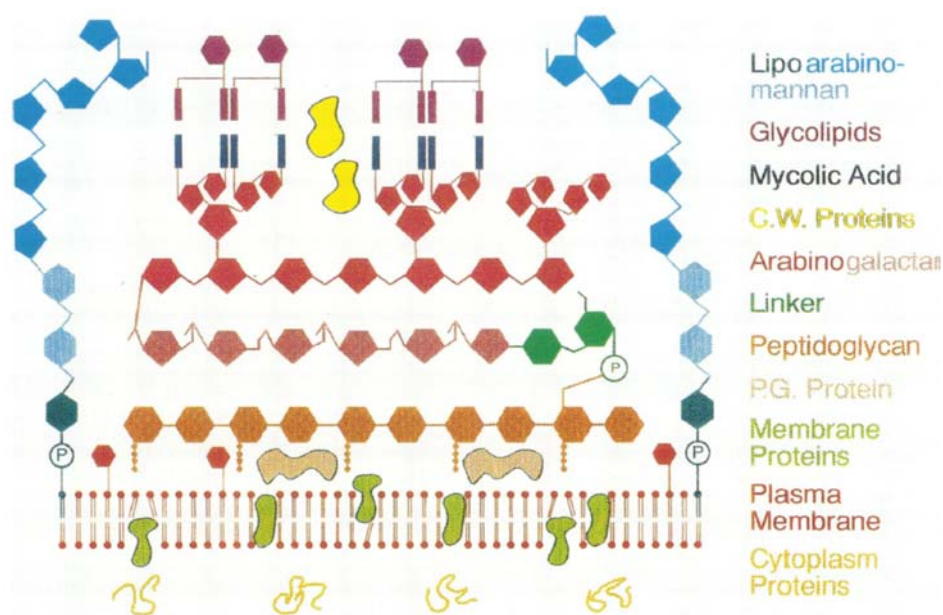


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular micobacteriana, tomado de McNeil y Brennan, 1991.

El número de especies *Mycobacterium* se ha incrementado en 40 desde 1980 (Skerman et al., 1980) a 110 en 2004. La descripción de nuevas especies ha sido paralela al descubrimiento de métodos moleculares y por el reconocimiento de que las especies de lento crecimiento son clínicamente importantes, y las de rápido crecimiento son ecológicamente importantes. La alta relación entre las cepas de micobacterias y el descubrimiento de una única copia del operon *rrn*, que le da microheterogeneidad a las secuencias, convirtió al gen 16S rRNA como un blanco ideal para la diferenciación entre cepas (De Smet et al., 1996; Holdberg-Petersen et al., 1999). Para aquel taxa de micobacterias el cual no puede ser diferenciado en base a su secuencia genética 16S rRNA, se han utilizado otros genes, tales como *gyrB* (Kasai et al., 2000; Niemann et al., 2000), *hsp65* (Devallois et al., 1997; Ringuet et al., 1999) y espaciadores intraespecíficos (De Smet et al., 1995; Roth et al., 2000b).

La mayoría de las 50 especies que comprenden al género *Mycobacterium* son bacterias ambientales no patogénicas relacionadas a las bacterias de suelo *Streptomyces* y *Actinomyces*. Sin embargo, existen algunas especies las cuales son patógenas exitosas como

Mycobacterium tuberculosis, *M. lepreae* y *M. ulcerans*, los agentes causantes de la tuberculosis, lepra y la úlcera de Buruli, respectivamente. La clave de su patogenicidad radica, en parte, a su habilidad para establecerse y proliferar dentro de los macrófagos del hospedero a pesar de las propiedades antimicrobianas de estas células (Dannenberg, 1993; Ernst, 1998). Las Micobacterias son hasta cierto punto pleomórficas y pueden desarrollar ramificaciones e incluso crecimiento filamentososo. Sin embargo, en contraste con los filamentos de los actinomicetos, los filamentos de las micobacterias se fragmentan incluso con la más pequeña perturbación y los verdaderos micelios no se forman. En general, las micobacterias pueden separarse en dos grandes grupos: crecimiento lento y crecimiento rápido.

Al cultivarse micobacterias en un medio sólido, estas forman colonias compactas y rugosas. Esta morfología de colonia es probablemente debido al alto contenido de lípidos y a la naturaleza hidrofóbica de su superficie celular, lo que facilita que estas células se peguen una con otra. En su mayoría, las micobacterias requieren de nutrientes simples para su crecimiento. La mayoría de las especies puede crecer aerobicamente en un medio salado mineral simple con amonio como fuente de nitrógeno y glicerol o acetato como única fuente de carbono y donador de electrón.

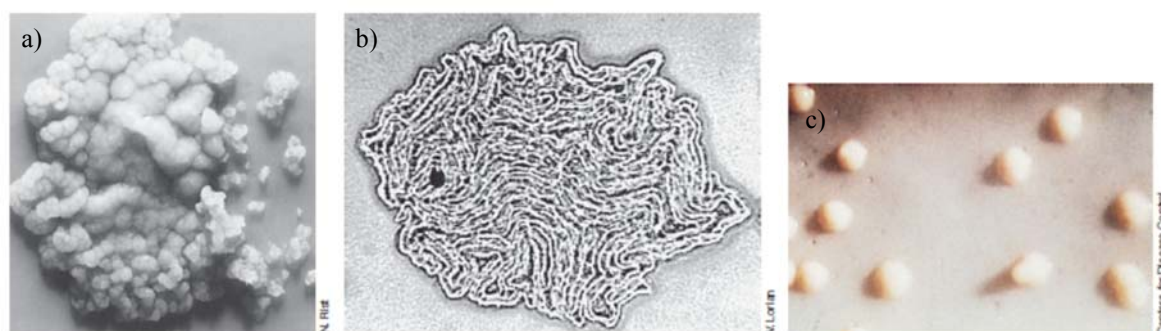


Figura 2 . Morfología característica de colonia de mycobacterias.

(a) *Mycobacterium tuberculosis*, con apariencia compacta y rugosa, la colonia es aproximadamente de 7 mm de diámetro. (b) Una colonia de *M. tuberculosis* en etapa temprana, mostrando el crecimiento característico con forma de cuerda. (c) Colonias de *Mycobacterium avium* de un cultivo aislado como un patógeno oportunista de un paciente con SIDA. Tomado de Brock, *Biology of Microorganisms*, 13ª Ed. 2012.

Las micobacterias han sido aisladas de un diverso arreglo de ambientes incluyendo material de origen mamífero y no mamífero, como por ejemplo agua dulce y salada, suelo, y polvo. Algunas especies no patogénicas saprófitas pueden también aparecer como patógenos oportunistas. Aunque muchas micobacterias han sido aisladas de muestras ambientales, esto no necesariamente significa que esas cepas crezcan bajo esas condiciones ya que se necesita que sean capaces de multiplicarse. Al no poseer la propiedad de multiplicarse activamente se les considera contaminantes, y la discriminación entre estas dos posibilidades es muy difícil debido a que las oportunidades de aislar micobacterias “contaminantes” son altas. Lo anterior resulta de la habilidad de las micobacterias para sobrevivir por periodos muy largos de tiempo bajo condiciones sin crecimiento. *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, por ejemplo, ha sido reportado que puede sobrevivir durante 252 días en una mezcla de agua-suelo (Kazda, 1983).

Kazda (1983) clasificó a las micobacterias en cuatro grupos en base a sus propiedades ecológicas relevantes. Diferenció patógenos obligados, patógenos facultativos, potencialmente patógenos y especies saprofitas. Dentro del grupo de patógenos obligados, los cuales se presume que no pueden multiplicarse fuera de seres vivos, se encuentran las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanus*, *M. asiaticus*, *M. malmoense*, *M. microti*, *M. simiae*, *M. szulgai* y *M. haemophilum*. Algunos ejemplos de los patógenos facultativos son *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. senegalense*, *M. scrofulaceum* y *M. xenopi* (Kazda, 1983). Estas especies pueden crecer en diferentes biotopos naturales sin perder sus propiedades patogénicas (Tsukamura, 1984). *M. lepreae*, *M. paratuberculosis* y *M. ulcerans* fueron asignados al grupo de patógenos facultativos ya que su incidencia en biotopos naturales no ha sido investigada a detalle. Las micobacterias saprofitas incluyen entre otras a las especies de lento crecimiento *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum*, *M. triviale*, *M. terrae* y *M. gastri*. Los grupos saprofitico y potencialmente patogénico se encuentran en muchos ambientes y solo ocurren ocasionalmente como flora de acompañamiento en procesos patogenicidad.

1.1.2 El complejo MAC.

Las micobacterias incluidas en el complejo MAC (*Mycobacterium avium* complex en inglés) se clasifican como ácido-alcohol resistentes, bacilos de lento crecimiento que pueden producir una pigmentación amarilla en ausencia de luz (la exposición a la luz a menudo intensifica la producción de pigmentación). El complejo MAC está compuesto de patógenos oportunistas capaces de causar enfermedad tanto en animales (Thoen et al., 1981) como en humanos (Iseman et al., 1985; Young et al., 1986). EL MAC es un complejo serológico de 28 serovares de 2 especies, *M. avium* y *M. intracellulare*, el cual algunas veces se extiende con 3 serovares adicionales de una tercer especie, *M. scrofulaceum*. Por lo anterior, la literatura de micobacterias se refiere al complejo como: Complejo *M. avium*-*M. intracellulare* o el complejo intermedio *M. avium*-*M. intracellulare*-*M. scrofulaceum* (Wayne et al., 1992). La distinción entre *M. avium* y *M. silvaticum* fue establecida por Thorel (1990) y se propusieron 3 subespecies de *M. avium* en base a sus propiedades fenotípicas y estudios de ácidos nucleicos: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *M. avium* subsp. *hominissuis* (Mijls et al., 2002). Investigaciones más recientes han propuesto la integración de *M. chimmerae* (Tortoli et al., 2004) y *M. colombiense* (Murcia et al., 2006) dentro del complejo.

Tal vez una de las características más importantes del complejo MAC es la ocurrencia de variaciones de tipos de colonia. Se han descrito 3 variantes de colonia: (1) liso, opaco y abovedado; (2) liso, transparente y plano y (3) rugoso (Inderlied et al., 1993). Se ha reportado que las variantes de colonia translúcidas son más resistentes a agentes antimicrobianos (Rastogi et al., 1981; Saito y Tomioka, 1988; Woodley y David, 1976), y hay evidencia basada tanto en estudios en macrófagos como en animales de que estas variantes son más virulentas (Crowle et al., 1986; Meylan et al., 1990; Rulong et al., 1991; Schaefer et al., 1970). Stormer y Falkinham (1989) aislaron variantes de colonia sin pigmentación de fuentes ambientales y de material clínico de pacientes con SIDA y demostraron que estas variantes eran significativamente más resistentes a agentes antimicrobianos que segregados con pigmentación de las mismas cepas. Además, los

segregados pigmentados crecían más rápidamente en medio con agar, dejando la incertidumbre de pasar por alto las variantes sin pigmentación al seleccionar colonias para pruebas de susceptibilidad. Woodley y David (1976) demostraron que la velocidad de la transición transparente a opaco era dependiente de la temperatura y que no es una consecuencia de mutación. Años después, Thorel y David (1984) demostraron que hay diferencias significativas en la expresión de antígenos de superficie celular entre los variantes de colonia transparentes y opacos; sin embargo, tales diferencias específicas no fueron relacionadas a diferencias funcionales como resistencia antimicrobiana o patogenicidad.

Mientras que los humanos son altamente susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* y *M. lepreae*, la mayoría de las personas que están expuestas a estas bacterias nunca desarrollan la enfermedad clínica, lo cual indica que el sistema inmune normal puede controlar estos microorganismos (Chester y Winn, 1986; Wolinsky, 1984). Esta observación se aplica en mayor medida a la exposición de los organismos de MAC, ya que, a pesar de evidencia de exposiciones tan altas como un 70%, la incidencia de enfermedad clínica es muy baja (<10 casos por 100,000 de población). Aun así, para las personas inmunológicamente comprometidas, *M. avium* parece tener predilección especial por infectar y diseminarse en pacientes con VIH.

Las cepas virulentas del complejo MAC pueden invadir y sobrevivir dentro de otras células además de fagocitos mononucleares y células epiteliales. Esta habilidad para infectar una variedad de tipos celulares puede estar relacionada a la persistencia de infección en el hospedero inmunocomprometido. Bermudez (2010) demostró que los organismos del MAC pueden infectar y multiplicarse dentro de los fibroblastos y, una vez dentro de ellos, las micobacterias se encuentran protegidas contra mecanismos no específicos de eliminación. Una vez que los bacilos se encuentran en un ambiente intracelular, la citotoxicidad mediada por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I, por sus siglas en inglés) y células NK (Natural Killer) o linfocitos T CD8⁺ es necesaria para liberar al bacilo de las células. A pesar de que es difícil evaluar la importancia total de la habilidad de MAC para

infectar fagocitos “no específicos”, es posible que una respuesta citotóxica deteriorada profundamente, la capacidad de invadir fibroblastos, células endoteliales, y otros fagocitos no específicos, contribuya a la persistencia y difusión de MAC.

1.2 La enfermedad de Johne o Paratuberculosis.

1.2.1. Etiología e historia.

Las micobacterias han causado enfermedad mucho tiempo atrás, desde que se ha podido encontrar evidencia. Lesiones medulares debido a la infección por micobacterias han sido halladas en huesos fosilizados desde hace más de 10000 años; las lesiones pulmonares que se tiene registro datan de hasta el año 1000 antes de la era común (Murray, 2004). A medida que las civilizaciones se urbanizaron, sus habitantes fueron víctimas de la más devastadora de todas las enfermedades micobacterianas, la tuberculosis.

Por otra parte, la Paratuberculosis o enfermedad de Johne es debida a la infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que es el agente etiológico. La Paratuberculosis es una enfermedad de inflamación gastrointestinal crónica que afecta a rumiantes domésticos y salvajes y algunos no rumiantes; está caracterizada por linfangitis y linfadenitis regional y enterocolitis granulomatosa. Los signos clínicos de la paratuberculosis son diarrea crónica, emaciación (pérdida de peso), decremento en la producción de leche, y eventualmente la muerte (Olsen et al., 2002; Manning, 2001; Chacon et al., 2004; Clarke 1997).

En 1894, en la región de Oldenburg en Alemania, un granjero consiguió una vaca que no producía leche y no subía de peso. Inicialmente se pensó que la tuberculosis intestinal, causada por *M. tuberculosis* era la culpable, aunque el animal resultó negativo a la prueba cutánea de la tuberculina. Al morir el animal, el estómago, intestinos y el mesenterio se enviaron para su examen a la Unidad de Patología Veterinaria en Dresden. Allí los tejidos fueron analizados por los Doctores Heinrich Albert Johne y Langdon Frothingham. Ellos notaron el engrosamiento de la mucosa intestinal y el crecimiento de los nódulos linfáticos mesentéricos. Utilizando una tinción de ácido-alcohol pudieron observar abundantes

bacterias a lo largo de los tejidos inflamados. Aunque los organismos tenían parecido con aquel que causaba la tuberculosis, una prueba de infección con cerdos de guinea utilizando los tejidos infectados falló. Johne y Frothingham concluyeron que la enfermedad era causada por la bacteria que causaba la tuberculosis en aves (después llamada *Mycobacterium avium*), y al notar similitudes patológicas a la tuberculosis intestinal, propusieron el nombre “enteritis pseudotuberculosis” (Johne y Frothingham, 1895). Una observación por serendipia le permitió al científico británico Frederick William Twort (Fildes, 1951) aislar al agente etiológico de la enfermedad de Johne. Al trabajar con cristalería no completamente limpia, Twort notó el crecimiento de pequeñas colonias satélites alrededor de colonias de *M. phlei* que se preparaba a descartar. Sospechando que *M. phlei* le proveía algún nutriente esencial, Twort adicionó una preparación de estas células inactivadas por calor al medio de cultivo, el cual le permitió cultivar a esta nueva bacteria ácido-cohol resistente a la cual llamó “*Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis, Johne*” (Twort e Ingram, 1912). Las siguientes décadas se centraron en el mejoramiento de los métodos de laboratorio para el cultivo del organismo y la evaluación de pruebas de diagnóstico usando estos primeros aislados (Twort e Ingram, 1913). Ya que el agente etiológico pudo ser cultivado en el laboratorio, una tuberculina llamada “johnina” se desarrolló para las pruebas de diagnóstico.

1.2.2 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es una bacteria resistente, y se encuentra clasificada dentro de las especies de micobacterias de lento crecimiento al igual que *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium leprae*, las cuales son patógenos importantes de animales y humanos, ya que se piensa que MAP podría tener potencial zoonótico (Rowe y Grant, 2006). Es ácido-alcohol resistente, aerobia y requiere del factor de crecimiento micobactina ya que es incapaz de producir este sideróforo de hierro (Barclay y Ratledge, 1983). Este patógeno intracelular está protegido por una compleja y característica pared celular micobacteriana compuesta por un 60% de lípidos. Como se mencionó anteriormente, la pared le confiere sus propiedades de hidrofobicidad (McNeil et al., 1991; Primm et al., 2004), le permite sobrevivir en el

ambiente y contribuye a su resistencia a bajo pH, altas temperaturas, agentes químicos (como por ejemplo clorina, Whan et al., 2001) y a procesos físicos como la pasteurización (Grant et al., 1996). El lipoarabinomano (LAM) y el arabinomano (AM) son componentes estructurales de la pared celular en MAP. Esta pared celular rica en lípidos le confiere a esta micobacteria una ventaja de supervivencia, pero la consecuencia de esta defensa es la lenta velocidad de crecimiento debido a la restricción de consumo de nutrientes (Domingue y Woody, 1997). MAP es la micobacteria de más lento crecimiento, con un tiempo de generación bajo condiciones óptimas de más de 20 h (Lambrecht et al., 1988), requiere de al menos 8-16 semanas para producir colonias visibles, y algunas cepas deben ser cultivadas hasta por 6 meses o más.

MAP puede ser bioquímicamente inactivo y la identificación se basa generalmente en la dependencia de micobactina y la detección molecular de la secuencia de inserción IS900 por medio de PCR (Collins et al., 1989; Green et al., 1989). Comparte más del 99% de homología con *M. avium* subsp. *avium*, la cual causa tuberculosis en aves. Las secuencias de RNA ribosomal 16S (RNAr) de estos dos taxa son idénticos (Billman-Jacobe et al., 1992), y han sido clasificadas como subespecies de *M. avium* (Thorel et al., 1990). La era de investigación postgenómica de *M. paratuberculosis* comenzó en 2005 con la publicación del genoma completo de la cepa K-10, que fue aislada de un hato lechero en Wisconsin en el año 1990 (J. Hensen, Iowa, 2009). El resultado de la secuenciación fue de un genoma de 4,829,781 pares de bases (Li et al., 2005). Se predijeron 4350 marcos de lectura y los análisis automatizados siguientes mostraron un total de 4587 genes (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=ntma03>). El genoma de MAP se caracteriza por su alto contenido de los nucleótidos guanina y citocina (69.3%), así como la abundancia de secuencias de inserción y proteínas PE/PPE, similares a las de otras micobacterias secuenciadas.

MAP es más termoresistente que *M. avium*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, y *M. xenopi* (Schulze y Buchholtz, 1992). Esta tolerancia a la temperatura disminuye la efectividad de la pasteurización para la eliminación de microorganismos en la leche de

animales infectados (Chiodini y Hermon, 1993; Keswani y Frank, 1998; Rowe et al., 200; Stabel et al., 1997; Streeter et al., 1995; Sung et al., 1998; Taylor et al., 1981). Los animales se exponen a este microorganismo mediante varias rutas, a través de las mamas o la leche/calostro, ingesta de comida o agua contaminada con heces (Streeter et al., 1995; Sweeney et al., 1992; Taylor et al., 1981). La leche contaminada es una de las fuentes más comunes de infección para los animales susceptibles. La transmisión intrauterina también es posible en el ganado clínica y subclínicamente infectado. Aunque MAP ha sido aislada del semen de machos infectados, las oportunidades de transmisión tanto para la hembra como para el feto a través de la inseminación artificial y natural no se ha estudiado pero probablemente sea baja (Larsen, 1981).

1.2.3 Distribución.

La infección por MAP es prevalente a nivel mundial, principalmente en áreas templadas y húmedas (Sweeney, 1996). La prevalencia actual de rebaños y animales se desconoce en la mayoría de los países debido a la falta de la aplicación de pruebas de diagnóstico y a la falta de su estandarización. Varias pruebas se utilizan para la estimación de la prevalencia como el cultivo fecal, cultivo de tejidos, o la detección de anticuerpos anti-MAP mediante la técnica ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas por sus siglas en inglés). Además, la estimación de la prevalencia exacta también es obstaculizada por la falta de especificidad y sensibilidad de estas pruebas de diagnóstico (Rosseels y Huygen, 2008).

La paratuberculosis se distribuye a nivel mundial, con prevalencias de 6.4-15% en Portugal (Coelho et al., 2008), 6.1% en Canadá (McNab et al 1991), 4.6% utilizando johnina y 72% utilizando la prueba de ELISA en Venezuela (Alfaro et al., 2006), 3.96% de prevalencia individual y 18.49% por hato en Eslovenia (Kusar et al., 2008), 6.1% en Alemania (Denzin et al., 2011) y 7.1% en Corea (Park et al., 2006). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, también conocida como Oficina Internacional de Epizootias) ha inscrito a la Paratuberculosis dentro de la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres. Su identificación es de declaración obligatoria y debe ser notificada a la OIE. Cada semestre por año, se hace un monitoreo mundial de la enfermedad y se elabora un mapa de

distribución el cual ha sido actualizado desde el año 2005. A continuación se muestran los últimos 2 mapas de distribución publicados por la OIE.

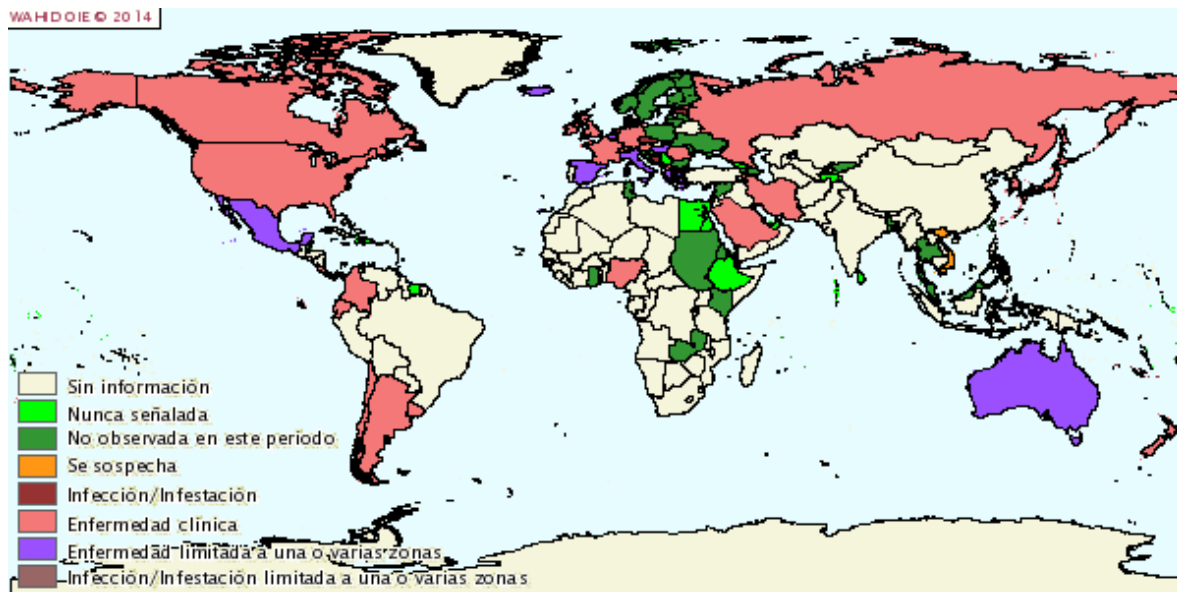


Figura 3. Distribución mundial de la Paratuberculosis (Período Ene-Jun 2013).

Tomado de la base de datos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, <http://www.oie.int/es/>).

1.2.4 Paratuberculosis en México.

La paratuberculosis se encuentra clasificada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) dentro de las enfermedades de tipo 3, que son aquellas que pueden afectar a humanos (enzoóticas), pero que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, son de notificación mensual obligatoria a las autoridades de sanidad animal.

Celis realizó una revisión sobre la paratuberculosis en México (Celis, 2011), encontrando datos de presencia de la enfermedad en al menos 22 estados de la República Mexicana, con prevalencias mayores al 5%, y una fluctuación entre 0.84-66.75%. De acuerdo a estos datos, el Biólogo Rodrigo Celis García sugirió cambiar la paratuberculosis al Grupo 2 de

enfermedades y realizar un estudio a escala nacional. De igual forma se registraron datos de presencia en bovinos, ovinos, caprinos y fauna silvestre en cautiverio.

1.2.5 La enfermedad de Crohn.

Se ha sugerido a MAP como agente etiológico de la enfermedad de Chron en humanos. Esta enfermedad fue descrita por Crohn y colaboradores en 1932 (Crohn et al., 1932) y se pensó que MAP podría estar involucrada fue en base a su similitud clínica con la enfermedad de Johne (Dalziel 1913). En 1984, Chiodini y colaboradores aislaron una micobacteria con aspecto de esferoplasto de pacientes con la enfermedad de Crohn, la cual más tarde fue identificada como MAP (Chiodini et al., 1984). Con el descubrimiento de la secuencia específica IS1900, varios grupos de investigación han tratado de utilizar técnicas moleculares para confirmar la presencia de ADN de MAP en los intestinos de estos pacientes. Los resultados de estos estudios han sido controversiales en cuanto a si MAP podría causar la enfermedad de Crohn (Rowbotham et al., 1995; Sanderson et al., 1992).

Se han identificado más de 30 genes que demuestran que hay un componente genético asociado con la ocurrencia de esta enfermedad (Barret et al., 2008), pero una relación específica con la exposición a MAP debe ser demostrada. Mientras que la detección de MAP mediante métodos microbiológicos de tinción estándar ha sido un desafío en individuos con la enfermedad de Crohn, investigaciones han revelado la presencia de MAP y ADN de MAP en sangre o lesiones de adultos y niños (Naser et al., 2009; Autschbach et al., 2005; Bull et al., 2003; Kirkwood et al., 2009; Lee et al., 2011; Mendoza et al., 2010; Chiapinni et al., 2009). Por otra parte, MAP también ha sido aislada de pacientes con otras enfermedades así como individuos saludables mediante varias técnicas (Juste et al., 2009; Tuci et al., 2011; Singh et al., 2008, 2011). Aunque MAP puede ser encontrada en intestinos de pacientes con la enfermedad de Crohn, aun falta por establecer si la bacteria está relacionada con la patogénesis de la enfermedad o su presencia es transitoria por el tracto digestivo. Algunos estudios inmunológicos relacionados a la conexión entre MAP y la enfermedad de Crohn mostraron los mismos resultados inconsistentes que los estudios basados en la técnica de PCR (Rowbotham et al., 1995; Stainsby et al., 1993; Vannuffel et

al., 1994). Por lo anterior, se deber realizar estudios de mayor profundidad para dilucidar si MAP es agente causal de la enfermedad de Crohn.

1.2.6 Patogénesis y respuesta inmune.

1.2.6.1 Fagocitosis y sobrevivencia de MAP.

El ganado y otros rumiantes usualmente se exponen a MAP dentro de los primeros meses de vida, ya sea por la via fecal-oral o por la ingestión de calostro infectado (Wells y Wagner, 2000). Después de la entrada de MAP al organismo, el patógeno atraviesa el epitelio mucoso (células M), es fagocitado y se multiplica dentro de macrófagos subepiteliales (Momotani et al., 1988). Una vez activadas, estas células inician la activación de linfocitos y la expansión clonal (Slagame et al., 1991). Las células M representan un objetivo primario en la infección de MAP, lo cual puede ser debido a la falta de lisosomas y enzimas hidrolíticas en estas células (Miller et al., 2007). Además poseen características funcionales y estructurales que facilitan la endocitosis y el transporte de macromoléculas y bacterias. A diferencia de los enterocitos, las células M carecen de capa mucosa, poseen microvellos irregulares, tienen un glicocaliz delgado y una actividad enzimática reducida (Brayden et al., 2005; Sierro et al., 2000). Se ha visto que después de algunas horas de la ingestión, MAP puede encontrarse dentro de los macrófagos epiteliales y células M (Momotani et al., 1988). Las células M presumiblemente pasan MAP degradado e intacto hacia las células vírgenes del sistema inmune (células B, T y macrófagos) localizadas justo debajo de la superficie basolateral de las células epiteliales intestinales.

Una vez dentro de los macrófagos, MAP se adapta muy fácilmente al ambiente intracelular y es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro del fagosoma. El fagosoma es una vesícula que se forma en el interior de una célula unida a la membrana durante el proceso de fagocitosis. Ésta puede contener microorganismos o material extracelular y al fusionarse con el lisosoma conduce a la degradación enzimática del material fagocitado. Tal como en el caso de *M. tuberculosis*, esta habilidad de sobrevivir dentro del fagosoma se le atribuye al bloqueo de la maduración del fagosoma en fagolisosoma, escapando así del proceso de destrucción que es muy efectivo para la eliminación de la mayoría de los patógenos

microbianos (Gatfield y Pieters, 2003; Rohde et al., 2007; Russel 1998; Dequeker et al., 1999; Deretic and Fratti, 1999). A pesar de que el mecanismo preciso utilizado por las micobacterias para interrumpir la maduración del fagosoma dentro de los macrófagos inactivados no se conoce a detalle, existen estudios en esta área los cuáles han comenzado a definir proteínas que están involucradas en el proceso de fusión del fagosoma-lisosoma y cómo los patógenos intracelulares podrían interactuar con estas proteínas para impedir la fusión (Koszycki et al., 1997; Via et al., 1998; Dequeker et al., 1999; Ferrari et al., 1999; Ullrich et al., 1998; Malik et al., 2000). A pesar de su habilidad para prevenir la fusión del fagosoma-lisosoma en macrófagos inactivados, varios estudios han mostrado que cuando las micobacterias son fagocitadas por macrófagos que han sido previamente activados con interferón gama (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la maduración del fagolisosoma sucede, acompañada de la destrucción del patógeno intracelular (Flynn et al., 1993; Kaufman et al., 1995; Bonecini-Almeida et al., 1998; Florido et al., 1999).

Varios receptores se han implicado en la entrada de las micobacterias hacia los macrófagos. La lista de los receptores de micobacterias potenciales incluyen al receptor de manosa (Shlesinger, 1993; Kang and Schlesinger, 1998; Astarie-Dequeker et al., 1999), receptores de complemento de tipo CR3 y CR4 (Schlesinger and Horwitz, 1991; Stokes et al., 1993; Melo et al., 2000), el receptor Toll de tipo 2 (TLR-2) (Means et al., 1999; Underhill et al., 1999) y el receptor de fibronectina (Kuroda et al., 1993) (Fig. 5). Aunque las micobacterias tanto patogénicas como no patogénicas pueden entrar a células eucariotas cultivadas con una facilidad similar, solo las especies patogénicas pueden sobrevivir y multiplicarse dentro (Shepard, 1956). Debido a lo anterior la patobiología de la enfermedad de Johne dificulta su diagnóstico; un animal infectado e infeccioso puede permanecer serológicamente negativo por un largo periodo de tiempo porque los anticuerpos aparecen de meses a años después de que ocurrió la infección.

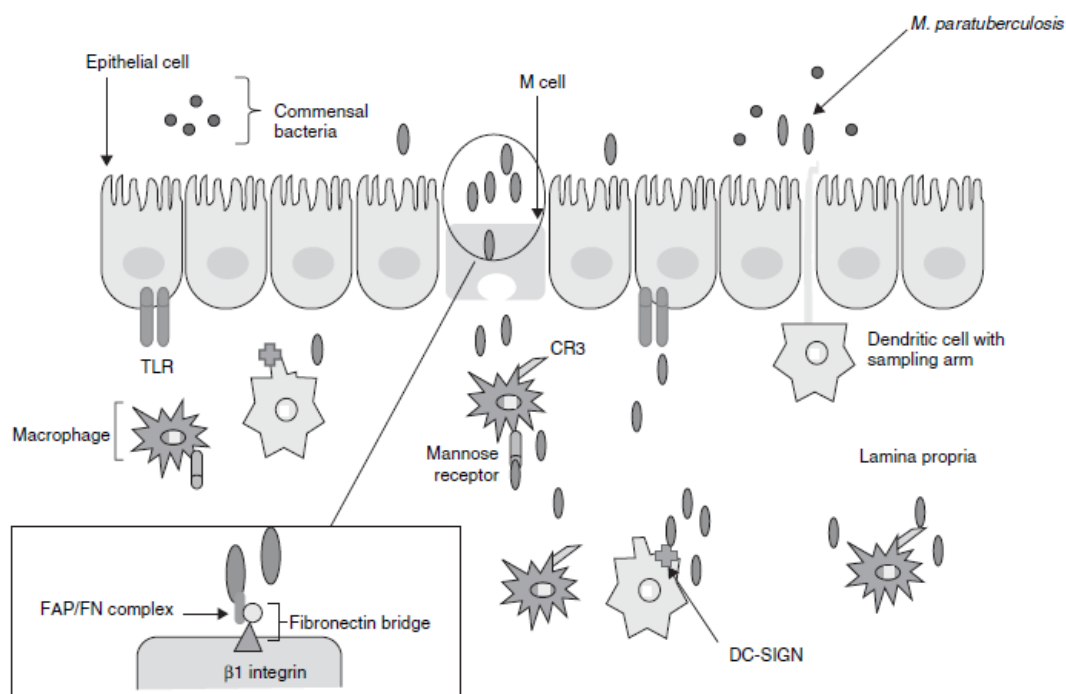


Figura 4. Tácticas de invasión de MAP hacia la pared intestinal y macrófagos. MAP invade principalmente las células M, creando un puente de fibronectina llegando posteriormente a los macrófagos subepiteliales. La entrada a estos últimos se logra mediante la unión de los receptores ManLAM al receptor CR3 y al receptor de manosa. Las células dendríticas también pueden transportar a MAP dentro de la lámina propia durante el muestreo a través de las uniones estrechas. Tomado de Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Editorial CAB, 2010.

1.2.6.2 Respuesta inmune.

Después de la infección con MAP la mayoría de los animales generará una respuesta inmune celular (Olsen et al., 2002). La respuesta inmune celular puede prevenir el progreso de la enfermedad en algunos animales (Olsen et al., 2002). El sistema inmune celular responsable de la inmunidad protectora abarca una variedad de células y de especial importancia son los linfocitos T. Los linfocitos T $CD4^+ \alpha\beta$, también conocidos como T colaboradores (T helper, Th, por sus siglas en inglés), contribuyen en la respuesta inmune mediante la producción de citocinas. Las células Th pueden dividirse en 2 grupos de contrarregulación; Th1 y Th2. El balance entre estos 2 subgrupos es decisivo para el éxito de la infección. El fenotipo Th1 produce las citocinas: interleucina 2 (IL-2), interferón gama (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Olsen et al., 2002), siendo esta una

de las reacciones detectables más tempranas de la infección por MAP. La respuesta Th1 comienza con la infiltración de linfocitos acompañada con la detección de muy pocos organismos (Orme et al., 1993). Durante la etapa subclínica temprana de la infección la actividad celular Th1 es predominante. Esta fase subclínica puede durar años y es difícil de detectar mediante ensayos convencionales (Figura 5).

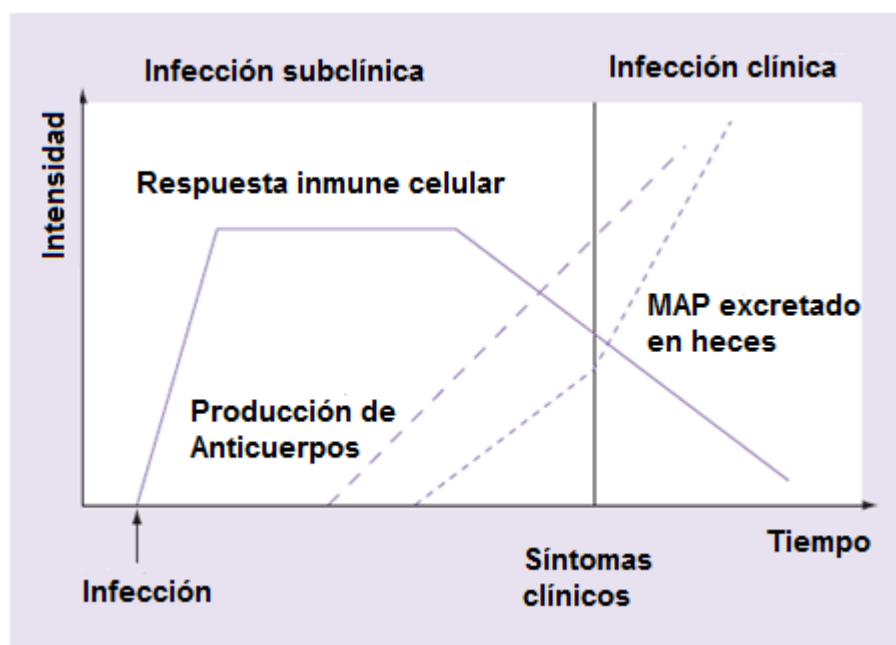


Figura 5. Modelo simplificado de la respuesta inmune contra la paratuberculosis (Rosseels y Huygen, 2008).

Los antígenos procesados de MAP por macrófagos activados (y posiblemente células B) son expuestos en la superficie celular como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II, por sus siglas en inglés). Los macrófagos activados liberan interleucina 1 (IL-1), una citocina estimuladora de células T (Adams y Czuprynski, 1994; Alzuherri et al., 1996; Henderson et al., 1997) y probablemente producen interleucina 8 (IL-8), un factor quimiotáctico responsable del reclutamiento de otras células del sistema inmune a la zona afectada (Sadek et al., 1998). Además los macrófagos producen IFN- γ , una molécula clave en la resistencia contra las enfermedades micobacterianas. La producción de esta citocina en la paratuberculosis ha sido demostrada por diferentes autores (Burrells et al., 1995, Stabel, 1996; Sweeney et al., 1998). Bassey y colaboradores identificaron a las células Th como la mayor fuente de IFN- γ en el ganado

infectado con MAP (Bassey y Collins, 1997), lo que también concuerda con el conocimiento de infecciones micobacterianas en otros rumiantes (Smyth et al., 2001). La cascada de citocinas también conduce al reclutamiento y activación de células T CD8+ citotóxicas y otros componentes inmunes, incluyendo neutrófilos y macrófagos adicionales en infecciones tempranas de MAP (Adams y Czuprynski, 1994; Alzuherri et al., 1996).

Se ha considerado que la respuesta humoral (Th2) contribuye muy poco en la defensa contra las micobacterias. Sin embargo, se han observado muchos efectos benéficos como la prolongación de la sobrevivencia, prevención de la pérdida de peso, reducción de las UFC's, eliminación de antígenos y diseminación reducida de bacterias con el uso de anticuerpos monoclonales contra antígenos micobacterianos (Teitelbaum et al., 1998; Glatmann-Freedman et al., 2000; Pethe et al., 2001; Chambers et al., 2004; Williams et al., 2004). Las citocinas involucradas en la respuesta humoral pueden inducir la producción de anticuerpos y están asociadas con la enfermedad progresiva (Olsen et al., 2002). Se sabe que los animales que son incapaces de controlar la enfermedad desarrollan una respuesta inmune humoral junto con la diseminación de bacterias en las heces y por la manifestación de signos clínicos (Olsen et al., 2002). En la etapa de respuesta Th2 de la infección, los animales muestran signos clínicos no específicos como la pérdida de peso y diarrea (Koets et al., 1999; Stabel et al., 1999). La inducción de la respuesta Th2 se asocia a la producción de las citocinas: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10; las cuales estimulan una respuesta inmune humoral (anticuerpos) que no protege ni detiene la infección o daños patológicos. La respuesta con anticuerpos es incapaz de contener la infección y puede agravar la situación, promoviendo la absorción de bacterias opsonizadas por los macrófagos. La elevación de los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) puede que contribuya a la pérdida de peso debido al catabolismo de los tejidos (Adams et al., 1996; Adams et al., 1997; Alzuherri et al., 1996; Beutler et al., 1989). Los microorganismos pueden diseminarse dentro y más allá del tracto gastrointestinal, con lesiones producidas por macrófagos infiltrados en riñones, hígado y glándulas mamarias (Pavlik et al., 1999).

Los animales afectados clínicamente en esta fase de la enfermedad usualmente fallecen en semanas. El cambio desde una respuesta inmune protectora inflamatoria (Th1) a una respuesta humoral (Th2) es otro mecanismo mediante el cual MAP evade el sistema inmune (Coussens, 2001).

1.3 Vacunación contra la Paratuberculosis.

La característica esencial de una vacuna contra la paratuberculosis debe ser la reducción de las pérdidas de producción causadas por MAP. Sin embargo, la vacuna ideal debería evitar una infección de los animales o servir como inmunoterapéutico en animales ya infectados. En la Tabla 1 se contrastan las características de las vacunas de bacterias completas en aceite frente a una vacuna ideal contra MAP.

Tabla I. Características de vacunas de bacterias completas en aceite, contrastadas con una vacuna hipotética ideal contra MAP. Tomado de Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Editorial CAB, 2010.

Características de la vacuna	Vacuna de bacterias completas en aceite	Vacuna ideal contra MAP
Prevenir enfermedad clínica en animales no infectados	Sí	Sí
Prevenir enfermedad clínica en animales infectados	Sí, en etapas tempranas de infección	Sí
Prevenir el establecimiento de la enfermedad	No	Sí
Lesiones en el sitio de inyección	Sí	No
Heridas por la autoinoculación de la vacuna	Sí	No
Causar respuestas de falsos positivos en pruebas inmunes contra TB bovina	Sí	No
Causar respuestas de falsos positivos en pruebas inmunes contra MAP	Sí	No

A pesar de 80 años de desarrollo de vacunas contra MAP, no se ha encontrado una fórmula que proteja a los animales de la enfermedad, que prevenga la dispersión por animales en etapa subclínica o que proporcione protección total frente a la infección (Harris y Barletta, 2001; Juste et al., 1994). Las vacunas actuales generalmente provocan grandes granulomas en el sitio de inoculación (Windsor y Eppleston, 2006) e inducen reactividad cruzada con la

prueba de la tuberculina, lo cual provoca un desincentivo hacia su uso, particularmente en ganado (Rosseels y Huygen, 2008). Las vacunas existentes comercialmente también inducen la producción de anticuerpos, así como la sensibilización a la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), volviendo difícil el diagnóstico diferencial entre animales vacunados y animales infectado naturalmente (Collins, 1994). Por otra parte se ha observado que la vacunación conduce a la reducción de la severidad de las lesiones y la carga bacteriana y resulta en una patología menos severa (Harris y Barletta, 2001). Debido a lo anterior, la búsqueda de una vacuna específica para MAP sigue en marcha. A la fecha se han evaluado 3 tipos de vacunas contra la paratuberculosis, y estas pueden clasificarse dentro de 3 grupos: (1) bacterias vivas o muertas inactivadas, (2) vectores de expresión de subunidades protéicas (ADN plasmídico) y (3) vacunas basadas en subunidades protéicas recombinantes.

1.3.1 Bacterias vivas o muertas inactivadas.

La historia de la vacunación para el control de la Paratuberculosis en rumiantes data al año de 1926, donde Vallee y Rinjard (1926) reportaron el uso de bacilos vivos no virulentos de paratuberculosis en adyuvante de aceite de oliva, parafina líquida y polvo de piedra pómez. Durante el siglo XX, se desarrolló un número de vacunas de bacterias vivas atenuadas y bacterias completas muertas para la enfermedad de Johne en bovinos y ovinos (Rosseels y Huygen, 2008). La diferencia entre el uso de la primera o la segunda no ha sido lo suficientemente evaluada para determinar si mejoran significativamente la eficacia de las vacunas. Lo que sí es claro es que la respuesta inmune hacia MAP viva en un adyuvante de aceite son diferentes a aquellas con el mismo microorganismo pero sin adyuvante (Begg y Griffin, 2005).

Dentro de las vacunas con células muertas completas se encuentran: la cepa 18 utilizada en una vacuna comercial (Mycopar) en los Estados Unidos está compuesta por *M. avium* subsp. *avium* (Chiodini., 1993; Spangler et al., 1991; Nedrow et al., 2007); la vacuna con la cepa ID-Lelystad, manufacturada en los países bajos, compuesta por MAP muerta por calor suspendida en una emulsión agua-aceite (Wentink et al., 1994; Muskens et al., 2002);

Gudair™, cepa 316F, que es una vacuna comercial desarrollada en España por Veterinaria CZ para corderos y crías de cabra (Corpa et al., 2000; Reddacliff et al., 2006; Windsor, 2006); La cepa 5889 Bergey de MAP que es una vacuna experimental desarrollada en Hungría. Esta última vacuna está compuesta de la cepa de MAP muerta por calor y con un adyuvante a base de aceite (Kormendy, 1994). Neoparasec™ es una vacuna que esta compuesta por la cepa viva modificada liofilizada 316F de MAP en adyuvante de aceite (Rhone-Merieux, Lyon, Francia). Fue utilizada hasta 2002 en Nueva Zelanda y en Francia para la vacunación de bovinos, ovejas y cabras (Kohler et al., 2001; Molina et al., 1996; Begg et al., 2005; Juste et al., 1994; Machintosh et al., 2005).

1.3.2 Vectores de expresión de subunidades proteicas.

Desde que Wolff y colaboradores demostraron en 1999 (Wolff et al., 1999) que la inyección de células musculares con ADN plasmídico codificando la enzima bacteriana β -galactosidasa, podía conducir a la transferencia del gen, transcripción en el núcleo y a la subsecuente síntesis de la enzima. En 1992 Tang y colaboradores (Tang et al., 1992) demostraron que la inyección de plásmidos podía utilizarse para la provocar una respuesta inmune y el siguiente año dos estudios demostraron que ratones (Ulmer et al., 1993) y gallinas (Robinson et al., 1993) inmunizados con ADN de influenza eran protegidos frente a un reto viral.

Las vacunas de ADN son muy efectivas (particularmente en pequeños roedores) para inducir respuestas inmunes humorales y celulares las cuales son necesarias frente a patógenos micobacterianos intracelulares (Huygen, 2005, 2006) y están ya disponibles para algunas enfermedades veterinarias virales (Meeuseen et al., 2007). El envío de subunidades de antígenos específicas de patógenos mediante vectores heterólogos de virus deficientes en replicación es una estrategia de vacunación alternativa que ya está siendo utilizada en enfermedades animales y humanos (Xing et al., 2005; Bejon et al., 2007; Weyer et al., 2007; Hawkrigde et al., 2008). El principio de esta técnica se basa en las propiedades de estos vectores de causar infección intracelular pero no enfermedad, además de dirigir naturalmente el procesamiento de antígenos hacia una respuesta celular. Para una vacuna

contra MAP se busca dirigir la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo celular (Th1) como se mencionó anteriormente. Por esa razón el uso de vectores de expresión de antígenos resulta atractivo, requiriendo adyuvantes no específicos o terapia de citocinas para ayudar a inducir la respuesta celular. El uso de vectores puede requerir múltiples inmunizaciones pero debido a que el ciclo completo de replicación intracelular no es necesario para el envío y presentación de antígenos, la exposición repetida al mismo vector puede realizarse (Gabitzsch et al., 2009). El mayor problema de las vacunas de ADN actuales es su eficacia de transfección y la cantidad de la proteína sintetizada. Se estima que la inyección de dosis en microgramos de ADN resulta en la producción de solo dosis en nanogramos de proteína (Huygen, 2005). Utilizando una inmunización de librería de expresión, Huntley y colaboradores reportaron el potencial protector de un plásmido codificante para 26 antígenos de MAP que les confirió una protección significativa a ratones BALB/c contra un reto intraperitoneal con 10^8 UFC de MAP (Huntley et al., 2005).

1.3.3 Vacunas basadas en subunidades protéicas.

La identificación de proteínas antigénicas que inducen fuertes respuestas inmunes de tipo Th1 durante la primera fase asintomática de la enfermedad y la demostración de su potencial protector en modelos de infección experimentales (ratones y especies objetivo) es crucial para el desarrollo de vacunas basadas en subunidades (Huygen et al., 2010). El genoma completo de la cepa K-10 de MAP fue secuenciado en el año 2010 y se encuentra disponible desde entonces, proporcionando una valiosa herramienta para el estudio de antígenos de MAP. Éstos pueden ser utilizados para el desarrollo de herramientas inmunodiagnósticas más específicas así como productos inmunoprolifactivos más efectivos. El genoma de K-10 es un solo cromosoma circular compuesta de 4.83×10^6 pares de bases que codifican para 4350 marcos de lectura abiertos predichos. Los análisis *in silico* han identificado más de 3000 genes con homología hacia *M. tuberculosis* y 161 regiones únicas que codifican para 39 genes no estudiados (Li et al., 2005). En la Tabla 2 se enlistan los genes evaluados hasta el año 2010 como vacunas de subunidades.

Tabla II. Resumen de candidatos vacunales protéicos y de ADN evaluados en animales. Tomado de Paratuberculosis, Organism, Disease, Control. Editorial CABI. 2010.

Tipo de vacuna	Otros nombres	Tamaño (kDa)	Función	Especie de prueba	Cepa utilizada en el reto experimental	Dosis y ruta de infección	Referencia
Vacunas proteicas							
MAP3527-MAP1519 proteína fusionada: fragmento C-terminal de 17.6 kDa de MAP3527-MAP1519-fragmento C-terminal de 14.6 kDa de MAP3527	MAP74F	74	MAP3527 (PepA) es una serin-proteasa de tipo tripsina de 34 kDa, con un dominio PDZ C-terminal. MAP1519 es una proteína hipotética perteneciente a la familia de proteínas PPE.	Ratón C57BL/6	Cepa de MAP 66115-98	10 ⁹ UFC, intraperitoneal 3 semanas después de la última inmunización.	Chen et al., 2008
MAP3840	Hsp70, dnaK	70	Chaperonina	40 bovinos hembras	MAP de una vaca infectada	Al menos 2 x 10 ⁴ UFC, oral, 9 dosis en un periodo de 21 días.	Koets et al., 2006
MAP0216 MAP1609c MAP3531c MAP0187c	Ag85A Ag85B Ag85C SOD	32 30 32 23	El complejo de antígenos 85 (Ag85A, Ag85C y Ag85C) poseen función de micolil transferasas involucradas en la síntesis de la pared celular. SOD es una superóxido dismutasa.	24 bovinos	Cepa de MAP 66115-98	1 x 10 ⁷ UFC oralmente por 7 días consecutivos, 4 semanas después de la última inmunización.	Kathaperu mal et al., 2008

Tabla II. Continuación.

Vacunas de ADN							
Mezcla de 26 antígenos de MAP como ADNp: número de genes 0448, 1301, 1308, 2491, 3498c, 1239c, 1493c, 1912, 2239, 3049c, 3131, 3171c, 0047c, 1003c, 2191, 2192, 3737, 1796c, 1871c, 2171c, 2174c, 2175c, 2230c, 2604c, 3742, 3764c				BALB/c	Cepa de MAP 6112	1 x 10 ⁸ UFC, intraperitoneal 2 semanas después de la última inmunización.	Huntley et al., 2005
Mezcla de ADNp con los genes MAP0216, MAP1609c, MAP3531c, MAP0187c, MAP2121c	Mezcla de Ag85A Ag85B Ag85C SOD MMP-1	32 30 32 23 35	El complejo de antígenos 85 (Ag85A, Ag85C y Ag85B) poseen función de micolil transferasas involucradas en la síntesis de la pared celular. SOD es una superóxido dismutasa. MMP-1 es una proteína de membrana con función desconocida.	Ratones C57BL/6	Aislado de MAP de un animal infectado	1 x 10 ⁹ UFC, intravenoso, 3 semanas después de la última inmunización	S.-U. Park et al., 2008
MAP0586c (ADNp)		33	Transglicosilasa	Ratones BALB/c y C57BL/6	MAP ATCC19698	2 x 10 ⁶ UFC, intravenoso, 6 semanas después de la última inmunización	Roupie et al., 2008
MAP3936 (ADNp) BCG3866c MAV0214	Hsp65 Ag85A Ag85A	65 32 32	Chaperonina de tipo I Gro-EL.	Corderos	MAP de paciente con enfermedad de Crohn	2 x 10 ⁹ UFC, oral 3 meses después de la última inmunización	Sechi et al., 2006

1.4 Vacunas producidas en plantas.

La historia de la relación entre las plantas y el uso de moléculas de interés presentes en ellas data desde el inicio de la civilización humana. Las plantas le han servido a la humanidad por siglos, pero solo en los últimos 20 años se ha vuelto posible su uso para la producción de proteínas recombinantes específicas. La primera proteína farmacéutica relevante producida en planta fue la hormona del crecimiento humano, la cual fue expresada en tabaco en 1986 (Barta et al., 1986). En 1989, se expresó el primer anticuerpo en tabaco (Hiatt et al., 1989), lo cual demostró que las plantas podían ensamblar glicoproteínas complejas funcionales con varias subunidades. La autenticidad estructural de las proteínas recombinantes de plantas se confirmó en 1990 con la expresión del antígeno A de la proteína de superficie de *Streptococcus mutans* (Curtiss y Cardineau, 1990) y en 1992 cuando se utilizaron por primera vez para producir una vacuna experimental: el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBV) (Mason et al., 1992). En un reporte posterior, el grupo demostró que la vacuna producida en las plantas de tabaco generaba la respuesta inmune esperada después de haber sido inyectada en ratones (Thanavala et al., 1995). Algunos otros antígenos vacunales producidos en plantas se muestran en la Tabla III.

Muchos autores han discutido el valor de este sistema de expresión el cual incluye costos de manufactura reducidos y el potencial de alternar las rutas de administración incluyendo la vía oral (Streatfield et al., 2001; Walmsley y Arntzen, 2003). Los antígenos expresados son almacenados en el tejido vegetal y las vacunas orales pueden ser administradas directamente, eliminando costos de purificación (Korban et al., 2002; Streatfield et al., 2001). Las ventajas principales de esta vía de inmunización es la probabilidad de generar una respuesta inmune de mucosas y la facilidad de administración de la vacuna. La superficie mucosa, la cual cubre el tracto digestivo, respiratorio y reproductor, es el tejido inmunológicamente activo más grande en el cuerpo (Tacket y Mason, 1999). Las vacunas orales pueden estimular tanto la inmunidad de mucosas como la sistémica (todo el cuerpo). Los antígenos en plantas transgénicas son dirigidos mediante bio-encapsulamiento, es decir, la gruesa pared celular de las células vegetales, que las protege de las secreciones gástricas y se pueden romper finalmente en el intestino mediante preparaciones sencillas.

Una vez que el antígeno es liberado de la célula vegetal es capturado por las células M presentes en las placas de Peyer y por el tejido linfoide asociado al intestino. Estos antígenos son pasados hacia los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos y linfocitos. Esto estimula el reclutamiento de células de defensa y células de memoria, la producción de IgG, IgE e IgA locales (Lal et al., 2007). En muchos de los casos, la refrigeración no es necesaria para la preservación de la efectividad de la vacuna, eliminando un impedimento mayor a los esfuerzos de vacunación internacional (Korban et al., 2002; Mahon et al., 1998).

Tabla III. Antígenos vacunales producidos en plantas que reportan inmunogenicidad o inmunoprotección.

Antígeno	Sistema de expresión	Localización del transgén	Nivel de expresión	Evaluación funcional	Referencia
Subunidad B (LTB) de la toxina termoestable de <i>E. coli</i> enterotóxica.	Zanahoria Soja	Genoma nuclear	0.3% PST 2.4% PST	Inmunogénico y protector frente a reto (Zanahoria), inmunog. y parcial (Soja).	Nochi et al (2007), Moravec et al (2007)
Subunidad B de la toxina del Cólera (CTB).	Tomate Arroz	Genoma nuclear	0.081% PST 2.1% PST	Inmunogénica via oral en ratones. Inmunogénica y protectora durante el reto con ratones.	Jiang et al (2007), Nochi et al (2007).
Rotavirus humano de grupo A.	Alfalfa	Genoma nuclear	0.06- 0.28% PST	Inmunogénica en ratones y la descendencia presentó síntomas menos severos.	Dong et al (2005).
Rotavirus (VP7).	Papa	Genoma nuclear	0.3-0.4% PST	Inmunogénica via oral en ratones. Actividad neutralizante contra el rotavirus.	Li et al (2006).
Proteína de cápside del virus Norwalk (NVCP).	Tomate y Papa	Genoma nuclear	8% PST 0.4% PST	Generó respuestas de anticuerpos sistémico y de mucosas en raton via oral.	Zhang et al (2006)

Tabla III. Continuación.

Proteína S SARS-CoV (S1).	Tomate y tabaco	Genoma nuclear	0.1% PST	Inmunogénica en ratones con administración oral.	Pogrebnyak et al (2005).
Proteína de superficie PyMSP4/5 de <i>Plasmodium yoelii</i> .	Tabaco	Genoma nuclear	0.02-0.04% PST	Induce anticuerpos específicos en ratones via parenteral.	Wang et al (2008).
<i>Yersinia pestis</i> F1 y antígenos de LcrV.	Tabaco	Expresión transitoria	380 y 120 µg/g Peso fresco	Inmunogénico y protector en monos contra <i>Y. pestis</i> con inyección subcutánea.	Mett et al (2007).
Inhibidores de entrada de VIH proteína de alga roja Griffithsina (GRFT).	Tabaco	Expresión transitoria	1g/kg Peso fresco	Activo contra VIH a concentración picomolar, capaz de bloquear la transmisión entre células.	O'Keefe et al (2009).
Toxina del Tétanos (TetC).	Tabaco	Cloroplasto	18-27% y 7-10% PST	Ratones desarrollaron una respuesta inmune sistémica y sobrevivieron al reto con la toxina.	Tregoning et al (2005).
Antígeno protector contra Anthrax.	Tabaco	Cloroplasto	4.5-14.2% PST	Respuesta inmune sistémica, ensayo de neutralización de toxina, los ratones sobrevivieron (100%) a dosis letal de toxina.	Koya et al (2005).
Parvovirus canino.	Tabaco	Cloroplasto	31.1 y 22.6% PST	Suero de conejo neutralizado CPV en un ensayo <i>in vitro</i> .	Molina et al (2005).

Las plantas presentan una ruta de síntesis eucariota de proteínas efectiva, y combinándola con los sistemas actuales de expresión de genes y con un área grande de cultivo, se puede producir una gran cantidad de proteína (Fischer y Emans, 2000). A diferencia de los sistemas celulares mamíferos, los cuales algunas veces pueden expresar agentes virales

patogénicos, los sistemas de plantas se encuentran libres de patógenos mamíferos (Ma et al., 2003). Así. Los sistemas de expresión en plantas pueden ofrecer ciertas ventajas sobre los sistemas de expresión en bacterias y sistemas de cultivos celulares de mamíferos (Tabla IV) (Fischer y Emans, 2000).

Tabla IV. Comparación de producción de proteínas recombinantes en plantas, bacterias y sistemas de mamíferos.

	Plantas transgénicas	Cultivos celulares de plantas	Levaduras	Bacterias	Cultivo celular de mamífero
Costo/Almacenamiento	Barato/T.A.	Medio/T.A.	Medio/-20°C	Barato/-20°C	Alto
Tamaño del gen	Sin límite	Sin límite	Desconocido	Desconocido	Limitado
Glicosilación	Correcta	Correcta	Incorrecta	Ninguna	Correcta
Capacidad de escalamiento	Alta	Medio	Alta	Alta	Muy baja
Propagación	Fácil	Factible	Fácil	Fácil	Difícil
Precisión de plegamiento de la proteína	Alta	Alta	Medio	Baja	Alta
Homogeneidad de la proteína	Alta	Alta	Medio	Baja	Medio
Rendimiento de proteína	Alta	Alta	Alta	Baja	Medio-Alto
Riesgos de contaminación	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Endotoxinas	Virus, Priones y ADN oncogénico
Costos de escalamiento	Bajo	Bajo-Medio	Alto	Alto	Alto
Tiempo requerido	Medio	Medio	Medio	Poco	Alto

En todos los casos, los antígenos o moléculas terapéuticas se expresan en los tejidos de la planta, de donde pueden ser purificados o procesados para poder ser aplicados tópicamente u oralmente. La mayor ventaja de los sistemas de expresión en plantas sobre otros sistemas de producción de vacunas es la reducción del costo de manufactura. Además, las vacunas producidas en plantas pueden cultivarse en donde se necesite, evadiendo costos de almacenamiento y transporte. Los fermentadores y bioreactores pueden ser reemplazados por cuartos de crecimiento de aislados o invernaderos. Inclusive, las plantas pueden crecer

en el campo con un confinamiento biológico de genes externos adecuado, tal como la herencia materna o la esterilidad masculina, o la expresión en tejidos vegetativos con su cosecha antes de la aparición de cualquier estructura reproductiva. Tal y como otros sistemas eucariotas, las vacunas producidas en plantas permiten la introducción de modificaciones postraduccionales. El plegamiento correcto y la formación de puentes disulfuro ocurre en los cloroplastos (Davoodi et al., 2009) o en el retículo endoplásmico (Moravec et al., 2007). Es bien conocido que los niveles de expresión varían dependiendo de la fase de desarrollo de las hojas, la hora del día y las secuencias regulatorias utilizadas, por lo que conseguir la consistencia de la expresión de transgenes en diferentes lotes es un reto importante (Daniell et al., 2009). Durante estas dos décadas, los antígenos vacunales expresados en el genoma nuclear de plantas han generado respuestas apropiadas de inmunoglobulina y han conferido protección al ser administradas por la vía oral (Arntzen et al., 2008; Yusibov y Rabindran, 2008). Pero, ninguna vacuna producida en planta se ha llevado más allá de la fase I de ensayo clínico (Yusibov y Rabindram, 2008).

1.4.1 Plataformas de expresión.

Una gran variedad de productos pueden producirse en plantas, pero cada uno posee sus requerimientos para su producción. Por lo tanto, no existe una sola especie que sea la ideal para la expresión de todos los productos. La elección de las plataformas de expresión se encuentra relacionada con el tipo de proteína en cuestión, es decir, la forma de la proteína recombinante que será finalmente utilizada. El ciclo de vida de la plataforma, el rendimiento de biomasa, confinamiento y costos de escalamiento son otros factores decisivos. El rendimiento de cualquier plataforma depende de muchos factores tanto biológicos como geográficos y necesitan ser evaluados para cada caso. Generalmente las especies domesticadas tienen preferencia sobre las especies silvestres para la agricultura molecular ya que se han adaptado a un amplio rango de condiciones ambientales debido a su comercialización. Las especies autopolinizantes son ventajosas para el confinamiento de cultivos transgénicos comparados con los de polinización cruzada ya que el riesgo por contaminación con polen se minimiza. Para las proteínas que necesitan ser purificadas, el procesamiento posterior puede afectar el costo de producción total. Por lo tanto, la

plataforma de expresión que proporcione facilidades de extracción y purificación de la proteína recombinante es la adecuada (Sharma y Sharma, 2009).

Los estudios iniciales de vacunas producidas en plantas utilizaban cultivos modelo de fácil transformación y manipulación tal como el tabaco (Mason et al., 1992). Los trabajos posteriores se han enfocado en el uso de cultivos de uso humano, en especial aquellos que pudieran utilizarse para la vacunación animal como la papa, tomate y maíz (Sala et al., 2005). Una gran cantidad de trabajos se han realizado utilizando papa como plataforma (Castanon et al., 2002; Sonnewald et al., 2003; Kim et al., 2004); y estos tubérculos han demostrado producir cantidades de antígeno necesarias para proporcionar diferentes niveles de protección en modelos de infección (Tacker et al., 1998, 2000; Thanavala et al., 2005). Sin embargo, se han reportado problemas de lenta degradación de proteína en los tubérculos cosechados y almacenados, además del hecho de que el tubérculo crudo no es comestible para los humanos. Otra especie de planta probada exhaustivamente para la expresión de proteínas ha sido el maíz. Las ventajas del maíz son la estabilidad de la proteína transgénica en las semillas secas, además de poder ser almacenadas y transportadas fácilmente (Tacket et al., 2004; Tacket, 2005). Muy importante es el hecho de que la matriz de los extractos de semilla de maíz ha demostrado proporcionar protección contra la degradación de la proteína durante su viaje a través del intestino (Streatfield y Howard, 2003). El maíz transgénico se ha utilizado para obtener respuestas inmunes protectoras contra la enterotoxina termoestable de *Escherichia coli* (LT) y un antígeno del virus de la gastroenteritis de cerdos (TGEV) (Streatfield et al., 2001; Chikwamba et al., 2002). El tomate también ha sido una especie vegetal popular para la expresión de candidatos vacunales, provee de contención y fácil procesamiento (Sandhu et al., 2000; Ma et al., 2003; Walmsley et al., 2003; Shchelkunov et al., 2004). Esta fruta tiene la ventaja sobre otros sistemas de expresión de que puede consumirse fresca, eliminando la necesidad de procesamiento post cosecha.

Muchos otros cultivos con hojas utilizados incluyen a la lechuga, alfalfa y el trébol. Las ventajas principales de la alfalfa es su naturaleza perene, su facilidad de propagación clonal a través de esquejes, su propia fijación de nitrógeno y las glicoproteínas sintetizadas en hojas tienden a tener estructuras de glucanos homogéneos (Fischer et al., 2004). Los cassettes de expresión han sido optimizados para la expresión en hojas de alfalfa y se han desarrollado métodos de expresión transitoria mediante agroinfiltración, de igual forma también se ha realizado la transformación de protoplastos y bombardeo de partículas. Algunos trabajos de expresión de recombinantes en alfalfa incluyen la expresión de un antígeno del virus de la fiebre aftosa (Wigdorovitz et al., 1999), una enzima para mejorar la utilización del fósforo (Austin-Phillips et al., 1999), y la Inmunoglobulina G C5-1 que permite la detección de anticuerpos no aglutinantes en humanos (Khouidi et al., 1999). En este último trabajo el anticuerpo C5-1 se acumuló con un porcentaje del 1% de la proteína soluble total.

1.4.2 Componentes moleculares generales que afectan la expresión de las proteínas recombinantes.

La expresión de transgenes está influenciada por varios factores que no pueden ser controlados a través del diseño de la construcción, y que conducen a la expresión variable de transgenes y, en algunos casos, su completa inactivación (Plasterk y Ketting, 2000).

Tales factores incluyen la posición de integración del transgén, la estructura del locus transgénico, número de copias del gen y la presencia de copias truncadas o rearrregladas del transgén. Se han adoptado distintas estrategias para minimizar la variación en la expresión de transgenes, incluyendo el uso de genes virales que suprimen el silenciamiento genético (Anandalakshmi et al., 1998). La habilidad de integrar una sola copia de transgenes en lugares precisos en el núcleo de la planta eliminaría los efectos de posición y los problemas asociados con la estructura variable de locus.

La eficiencia de transcripción de un gen es dependiente a su localización relativa y motivos de regulación, y a la secuencia de los elementos que controlan su transcripción a ARNm directamente. Estos incluyen: regiones regulatorias río arriba, el promotor, el sitio de inicio

de la transcripción; exones; intrones; codón de paro; regiones 3' no traducidas; señal poliA; y el sitio de terminación de transcripción. La selección de un promotor adecuado es una de las variables más importantes para la sobreexpresión de una proteína. Mientras que muchos promotores han sido probados por su habilidad para apoyar la expresión de genes y su especificidad, un pequeño número han sido utilizados para la producción de proteínas de interés comercial (Egelkrout et al., 2012). El uso de promotores constitutivos, también es una estrategia popular para expresar proteínas. Sin embargo, al utilizar estos tipos de promotores la preocupación se centra en si la proteína interferirá con el metabolismo celular conduciendo a toxicidad cuando los transgenes sean sobreexpresados durante todas las etapas de crecimiento de la planta. El problema de la toxicidad celular puede evitarse mediante la expresión dirigida a ciertos tejidos con actividad metabólica baja tales como la semilla o el endospermo.

Otra estrategia para evitar el silenciamiento genético es incrementar el número de copias de un transgén. En este caso se puede causar la inestabilidad del gen y el silenciamiento dependiente de homología. No obstante, con el diseño cuidadoso también puede conducir a altos niveles de expresión de proteína a través de una actividad de transcripción más alta (Butaye et al., 2005). Los sitios de unión de los factores de transcripción controlan el acceso de la ARN polimerasa al promotor. El control sobre el momento de expresión se puede lograr mediante el uso de factores de transcripción que se colocan bajo el control de promotores inducibles. Esto permite un alto nivel de producción de proteínas (lo cual es perjudicial para la salud de la planta), bajo condiciones normales de crecimiento, ya que la expresión es disparada justo antes de la cosecha. Sea cual sea el promotor, la sobreexpresión de proteínas recombinantes en plantas se ve afectada por los niveles de factores de transcripción dirigidos al promotor. En algunos casos, múltiples copias de un promotor con un sitio de unión en común pueden reducir los niveles de factores de transcripción de un promotor, y en consecuencia limitar el nivel de expresión de la proteína foránea. El silenciamiento transcripcional de genes conduce al término de la transcripción. Es importante reconocer los factores responsables y prevenirlos para lograr altos niveles de expresión. El silenciamiento transcripcional de genes puede estar relacionado directamente

a la estructura de la cromatina y ocurre a través de mecanismos epigenéticos. Uno de estos mecanismos es la metilación de un transgén, a menudo debido a la formación de la heterocromatina. La formación de la heterocromatina puede ser iniciada por una serie de eventos poco conocidos (entre ellos el apareamiento del ADN entre copias de transgenes, presencia de ARN de doble cadena homóloga al promotor, histonas hipoacetiladas, la presencia de secuencias virales en el genoma que se encuentran en un vector viral, o la presencia de transgenes ectópicos (Moazed, 2009; Kraye von Krauss et al., 2008). Los intrones con estructuras de tipo horquilla con autocomplementariedad son efectivas para el silenciamiento (Smith et al., 2009). Secuencias repetitivas alrededor de un transgén o la presencia de regiones con similitud a pequeños ARN's de interferencia (siRNA) endógenos pueden disparar la metilación de ADN dirigida por ARN y el silenciamiento genético (Lippman y Martienssen, 2004).

La traducción de ARNm a proteína es un requerimiento clave para la acumulación de proteína. Incluso si el promotor es activo, los niveles de ARNm pueden permanecer bajos debido al silenciamiento génico postraduccional o a la inestabilidad del ARNm. La estabilidad del ARNm varía de minutos a días dependiendo de motivos específicos de secuencias presentes dentro del ARNm. La capucha 5'-metil G y la cola 3'-poliA estabilizan los transcritos, así como reclutan factores de traducción. La alteración experimental de las secuencias que rodean el codón de inicio AUG, marcos de lectura abiertos, y 5'-UTRs que regulan la estructura secundaria del ARNm, afectan la estabilidad del ARNm y en la eficiencia de traducción (Liu et al., 2010). El uso de codones optimizados se refiere a la frecuencia del uso de codones alternativos y equivalentes para aminoácidos específicos. La relación de codones utilizados para un aminoácido difiere entre organismos y está correlacionado a los niveles de ARNs disponibles para ese aminoácido (Ikemura, 1985). La optimización de codones de un transgén a la del organismo hospedero es una práctica estándar para los estudios de expresión.

A pesar de lo anterior, es importante tener en cuenta que cualquier codón modificado puede contribuir a la modificación del procesamiento post-traducciona l y generar secuencias no deseadas. Las proteínas citoplasmáticas son degradadas ya sea por rutas mediadas por proteosomas de ubiquitina o por acción de proteasas citosólicas. La fusión de proteínas de interés a otras proteínas o a etiquetas puede ayudar a la recuperación, ayudar a la visualización de proteínas dentro de la célula para estudios *in vivo*, o incrementar la estabilidad.

2. ANTECEDENTES.

La producción de proteínas recombinantes de interés data a la década de los 80's junto con la posterior llegada de métodos de transformación de diferentes especies de plantas. El potencial de uso de las plantas como sistemas de producción de proteínas recombinantes se estableció entre 1986 y 1990 con la exitosa expresión de una proteína de fusión de la hormona humana de crecimiento, un interferón y una albúmina de suero humano (Barta et al., 1986; De Zoeten et al., 1989; Sijmons et al., 1990).

La autenticidad estructural de las proteínas recombinantes de plantas se confirmó en 1990 con la expresión del antígeno A de la proteína de superficie de *Streptococcus mutans* (Curtiss y Cardineau, 1990 y 1992), cuando se utilizaron por primera vez para producir una vacuna experimental: el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBV) (Mason et al., 1992). En un reporte posterior, el grupo demostró que la vacuna producida en las plantas de tabaco generaba la respuesta inmune esperada después de haber sido inyectada en ratones (Thanavala et al., 1995). La inducción de respuestas inmunes mediadas por células B y T utilizando plantas como fuente de vacunas comestibles fue propuesto por los grupos de Mason, Walmsley y Ma, donde los antígenos vacunales son ingeridos en una fruta o en vegetales crudos (Mason y Arntzen, 1995; Walmsley y Arntzen, 2000; Ma y Vine, 1999). Posteriormente el principio de actividad de las vacunas comestibles fue demostrado para papas transgénicas productoras de la subunidad B de la enterotoxina termoestable de *E. coli* (Haq et al., 1995). Los ratones alimentados con papas crudas generaron respuestas inmunes en suero y mucosas hacia el antígeno.

A la fecha se han generado gran cantidad de plantas transgénicas productoras de antígenos vacunales que han demostrado una correcta traducción, conformación y reconocimiento por anticuerpos específicos contra las proteínas recombinantes en bioensayos de inmunogenicidad. Algunos ejemplos de antígenos vacunales generados en plantas se mencionan a continuación: Nochi y colaboradores, quienes en 2007 transformaron arroz con la subunidad B de la toxina Cólera obteniendo un rendimiento del 2.1% de la proteína soluble total, y además observaron que el antígeno generaba una producción de anticuerpos

específicos así como protegía a ratones frente a un reto experimental con el patógeno (Nochi et al., 2007). Wang y colaboradores transformaron tabaco con la proteína de superficie PyMSP4/5 de *Plasmodium yoelii* con un rendimiento del 0.02-0.04% de la proteína soluble total y observaron la producción de anticuerpos específicos en ratones mediante la vía de administración parenteral (Wang et al., 2008).

La producción de antígenos vacunales en alfalfa comenzó con la transformación realizada por Wigdorovitz y colaboradores en 1999 quienes insertaron el gen de la proteína estructural VP1 del virus de la fiebre aftosa al genoma nuclear de la planta. Los autores observaron el desarrollo de una respuesta inmune específica en ratones inmunizados parenteral y oralmente, además los ratones fueron protegidos frente a un reto experimental con el virus (Wigdorovitz et al., 1999). Otro trabajo realizado con este mismo patógeno y sistema de expresión fue el de Dus Santos et al. (2005) en donde insertaron el gen P1 de la poliproteína estructural del virus de la fiebre aftosa. Los ratones inmunizados de manera parenteral desarrollaron una fuerte respuesta de anticuerpos específicos y fueron protegidos frente a un reto infeccioso con el virus.

En 2004, Ziauddin y colaboradores reportaron la transformación nuclear de alfalfa con una porción (Lkt50) del gen de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* utilizando las cepas LBA4404 y C58 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se observó la presencia de polipéptidos completos y truncados con ayuda de sueros anti-Lkt66 en las plantas mantenidas *in vitro*, mientras que las plantas de invernadero expresaban solamente el producto completo (Ziauddin et al., 2004). Dong y colaboradores realizaron en 2005 la transformación genética de alfalfa con un gen con codones optimizados de la proteína VP6 del rotavirus humano de grupo A. El nivel de expresión de la proteína recombinante pBsVP6 en alfalfa fue de 0.28% de la proteína soluble total; los ratones inmunizados oralmente desarrollaron títulos altos de Inmunoglobulinas anti-VP6 en suero e IgA en mucosas, así como la descendencia reaccionó de forma menos severa frente a un reto infeccioso experimental con el rotavirus (Dong et al., 2005). El año siguiente, Joensuu y colaboradores realizan la transformación de cloroplasto de alfalfa con el gen de la subunidad mayor y la adhesina

FaeG de *Escherichia coli* enterotoxigénica F4+ (F4+ ETEC). Los niveles de expresión alcanzaron el 1% de la proteína soluble total. La proteína recombinante se mantuvo estable durante 2 años en plantas deshidratadas y almacenadas a temperatura ambiente. La administración de plantas transgénicas a cerdos junto con la toxina del cólera como adyuvante aumentaron la respuesta inmune y se disminuyó la excreción de *E. coli* F4+ ETEC durante el reto infeccioso experimental (Joensuu et al., 2006).

En 2008, Raymond y colaboradores (Raymond et al., 2008) expresan una lipoproteína de membrana externa de *Mannheimia haemolytica* GS60 en alfalfa para evaluarla como vacuna comestible contra la pastereiosis neumónica bovina. Los autores obtuvieron un rendimiento del 0.02% de la proteína soluble total. También observaron que los antígenos producidos por las líneas transformadas de alfalfa eran reconocidos por anticuerpos específicos contra la proteína GS60 en conejos inyectados con las plantas. Es decir, la administración oral de alfalfas transgénicas fue capaz de inducir una seroconversión. El trabajo más reciente de expresión de vacunas en alfalfa fue realizado por Aguirreburualde (2013), en el cual expresaron una versión truncada de la proteína estructural E2 del Virus de la Diarrea Bovina (BVDV) fusionada a una proteína llamada APCH, que tiene como objetivo a las células presentadoras de antígenos. La concentración de la proteína recombinante APCH-tE2 lograda fue de 1 µg/g de peso fresco y su expresión se mantuvo estable después de la propagación de las plantas. Los conejillos de indias inmunizados de manera parenteral con extractos de hojas de alfalfa transgénicas desarrollaron altos niveles de anticuerpos neutralizantes y después de un reto infeccioso realizado en bovinos con 3 µg de APCH-tE2 producida en alfalfa estos mostraron protección completa (Pérez et al., 2013).

El complejo de antígenos 85 (Ag85A, Ag85B y Ag85C) son proteínas altamente conservadas con actividad micoliltransferasa presentes en todas las especies de micobacterias y abundantemente secretadas en el filtrado de cultivo (Rosseels y Huygen, 2008). Estas proteínas participan en las últimas etapas del ensamblaje de la pared celular de MAP y están codificados por los genes *fbpA*, *fbpB* y *fbpC*, respectivamente (Rosseels et al.,

2006; Belisle et al., 1997; Kathaperumal et al., 2008). Se ha observado que la proteína MAP1609c (Ag85B) se une a fibronectina (Thole et al., 1992; Peake et al., 1993), además de ser la proteína secretoria más abundante dentro del complejo de antígenos 85 (Ohara et al., 1997). Se han reportado las propiedades inmunogénicas de estos antígenos en ganado y ratones experimentalmente infectados con MAP y también en ratones vacunados con la proteína recombinante o como vacunas de ADNp. Los resultados demuestran la generación de respuestas celulares T fuertes y la producción de las citocinas IL-2, IFN- γ , IL-12, TNF- α (Mullerad et al., 2002; Kathaperumal et al., 2008; Park et al., 2008; Rosseels et al., 2008). En pruebas *in vitro* se indujo la producción de interferón gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Shin et al., 2005).

MAP0586c es un antígeno que fue descubierto mediante identificación proteómica sistemática y análisis inmunoproteómicos del secretoma de MAP (Leroy et al., 2007). Esta proteína se identificó como una transglicosilasa putativa (Roupie et al., 2008) y además este antígeno ya ha sido evaluado como vacuna de ADN junto con el gen MAP4308c. La inmunización de ratones con ADN plasmídico conteniendo los genes MAP0586c y MAP4308c indujo una fuerte respuesta inmune de tipo Th1, mientras que el plásmido con el gen MAP4308c estimuló respuestas con anticuerpos. Los ratones BALB/c infectados con MAP también generaron una respuesta específica para MAP0586c de células T y estuvieron parcialmente protegidos contra una infección después de la inmunización con ADN, indicando que esta transglicosilasa putativa necesitaba posteriores estudios de inmunoprotección en rumiantes (Roupie et al., 2008).

En el año 2012, Celis realizó la transformación genética de alfalfa con los genes MAP1609c (Ag85B) y MAP0586c. Para ello, montó un protocolo de transformación mediado por cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* insertando las construcciones pMDC32::MAP1609c y pMDC32::MAP0586c con una eficiencia del 57.5% para el primer caso. Celis concluye que su protocolo de transformación representa un buen modelo como sistema producción de candidatos vacunales, obteniéndose plantas transgénicas en un periodo de 3 meses (Celis, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN.

A pesar de los nuevos métodos moleculares e inmunológicos de diagnóstico y el descubrimiento de vacunas, la enfermedad de Johne (Paratuberculosis) continúa siendo un problema mayor con prevalencia en aumento a nivel mundial. Debido a que un antígeno bien definido y fuertemente inmunogénico puede servir tanto para el diagnóstico como para vacunación, se han realizado grandes esfuerzos para identificar el antígeno que cumpla mejor con estos propósitos para determinado patógeno.

Se han sugerido importantes a los antígenos secretados por las bacterias durante su crecimiento para el desarrollo de una respuesta inmune protectora (Andersen, 1994; Horwitz et al., 1995). Algunos antígenos secretados por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* han sido identificados y el desarrollo de una vacuna inmunoprotectora, barata y de fácil aplicación para este patógeno es necesaria. Las vacunas recombinantes expresadas en plantas reducirían los costos de vacunación relacionados con el transporte, producción, purificación y otros procesos consecuentes usados para las vacunas convencionales. Además, se tiene la ventaja de generar una respuesta inmune de mucosas desde el tracto intestinal (al ser administradas por vía oral), el sitio de entrada de muchos patógenos, un fácil escalamiento, estabilidad de la vacuna, transporte, entre otros beneficios.

4. HIPÓTESIS.

Si los antígenos recombinantes MAP1609c y MAP0586c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* son expresados correctamente en alfalfa, entonces, su inmunoreactividad podrá ser evaluada frente a anticuerpos de animales infectados naturalmente con la bacteria.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Analizar la presencia y producción de los antígenos recombinantes MAP1609c y MAP0586c en alfalfa.

Objetivos particulares.

1. Identificar las líneas de alfalfa con mayor expresión del antígeno recombinante.
2. Evaluar la inmunoreactividad de los antígenos recombinantes expresados en alfalfa con sueros de animales naturalmente infectados con MAP.
3. Evaluar la inmunoreactividad de extractos protéicos de alfalfa transgénica con anticuerpos específicos de ratones inmunizados con ADNp.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Desarrollo y selección de embriones de alfalfa con los genes MAP1609c y MAP0586c.

La transformación genética de alfalfa se realizó mediante el co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (Celis, 2012) en la cual el paso final consiste en la siembra de los explantes transformados en medio B5hKCb. Una vez generados los embriones a partir de los explantes estos fueron transferidos a frascos con medio Murashige-Skoog (Anexo III) con Higromicina (50 mg/L) para la selección de las plantas las cuales sean resistentes al antibiótico debido a la correcta incorporación del material genético a su genoma. Los embriones deben desarrollarse normalmente hasta formar hojas completas, el aspecto debe ser de color verde oscuro, no vitrificadas, ni café. Los embriones se transfirieron a frascos de vidrio con 20 mL de medio MS/Hig y se descartaron aquellos que no se desarrollaron por completo. Finalmente, se descartaron los embriones que no se desarrollaron y se individualizaron aquellos que crecieron adecuadamente. Las plantas generaron hojas completas y se subcultivaron con el siguiente método: (1) las plantas ya desarrolladas son transferidas desde los frascos hacia placas de cerámica estériles (2) se corta el tallo entre los nudos (donde se encuentra el tejido somático y que da origen a nuevos brotes) procurando dejar 2 nudos en cada corte (3) los esquejes de la planta son transferidos a cajas magenta con medio Murashige-Skoog estéril (4) el procedimiento debe realizarse lo más brevemente posible para impedir el escape de agua de las hojas debido al cambio brusco de humedad *in vitro-ex vitro*. Las condiciones de cuarto de cultivo fueron de una temperatura de 28 °C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

6.1.1. Bioensayo de inducción de callo.

Una vez desarrollados los embriones de alfalfa hasta producir hojas se colectó una ramita por línea seleccionada y se transfirieron a placas de petri con agua destilada estéril. Se cortaron las 3 hojas hasta la base del tallo y se colocaron sobre cajas petri con medio Murashige-Skoog, 2,4-D (1 mg/mL), cinetina (0.1 mg/L) e Higromicina (50 mg/L). Se utilizó como control negativo alfalfa Regen SY27 sin transformar. El experimento se realizó por triplicado para cada construcción genética, así como para el control negativo.

6.2. Confirmación de transformación de alfalfa mediante PCR.

6.2.1. Extracción de ADNg de alfalfa.

La extracción de ADNg de alfalfa se llevó a cabo mediante el método de CTAB (modificado de Weigel y Glazebrook, 2012).

Se homogenizaron en un mortero frío y estéril 100 mg de tejido vegetal con Nitrógeno líquido. Inmediatamente se agregaron 300 μ L de Buffer de extracción CTAB 2x (2% (p/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1% v/v 2-mercaptoetanol, agregar justo antes de usar). Posteriormente se mezcló e incubó a 65 °C durante 30 minutos invirtiendo los tubos cada 5 minutos. Se agregaron 600 μ L de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1) y se homogenizó por inversión. A continuación se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos (Hermle Z30K) y se recuperó la fase superior en un tubo nuevo. Inmediatamente se agregaron 500 μ L de Isopropanol y se mezcló nuevamente por inversión. Se incubaron los tubos durante 30 minutos a -20 °C. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 15 minutos y se decantaron, se lavaron con 1 mL de Etanol al 70%. Se realizó una última centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar el Etanol durante 15 minutos. Finalmente se resuspendió en un volumen final de 30 μ L de agua Milli Q.

6.2.3. Verificación de integridad de ADNg vegetal extraído mediante PCR.

Para verificar la correcta extracción de ADNg y evaluar su integridad se realizó PCR utilizando como ADN templado el material genético extraído de alfalfas y microalgas utilizando primers universales para especies vegetales diseñados por Taberlet y colaboradores en 1991. Se utilizó el primer forward Trn1c (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3') y el primer reverse Trn1d (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') los cuales generan un producto de aproximadamente 400 pares de bases. La mezcla de reacción y el programa de PCR se detallan a continuación:

Buffer GoTaq Flexi 5X	2.5 μ L	94 °C ----- 3 min	
MgCl ₂ (25 mM)	1 μ L	94 °C ----- 1 min	} 34 ciclos
dNTP's (10 mM)	0.25 μ L	53 °C ----- 1 min	
Tnl c (10 μ M)	1 μ L	72 °C ----- 1 min	
Tnl d (10 μ M)	1 μ L	72 °C ----- 10 min	
Go Taq Flexi (1U/ μ L)	0.1 μ L	25 °C ----- infinito	
ADN (50-100 ng)	X		
Agua Milli Q (Vol. Final 12.5 μ L)	X		

6.2.4. PCR de líneas de alfalfa transformantes con los genes MAP1609c y MAP0586c.

El gen MAP1609c fue amplificado con un primer forward con la secuencia 5'-TTTCTAGAATGGGCCGCGACATCAAGGTC-3' y un primer reverse 5'-TTTCTAGAGTTATCCGCCGCCGCCCG-3' los cuales generan un producto de amplificación de 831 pares de bases y que además poseen un sitio de restricción para la enzima *Xba*I cada uno (marcado en negritas). El gen MAP0586c fue amplificado con el primer 5'-GGAAGATCTTGGTGAGCAATCGGCGCACC-3' (forward) y el primer 5'-TATAAGAATTCCTGCGGGTGCGCCGCCACGTAGTCGG-3' los cuales generan un producto de amplificación de 961 pares de bases. La mezcla de reacción de PCR para ambos juegos de primers se detalla en la siguiente tabla:

Buffer GoTaq Flexi 5X	2.5 μ L	95 °C ----- 3 min	
MgCl ₂ (25 mM)	1 μ L	95 °C ----- 1 min	} 34 ciclos
dNTP's (10 mM)	0.25 μ L	60 °C ----- 1 min	
Primer Fw (10 μ M)	1 μ L	72 °C ----- 1 min	
Primer Rv (10 μ M)	1 μ L	72 °C ----- 10 min	
Go Taq Flexi (1U/ μ L)	0.1 μ L	25 °C ----- infinito	
DMSO 5%	0.625 μ L		
ADN (50-100 ng)	X		
Agua Milli Q (Vol. Final 12.5 μ L)	X		

6.3. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes MAP1609c y MAP0586c en *E. coli*.

Se analizaron los vectores de expresión pQE-80L::MAP1609c y pQE-80L::MAP0586c (Anexo II) gentilmente donados por la Dra. Kris Huygen (Instituto Científico de Salud Pública, Bruselas, Bélgica) mediante PCR de punto final para corroborar la presencia de una etiqueta de 6xHis la cual permite la purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC). Para ello se diseñaron primers flanqueando el gen insertado y la etiqueta de histidina, se utilizó el primer forward con secuencia 5'-TGCCACCTGACGTCTAAGAA-3' y el primer reverse con secuencia 5'-GAACCGCTCTAAAAGTCCTC-3', el producto de amplificación de los primers es de 1299 pares de bases. La mezcla de reacción y programa de amplificación se detallan a continuación:

Buffer GoTaq Flexi 5X	2.5 μ L	95 °C ----- 3 min	} 34 ciclos
MgCl ₂ (25 mM)	1 μ L	95 °C ----- 1 min	
dNTP's (10 mM)	0.25 μ L	60 °C ----- 1 min	
pQE-80LF (20 μ M)	1 μ L	72 °C ----- 1:10 min	
pQE-80LR (20 μ M)	1 μ L	72 °C ----- 10 min	
Go Taq Flexi (1U/ μ L)	0.1 μ L	25 °C ----- infinito	
DMSO 5%	0.625 μ L		
ADN (50-100 ng)	X		
Agua Milli Q (Vol. Final 12.5 μ L)	X		

Una vez analizada la secuencia obtenida por Genewiz (Genewiz Inc., E.U.A.) y corroborando la presencia de la etiqueta de Histidinas se procedió a la expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

6.3.1 Crecimiento e inducción del cultivo.

Se inocularon 20 mL de medio LB/Ampicilina (100 μ g/mL) en un matraz de 100 mL y se incubaron los cultivos toda la noche a 37 °C con agitación. Posteriormente se inoculó 1 L de medio precalentado a 37 °C (con Ampicilina) con 20 mL de los cultivos anteriores y se crecieron a 37 °C con agitación vigorosa (aprox. 120 rpm), hasta una OD₆₀₀ de 0.6

(aproximadamente 80 min). Se indujo la expresión agregando IPTG (Sigma CAT #I5502) hasta una concentración final de 1 mM. Se incubaron los cultivos durante 4 horas y se colectó 1 mL de células a intervalos de 1, 2, 3, y 4h, estas muestras se centrifugaron a 4000 x g 5 minutos (Heraus Pico 17, Thermo Scientific), se resuspendieron en 1 mL de PBS y se congelaron a -20 °C hasta su uso. Se cosecharon las células por centrifugación a 3500 rpm por 30 minutos, se decantó el medio y almacenaron los pellets a -20 °C.

6.3.2 Extracción de proteína de *E. coli*.

Se resuspendieron los pellets en 3-5 mL de Buffer de fosfatos (Anexo IV) y se homogenizaron en un solo tubo. Se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y resuspendieron las células en un volumen igual al pellet de Buffer de fosfatos. La lisis consistió en 6 intervalos de sonicación de 10 segundos con pausas de 10 segundos en hielo. Se agregó 1 µL de PMSF (Sigma CAT #P7626) por cada mL de extracto y se centrifugaron los lisados a 10000 x g durante 10 minutos para remover restos celulares. Finalmente se analizaron los extractos protéicos mediante una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 10%.

6.4. Identificación de líneas de alfalfa con mayor expresión de antígeno recombinante.

6.4.1. Extracción de proteínas de alfalfa.

Se siguió el protocolo de extracción de proteínas de alfalfa descrito por Ibarra y colaboradores en 2011 (Ibarra, et al., 2011) con ligeras modificaciones (extracción sin nitrógeno líquido). A lo largo del experimento se mantuvieron las muestras en hielo. Se homogenizó la muestra en un mortero frío y con ayuda de perlitas de vidrio (Sigma CAT# G4649). Posteriormente se agregó 1.5 mL de Buffer TBE 1X (Anexo IV) por cada 100 mg de tejido vegetal y se agitó durante 30 minutos en vórtex. Enseguida se centrifugaron los tubos a 12000 x g durante 10 minutos a 20-25 °C. Para finalmente filtrar el sobrenadante con un filtro con un tamaño de poro de membrana de 0.45 µm de diámetro. Se almacenaron las muestras en congelación a -20 °C.

6.4.2. ELISA indirecto de proteínas recombinantes de alfalfa.

Para la técnica de ELISA indirecta previamente se determinó la concentración óptima de anticuerpo primario y secundario a utilizar durante cada prueba. Se utilizó suero colectado de una oveja infectada naturalmente con MAP como anticuerpo primario. Posteriormente se evaluaron 35 sueros de animales infectados naturalmente (Gentimente donados por la Dra. Sawako Hori, IICV-UABC).

Brevemente, se colocaron 100 μ L de extractos de proteína de alfalfa por pocillo a una concentración de 20 μ g/mL de proteína, un blanco (PBS en lugar de extracto) y un control negativo (alfalfa sin transformar) en PBS (Anexo IV) seguido de una incubación de 2 hrs a 37° C. Inmediatamente se lavó por 5 minutos cada pocillo con PBST (Anexo IV) 3 veces. Posteriormente se procedió a bloquear con 200 μ L de leche descremada 5% (0.5 g de leche en 10 mL de PBST) y a incubar por 2 hrs a la temperatura del cuarto. Se lavó 3 veces con PBST e inmediatamente se agregaron 100 μ L del anticuerpo primario en PBST. Se incubó la placa durante 1:30 hrs a 37° C. Una vez terminada la incubación se lavó 3 veces con PBST. Se agregaron 100 μ L de Anti-Goat IgG (Sigma CAT #A5420) a una dilución a 37° C en PBST y se incubó la placa durante 1:30 hrs a 37° C. Se lavó la placa 3 veces con PBST. Se desarrolló la reacción mediante la adición de 200 μ L del sustrato *o*-fenildiamina (Sigma CAT #P8287) y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. Se leyeron las absorbancias a 405, 450 y 490 nm.

6.5 Producción de anticuerpos específicos contra las proteínas MAP1609c y MAP0586c.

6.5.1 Ratones.

Se utilizaron ratones de la cepa CD1 de 6-8 semanas de edad y con un peso de 20 g aproximadamente para el inicio del experimento. Se alojaron en jaulas con 5 individuos, y se organizaron por grupos de inmunización. Los ratones se alimentaron con comida comercial y agua disponible para cada jaula.

6.5.2 Purificación de ADNp con los genes MAP1609c y MAP0586c por lisis alcalina con SDS (Modificado de Sambrook and Russell).

El vector utilizado para la expresión de los genes de interés en células de mamífero fue el plásmido pV1J.ns-tPA (Roupie et al., 2008) donado por la Dra. Kris Huygen (Instituto Pasteur, Bruselas, Bélgica. Se cultivaron células previamente transformadas con las construcciones pV1J.ns-tPA::MAP1609c y pV1J.ns-tPA::MAP0586c y se continuó con el protocolo siguiente:

6.5.2.1 Preparación de inóculo.

Se inocularon 30 mL de medio LB con el antibiótico de resistencia con 0.1-1 mL de células transformadas con el plásmido y se incubó el cultivo a 37 °C con agitación vigorosa hasta que las bacterias alcanzaron una $O.D._{600} = \sim 0.6$. Posteriormente, se inocularon 500 mL de medio LB precalentado a 37 °C con el antibiótico indicado con 25 mL del cultivo y se incubó el cultivo por 16 horas a 37 °C a 300 ciclos/min de agitación. Enseguida se colectó el resto de las células mediante centrifugación a $2700 \times g$ (4100) por 15 min a 4 °C descartando el sobrenadante. Finalmente se resuspendió el pellet en 20 mL de STE enfriado en hielo y se colectaron las bacterias por centrifugación. Se almacenó el pellet a -20 °C.

6.5.2.2 Lisis de células.

Se dejó derretir el pellet de bacterias a temperatura de cuarto por 5-10 minutos y se resuspendió el pellet en 1.8 mL de la solución de Birnboim 1 (Anexo IV). Se agregaron 200 μ L de lisozima (10 mg/mL, Sigma CAT #L6876) recién preparada. A continuación se agregaron 4 mL de solución II (Anexo IV) recién preparada e inmediatamente se mezcló suavemente el contenido de los tubos por inversión. Después se incubaron los tubos durante 5-10 minutos a temperatura del cuarto. Inmediatamente se agregaron 2 mL de la solución III (Anexo IV) y se mezcló suavemente girando el contenido (no deben verse 2 fases en este punto). Finalmente se incubó en hielo por 10 minutos seguido de una centrifugación a $\geq 20000 \times g$ por 30 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante claro y descartó el pellet.

6.5.2.3 Recuperación de ADN plasmídico.

Se tomó el sobrenadante y se mezcló junto 0.6 volúmenes de isopropanol en tubos nuevos. Se incubó por 10 minutos a temperatura del cuarto y se recuperaron los ácidos nucleicos por centrifugación a 12000 x g por 15 minutos a temperatura del cuarto. Posteriormente se decantó el sobrenadante con cuidado invirtiendo el tubo sobre papel absorbente. Enseguida se lavó con etanol al 70% a temperatura de cuarto y se decantó. Finalmente se dejó evaporar el etanol remanente por 10-15 minutos y se disolvió el pellet en 300 μ L de TE con RNAsa (Sigma CAT #R6513).

6.5.2.4 Purificación.

Se resuspendió el pellet en un volumen de 200 μ L de agua Milli Q y se agregó 1 volumen (200 μ L) de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se mezcló suavemente en el vórtex hasta formar una emulsión opaca. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g por 7 minutos y se tomó la fase superior acuosa que contiene los plásmidos. Se agregó 1 volumen (200 μ L) de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 a la fase acuosa recuperada y se agitó nuevamente en vórtex. Inmediatamente se centrifugó a 12000 x g por 7 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agregaron 2.5 volúmenes (500 μ L) de Etanol absoluto frío y 8 μ L de NaCl 5M y se mezcló suavemente por inversión. Se incubó a -80 por 2 hrs seguido de una centrifugación a 10000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó 2 veces el pellet con 1 mL de Etanol al 70% frío seguido de una centrifugación a 10000 rpm durante 5 min. Finalmente se descartó el sobrenadante, se resuspendió en Milli Q estéril y se almacenó a -20 hasta su uso.

6.5.3 Inmunización de ratones.

Los ratones fueron inmunizados intramuscularmente a la semana 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 con 100 μ g de ADN plasmídico, se inyectaron 50 μ g en cada muslo y los grupos se organizaron de acuerdo a la configuración siguiente:

Grupo 1 (Control -): Volumen de PBS equivalente al total de μL utilizados para 100 μg de ADNp.

Grupo 2: Volumen necesario para un total de 100 μg de la construcción pV1J.ns-tPA::MAP1609c.

Grupo 3: Volumen necesario para un total de 100 μg de la construcción pV1J.ns-tPA::MAP0586c.

La toma de suero se realizó mediante sangrado de la cola y con la ayuda de tubos capilares con heparina a la semana 0, 5, 7 y 9. La sangre fue centrifugada a $400 \times g$ durante 10 minutos, el suero fue diluido en PBS y congelado a -20°C . Finalmente los ratones fueron sacrificados 1 mes después de la última inmunización, la sangre fue colectada y se obtuvo el suero mediante centrifugación a $3000 \times g$ durante 5 minutos.

6.5.4 ELISA indirecta con sueros de ratones inmunizados.

Se utilizó como anticuerpo primario, el suero de los animales inmunizados con ADNp y como anticuerpo secundario Anti-Mouse IgG conjugado con peroxidasa (Sigma CAT #A9044). En breve: se colocaron en cada pocillo 100 μL de extractos protéicos de *E. coli* inducida 4 hrs con IPTG y transformada con el plásmido pQE-80L::MAP1609c, pQE-80L::MAP0586c (Anexo II) a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se utilizó como control negativo extracto protéico de *E. coli* DH5 α sin transformar, un blanco con PBS en lugar de anticuerpo primario y Anti-Mouse IgG (1:1000) como control positivo de la reacción. Enseguida se realizó una incubación de 2 hrs a 37°C . Inmediatamente se lavó por 5 minutos cada pocillo con PBST 3 veces. Posteriormente se procedió a bloquear con 200 μL de leche descremada 5% (0.5 g de leche en 10 mL de PBST) y a incubar por 2 hrs a la temperatura del cuarto. Se lavó 3 veces con PBST e inmediatamente se agregaron 100 μL del anticuerpo primario en PBST. Se incubó la placa durante 1:30 hrs a 37°C . Una vez terminada la incubación se lavó 3 veces con PBST. Se agregaron 100 μL del anticuerpo secundario a 37°C en PBST y se incubó la placa durante 1:30 hrs a 37°C . Se lavó 3 veces con PBST. Se desarrolló la reacción mediante la adición de 200 μL del sustrato *o*-

fenildiamina (Sigma CAT #P8287) y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. Se leyeron las absorbancias a 405, 450 y 490 nm.

6.6 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis ANOVA de una sola vía para determinar diferencias significativas entre líneas de alfalfa con mayor expresión de proteína recombinante, al igual que para el ELISA indirecto con extractos de las líneas con mayor expresión de recombinante frente a sueros de animales infectados naturalmente con MAP. Para los datos obtenidos durante el bioensayo de producción de anticuerpos y la inmunoreactividad frente a extractos de alfalfa y *E. coli* transgénica se realizó un ANOVA factorial utilizando el software STATISTICA 8.0 y SigmaPlot 11.0.

7. RESULTADOS.

7.1 Desarrollo y multiplicación de embriones de alfalfa con las construcciones MAP1609c y MAP0586c.

Se partió desde explantes de alfalfa transformados mediante cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones MAP1609c y MAP0586c por el Biólogo Rodrigo Celís en 2011 (Celis, 2012) los cuales se desarrollaron en medio B5hKCb (Figura 6). Una vez desarrollados los embriones estos se transfirieron a frascos con medio MS e Higromicina (50 mg/L) como antibiótico de selección. Debido a la alta proliferación, un total de 100 embriones transformados con cada construcción fueron transferidos con 5 individuos por frasco. Después de algunas semanas, se observaron embriones sin desarrollo, embriones con hojas cotidelonares y embriones con hojas nomófilas (Figura 6, incisos b, c y d).

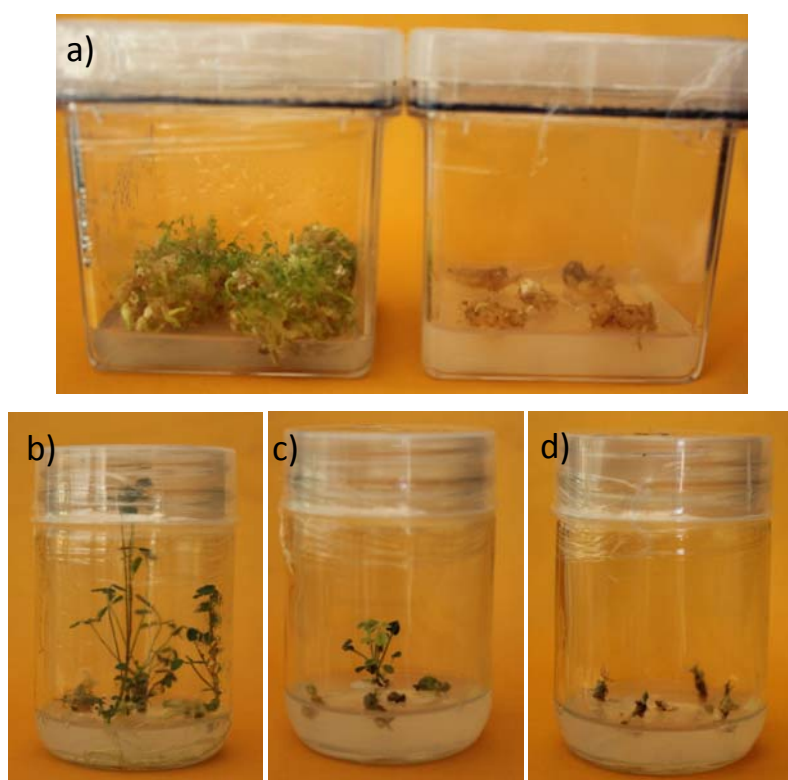


Figura 6. Desarrollo de embriones y conversión a planta. a) Proliferación de explantes de alfalfa transformados con el gen MAP0586c (izquierda) y explantes de plantas de alfalfa Regen SY27 sin transformar (derecha). b) Plantas con hojas nemófilas transformadas con el gen MAP0586c. c) Plantas con hojas eófilas transformadas con el gen MAP1609c. d) Plantas con hojas coditelonares transformadas con el gen MAP1609c.

Se clasificó el desarrollo de los embriones de acuerdo al crecimiento de las hojas: embrión sin crecimiento, embrión con hojas dicotiledonares y embrión con hojas eófilas o nemófilas. De los 100 embriones por construcción transferidos a frascos se construyó la tabla 5:

Tabla V. Número de embriones desarrollados a partir de explantes de alfalfa transformada con los genes MAP1609c y MAP0586c.

Frasco	SC	HC	HNE	Construcción	Frasco	SC	HC	HNE	Construcción
3	0	2	3	MAP0586c	1	0	4	1	MAP1609c
4	1	1	3	MAP0586c	2	0	3	2	MAP1609c
6	1	1	3	MAP0586c	5	0	2	3	MAP1609c
8	2	1	2	MAP0586c	7	3	0	2	MAP1609c
13	2	0	3	MAP0586c	9	2	1	2	MAP1609c
14	1	0	4	MAP0586c	10	2	0	3	MAP1609c
15	1	1	3	MAP0586c	11	2	0	3	MAP1609c
16	2	0	3	MAP0586c	12	1	0	4	MAP1609c
20	/	/	/	MAP0586c	17	/	/	2	MAP1609c
21	2	0	3	MAP0586c	18	1	2	2	MAP1609c
22	0	1	4	MAP0586c	19	3	0	2	MAP1609c
23	1	2	2	MAP0586c	24	4	0	1	MAP1609c
26	0	0	5	MAP0586c	25	4	0	1	MAP1609c
28	0	1	4	MAP0586c	27	2	0	3	MAP1609c
29	1	2	2	MAP0586c	31	3	0	2	MAP1609c
30	0	0	5	MAP0586c	32	3	1	1	MAP1609c
34	2	0	3	MAP0586c	33	4	0	1	MAP1609c
35	1	2	2	MAP0586c	38	1	3	1	MAP1609c
36	0	1	4	MAP0586c	39	/	1	/	MAP1609c
37	3	0	2	MAP0586c	40	2	1	2	MAP1609c
Total	20	15	60		Total	37	18	38	

SC: Embriones sin crecimiento. HC: Embriones con hojas cotiledonares. HNE: Plantas con hojas eófilas o nemófilas. /: embriones con necrosis o malformaciones.

Un promedio del 75% de los embriones de alfalfa transformada con el gen MAP0586c lograron desarrollarse hasta producir hojas eófilas o nemófilas y el 25% de ellas no presentaron crecimiento después de su individualización (Fig 6, imagen d). Un promedio del 56% de los embriones de alfalfa transformada con el gen MAP1609c desarrollaron hojas eófilas o nemófilas mientras que el 44% no mostró crecimiento. Las plantas que no se desarrollaron, o aquellas que se desarrollaron con malformaciones, clorosis o vitrificación, fueron descartadas y se procedió a individualizar cada embrión. Se descartaron las plantas con malformaciones, vitrificación y clorosis y se establecieron 50 líneas de alfalfa con el gen MAP0586c y 25 líneas de alfalfa con el gen MAP1609c las cuales posteriormente se continuaron propagando.

7.1.1 Bioensayo de inducción de callo.

Para hacer una primera evaluación sobre la transformación genética de las plantas de alfalfa se colocaron explantes foliares sobre medio sólido adicionado con los reguladores de crecimiento 2,4-D (1 mg/L) y Cinetina (0.1 mg/L) así como Higromicina (50 mg/L) como antibiótico de selección. El vector pMDC32 (Anexo II) cuenta con el gen de resistencia a Higromicina, el cual es transferido al organismo objetivo, además del gen de interés. El experimento se realizó por triplicado, colocando explantes foliares de las líneas de alfalfa transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c en las placas.

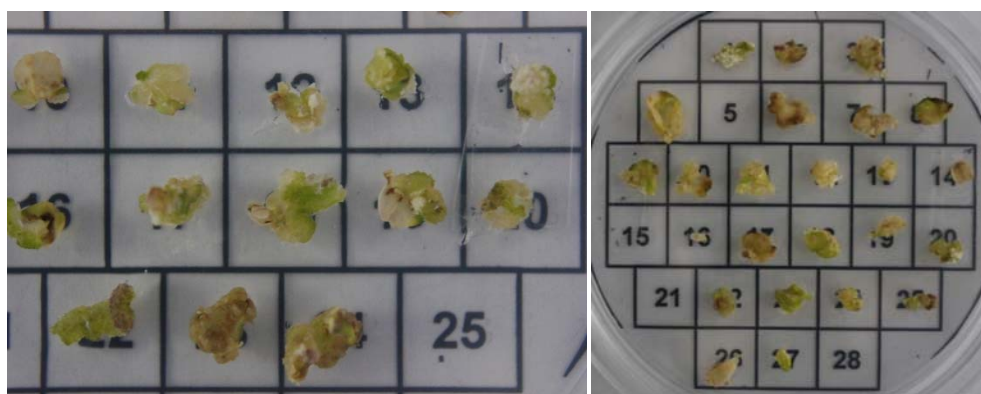


Figura 7. Proliferación celular de explantes foliares de alfalfas transformadas con los genes MAP1609c (izquierda) y MAP0586c (derecha). Los controles negativos de la placa A1 (derecha) se encuentran en las posiciones 26 y 27, ambos sin proliferación alguna y un aspecto clorótico.

La proliferación de células se observó mediante estereoscopio y se elaboró una tabla resumen de cada placa del experimento (Anexo V). De un total de 50 líneas de alfalfa se analizaron 47 explantes con el gen MAP0586c, esto debido a que las hojas de 3 líneas eran muy pequeñas y su manejo era dificultoso; así como 23 líneas con el gen MAP1609c. En la placa A1 (en la cual se colocaron los explantes de plantas con el gen MAP0586c) se observó ligera proliferación en el área de corte de la línea 14 y una ligera proliferación en el área de contacto con el medio del control negativo.

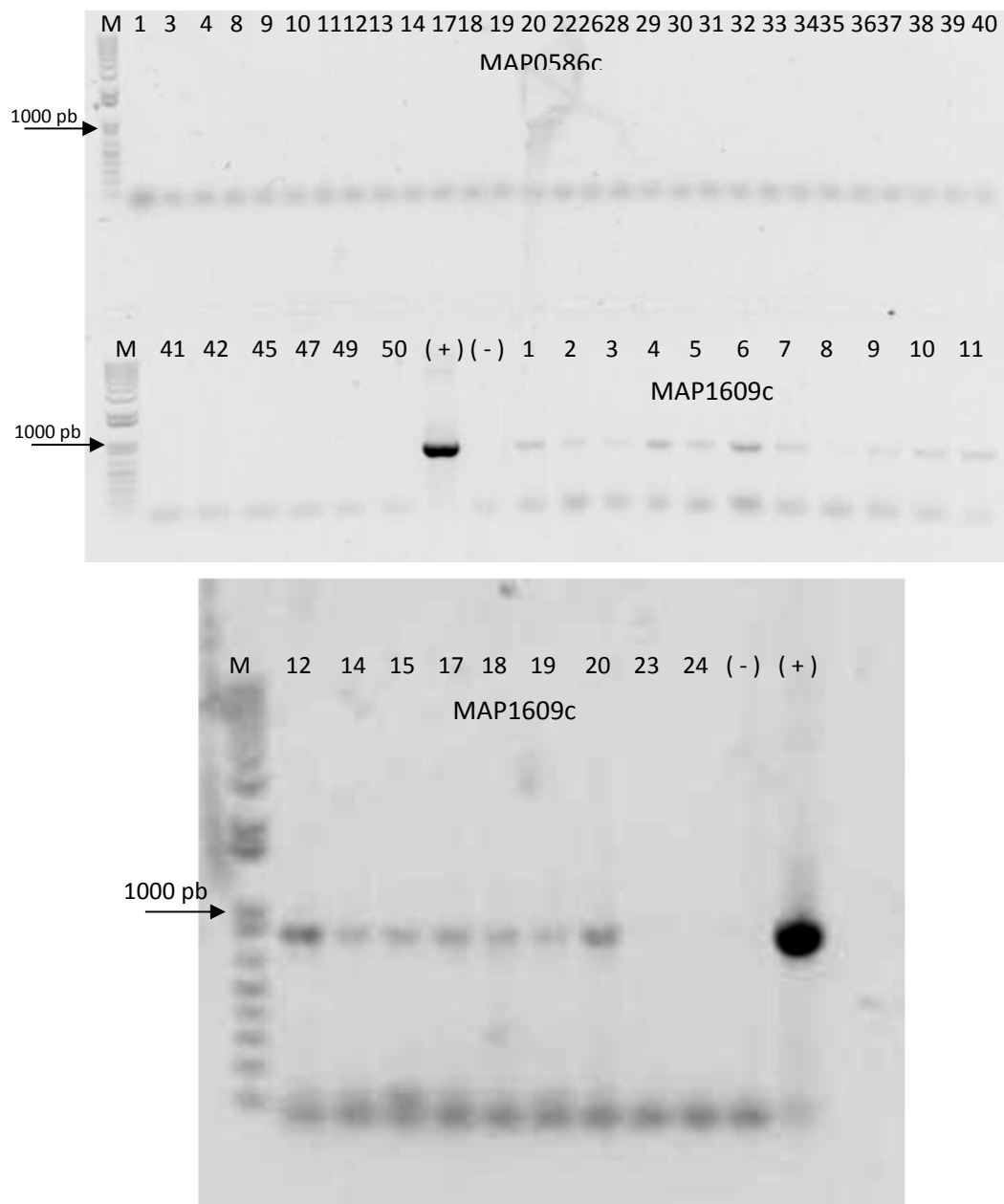
En la placa A2 no hubo proliferación de las líneas 8 y 16, así como de los controles negativos. En la placa A3 no hubo proliferación de la línea 16 ni de los controles negativos. En la serie de placas B se colocó el resto de las líneas con la construcción MAP0586c; en la placa B1 las líneas 32, 35 y 38 no mostraron proliferación y la línea 46 mostró ligera proliferación en el área de corte; en la placa B2 no se observó crecimiento de las líneas 29, 32, 35 y 47. En la caja B3 no se observó proliferación de los explantes de las líneas 29, 35 y 38. Finalmente, todas las líneas de alfalfa transformadas con el gen MAP1609c colocadas en las cajas C1, C2 y C3 mostraron proliferación. En resumen, el 100% de los explantes de plantas transformadas con el gen MAP1609c mostró proliferación celular formando callo y un 89% de los explantes de plantas con el gen MAP0586c demostrando la resistencia conferida por la transgénesis.

7.2 Análisis molecular de transformantes de alfalfa con los genes MAP1609c y MAP0586c.

Previo al PCR con primers específicos para los genes se realizó un PCR con primers universales para planta, con el objetivo de verificar la integridad del ADNg extraído. En todas las líneas de alfalfa transformadas con el gen MAP1609c, excepto las líneas 8, 23 y 24, se amplificó a un producto de tamaño correcto (aproximadamente 1000 pares de bases), confirmando la presencia del transgén en el genoma de la planta. En ambos casos el ADN de alfalfa sin transformar resultó negativo. No fue posible la amplificación de las líneas de alfalfa transformadas con el gen MAP0586c en ninguno de los PCR's (Fig. 8). Se modificaron algunos parámetros como la concentración de ADN templado y la temperatura

de alineamiento de los primers, obteniendo los mismos resultados. Se decidió continuar con el subcultivo de todas las líneas y confirmar la transgénesis mediante otros métodos moleculares.

Figura 8. Amplificación de ADN genómico de líneas de alfalfa transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c.

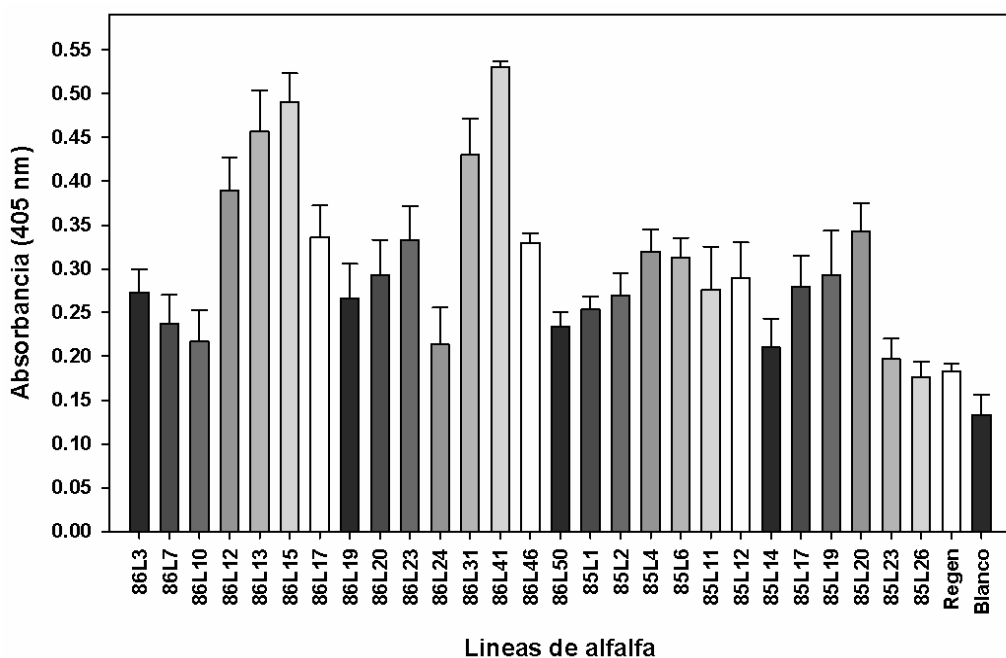


M: 1 Kb Plus (Invitrogen™ #CAT. 10787-018). (-) Control negativo agua Milli Q. (+) Control positivo plásmido pV1J.ns-tPA::MAP1609c y pV1J.ns-tPA::MAP0586c.

7.3 Identificación de las líneas de alfalfa con mayor expresión de las proteínas recombinantes MAP1609c y MAP0586c.

Se evaluó la expresión de proteína recombinante entre líneas mediante la técnica de ELISA indirecta, la cuál se basa en el reconocimiento Antígeno-Anticuerpo y la reacción de un anticuerpo marcado con un sustrato que genera una coloración proporcional a la cantidad de complejos formados. Las absorbancias obtenidas a 405 nm en la prueba de ELISA indirecta con extractos proteicos de alfalfas transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c mostraron las líneas con mayor expresión de proteína recombinante (Fig. 9). El análisis estadístico realizado mediante SigmaPlot mostró una falta de normalidad en los datos por lo que se realizó un análisis de varianza Kruskal-Wallis de una vía para los rangos mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$).

Figura 9. ELISA indirecta con líneas de alfalfa transformadas con los genes MAP1609c (85) y MAP0586c (86).



Control negativo: Alfalfa sin transformar (Regen). Control negativo: PBS como anticuerpo primario (Blanco). Suero de animal infectado naturalmente con MAP como anticuerpo primario (1:1000).

La línea L8520 transformada con el gen MAP1609c mostró la mayor absorbancia, seguida por las líneas 4, 19, 6 y 12. La diferencia entre la línea 20 y las plantas sin transformar fue de casi el doble de la absorbancia. Para el caso de las plantas transformadas con el gen MAP0586c, la línea 41 mostró la mayor absorbancia, seguida de las líneas 15, 13, 31, y 12. La diferencia de la línea 41 con respecto a las plantas sin transformar fue de casi el triple de la absorbancia. La comparación entre la línea 41 y 20 transformadas con los genes MAP0586c y MAP1609c, respectivamente, hace notar una posible mayor expresión de proteína recombinante en la primera.

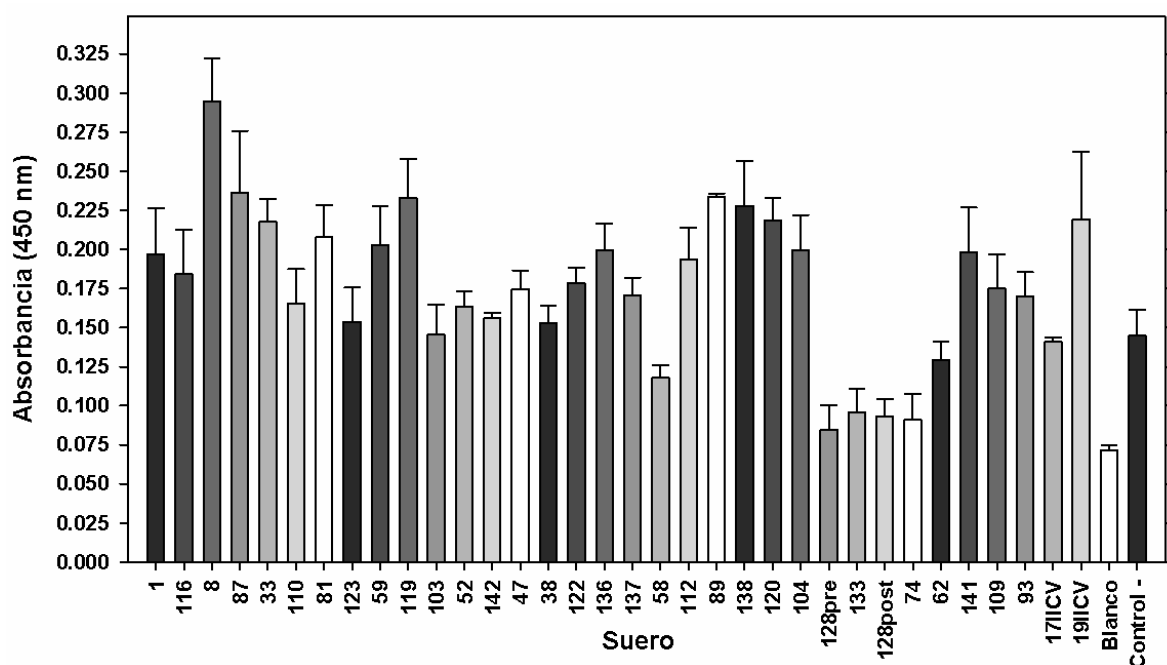
7.4 Inmunoreactividad de extractos proteicos de las líneas 20 y 41 transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c con sueros de animales infectados naturalmente con MAP.

Las pruebas de identificación de las líneas con mayor expresión de proteína recombinante se realizaron con un suero colectado de una oveja infectada naturalmente. Posteriormente se utilizaron 35 sueros colectados de otros animales infectados naturalmente, y se probaron contra los extractos de las líneas que presentaron mayor expresión de antígenos recombinantes mostrando absorbancias muy distintas. El suero con mayor título de anticuerpos específicos contra las proteínas recombinantes de MAP fue el suero #8 (Figs 10 y 11). En ambos casos llegó a ser casi el doble de la absorbancia obtenida en el control negativo con alfalfa sin transformar (Control -).

Los sueros 128prei, 123, 128post, 74 y 62 registraron absorbancias más bajas que el control negativo de alfalfa sin transformar en la prueba contra extractos proteicos de plantas transformadas con la proteína MAP1609c; sin embargo, el resultado fue el contrario para los extractos de la proteína MAP0586c (excepto el suero 62). Al realizar el análisis de varianza de una vía (ANOVA) el valor de significancia ($p=0.001$) mostró diferencias estadísticamente significativas para la ELISA indirecta con extractos de alfalfa con la proteína MAP0586c, de igual forma para la proteína MAP1609c se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$).

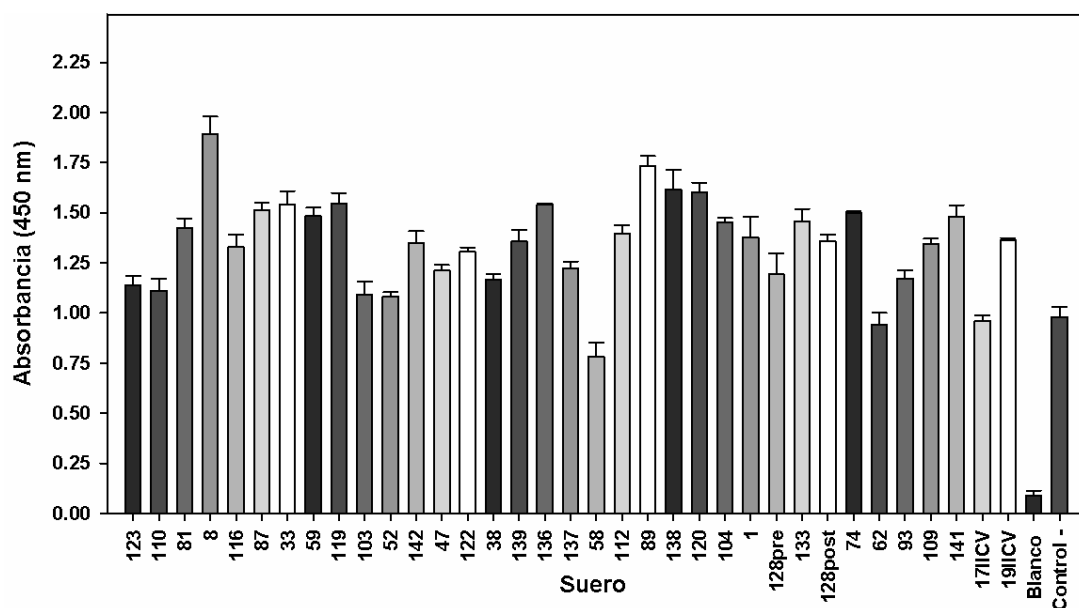
El suero 58 registró absorbancias menores a las del control negativo en ambos casos. Se observaron absorbancias más altas que las del control negativo de alfalfa sin transformar en 26 de los 35 sueros utilizados para los extractos proteicos de la línea 20 de alfalfa transformada con el gen MAP1609c (Fig 10). La ELISA indirecta realizada con extractos proteicos de la línea de alfalfa 41 transformada con el gen MAP0586c (Fig. 11) mostró una mayor absorbancia que la del control negativo de alfalfa sin transformar en 32 de los 35 sueros utilizados, (suero 58, 62 y 17IICV mostraron absorbancias menores al control negativo) indicando que un número mayor de sueros tenían anticuerpos específicos contra la proteína MAP0586c que contra la proteína MAP1609c.

Figura 30. ELISA indirecta con extractos protéicos de la línea 20 de alfalfa transformada con el gen MAP1609c.



Control negativo de alfalfa sin transformar (Control -). Control negativo con PBS como anticuerpo primario (Blanco). Anticuerpo primario obtenido de cabras infectadas naturalmente con MAP (Dil. 1:25).

Figura 4. ELISA indirecto con extractos protéicos de la línea 41 de alfalfa transformada con el gen MAP0586c.

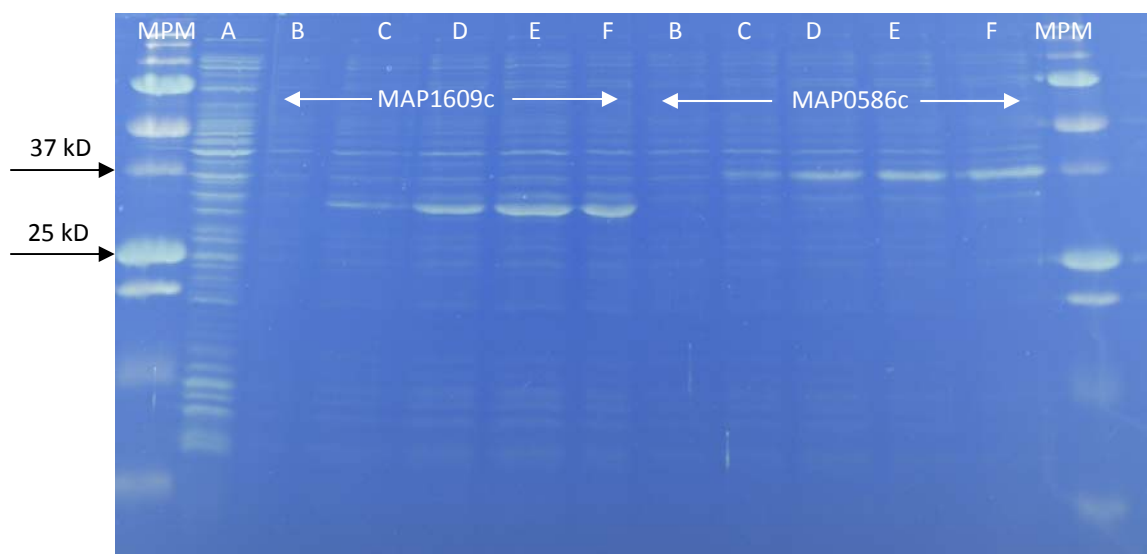


*Control negativo de alfalfa sin transformar (Control -). Control negativo con PBS como anticuerpo primario. Anticuerpo primario obtenido de cabras infectadas naturalmente con MAP (Dil. 1:25).

7.5 Expresión y purificación de proteínas recombinantes de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Escherichia coli*.

Para lograr la determinación de la cantidad de proteína recombinante expresada por las plantas transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c es necesario elaborar una curva patrón de concentraciones conocidas de proteína recombinante purificada, y comparar las absorbancias generadas en una prueba de ELISA indirecta frente a las absorbancias generadas por las plantas. Primeramente, se corrieron los extractos de los cultivos inducidos al tiempo 0 y a la hora 1, 2, 3 y 4 en una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 10%. La expresión de la proteína recombinante fue incrementándose a cada hora, obteniéndose la mayor intensidad de la banda a las horas 3 y 4 postinducción. Los extractos protéicos tomados antes de la adición de IPTG no mostraron producción de la proteína recombinante. Se corrieron también muestras de sobrenadante en geles de poliacrilamida bajo las mismas condiciones para determinar si la proteína era excretada el medio de cultivo, sin embargo no se observaron ninguna banda de proteína.

Figura 5. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* transformadas con los plásmidos pQE-80L::MAP1609c y pQE-80L::MAP0586c.



MPM: Precision Plus Dual Color (Bio-Rad #CAT. 161-0374). Proteínas de *E. coli* DH5 α sin transformar (A). *E. coli* sin inducir (B). 1 hr de inducción (C). 2 hr de inducción (D). 3 hr de inducción (E). 4 hrs de inducción (F). Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 10%.

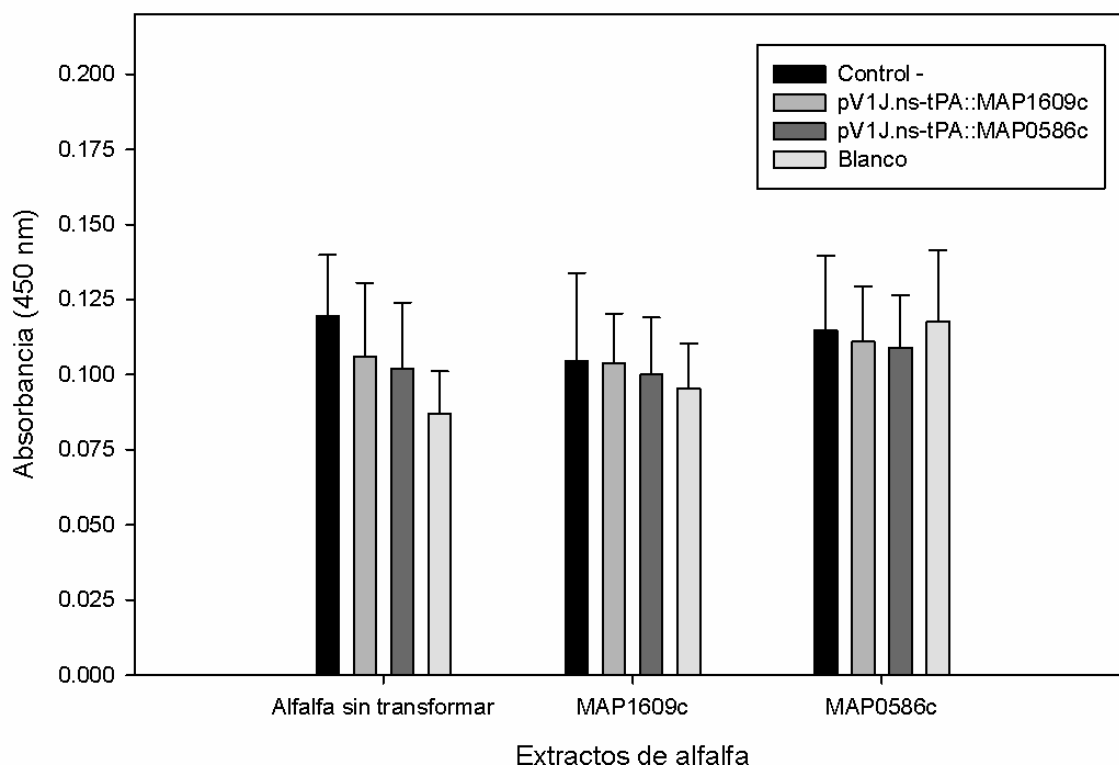
Bajo condiciones desnaturizantes, se observó que la proteína MAP1609c tiene un tamaño aproximado de 32.12 kD lo cual concuerda con los cálculos dado que el gen cuenta con 876 pares de bases (sin contar el péptido señal). Por otra parte, la proteína MAP0586c sí se encuentra con péptido señal y tiene un tamaño de 942 pares de bases, lo cual equivale aproximadamente a 34.54 kD. Se realizaron extractos proteicos de los pellets obtenidos después de 4 horas postinducción, se confirmó la correcta expresión de las proteínas recombinantes mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y los extractos fueron cargados en una columna cromatográfica de afinidad (IMAC). Los extractos fueron cargados a las columnas en buffers con condiciones nativas y desnaturizantes para proteínas, sin embargo en ninguno de los dos casos fue posible observar la proteína purificada mediante electroforesis desnaturizante en las fracciones obtenidas en la columna. Se probaron otros métodos de purificación en la que los extractos eran centrifugados con filtros de exclusión molecular, pero la electroforesis de las fracciones no mostró una correcta separación. Se realizó electroelución con cortes de gel de

poliacrilamida conteniendo la proteína recombinante, y se corrieron las muestras en electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida sin observarse una correcta difusión de las proteínas desde el gel durante la electroelusión.

7.6 Inmunoreactividad de sueros de ratones inmunizados con ADN plasmídico con los genes MAP1609c y MAP0586c frente extractos de alfalfa transgénica.

La producción de anticuerpos específicos contra proteínas recombinantes es una parte crucial en el análisis de expresión de antígenos recombinantes en cualquier organismo. En este experimento se inmunizaron ratones de la cepa CD1 intramuscularmente con los plásmidos de expresión en mamífero pV1J.ns-tPA::MAP1609c y pV1J.ns-tPA::MAP0586c. El suero colectado de los 3 grupos 30 días después de la última inmunización de los ratones fue analizado frente a extractos proteicos de alfalfas sin transformar, extractos de la línea 20 (MAP1609c) y extractos de la línea 41 (MAP0586c). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos inmunizados con ADN plasmídico, así como respecto al control negativo de la reacción en la cual se sustituyó el anticuerpo primario por PBS. El análisis estadístico mostró una igualdad entre las medias poblacionales ($p=0.613$) mientras que entre las medias muestrales no fue este el caso ($p=0.3416$). Lo anterior prueba que no existen diferencias notables entre los grupos de inmunización, utilizando extractos proteicos de alfalfa en la placa de ELISA como antígeno así como entre las proteínas de alfalfa de cada grupo de inmunización.

Figura 6. ELISA indirecta con sueros de ratones inmunizados con los plásmidos pV1J.ns-tPA::MAP1609c, pV1J.ns-tPA::MAP0586c frente a proteínas de alfalfa transgénicas y silvestre.



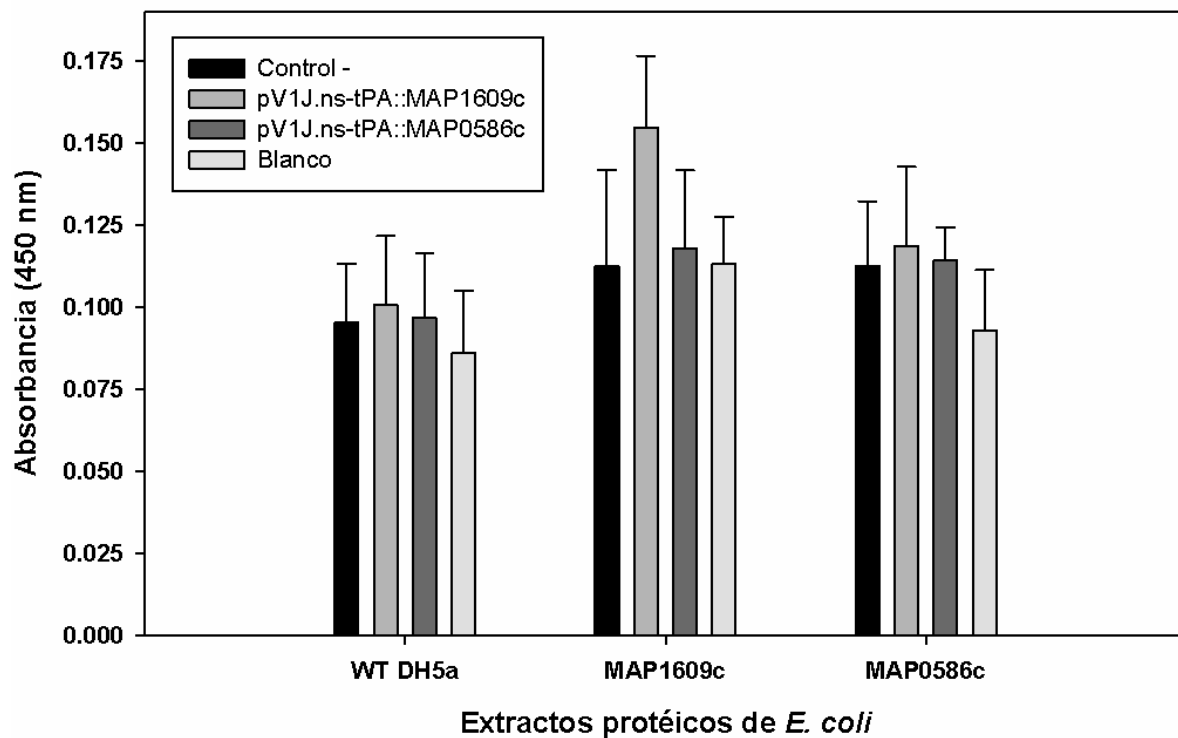
Control -: solución salina (PBS). Control negativo de reacción: PBS (Blanco) en lugar de anticuerpos de ratón. Control positivo: Antimouse IgG conjugada con peroxidasa de rábano. Dilución 1:500 del anticuerpo primario. Dilución 1:1000 del anticuerpo secundario.

7.7 Inmunoreactividad de sueros de ratones inmunizados con ADN plasmídico con los genes MAP1609c y MAP0586c frente extractos de *E. coli* transformante.

Se probaron los sueros de los ratones inmunizados con ADNp frente a extractos de *E. coli* sin transformar (Control negativo), y extractos de *E. coli* inducidos con IPTG por 4 h con las construcciones pQE-80L::MAP1609c y pQE80L::MAP0586c. Al leer la placa a 450 nm no se observan diferencias entre los grupos de ratones inmunizados con PBS, con el plásmido pV1J.ns-tPA::MAP1609c y pV1J.ns-tPA::MAP0586c. El análisis estadístico ANOVA realizado entre los grupos de ratones corroboró lo anterior con un nivel de significancia $p=0.065$. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre proteínas de *E. coli* y extractos, indicando una mayor producción de anticuerpos específicos para el caso del antígeno MAP1609c en relación con la alfalfa sin transformar y el antígeno

MAP0586c. El análisis estadístico ANOVA mostró diferencias significativas con un nivel de significancia de $p=.006$.

Figura 7. ELISA indirecta con sueros de ratones inmunizados con los plásmidos pV1J.ns-tPA::MAP1609c y pV1J.ns-tPA::MAP0586c frente a extractos de *E. coli* DH5a expresantes de las proteínas recombinantes MAP1609c y MAP0586c.



Control -: solución salina (PBS). Control negativo de reacción: PBS (Blanco) en lugar de anticuerpos de ratón. Control positivo: Antimouse IgG conjugada con peroxidasa de rábano. Dilución 1:500 del anticuerpo primario. Dilución 1:1000 del anticuerpo secundario.

8. DISCUSIÓN.

Desarrollo y confirmación de transgénesis de embriones de alfalfa con los genes MAP1609c y MAP0586c.

El desarrollo de las plantas de alfalfa transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c inició con la transferencia de 100 embriones a frascos con medio MS estéril, de las cuales hubo una regeneración a plantas transgénicas completas del 75% y 56% para el caso de alfalfa con el transgén MAP0586c y MAP1609c, respectivamente. Estos porcentajes de regeneración de plantas se encuentran dentro del rango obtenido por Ding et al., (2003) quien reporta un porcentaje entre 37 y 83%. De igual manera existen más reportes sobre las bajas frecuencias de regeneración de alfalfa, falta de reproducibilidad y dependencia del genotipo (Schroeder et al., 1991; Bagga et al., 1992; Samac, 1995). Du y colaboradores reportan que el uso de diversas cepas de *A. tumefaciens* y vectores de transformación en distintos genotipos de alfalfa influyó en el número de plantas transgénicas obtenidas (Du et al., 1994). Lo anterior indicó que la variación del porcentaje de embriones desarrollados puede estar relacionada inclusive a estos factores. De igual manera este efecto se ha observado en soja, en donde una determinada cepa de *Agrobacterium* fue probada con distintos genotipos de la planta, dando frecuencias de transformación con un rango de 0 a 100% (Byrne et al., 1987). La variación del desarrollo de embriones y crecimiento a plantas completas puede verse afectada también por la alteración o la pérdida de un transgén durante la recombinación somática o la conversión de genes (Lebel et al., 1993). La posibilidad de plantas no transgénicas o tejido revertido y que se vuelve prominente en una planta transgénica puede ser considerada en cultivos como la alfalfa. Esta planta se somete a ciclos repetidos de cosecha y recrecimiento a partir de múltiples brotes y es sometida a una gran variedad de estresores durante un periodo de años (Du et al., 1994). La proliferación celular durante el bioensayo de regeneración de callo mostró una clara diferencia respecto a los controles negativos de alfalfa sin transformar, los cuales se volvieron necróticos debido al antibiótico de selección Higromicina. La resistencia conferida gracias a la integración al genoma del gen de resistencia permitió a las plantas transgénicas la proliferación sobre el medio, confirmando de esta manera la transgénesis y permitiendo también el descarte de líneas (para el caso de las plantas transformadas con el

gen MAP1609c, ya que al no poder amplificarse el gen MAP0586c mediante PCR las líneas que no proliferaron en el bioensayo no pudieron confirmarse). Estos resultados son similares a los reportados por Desgagnés y colaboradores quienes también realizaron un bioensayo de regeneración de callo de sus plantas transgénicas observando la rápida necrosis y desecación de los controles negativos y las plantas no transgénicas (Desgagnés et al., 1995). El PCR confirmó la transgénesis de líneas de alfalfa transformadas con el gen MAP1609c, mientras que ninguna línea con el gen MAP0586c pudo ser amplificada. La correcta actividad de la enzima se observó mediante la amplificación del control positivo con los primers utilizados, por lo que se decidió demostrar la transgénesis de las líneas de alfalfa con este gen mediante qPCR sin éxito. Es interesante el hecho de que la ausencia de proliferación en líneas transgénicas de alfalfa ha sido reportada por Shao y colaboradores, quienes obtuvieron líneas transgénicas que si bien no mostraron crecimiento celular en presencia de la hormona de crecimiento 2,4-D y cinetina pudieron ser confirmadas mediante PCR (Shao et al., 2000).

Un aspecto importante a considerar es que MAP posee un alto contenido de G+C en su genoma (Saviola y Bashai, 2006; Shinnick y Good, 1994) que puede dificultar la hibridación correcta de los primers. Sin embargo, no se observaron amplificaciones de productos inespecíficos (productos de menor o mayor tamaño al esperado). En contraste, Desgagnés y colaboradores observaron la hibridación inespecífica de sus primers con el genoma de alfalfa y probaron una temperatura de alineamiento más alta (Desgagnés et al., 1995). En ese trabajo también se modificaron las concentraciones de ADN templado y temperaturas de alineamiento, sin embargo, para su caso sí fue posible la amplificación del gen objetivo. Otra forma de solventar este problema es la adición de reactivos como el DMSO que mejoran la eficiencia y especificidad en la amplificación (Kitade et al., 2003).

Evaluación de la inmunoreactividad de los antígenos recombinantes expresados en alfalfa con sueros de animales naturalmente infectados con MAP.

Para corroborar la transgénesis de las plantas transformadas con el gen MAP0586c y el nivel de expresión de las plantas transformadas con el gen MAP1609c se realizaron pruebas de ELISA indirecta sometiendo extractos de alfalfa a sueros de animales infectados con MAP. La selección de líneas transgénicas con mayor expresión y la concentración de los antígenos recombinantes en plantas transgénicas suele determinarse mediante Western blot (Lee et al., 2008; Dus Santos et al., 2002;), ELISA (Dong et al., 2005; Wang et al., 2012; Pérez A. M. S. et al., 2013; Wigdorovitz et al., 1999, Festa et al., 2013). El método utilizado en este trabajo consistió en comparar las absorbancias obtenidas en la prueba de ELISA indirecta de los extractos protéicos de alfalfa utilizando anticuerpos de animales infectados naturalmente con MAP. Las líneas 20 y 41 transformadas con los genes MAP1609c y MAP0586c, respectivamente, mostraron las mayores absorbancias comparadas con el control negativo de alfalfa sin transformar. Así también, el análisis estadístico comprobó que existían diferencias significativas y que no todas las medias eran iguales. Al no contar con anticuerpos monoclonales antiMAP1609c y antiMAP0586c y utilizar anticuerpos generados por animales naturalmente infectados, existe la probabilidad de obtener una mayor respuesta para un antígeno que para el otro. Esto se observó al comparar las absorbancias obtenidas en el suero 128pre, 128post y 74, los cuales muestran una absorbancia mucho mayor con extractos de alfalfa transformada con el gen MAP0586c que con los extractos de alfalfa transformada con el gen MAP1609c comparados con el control negativo. Lo anterior puede explicar la baja absorbancia de las líneas transformadas con el gen MAP1609c durante la selección de las líneas con mayor expresión de recombinante.

Evaluación de la inmunoreactividad de extractos de alfalfa con anticuerpos específicos de ratones inmunizados con ADNp.

En gran cantidad de trabajos de expresión de recombinantes en plantas la proteína es comparada con la misma proteína recombinante purificada producida en un sistema unicelular (generalmente *E. coli*), estableciendo así un control positivo y una referencia

visual durante los SDS-PAGE's y posteriormente en Western blot (Lee et al., 2008; Dong et al., 2005; Pérez et al., 2013; Gorantala et al., 2011). La expresión de las proteínas recombinantes MAP1609c y MAP0586c en *E. coli* DH5 α fue monitoreada durante 4 hrs a intervalos de 1h post-inducción, mostrando la mayor producción de proteína recombinante a partir de las 3 hrs. Basagoudanavar y colaboradores reportan en 2004 la expresión de una proteína de MAP de 35 kD en *E. coli*. En este trabajo logran observar la producción de la proteína recombinante a partir de los 30 minutos después de la inducción con IPTG y que después de la hora 3 el nivel de expresión de la recombinante se mantuvo casi constante. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos ya que después de la hora 2-3 el nivel de recombinante se mostró estable. A pesar de utilizar distintos genes y distinto vector de expresión, las pruebas de localización celular de la proteína recombinante son similares a las reportadas por Basagoudanavar quienes demostraron también que su proteína no era excretada al medio sino era intracelular (Basagoudanavar et al., 2004). También demostraron que las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* eran reconocidas por sueros de animales naturalmente infectados con MAP, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

De acuerdo al tamaño calculado de cada proteína (32.13 kD y 34.54 kD para la proteína MAP1609c y MAP0586c, respectivamente) se pudieron observar pequeñas diferencias entre los pesos moleculares calculados y los obtenidos mediante SDS-PAGE (aproximadamente 32-34 kD para la proteína MAP1609c y 37 kD para la proteína MAP0586c). Esto concuerda con lo reportado por Mullerad y colaboradores en 2002, quienes clonaron el gen MAP1609c en *E. coli* y reportan que la presencia de una etiqueta de 6xHis puede cambiar, además de su adición de su propio peso molecular al peso molecular total de la proteína recombinante, la migración de la proteína en el SDS-PAGE (Mullerad et al., 2002). Además Bachrach y colaboradores demostraron que después de la eliminación de la etiqueta de 6xHis por digestión mediante enteroquinasa, la proteína recombinante era idéntica a la nativa en cuanto a su peso molecular y patrón de migración (Bachrach et al., 1997). Otras diferencias significativas respecto a pesos moleculares de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* pueden deberse a fusiones con otras

proteínas grandes que facilitan la localización y purificación de la proteína recombinante (Zhang et al., 2011).

La producción de anticuerpos específicos para la proteína MAP0586c se llevó a cabo mediante la inmunización de ratones con ADNp con dicho gen. Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las pruebas de ELISA indirecta realizadas contra extractos de alfalfa transformada con el mismo gen ni contra extractos de *E. coli*. Comparando las varianzas entre grupos y entre muestras, el único trabajo realizado con este gen evaluado como vacuna de ADNp es el reportado por Roupie y colaboradores (Roupie et al., 2008) en dónde reportan la baja producción de anticuerpos específicos contra esta proteína en ratones de la cepa C57BL/6 y BALB/c. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este experimento. Al desconocer la cantidad de proteína recombinante expresada por alfalfas transgénicas y *E. coli* transformadas con el gen MAP0586c estos resultados no pueden ser comparados en su totalidad, ya que Roupie y colaboradores utilizaron una concentración de recombinante conocida para las pruebas de ELISA.

La producción de anticuerpos específicos contra la proteína MAP1609c por otra parte, si bien no mostró diferencias estadísticamente significativas con extractos protéicos de alfalfa transgénica, demostró una diferencia significativa en la prueba de ELISA realizada con extractos de *E. coli* transformada con dicho gen. Dichas diferencias son significativas si son comparadas contra el grupo de inmunización control (PBS) así como contra el valor obtenido con extractos de alfalfa sin transformar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Park (Park et al., 2008) y Rosseels (Rossels et al., 2002), quienes inmunizaron ratones con un plásmido con el gen MAP1609c y reportan que los títulos de anticuerpos generados contra este plásmido fue más alto que el del grupo control.

9. CONCLUSIONES.

La transgénesis de las líneas de alfalfa pudo confirmarse mediante la técnica de PCR y ELISA indirecta utilizando suero de animal infectado naturalmente con MAP indicando un reconocimiento de los antígenos por los anticuerpos específicos. El suero de animal infectado permitió de igual forma identificar las líneas de alfalfa con mayor expresión de las proteínas recombinantes, siendo la línea 20 con el gen MAP1609c y la línea 41 con el gen MAP0586c las mayores productoras de antígeno. Las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* también fueron reconocidas por sueros de animales naturalmente infectados haciendo notar una diferencia entre títulos de anticuerpos para cada antígeno en un mismo suero. Finalmente, los anticuerpos producidos en ratones inmunizados con el gen MAP1609c mostraron un mayor título en relación con los ratones inmunizados con el gen MAP0586c utilizando extractos de *E. coli* a diferencia de los extractos de alfalfa los cuales no mostraron diferencia alguna.

10. LITERATURA CITADA

Adams J. L., Collins M. T. y Czuprynski C. J. 1996. Polymerase chain reaction analysis of TNF- α and IL-6 mRNA levels in whole blood from cattle naturally or experimentally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Can. J. Vet. Res.* 60: 257–262.

Adams J. L., y Czuprynski C. J. 1995. Ex vivo induction of TNF- α and IL-6 mRNA in bovine whole blood by *Mycobacterium paratuberculosis* and mycobacterial cell wall components. *Microbiol. Pathol.* 19: 19–29.

Alfaro C., de Rolo M., Clavijo A. y Valle A.. 2006. Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado de doble propósito de los Llanos de Monagas, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 24(3): 321-332.

Anandalakshmi R., Pruss G. J., Ge X., Marathe R., Mallory A. C., Smith T. H. y Vance V. B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 13079–13084.

Andersen P. The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology* 1994; 191: 537-547.

Alzuhheri H. M., Woodall C. J., y Clarke C. J. 1996. Increased intestinal TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49: 331–345. 8.

Arntzen C. J. 2008. Plant science. Using tobacco to treat cancer. *Science* 321, 1052–1053

Astarie-Dequeker C., N'Diaye E. N., Le Cabec V., Rittig M. G., Prandi J. y Maridonneau-Parini I. 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic

mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infection and Immunity* 67: 469–477.

Austin-Phillips S., Koegel R. G., Straub R. J., Cook M. 1999. Animal feed composition containing phytase derived from transgenic alfalfa and methods of use thereof. US patent application 5900525.

Autschbach F., Eisold S., Hinz U., Zinser S., Linnebacher M., Giese T., Löffler T., Büchler, M.W., Schmidt, J., 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54, 944–949.

Bachrach G., Banai M., Fishman Y., Bercovier H. 1997. Delayed-type hypersensitivity activity of the Brucella L7/L12 ribosomal protein depends on posttranslational modification. *Infect Immun* 65: 267–271.

Bagga S., Sutton D., Kemp J. D., Sengupta-Gopalan C. 1992. Constitutive expression of the beta-phaseolin gene in different tissues of transgenic alfalfa does not ensure phaseolin accumulation in non-seed tissue. *Plant. Mol. Biol.* 19: 951-958.

Barclay R. y Ratledge C. 1983. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *Journal of Bacteriology.* 153: 1138-1146.

Barrett J.C., Hansoul S., Nicolae D. L., Cho J. H., Duerr R. H., Rioux J. D., Brant S. R., Silverberg M. S., Taylor, K. D., Barmada M. M., Bitton A., Dassopoulos T., Datta L. W., Green T., Griffiths A. M., Kistner E. O., Murtha M. T., Regueiro M. D., Rotter J. I., Schumm L. P., Steinhart A. H., Targan S. R., Xavier R. J., NIDDK IND Genetics Consortium, Libioulle C., Sandor C., Lathrop M., Belaiche J., Dewitt O., Guy I., Heath S., Laukens D., Mni M., Rutgeerts P., Van Gossum A., Zelenika D., Franchimont D., Hugot J.-

P., de Vos M., Vermeire S., Louis E., Belgian-French IBD Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L. R., Anderson C. A., Drummond H., Nimmo E., Ahmad T., Prescott N. J., Onnie C. M., Fisher S. A., Marchini J., Ghori J., Bumpstead S., Gwilliam R., Tremelling M., Deloukas P., Manfield J., Jewell D., Satsangi J., Mathew C. G., Parkes M., Georges M., Daly M. J. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40, 955–962.

Barta A., Sommergruber K., Thomson D. 1986. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* 6, 347–357.

Basagoudanavar S. H., Goswami P. P., Tiwari V., Pandey A. K., Singh N. 2004. Heterologous Expression of a Gene Encoding a 35 kD Protein of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in *Escherichia coli*. *Veterinary Research Communications* 28: 209-224.

Bassey E. O. y Collins M. T. 1997. Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected cattle. *Infection and Immunity.* 65: 4869-4872.

Begg D. J. y Griffin J. F. 2005. Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. *Vaccine* 23, 4999–5008.

Begg D. J., O'Brien R., Mackintosh C. G., Griffin J. F. 2005. Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infect. Immun.* 73(9), 5603–5611.

Bejon P., Ogada E., Mwangi T., Milligan P., Lang T., Fegan G., Gilbert S. C., Peshu N., Marsh K. y Hill A. V. 2007. Extended follow-up following a phase 2b randomized trial of the candidate malaria vaccines FP9 ME-TRAP and MVA ME-TRAP among children in Kenya. *PLoS ONE* 15, e707.

Bermudez L. E., Petrofsky M., Sommer S., Barletta R. G. 2010. Peyer's Patch-Deficient Mice Demonstrate That *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Translocates across the Mucosal Barrier via both M cells and Enterocytes but Has Inefficient Dissemination. *Infect. Immun.* 78 (8): 3570-3577.

Beutler B., y A. Cerami. 1989. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 625–655.

Billman-Jacobe, H., Carrigan M., Cockram F., Corner L.nA., Gill I. J., Hill J. F., Milner A. R., y Wood P. R. 1992. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 69: 25–28.

Bonecini-Almeida M. G., Chitale S., Boutsikakis I., Geng J., Doo H., He S. y Ho J. L. 1998. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes. *Journal of Immunology* 160: 4490–4499.

Brayden D. J., Jespon M., Baird A.W. 2005. Intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov. Today* 10 (17): 1145–1157.

Burrells C, Inglis N. F., Davies R. C. y Sharp J. M. 1995. Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and paratuberculosis using two defined mycobacterial antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45: 311-320.

Bull T. J., McMinn E. J., Sidi-Boumedine K., Skull A., Durkin D., Neild P., Rhodes G., Pickup R., Hermon-Taylor J., 2003. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2915–2923.

Butaye K. M. J., Cammue B. P. A., Delaure S. L., De Bolle M. F. C. 2005. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants, *Mol. Breed.* 16: 79–91.

Byrne M. C., McDonnell R. E., Wright M. S., Carnes M. G. 1987. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 8: 3-15.

Celis G. R. 2012. Transformación de Alfalfa (*Medicago sativa* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* como Sistema de Producción de Vacunas Utilizadas los Genes *MAP1609c* (Ag85b) y *MAP0586c* de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Chacon O, Bermudez L. E., Barletta R. G. 2004. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu Rev Microbiol*, 58, 329–63.

Chambers M. A., Gavier-Widen D., Hewinson R. G., 2004. Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41, 93–100.

Chen L.-H., Kathaperumal K., Huang C.-J., Mc-Donough S. P., Stehman S., Akey B., Huntley J. F., Bannantine J. P., Chang C.-F. y Chang Y.-F. 2008. Immune responses in mice to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following vaccination with a novel 74F recombinant polyprotein. *Vaccine* 26, 1253–1262.

Chester A. C., y W. C. Winn Jr. 1986. Unusual and newly recognized patterns of nontuberculous mycobacteria infection with emphasis on the immunocompromised host. *Pathol. Ann.* 21:251-264.

Chiappini E., de Martino M., Mangiantini F., Lionetti P. 2009. Crohn's disease and mycobacterial infection in children: an intriguing relationship. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 49, 550–558.

Chiodini R. J., y Hermon-Taylor J. 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 629–631.

Chiodini R. J, Van Kruiningen H. J, Merkal R. S, Thayer Jr. W. R y Coutu J. A. 1984. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. Journal of Clinical Microbiology 20: 966-971.

Chiodini R. J. 1993. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18. J. Clin. Microbiol. 31(7), 1956–8.

Clarke C. J. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J. Comp. Path. 116, 217–61.

Coelho A. C., Pinto M. L., Coehlo A. M., Rodrigues J. y Juste R. 2008. Estimation of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR in sheep blood. Small Rumian Research, 76: 201-206.

Collins D. M., Gabric D. M. y de Lisle G. W. 1989. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. FEMS Microbiology Letters 51: 175-178.

Collins M. T. 1994. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204: 208–10.

Corpa J. M, Perez V., Garcia Marin J. F. 2000. Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. Vet. Microbiol. 77(3–4), 475–485.

Coussens P. M. 2001. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Animal Health Research Reviews* 2 (2): 141-161.

Crohn B. B., Ginzburg K. y Oppenheimer G. D. 1932. Regional ileitis; a pathological and clinical entity. *JAMA* 99: 1323-1329.

Crowle A. J., Tsang A. Y., Vatter A. E., y May M. H.. 1986. Comparison of 15 laboratory and patient-derived strains of *Mycobacterium avium* for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. *J. Clin. Microbiol.* 24:812-821.

Curtiss R. y Cardineau C. 1990. Oral immunization by transgenic plants. *World Patent Application*; 5, 679,880.

Dalziel T.K. 1913. Chronic interstitial enteritis. *Br. Med. J.* ii, 1068–1070.

Daniell H., Singh N. D., Mason H. y Streatfield S. J. 2009. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in Plant Science.* 14(12): 669-679.

Dannenbergh A. M. Jr. 1993. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp. Pract.* 28: 51–58.

Davoodi-Semiromi A., Samson N., Daniell H. 2009. The green vaccine: a global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. *Hum. Vaccin.* 5: 488– 493

De Smet K. A., Brown I. N., Yates M., y Ivanyi J. 1995. Ribosomal internal transcribed spacer sequences are identical among *Mycobacterium avium intracellulare* complex isolates from AIDS patients, but vary among isolates from elderly pulmonary disease patients. *Microbiology* 141: 2739–2747.

De Smet K. A., Hellyer T. J., Khan A. W., Brown I. N., y Ivanyi J. 1996. Genetic and serovar typing of clinical isolates of the *Mycobacterium avium intracellulare* complex. *Tuberc. Lung Dis.* 77: 71–76.

De Zoeten G. A., Penswick J. R., Horisberger M. A., Ahl P., Schultze M. y Hohn T. 1989. The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* 172: 213–222.

Denzin N., Gehrman B., Ewert B. y Rohde H. 2011. Estimation of the prevalence at animal level of paratuberculosis in female cattle of Saxony-Anhalt (Germany). *Veterinary Science development*, 1(10): 42-46.

Dequeker C. A., N'Diaye E.-N., Cabec V. L., Rittig M. G., Prandi J. y Parani I. M. 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infection and Immunity* 67: 469–477.

Deretic V. y Fratti R. A. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Molecular Microbiology* 31: 1603–1609.

Desgagnés R., Laberge S., Allard G., Khoudi H., Castonguay Y., Lapointe J., Michaud R., Vézina L.-P. 1995. Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 42: 129-140.

Devallois A., Goh K. S., y Rastogi N. 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2969–2973.

Devriendt B., Geest B. G., Goddeeris B. M., Cox E. 2012. Crossing the barrier: Targeting epithelial receptors for enhanced oral vaccine delivery. *Journal of Controlled Release* 160: 431-439.

Ding Y.-L., Aldao-Humble G., Ludlow E., Drayton M., Lin Y.-H., Nagel J., Dupal M., Zhao G., Pallaghy C., Kalla R., Emmerling M., Spangenberg G. 2003. Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Medicago* and *Trifolium* species. *Plant Science*. 165: 1419-1427.

Domingue G. J. y Woody H. B. 1997. Bacterial persistence and expression of disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 320–344.

Dong J. L., Liang B. G., Jin Y. S., Zhang W. J., Wang T. 2005. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 339: 153–163

Du S., Erickson L., Bowley S. 1994. Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 13: 330-334.

Dus Santos M. J., Carrillo C., Ardila F., Ríos R. D., Franzone P., Piccone M. E., Wigdorovitz A., Borca M. V. 2005. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. *Vaccine* 23: 1838-1843.

Egelkrout E., Rajan V., Howard J. A. 2012. Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Science*. 184: 81-101.

Ernst J. D. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 66: 1277–81.

Ferrari G., Langen H., Naito M., Pieters J. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97: 435–447.

Festa M., Brun P., Piccinini R., Castagliuolo I., Basso B. 2013. *Staphylococcus aureus* Efb protein expression in *Nicotiana tabacum* and immune response to oral administration. *Research in Veterinary Science* 94: 484-489.

Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Twyman R. M. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 152–8.

Florido M., Goncalves A. S., Silva R. A., Ehlers S., Cooper A. M. y Appelberg R. 1999. Resistance of virulent *Mycobacterium avium* to gamma interferon-mediated antimicrobial activity suggests additional signals for induction of mycobacteriostasis. *Infection and Immunity* 67: 3610–3618.

Flynn J. L., Chan J., Triebold K. J., Dalton D. K., Stewart T. A. y Bloom B. R. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Experimental Medicine* 178: 2249–2254.

Gatfield J. y Pieters J. 2003. Molecular mechanisms of host–pathogen interaction: entry and survival of mycobacteria in macrophages. *Advances in Immunology* 81: 45–96.

Gabitzsch E. S., Xu Y., Yoshida L. H., Balint J., Gayle R. B., Amalfitano A. y Jones F. R. 2009. A preliminary and comparative evaluation of a novel Ad5 [E1-, E2b-] recombinant based vaccine used to induce cell mediated immune responses. *Immunology Letters* 122, 44–51.

Glatman-Freedman A., Mednick A. J., Lendvai N., Casadevall A. 2000. Clearance and organ distribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan in the presence and absence of LAM-binding IgM. *Infect. Immun.* 68, 335–341.

Gorantala J., Grover S., Goel D., Rahi A., Chandra S., Bhatngar R. 2011. A plant based protective antigen [PA(dIV)] vaccine expressed in chloroplasts demonstrates protective immunity in mice against anthrax. *Vaccine* 29: 4521-4533.

Good R. C. 1985. Opportunistic pathogens in the genus mycobacterium. *Annu. Rev. Microbiol.* 39:347-369.

Grant I. R., Ball H. J., Neill S. D. y Rowe M. T. 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow's milk at pasteurisation temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 631–636.

Haq T. A., Mason H. S., Clements J. D. y Arntzen C. J. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714–716.

Harris N. B y Barletta R. G. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001. 14: 489–512.

Hartmans S., Bont J. A. M., y Stackebrandt E. 2006. The Genus *Mycobacterium*—Nonmedical, 3: 889–918.

Hawkridge T., Scriba T. J., Gelderbloem S., Smit E., Tameris M., Moyo S., Lang T., Veldsman A., Hatherill M., Merwe L., Fletcher H. A., Mahomed H., Hill A. V., Hanekom W. A., Hussey G. D. y McShane H. 2008. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *Journal of Infectious Diseases* 198, 544–552.

Hiatt A., Cafferkey R. y Bowdish K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342, 76–78.

Holberg-Petersen M., Steinbakk M., Figenschau K. J., Jantzen E., Eng J., y Melby K. K. 1999. Identification of clinical isolates of *Mycobacterium* spp. by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA gene: Experience from a clinical laboratory. *APMIS* 107:231–239.

Horwitz M. A., Lee B. M., Dillon B. J. y Harth G. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 1530-1534.

Huntley J. F., Stabel J. R., Paustian M. L., Reinhardt T. A. y Bannantine J. P. 2005. Expression library immunization confers protection against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infection and Immunity* 73, 6877–6884.

Huygen K. 2005. Plasmid DNA vaccination. *Microbes and infection*. 7: 932-938.

Huygen K. 2006. DNA vaccines against mycobacterial diseases. *Future Microbiology*. 1: 63-73.

Huygen K., Bull T., Collins D. M. 2010. Development of New Paratuberculosis Vaccines. En: Behr M. A. y Collins D. M. (eds.). *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CABI, Wallingford, U.K. 357p.

Ibarra H. C. C., Aguilar O., Rito P. M. 2011. Application of an aqueous two-phase systems strategy for the potential recovery of a recombinant protein from alfalfa (*Medicago sativa*). *Separation and Purification Technology* 77: 94-98.

Ikemura T. 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evolut.* 2: 13–34.

Inderlied C. B., Kemper C. A. y Bermudez L. E. 1993 The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology reviews*. (6)3: 266-310.

Iseman M. D., Corpe R. F., O'Brien R. J., Rosenzweig D. Y., y Wolinsky E. 1985. Disease due to *Mycobacterium avium intracellulare*. *Chest* 87:139S-149S.

Jagdeep S. S., Singh S. V., Tyagi P., Subhodh S., Singh P. K., Singh A. V., Narayanasamy K., Sheoran N. y Sandhu K. S. 2008. Immunology of mycobacterial infections: With special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology* 213: 585-598.

Jiang X. L. He Z. M., Peng Z. Q., Qi Y., Chen Q., Yu S. Y. 2007. Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Res.* 16, 169–175.

Joensuu J. J., Verdonck F., Ehrström A., Peltola M., Siljander-Rasi H., Nuutila A. M., Oksman-Caldentey K.-M., Teeri T. H., Cox. E., Goddeeris B. M. y Niklander-Teeri V. 2006. F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in alfalfa reduces F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* excretion in weaned piglets. *Vaccine*. 24: 2387-2394.

Johne H. A. y Frothingham, L. 1895. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind [A peculiar case of tuberculosis in a cow]. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und vergleichende Pathologie* 21: 438–455.

Juste R. A., Elguezabal N., Pavón A., Garrido J. M., Geijo M., Sevilla I., Cabriada J. L., Tejada A., García-Campos F., Casado R., Ochotorena I., Izeta A., 2009. Association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. *Int. J. Infect. Dis.* 13, 247–254.

Juste R. A., Garcia Marin J. F., Peris B., Saez de Ocariz C., Badiola J. J. 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Comp. Pathol. 110:185–94.

Kang B. K. y Schlesinger L. S. 1998. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. Infection and Immunity 66: 2769–2777.

Kasai H., Ezaki T., y Harayama S. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. J. Clin. Microbiol. 38:301–308.

Kathaperumal K., Park S.-U., McDonough S., Stehman S., Akey B., Huntley J., Wong S., Chang C.-F. y Chang Y.-F. 2008. Vaccination with recombinant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proteins induces differential immune responses and protects calves against infection by oral challenge. Vaccine 26, 1652–1663.

Kaufmann S. H., Ladel C. H. y Flesch I. E. 1995. T cells and cytokines in intracellular bacterial infections: experiences with *Mycobacterium bovis* BCG. Ciba Foundation Symposium 195: 123–132.

Kazda J. F. 1983. The principles of the ecology of mycobacteria. En: C. Ratledge y J. Stanford (Eds.) The Biology of the Mycobacteria, Volume 2: Immunological and Environmental Aspects. Academic Press. London UK, 323–415.

Keswani J., y Frank J. F. 1998. Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. J. Food Protect. 61: 974–978.

Khoudi H., Laberge S., Ferullo J. M., Bazin R., Darveau A., Castonguay Y., Allard G., Lemieux R., Vézina L. P. 1999. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. Biotechnol. Bioeng. 64 (2): 135–143.

Kirkwood, C. D., Wagner J., Boniface K., Vaughn J., Michalski W. P., Catto-Smith A., Cameron D. J. S., Bishop R. F. 2009. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in children with early-onset Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 1643–1655.

Kitade Y., Ootsuka S., Litsuka O., Saga N. 2003. Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) gene. *Journal of Applied Phycology* 15: 555-557.

Koets A., Hoek A., Langelaar M., Overdijk M., Santema W., Franken P., Eden W. y Rutten V. 2006. Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. *Vaccine* 24, 2550– 2559.

Kohler H., Gyra H., Zimmer K. et al. 2001. Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 48(3), 185–195.

Koets A. P., Rutten V. P. M. G., Hoek A., Bakker D., van Zijderveld F., Müller K. E., y van Eden W. 1999. The T(h) 1 to T(h) 2 shift in bovine paratuberculosis and the role of apoptotic cell death. *Proc. Int. Colloq. Paratuberc.* 6: 585–592. 59.

Korban S. S., Krasnyanski S. F., Buetow D. E. 2002. Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. *J Am Coll Nutr.* 21 (suppl.):212–17S.

Kormendy B. 1994. The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Vet. Microbiol.* 41(1–2), 117–125.

Koszycki S. S., Haddix P. L. y Russell D. G. 1997. The interaction between *Mycobacterium* and the macrophage analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 18: 2558–2565.

Koya V., Moayeri M., Leppla S. H. y Daniell H. 2005. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun.* 73, 8266–8274.

Krayer von Krauss M. P., Kaiser M., Almaas V., Van der Sluijs J., Kloprogge P. 2008. Diagnosing and prioritizing uncertainties according to their relevance for policy: the case of transgene silencing, *Sci. Total Environ.* 390: 23–34.

Kuroda K., Brown E. J., Telle W. B., Russell D. G. y Ratliff T. L. 1993. Characterization of the internalization of bacillus Calmette–Guerin by human bladder tumor cells. *Journal of Clinical Investigation* 91: 69–76.

Kusar D., Ocepek M., Logar K., Pate M., Krt B. 2008. Seroprevalence of Cattle Paratuberculosis in Slovenia in 2008 and Comparison of Data from current and previous studies. *Slov. Vet. Res.* 48(2):39-44.

Lal P., Ramachandran V. G., Goyal R., Sharma R. 2007. Edible vaccines: current status and future. *Indian J Med Microbiol.* 25 :93–102.

Larsen, A. B. 1981. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179: 169–171.

Lebel E. G., Masson J., Bogucki A., Paszkowski J. 1993. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 422-426.

Lee A., Griffiths T. A., Parab R. S., King R. K., Dubinsky M. C., Urbanski S. J., Wrobel I., Rioux K. P. 2011. Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with Crohn's disease in pediatric patients. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 174.

Lee R. W. H., Cornelisse M., Ziauddin A., Slack P. J., Hodgins D. C., Strommer J. N., Shewen P. E. y Lo R. Y. C. 2008. Expression of a modified *Mannheimia haemolytica* GS60 outer membrane lipoprotein in transgenic alfalfa for the development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis. *Journal of Biotechnology*. 135: 224-231.

Li J. T., Fei L., Mou Z., Wei J., Tang Y., He H., Wang L., Wu Y. 2006. Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology* 356, 171– 178

Li L., Bannantine J. P., Zhang Q., Amonsin A., May B. J., Alt D., Banerji N., Kanjilal S. y Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102(35): 12344–12349.

Lippman Z., Martienssen R. 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431: 364-370.

Liu W. X., Liu H. L., Chai Z. J., Xu X. P., Song Y. R., Qu L. Q. 2010. Evaluation of seed storage-protein gene 5 untranslated regions in enhancing gene expression in transgenic rice seed, *Theor. Appl. Genet.* 1–8.

Ma J. K. y Vine N. D. 1999. Plant expression systems for the production of vaccines. *Curr. TopMicrobiol. Immunol.* 236: 275–292.

Ma J. K. C., Drake P. M. W., Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Rev Genet*; 4:794–805.

Mackintosh C. G., Labes R. E., Griffin J. F. 2005. The effect of Johne's vaccination on tuberculin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *NZ Vet. J.* 53(4), 216–222.

Mahon B. R., Moore A., Johnson P. A., Mills K. H. G. 1998. Approaches to new vaccines. *Crit. Rev. Biotechnol.* 18: 257–82.

Malik Z. A., Denning G. M. y Kusner D. J. 2000. Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome–lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 191: 287–302.

Manning E. J. B. 2001. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: A review of current knowledge. *J Zoo and Wildlife Med*, 32, 293–304.

Mason H. S. y Arntzen C. J. 1995. Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotechnol* 13: 388–392.

Mason H. S., Lam D. M. K. y Arntzen C. J. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 11745–11749.

McNab W. B., A. H. Meek y J. R. Duncan. 1991. An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 55(3): 246-251.

McNab W. B., A. H. Meek y J. R. Duncan. 1991. An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 55(3): 246-251.

McNeil M. R., y Brennan P. J. 1991. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res. Microbiol.* 142:451-463.

McNeil M., Daffe M. y Brennan P. J. 1991 Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 266, 13217–13223.

Means T. K., Wang S., Lien E., Yoshimura A., Golenbock D. T. y Fenton M. J. 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* 163: 3920–7.

Melo M. D, Catchpole I. R., Haggart G. y Stokes R. W. 2000. Utilization of CD11b knockout mice to characterize the role of complement receptor 3 (CR3, CD11b/CD18) in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Cellular Immunology* 205: 13–23.

Mendoza J. L., San-Pedro A., Culebras E., Cies R., Taxonera C., Lana R., Urcelay E., de la Torre F., Picazo J. J., Diaz-Rubio M. 2010. High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 16, 4558–4563.

Mett V., Lyons J., Musiychuk K., Chichester J. A., Brasil T., Couch R., Sherwood R., Palmer G. A., Streatfield S. J., Yusibov V. 2007. A plant-produced plague vaccine candidate confers protection to monkeys. *Vaccine* 25, 3014–3017

Meylan P. R., Richman D. D., y Kornbluth R. S. 1990. Characterization and growth in human macrophages of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from the blood of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Infect. Immun.* 58:2564-2568.

Mijs W., De Haas P., Rossau R., Van Der Laan T., Rigouts L., Portaels F., Van Soolingen D. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *Hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1505–1518.

Miller H., Zhang J., Kuolee R., Patel G. B. y Chen W. 2007. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World Journal of Gastroenterology* 13, 1477–1486.

Moazed D. 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence, *Nature* 457: 413–420.

Molina A., Veramendi J., Hervás-Stubbs S. 2005. Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology* 342, 266–275.

Molina J. M., Anguiano A., Ferrer O. 1996. Study on immune response of goats vaccinated with a live strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19(1), 9–15.

Momotani E., Whipple D. L., Thiermann A. B., Cheville N. F. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol*, 25, 131–7.

Moravec T., Schmidt M. A., Herman E. M., Woodford-Thomas T. 2007. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* 25, 1647–1657

Mullerad J., Michal I., Fishman Y., Hovav A.-H., Barletta R. G., Bercovier H. 2002. The immunogenicity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 85B antigen. *Med. Microbiol. Immunol.* 190: 179-187.

Murcia M. I., E. Tortoli, M. C. Menendez, E. Palenque y M. J. García. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2049-2054.

Murray J. F. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* and the cause of consumption: from discovery to fact. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 169, 1086–1088.

Muskens J., Van Zijderveld F., Eger A., Bakker D. 2002. Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 86(3), 269–278.

Nedrow A. J., Gavalchin J., Smith M. C et al. 2007. Antibody and skin-test responses of sheep vaccinated against Johne's Disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116(1–2), 109–112.

Niemann S., D. Harmsen, S. Rüsç-Gerdes, and E. Richter. 2000. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38:3231–3234.

Naser S. A., Collins M. T., Crawford J. T., Valentine J. F. 2009. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) from the llood of patients with Crohn's disease: a follow-up blind multi center investigation. *Open Inflamm. J.* 2, 22–23.

Nochi T., Hidenori T., Yoshikazu Y., Lijun Y., Takehiro M., Mio M., Ushio N., Akiko M., Akihiro U., Takachika H., Shigeto M. Kunisuke T., Fumio T. y Hiroshi K. 2007. From the cover: rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10986–10991.

O'Keefe B. R. Vojdani F., Buffa V., Shattock R. J., Montefiori D. C., Bakke J., Mirsalis J., d'Andrea A. L., Hume S. D., Bratcher B., Saucedo C. J., McMahon J. B., Pogue G. P., Palmer K. E. 2009. Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6099–6104.

Ohara N., Ohara-Wada N., Kitaura H., Nishiyama T., Matsumoto S., Yamada T. 1997. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 65:3680–3685.

Olsen I., Sigurgardottir G., Djonne B. 2002. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet Q*, 24, 12–28.

Orme I. M. 1993. Immunity to mycobacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 5.

Park K., J. Ahn, W. C. Davis, H. C. Koo, N. H. Kwon, W. K. Jung, J. M. Kim, S. K. Hong, Y. J. Park. 2006. Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. *Journal of Veterinary Science* 7(4); 349-354.

Park S.-U., Kathaperumal K., McDonough S., Akey B., Huntley J., Bannantine J. P. y Chang Y.-F. 2008. Immunization with a DNA vaccine cocktail induces a Th1 response and protects mice against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* challenge. *Vaccine* 26(34); 4329–4337.

Pavlik I., Matlova L., Bartl J., Svastova P., Dvorska L., y Whitlock R. 1999. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture showing organism distribution in different breeds of cattle. *Proc. Int. Colloq. Paratuberc.* 6: 642–656. 80.

Peake P., Gooley A., Britton W. J. 1993. Mechanism of interaction of the 85B secreted protein of *Mycobacterium bovis* with fibronectin. *Infect Immun* 61:4828–4834.

Pérez A. M. S., Gómez M. C., Ostachuk A., Wolman F., Albanesi G., Pecora A., Odeon A., Ardila F., Escribano J. M., Dus S. M. J. y Wigdorovitz A. 2013. Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 151: 315-324.

Pethe K., Alonso S., Biet F., Delogu G., Brennan M. J., Loch C., Menozzi F. D. 2001. The heparin-binding haemagglutinin of *Mycobacterium tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* 412, 190–194.

Plasterk R. H. A. y Ketting R. F. 2000. The silence of the genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 562–567.

Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R. y Koprowski H. 2005. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9062–9067

Primm, T. P., Lucero C. A. y Falkinham J. O. III 2004 Health impacts of environmental *Mycobacteria*. *Clin Microbiol Rev* 17, 98–106.

Rastogi N., Frehel C., Ryter A., Ohayon H., Lesourd M. y David H. L. 1981. Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium*: is the wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 666-677.

Reddacliff L., Eppleston J., Windsor P., Whittington R., Jones S. 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.* 115(1–3), 77–90.

Ringuet H., C. Akoua-Koffi S., Honore A., Varnerot V., Vincent P. Berche J. L. Gaillard y Pierre-Audigier C. 1999. Hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37:852–857.

Robinson H. L., Hunt L. A., Webster R. G., 1993. Protection against lethal influenza virus challenge by immunization with a hemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11: 957–960.

Rohde K. H., Abramovitch R. B. y Russell D. G. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. *Cell Host and Microbe* 2, 352–364.

Rosales-Mendoza S., Soria G. R. E., López R. R., Moreno F. L., Alpuche S. A. G. 2008. Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Rep.* 27, 79–84.

Rosseels V. y Huygen K. 2008. Vaccination against paratuberculosis. *Expert Rev. Vaccines* 7(6): 817-83.

Rosseels V., Marché S., Roupie V., Godfroid J., Walravens K., Marche, S., Govaerts M., y Huygen, K. 2006. Members of the 30- to 32-Kilodalton Mycolyl Transferase Family (Ag85) from Culture Filtrate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Are Immunodominant Th1-Type Antigens Recognized Early upon Infection in Mice and Cattle. *Infect. Immun.* 74(1): 202-212.

Rosseels V., Scanlan V., Vanonckelen A., Jurion F., Palfliet K., Marché S., Godfroid J., Walravens K., Huygen K. 2002. Development of plasmid DNA based *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine encoding immunodominant T cell antigens identified in mycobacterial culture filtrate. In: Seventh International Colloquium on Paratuberculosis. Juste RA, Geijo MV, Garrido JBM (Eds). International Association for Paratuberculosis Inc., Bilbao, Spain 108–113.

Roth A., Reischl U., Streubel A., Naumann L., Kroppenstedt R. M., Habicht M., Fischer M. y Mauch H. 2000. Novel diagnostic algorithm for identification of myco- bacteria using genus-specific amplification of the 16S- 23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J. Clin. Microbiol.* 38:1094–1104.

Roupie V., Leroy B., Rosseels V., Piersoel V., Noël-Georis I., Romano M., Govaerts M., Letesson J. J., Wattiez R. y Huygen K. 2008. Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding MAP0586c and MAP4308c of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* secretome. *Vaccine* 26, 4783–4794.

Rowbotham D. S., Howdle P. D. y Trejdosiewicz L. K. 1995. Peripheral cell-mediated immune response to mycobacterial antigens in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology* 102: 456-461.

Rowbotham D. S., Mapstone N. P., Trejdosiewicz L. K., Howdle P. D. y Quirke P. 1995. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut* 37: 660-667.

Rowe M. T. y Grant I. R. 2006. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Letters in Applied Microbiology* 42: 305-311.

Rowe M. T., Grant I. R., Dundee L. y Ball H. J. 2000. Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Irish J. Agric. Food Res.* 39: 203–208.

Rulong S., Aguas A. P., da Silva P. P., y Silva M. T. 1991. Intramacrophagic *Mycobacterium avium* bacilli are coated by a multiple lamellar structure: freeze fracture analysis of infected mouse liver. *Infect. Immun.* 59:3895-3902.

Runyon E. H. 1974. Ten mycobacterial pathogens. *Tubercle* 55:235-240.

Russell D. G. 1998. What does 'inhibition of phagosome-lysosome fusion' really mean? *Trends in Microbiology* 6: 212–214.

Saito H., y Tomioka H. 1988. Susceptibilities of transparent, opaque, and rough colonial variants of *Mycobacterium avium* complex to various fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:400-402.

Sanderson J. D., Moss M. T., Tizard M. L y Hermon-Taylor J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992; 33: 890-896.

Saviola B. y Bishai W. 2006. The Genus *Mycobacterium*-Medical. En: Dworkin M. (Ed.) The Prokaryotes. Springer (3): 919-933.

Schaefer W. B., Davis C. L., y M. L. Cohn. 1970. Pathogenicity of transparent, opaque and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. Am. Rev. Respir. Dis. 102:499-506.

Schlesinger L. S. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. Journal of Immunology 150: 2920–2930.

Schlesinger L. S y Horwitz M. A. 1991. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. Journal of Immunology 147: 1983–1994.

Schroeder H. E., Khan M. R. I., Knibb W. R., Spencer D., Higgins T. J. V. 1991. Expression of a chicken ovalbumin gene in three lucerne cultivars. Aust. J. Plant Physiol. 18: 495-505.

Schulze-Roebbecke R., y Buchholtz K. 1992. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1869–1873. 91.

Sechi L., Mara A. L., Cappai P., Frothingham R., Ortu S., Leoni A., Ahmed N. y Zanetti S. 2006. Immunization with DNA vaccines encoding different mycobacterial antigens elicits a Th1 type immune response in lambs and protects against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Vaccine 24, 229–235.

Sharma A. K. y Sharma M. K. 2009. Plant as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* 27: 811-832.

Shao C.-Y., Russinova E., Iantcheva A., Atanassov A., McCormac A., Chen D.-F., Elliot M. C., Slater A. 2000. *Plant Growth Regulation* 31: 155-166.

Shepard C. C. 1956. Growth characteristics of tubercle bacilli and certain other *Mycobacteria* in HeLa cells. *J. Exp.Med.* 105:39–55.

Shin S. J., Chang C.-F., Chang C.-D., McDonough S. P., Thompson B., Yoo H. S. y Chang Y.-F. 2005. In Vitro Cellular Immune Responses to Recombinant Antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. 73(8): 5074-5085.

Shinnick T. M., Good R. C. 1994. *Mycobacterial Taxonomy*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13 (11): 884-901.

Sierro F., Pringault E., Assman P.S., Kraehenbuhl J. P. y Debard N. 2000. Transient expression of M-cell phenotype by enterocyte-like cells of the follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patches, *Gastroenterology* 119, 734–743.

Sijmons P. C., Dekker B. M. M., Schrammeijer B., Verwoerd T. C., van den Elzen P. J. M. y Hoekema A. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technol* 8: 217–221.

Singh A. V., Singh S. V., Makharia G. K., Singh P. K., Schal J. S. 2008. Presence and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical and suspected cases of Crohn's disease and in healthy human population in India. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 190–197.

Singh, A. V., Singh, S. V., Singh, P. K., Sohal, J. S., Singh, M. K., 2011. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* ('Indian bison type') in animal attendants suffering from gastrointestinal complaints who work with goat herds endemic for Johne's disease in India. *Int. J. Infect. Dis.* 10, e677–e683.

Skerman V. B. D., McGowan V. y Sneath P. H. A. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225–420.

Slagame P., Abrams J. S. y Clayberger C. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T-cell clones. *Science* 254: 279–282.

Smith N. A., Singh S. P., Wang M. B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G., Waterhouse P. M. 2000. Gene expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs, *Nature* 407: 319–320.

Smyth A. J., Welsh M. D., Girvin R. M. y Pollock J. M. In vitro responsiveness of 76 T cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle to mycobacterial antigens: predominant involvement of WCI(+) cells. 2001. *Infection and Immunity* 69: 89-96.

Spangler E., Heider L. E, Bech-Nielsen S., Dorn C. R. 1991. Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 52(8), 1197–1200.

Stainsby K. J., Lowes J. R., Allan R. N. y Ibbotson J. P. 1993. Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* and nine species of environmental mycobacteria in Crohn's disease and control subjects. *Gut* 34: 371-374.

Stabel J. R. 1996. Production of 7-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 8: 345-350.

Stabel J. R. 1999. Transitions in immune response to *M. a. paratuberculosis*. Proc. Int. Colloq. Paratuberc. 6: 579–584.

Stabel J. R., Steadham E. M., y Bolin C. A. 1997. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl. Environ. Microbiol. 63: 4975–4977.

Stainsby K. J., Lowes J. R., Allan R. N. y Ibbotson J. P. 1993. Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* and nine species of environmental mycobacteria in Crohn's disease and control subjects. Gut 34: 371-374.

Stokes R. W., Haidl I. D., Jefferies W. A. y Speert D. P. 1993. Mycobacteria–macrophage interactions. Macrophage phenotype determines the nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages. Journal of Immunology 151: 7067–7076.

Stormer R. S., y Falkinham J. O. 1989. Differences in antimicrobial susceptibility of pigmented and unpigmented colonial variants of *Mycobacterium avium*. J. Clin. Microbiol. 27:2459-2465.

Streatfield S. J, Jilka J. M., Hood E. E., Turner D. D., Bailey M. R., Mayor J. M., Woodard S. L., Beifuss K. K., Horn M. E., Delaney D. E., Tizard I. R. y Howard J. A. 2001. Plant-based vaccines: unique advantages. Vaccine 19: 2742–2748.

Streeter R. N., Hoffsis G. F., Bech-Nielsen S., Shulaw W. P. y Rings M. 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am. J. Vet. Res. 56: 1322–1324.

Sung N. y Collins M. T. 1998. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 999–1005.

Sweeney R. W. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12(2), 305–512.

Sweeney R. W., Whitlock R. H. y Rosenberger A. E. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 30: 166– 171.

Sweeney R. W., Jones D. E., Habecker P. y Scott P. 1998. Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 9: 842-847.

Thoen C. O., Karlson A. G. y Himes E. M. 1981. Mycobacterial infections in animals. *Rev. Infect. Dis.* 3:960-972.

Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.

Tacket C. O., Mason H. S. 1999. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect.* 1:777–83.

Taylor T. K., Wilks C. R., y McQueen D. S. 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109: 532– 533.

Teitelbaum R., Glatman-Freedman A., Chen B., Robbins J. B., Unanue E., Casadevall A., Bloom B. R. 1998. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15688–15693.

Thanavala Y., Yang Y.-F., Lyons P., Mason H. S. y Arntzen C. J. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 3358–3361.

Thole J. E., Schoningh R., Janson A. A., Garbe T., Cornelisse Y. E., Clark-Curtiss J. E., Kolk A. H., Ottenhoff T. H., De Vries R. R., Abou Zeid C. 1992. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol* 6:153–163

Thorel M. F., Blom-Potar M. C. y Rastogi N. 1990. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* and “wood-pigeon” mycobacteria by isoenzyme profile and selective staining of immunoprecipitates. *Res. Microbiol.* 141: 551–561.

Thorel M. F. y H. L. David. 1984. Specific surface antigens of SmT variants of *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* 43:438-439.

Timpe A. y Runyon E. H. 1954. The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease. *J. Lab. Clin. Med.* 44:202-209.

Tortoli E., Rindi L., Garcia M. J., Chiaradonna P., Dei R., Garzelli C., Kroppenstedt R. M., Lari N., Mattei R., Mariottini A., Mazzarelli G., Murcia M. I., Nanetti A., Piccoli P., Scarparo C. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1277-1285.

Tregoning J. S., Clare S., Bowe F., Edwards L., Fairweather N., Qazi O., Nixon P. J., Maliga P., Dougan G., Hussell T. 2005. Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine. *Eur. J. Immunol.* 35, 1320–1326.

Trinh T. H., Ratet P., Kondorosi E., Durand P., Kamaté K., Bauer P. Kondorosi A. 1998. Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 345-355.

Tuci A., Tonon F., Castellani L., Sartini A., Roda G., Marocchi M., Caponi A., Munarini A., Rosati G., Ugolini G., Fuccio L., Scagliarini M., Bazzoli F., Belluzzi A. 2011. Fecal detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* using the IS900 DNA sequence in Crohn's disease and ulcerative colitis patients and healthy subjects. *Dig. Dis. Sci.* 10, 2957–2962.

Twort F.W. y Ingram G. L. Y. 1913. A Monograph on Johnne's Disease (enteritis chronica pseudotuberculosa bovis). Baillière, Tindall and Cox, London.

Ullrich H.-J, Beatty W. L. y Russell D. G. 1999. Direct delivery of procathepsin D to phagosomes: implications for phagosome biogenesis and parasitism by mycobacteria. *European Journal of Cell Biology* 78: 739–748.

Ulmer J. B., Donnelly J. J., Parker S. E., Rhodes G. H., Felgner P. L., Dwarki V. J., Gromkowski S. H., Deck R. R., DeWitt C. M., Friedman A., et al., 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein, *Science* 259: 1745–1749.

Underhill D. M., Ozinsky A., Smith K. D. y Aderem A. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14459–14463.

Vallee H. y Rinjard P. 1926. Etudes sur l'enterite paratuberculeuse des bovides (note préliminaire). *Revue Générale de Médecine Vétérinaire* 35, 1–9.

Vannuffel P., Dieterich C., Naerhuyzen B., Gilot P., Coene M., Fiasse R. y Cocito C. 1994. Occurrence, in Crohn's disease, of antibodies directed against a species-specific recombinant polypeptide of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1: 241-24

Via L. E., Fratti R. A., McFalone M., Ramos E. P., Deretic D. y Deretic V. 1998. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *Journal of Cell Science* 111: 897–905.

Walmsley A. y Arntzen C. 2000. Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotech* 11: 126–129.

Walmsley A. M. y Arntzen C. J. 2003. Plant cell factories and mucosal vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 145–150.

Wang L., Webster D. E., Campbell A. E., Dry I. B., Wesselingh S. L., Coppel R. L. 2008. Immunogenicity of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 produced in transgenic plants. *Int. J. Parasitol.* 38, 103–110.

Wang Y., Deng H., Zhang X., Xiao H., Jiang Y., Song Y., Fang L., Xiao S., Zhen Y., Chen H. 2009. Generation and immunogenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed in transgenic rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 292–297.

Wang Y., Shen Q., Jiang Y., Song Y., Fang L., Xiao S., Chen H. 2012. Immunogenicity of foot-and-mouth disease virus structural popyrotein P1 expressed in transgenic rice. *Journal of Virological Methods* 181: 12-17.

Wayne, L. G., and H. A. Sramek. 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:1-25.

Wentink G. H., Bongers J. H., Zeeuwen A. A., Jaartsveld F. H. 1994. Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *J. Vet. Med. B.* 41(7–8), 517–522.

Weyer J., Rupprecht C. E., Mans J., Viljoen G. J. y Nel L. H. 2007. Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine* 25, 4213–4222.

Whan L., Grant I. R., Ball H. J., Scott R. y Rowe M. T. 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett Appl Microbiol* 33, 227–231.

Wigdorovitz A., Carrillo C., Dus Santos M. J., Trono K., Peralta A., Gómez M. C., Ríos R. D., Franzone P. M., Sadir A. M., Escribano J. M. y Borca M. V. 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 (2): 347-353.

Williams A., Reljic A., Naylor I., Clark S. O., Falero-Diaz G., Singh M., Challacombe S., Marsh P. D., Ivanyi J. 2004. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology* 111, 328–333.

Windsor P. 2006. Research into vaccination against ovine Johne's disease in Australia. *Small Rum. Res.* 62, 139–142.

Windsor P. A. y Eppleston, J. 2006. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *New Zealand Veterinary Journal* 54, 237–241.

Wolinsky E. 1984. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Microbiol. Serol.* 15:1141-1207.

Woodley C. L. y David H. L. 1976. Effect of temperature on the rate of the transparent to opaque colony type transition in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9:113-119.

Xing Z., Santosuosso M., McCormick S., Yang T. C., Millar J., Hitt M., Wan Y., Bramson J. y Vordermeier H. M. 2005. Recent advances in the development of adenovirus and poxvirus-vectored tuberculosis vaccines. *Current Gene Therapy* 5, 485–492.

Young L. S., Inderlied C. B., Berlin O. G. y Gottlieb M. S. 1986. Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev. Infect. Dis.* 8:1024-1033.

Yusibov V. y Rabindran S. 2008. Recent progress in the development of plant derived vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 7, 1173–1183

Ziauddin A., Lee R. W. H., Lo R., Shewen P. y Strommer J. 2004. Transformation of alfalfa with bacterial fusion gene, *Mannheimia haemolytica* A1 *leukotoxin50-gfp*: Response with *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 and C58. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 79: 271-278.

Zhang H., Huang Q., Su J. 2010. Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Regeneration System and *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation. *Agricultural Science in China* 9 (2): 170-178.

Zhang H.-Y., Chen P.-F., Xu J.-M., Dai Q.-M., Xu F., Han Q.-W., Wang J.-J., Jin H.-Y. 2011. Separation and purification of *Escherichia coli*-expressed human thymosin- α 1 using affinity chromatography and high-performance liquid chromatography. *Protein Expression and Purification* 77: 140-145.

Zhang X., Buehner N. A., Hutson A. M., Estes M. K., Mason H. S. 2006. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol. J.* 4, 419–432.

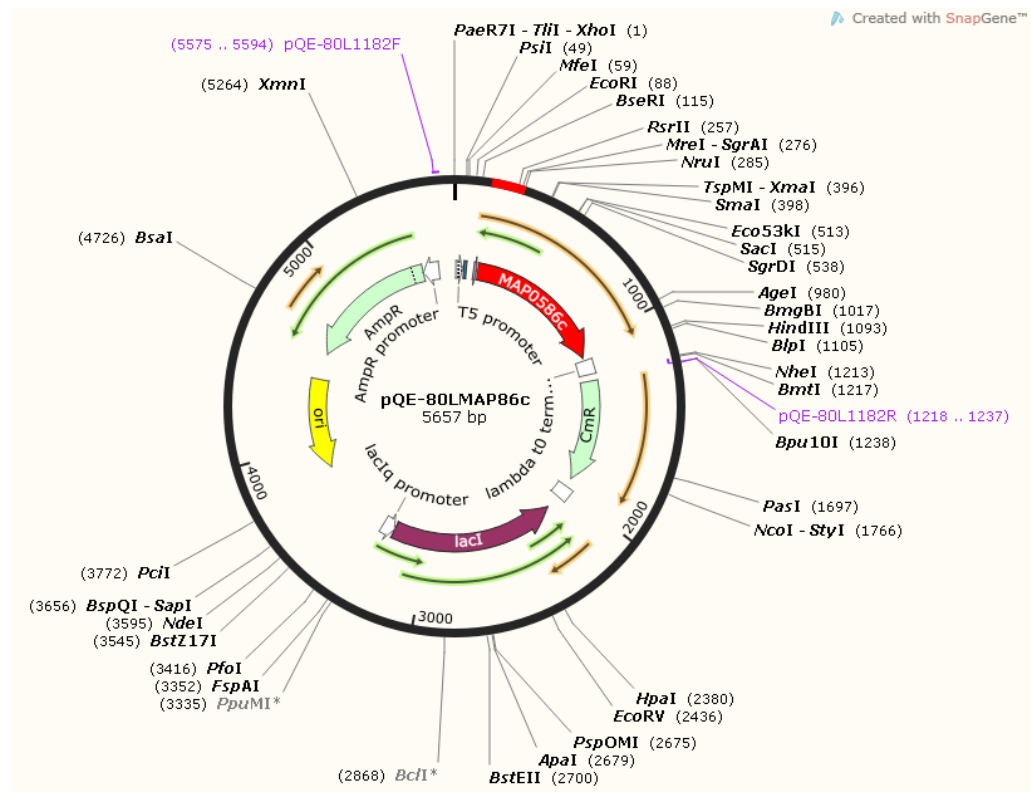
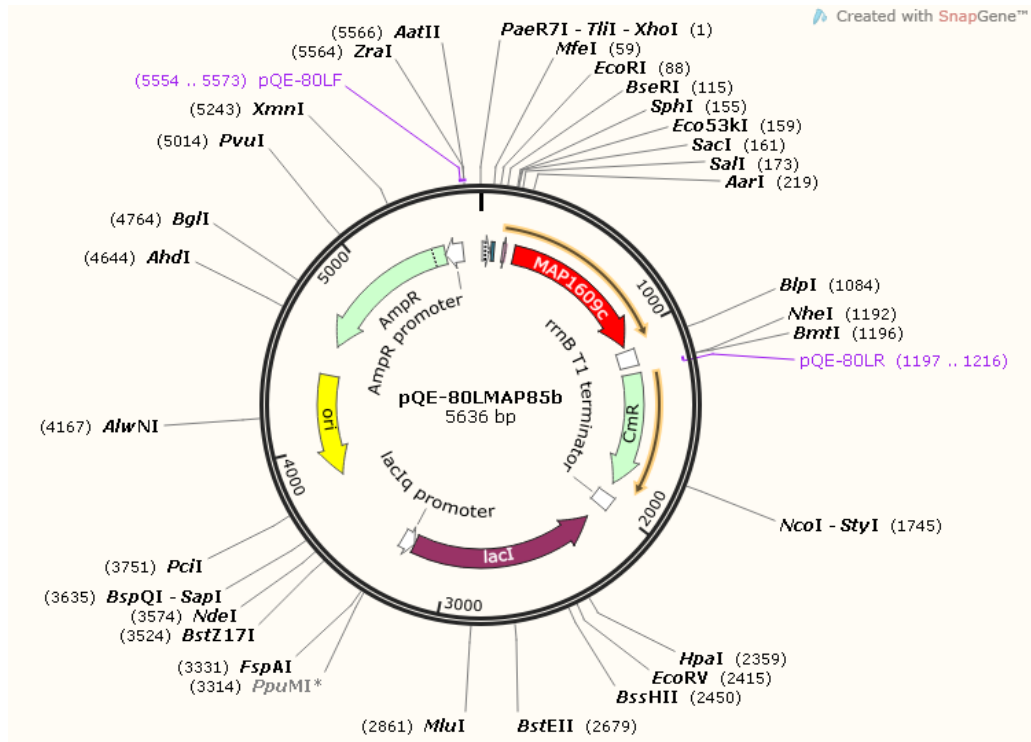
ANEXO I. Material biológico.

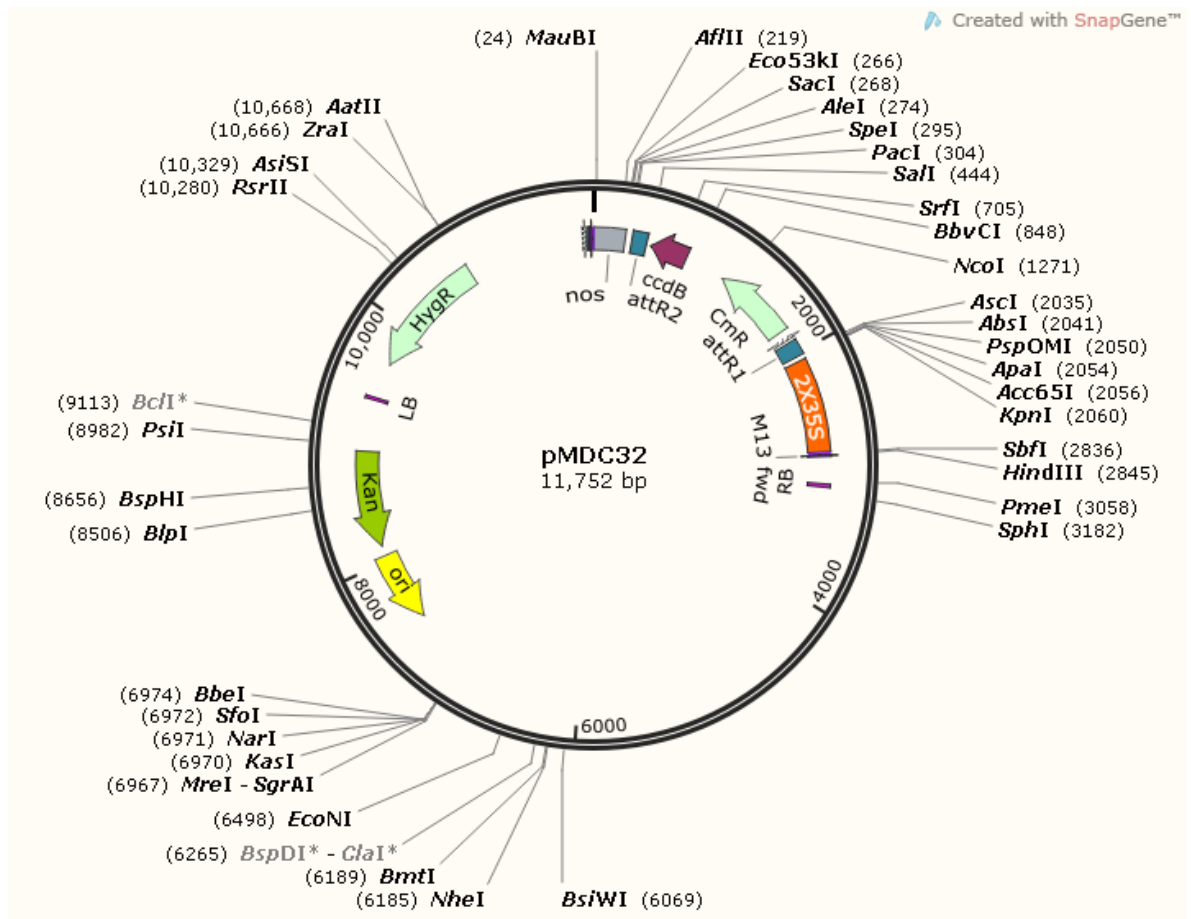
***E. coli* DH5 α .** Estas células tienen una alta importancia en investigación científica. Frecuentemente se usan para la transformación con ADN plasmídico para su posterior amplificación, ya que con cada división celular el plásmido es copiado. Lo anterior gracias a la mutación en el gen *endA1* el cual inactiva la endonucleasa intracelular encargada de la degradación del ADNp. Además, permite la selección de transformantes utilizando X-gal con vectores con el gen *lacZ*. La mutación en el gen *recA1* elimina la recombinación homóloga reduciendo las probabilidades de delección y multimerización de vectores. El genotipo de esta cepa es el siguiente: F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk⁻, mk⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ :2174.

Alfalfa Regen SY27 (*Medicago sativa* L.). Línea de alfalfa seleccionada por su alta capacidad de regeneración (85-90%) y alta eficiencia de transformación utilizando *A. tumefaciens*. Genotipo diseñado para producción de proteínas. Esta clona fue amablemente donada por Sandra Austin-Phillips del Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Universidad de Wisconsin, E. U.

Ratón CD-1 (*Mus musculus*). El ratón de la cepa CD-1 se usa en experimentación general, así como en estudios de oncología, toxicología, teratología, envejecimiento, y como modelo para cirugía. Posee como ventaja su variabilidad genética, lo cual puede servir como ventaja en la clonación posicional de un loci de rasgo cuantitativo para la selección genotípica y fenotípica de un rasgo especial. La apariencia de los ratones CD-1, al igual que la cepa BALB/c, es albino.

ANEXO II. Vectores de transformación.





ANEXO III. Medios de cultivo, antibióticos y reguladores de crecimiento.

Medio LB (Luria-Bertani).

Por litro:

Triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Aforar a 1 L con agua destilada y agitar hasta que los solutos se disuelvan. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N. Esterilice en autoclave por 20 minutos (si se va a agregar antibiótico este se agrega antes de cultivar después de esterilizar).

Medio Murashige-Skoog (MS).

Cada solución se prepara pesando y disolviendo en el orden indicado cada reactivo, antes de adicionar el siguiente, en un vaso de precipitados de vidrio conteniendo agua destilada y en agitación por barra magnética.

Solución 1: KNO₃.....19.0 g
 NH₄NO₃.....16.5 g
 KH₂PO₄.....1.7 g
 MgSO₄ · 7H₂O....3.7 g
 H₂O cbp.....1000 mL

Solución 2: CaCl₂ · 2H₂O.....4.4 g
 H₂O cbp.....1000 mL

Solución 3: Na₂EDTA · 2H₂O.....0.373 g
 FeSO₄ · 7H₂O.....0.278 g
 H₂O cbp.....1000 mL

Solución 4: H₃BO₃.....0.310 g
 MnSO₄ · H₂O.....0.845 g
 ZnSO₄ · 7H₂O.....0.430 g
 KI.....0.0415 g
 Na₂MoO₄ · 2H₂O...0.0125 g

Solución 5: CuSO₄ · 5H₂O.....0.250 g
 CoCl₂ · 6H₂O.....0.250 g
 H₂O cbp100 mL

1. Preparación del medio de cultivo:

2.a En un vaso de precipitados se adicionan las alícuotas correspondientes de cada solución stock, en el orden indicado (volumen para un litro de medio final):

Solución 1: 100 ml

Solución 2: 100 ml

Solución 3: 100 ml

Solución 4: 10 ml

Solución 5: 10 ml

2.b Se agrega y disuelve la sacarosa, los reguladores de crecimiento y se adiciona agua destilada para un volumen cercano al volumen final de medio.

2.c Se ajusta el pH a 5.8 y posteriormente se adiciona agua destilada hasta el volumen final de medio.

2.d En caso de preparar medio semisólido, se adiciona agar bacteriológico en concentración de 0.8% y se disuelve en el horno de microondas, agitando frecuentemente, hasta que se observe la fusión total del agar.

2.e Una vez disuelto, el medio se distribuye en los recipientes de cultivo correspondientes y se esteriliza en autoclave a 121°C y 1.05 Kgcm⁻² de presión. Al concluir la esterilización se dejan solidificar sobre una superficie plana.

Ampicilina (Stock) 100 mg/mL en H₂O. Esterilizar con filtro de 0.2 µm. Almacenar alícuotas a -20 °C.

Higromicina Stock 50mg/mL en dH₂O. Esterilizar con filtro de 0.2 µm. Almacenar alícuotas a -20 °C.

2,4-D (10 mM) 10 mL

Disolver 0.0221 g en 10 mL de etanol al 95%. Almacenar a 4 °C.

Cinetina

Disolver 21.5 mg en 1 mL de NaOH 1N, aforar a 10 mL con agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a -20 °C.

ANEXO IV. Soluciones y reactivos.**Go Taq Flexi DNA Polymerase** (Promega CAT# 9PIM829)**RNAsa pancreática (1 mg/mL)**

Disolver 2 mg de RNAsa I pancreática en 2 mL de TE (pH 7.6).

Solución de Lisis Alcalina I (Birnboim I)

50 mM Glucosa

25 mM Tris-Cl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

Prepare la solución de stocks estándares en lotes de 100 ml, esterilizar por autoclave, almacenar a 4 °C.

Solución de Lisis Alcalina II (antes de usar) (Birnboim II)

0.2 N NaOH (diluida en ese momento de un stock 10 N)

1 % (p/v) SDS

Almacenar a temperatura del cuarto.

Solución de Lisis Alcalina III (Birnboim III)

5 M Acetato de Potasio 60 mL

Ácido acético glacial 11.5 mL

H₂O 28.5 mL

Almacenar a 4 °C y transferir a hielo justo antes de usar.

Tris EDTA (TE) (pH 8.0)

100 mM Tris-Cl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

Esterilizar en autoclave. Almacene a temperatura de cuarto.

STE

10 mM Tris-Cl (pH 8.0)

0.1 M NaCl

1 mM EDTA (pH 8.0)

Esterilizar en autoclave. Almacenar a 4 °C.

Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1

Agregar 24 partes del volumen total de Cloroformo y 1 parte de Alcohol Isoamílico. Es opcional Agregar TE para que este no se evapore. Utilizar material de vidrio para preparar la solución y realizarlo en campana de extracción, utilizar guantes. Almacenar a 4 °C y protegido de la luz.

IPTG (1M) (al 20% = 0.8M)

238 mg/mL en H₂O. Esterilizar con filtro de 0.2 µm. Almacenar alícuotas a -20 °C.

PMSF (100 mM).

Disolver en isopropanol y almacenar a 2-8 °C.

Buffer de fosfatos

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Ajustar el pH a 8.0.

EDTA 0.5 M (50 mL)

9.305 g EDTA disódico

Disolver en 40 mL de agua y ajustar el pH con NaOH. Llevar a un volumen final de 50 mL.

Esterilizar en autoclave.

TBE 5X (1 Lt)

54 g Trisma base
27.5 g Ácido Bórico
20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

TBE 1X (100 mL)

20 mL TBE 5X
80 mL Agua Destilada

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 0.2 M

2.8 g en 100 mL de Milli Q

Ácido Cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_7 \text{H}_2\text{O}$) 0.1 M

2.1015 g en 100 mL de Milli Q

Buffer Citrato-Fosfato pH 5.0

Sol. Fosfato de Na 0.2 M	25.7 mL
Sol. Ácido Cítrico 0.1 M	24.3 mL
Milli Q	50 mL

PBS

NaH_2PO_4	0.876g
Na_2HPO_4	2.56 g
NaCl	8.77 g

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a 7.3 con HCl.

PBST

1 litro PBS + 500 μL Tween-20

ANEXO V. Tabla resumen de bioensayo de regeneración de callo.

MAP0586c			Tolerancia a Higromicina Caja A			
Linea	Frasco	Explante	Pscn	A1	A2	A3
1	14	1	1	1	1	1
2	14	1	2	1	1	1
3	14	1	3	1	1	1
4	14	1	4	1	1	1
5	14	1	5	/	/	/
6	37	2	6	1	1	1
7	37	2	7	1	1	1
8	37	2	8	1	0	1
9	37	2	9	1	1	1
10	48	2	10	1	1	1
11	30	1	11	1	1	1
12	35	1	12	1	1	1
13	35	1	13	1	1	1
14	35	1	14	1	1	1
15	35	1	15	/	/	/
16	35	1	16	0	0	0
17	46	1	17	1	1	1
18	46	1	18	1	1	1
19	29	1	19	1	1	1
20	29	1	20	1	1	1
21	29	1	21	/	/	/
22	29	1	22	1	1	1
23	19	1	23	1	1	1
24	34	1	24	1	1	1
25	34	1	25	1	1	1

Tabla VI. Bioensayo de inducción de callo con plantas de alfalfa transformadas con el gen MAP0586c. El numero 1 representa proliferación de células (generación de callo). El número 0 representa la ausencia de proliferación de células. El símbolo / indica que no se colocó explante de esa línea en la placa.

(Continuación)

MAP0586c			Tolerancia a Higromicina Caja B			
Linea	Frasco	Explante	Pscn	B1	B2	B3
26	22	1	1	1	1	1
27	22	1	2	1	1	1
28	4	2	3	1	1	1
29	21	1	4	1	0	0
30	23	2	5	1	1	1
31	23	2	6	1	1	1
32	16	2	7	0	0	1
33	28	2	8	1	1	1
34	28	2	9	1	1	1
35	28	2	10	0	0	0
36	26	1	11	1	1	1
37	26	1	12	1	1	1
38	26	1	13	0	/	0
39	36	1	14	1	1	1
40	36	1	15	1	1	1
41	13	2	16	1	1	1
42	13	2	17	1	1	1
43	13	2	18	1	1	1
44	52	1	19	1	1	1
45	8	2	20	1	1	1
46	8	2	21	1	1	1
47	8	2	22	1	0	1
48	8	2	23	1	1	1
49	8	2	24	1	1	1
50	8	2	25	1	1	1

Tabla VI. Bioensayo de inducción de callo con plantas de alfalfa transformadas con el gen MAP0586c. El número 1 representa proliferación de células (generación de callo). El número 0 representa la ausencia de proliferación de células. El símbolo / indica que no se colocó explante de esa línea en la placa.

MAP1609c			Tolerancia a Higromicina Caja C			
Linea	Frasco	Explante	Pscn	C1	C2	C3
1	10	3	1	1	1	1
2	14	1	2	1	1	1
3	14	1	3	1	1	1
4	31	1	4	1	1	1
5	42	3	5	1	1	1
6	5	2	6	1	1	1
7	5	2	7	1	1	1
8	12	2	8	1	1	1
9	55	1	9	1	1	1
10	55	1	10	1	1	1
11	55	1	11	1	1	1
12	32	2	12	1	1	1
13	9	1	13	1	1	1
14	9	1	14	1	1	1
15	27	1	15	1	1	1
16	27	1	16	1	1	1
17	2	1	17	1	1	1
18	2	1	18	1	1	1
19	50	2	19	1	1	1
20	7	1	20	1	1	1
21	7	1	21	/	/	/
22	7	1	22	1	1	1
23	17	1	23	1	1	1
24	17	1	24	1	1	1

Tabla VII. Bioensayo de inducción de callo con plantas de alfalfa transformadas con el gen MAP1609c. El numero 1 representa proliferación de células (generación de callo). El número 0 representa la ausencia de proliferación de células. El símbolo / indica que no se colocó explante de esa línea en la placa.