



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Evaluación de la Proteína de la
Cápside del Virus de la Mancha
Anular de la Papaya (PRSV) Como
Acarreador de Antígenos
Acoplados Químicamente**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

Jesús Fernando Guerrero Rodríguez

Zapopan, Jalisco

21 Marzo de 2014



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Evaluación de la Proteína de la Cápside del
Virus de la Mancha Anular de la Papaya
(PRSV) como Acarreador de Antígenos
Acoplados Químicamente**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo
de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Jesús Fernando Guerrero Rodríguez

Director

Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández

Co-director

Dr. Abel Gutiérrez Ortega

Zapopan, Jalisco

21 de Marzo de 2014

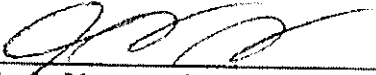


Evaluación de la Proteína de la Cápside del Virus de la Mancha Anular de la Papaya (PRSV) Como Acarreador de Antígenos Acoplados Químicamente

Por
Jesús Fernando Guerrero Rodríguez


Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos
Naturales y Agrícolas

Aprobado por:



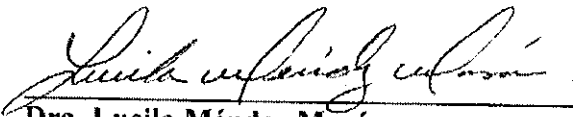
Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
Director de Tesis e integrante del jurado

04/03/2014
Fecha



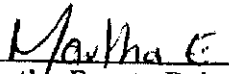
Dr. Abel Gutiérrez Ortega
Co-Director de Tesis e integrante del jurado

04/03/2014
Fecha




Dra. Lucila Méndez Morán
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

04/03/2014
Fecha



Dra. Martha Escoto Delgadillo
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

04/03/2014
Fecha



Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

04/MAR-14
Fecha

A mis padres por todo

Agradecimientos

A mis padres Ernesto y Lilia por todo el apoyo y cariño que me han brindado en todo este proceso llamado vida.

A mis hermanos Edgar y Liliana por su cariño, recuerdos y tiempo compartido.

A Titi por todo su apoyo, cariño y por ayudarme a caminar en línea recta.

A mis directores de tesis Dra. Carla Sánchez y Dr. Abel Gutiérrez por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto. Por la gran paciencia, tiempo, consejos, enseñanza y regaños que me brindaron para la conclusión de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de biotecnología médica y farmacéutica del CIATEJ A. C. por esas platicas de café, amistad y consejos; Chuck, Aurora, Paola, Gisela, Felipe, Yessica, Gladys, Carlos, Memo, Ana Lilia y más.

A CONACYT por el otorgamiento de la beca de estudios.

Gracias a UdeG CUCBA, y CIATEJ por abrirme las puertas para la realización de este proyecto.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Vacunas y adyuvantes.....	3
2.2 Partículas tipo virus (PTVs).....	7
2.3 Conjugación química.....	9
2.4 Virus vegetales y partículas tipo virus como acarreadores de antígenos mediante conjugación química.....	10
2.5 Los Potyvirus y el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV).....	14
3. Justificación.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivo general.....	21
5.1 Objetivos particulares.....	21
6. Materiales y métodos.....	21
6.1 Secuencia del gen de la proteína de la cápside del PRSV.....	21
6.2 Expresión y purificación de la proteína de la cápside del PRSV.....	22
6.3 Determinación de la formación de partículas tipo virus.....	24
6.4 Determinación de la disponibilidad de lisinas reactivas para conjugación química en la superficie de las partículas tipo virus.....	25
6.5 Conjugación química de la proteína verde fluorescente a la superficie de las partículas tipo virus.....	26
6.6 Medición de anticuerpos antígeno-específicos en ratones BALB/c inmunizados.....	27
7. Resultados y Discusión.....	30
7.1 Confirmación de la presencia del gen de la proteína de la cápside del PRSV en el plásmido de expresión.....	30
7.2 Expresión y purificación de la proteína de la cápside del PRSV.....	31

7.3 Determinación de la formación de partículas tipo virus	40
7.4 Determinación de la disponibilidad de lisinas reactivas para conjugación química en la superficie de las partículas tipo virus.....	41
7.5 Conjugación química de la proteína verde fluorescente a la superficie de las partículas tipo virus.....	43
Gráfico 4. Medición de anticuerpos antígeno-específicos en ratones BALB/c inmunizados. SP: suero preinmune; S1: primer suero inmune; S2: segundo suero inmune y G (grupos) evaluados.....	46
8. Conclusiones.....	47
9. Literatura Citada.....	48

Abreviaturas

CCMV: Virus del moteado clorótico del caupí.

COPV: Virus del papiloma oral canino.

CPA: Células presentadoras de antígenos.

CPMV: Virus del mosaico del caupí.

DCs: Células dendríticas.

FE: Fracción de elución.

FI: Fracción insoluble.

FL: Fracción de lavado.

FNR: Fracción no retenida.

FS: Fracción soluble.

G: Grupo.

GFP: Proteína verde fluorescente.

HA: Hemaglutinina.

Ig: Inmunoglobulinas.

IPTG: Isopropil- β -D-I-tiogalactopiranosido.

KE: Ácido glutámico.

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani.

LTC: Linfocitos T citotóxicos.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MPM: Marcador de pesos molecular.

NEM: *N*-Ethylmaleimide.

NP: Nucleocápside.

PapMV: Virus del mosaico de la papaya.

PC: Proteína de la cápside.

PPV: Virus eruptivo de la ciruela.

PRSV: Virus de la mancha anular de la papaya.

PTVs: Partículas tipo virus.

PV: Partículas virales.

PVA: Virus de la papa A.

PVC: Virus del parvovirus canino.

PVX: Virus de la papa X

PVY: Virus de la papa Y.

RHDV: Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo.

S1: Primer suero inmune.

S2: Segundo suero inmune.

SNA: Sulfo-*N*-hydroxysulfosuccinimide (NHS)-Acetate.

SP: Suero preinmune.

Sulfo-MBS: Sulfo- *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide-ester (MBS).

TA: Temperatura ambiente.

TEV: Virus del jaspeado del tabaco.

TLR: Receptores tipo toll.

TMV: Virus del mosaico del tabaco.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VHC: Virus de la hepatitis C humana.

VPH: Virus del papiloma humano.

Resumen

El virus de la mancha anular de la papaya es un virus filamentosos y flexible del género de los potyvirus, tiene un tamaño de 780 nm de largo y 12 nm de ancho. Está compuesto por una cadena sencilla lineal de ARN, protegida por 2000 subunidades de la proteína de la cápside. En la actualidad, existe un número creciente de reportes que indican que los virus o sus cápsides, por su estructura altamente ordenada y repetitiva, pueden aumentar la respuesta inmune hacia antígenos o partes de éstos que se presenten en su superficie. No obstante, no existe hasta hoy un estudio que demuestre que la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya es capaz de aumentar la respuesta inmune hacia un antígeno coadministrado en un modelo animal. En el presente trabajo se realizó la expresión de la proteína de la cápside de este virus vegetal en *Escherichia coli* y se evaluó su efecto como potenciador de la respuesta inmune hacia un antígeno soluble. Se encontró que los monómeros de la proteína de la cápside formaron partículas tipo virus de estructura filamentosas similares al virus nativo. Por otro lado, se demostró que la superficie de las partículas tipo virus contiene grupos amino disponibles para conjugación química. Asimismo, se lograron unir las partículas a la proteína verde fluorescente mediante el uso de un entrecruzador químico heterobifuncional, sin embargo, los conjugados mostraron baja estabilidad. Por último, se inmunizaron ratones hembra BALB/c con una mezcla de partícula y proteína verde fluorescente y se determinó que los títulos de anticuerpos fueron más altos en comparación con la inmunización con la proteína verde fluorescente sola. El isotipo IgG1 fue el que se indujo en mayor medida, sugiriendo que las partículas tipo virus tuvieron un efecto de reclutamiento de linfocitos hacia la zona de inmunización. Estos datos indican que la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya producida en forma recombinante en *Escherichia coli* podría, en principio, ser adicionada en nuevas formulaciones vacunales con el fin de incrementar la respuesta de anticuerpos hacia antígenos solubles selectos.

Abstract

Papaya ringspot virus is a member of the genus *Potyvirus*, has filamentous and flexible virus of 780 nm long and 12 nm wide. It is composed of a linear single stranded RNA encapsidated by 2000 subunits of capsid protein. Today, a growing number of reports indicating that the virus and their capsids, by their highly ordered and repetitive structure, can increase the immune response to antigens or parts thereof that occur on its surface. However, until now no study showing that the capsid protein of papaya ringspot virus is able to enhance the immune response to a coadministered antigen in an animal model. In this study the expression of the capsid protein of the plant virus in *Escherichia coli* was carried out and their effect as a potentiator of the immune response to a soluble antigen was evaluated. It was found that the monomer protein of the capsid formed filamentary virus-like particle similar to the native virus. Furthermore, it was shown that the surface of the virus-like particles containing amino groups available for chemical conjugation. Furthermore, they were able to bind the particles to the green fluorescent protein using a heterobifunctional chemical crosslinking, however, showed low stability conjugates. Finally, female BALB / c mice were immunized with a mixture of particle and green fluorescent protein and found that the antibody titers were higher compared to immunization with the single green fluorescent protein. The IgG1 isotype is induced which was further, suggesting that the virus-like particles had an effect on the recruitment of lymphocytes to the area of immunization. These data indicate that the protein capsid of papaya ringspot virus recombinantly produced in *Escherichia coli* could, in principle, be added to new vaccine formulations in order to increase the antibody response to selected soluble antigens.

1. Introducción

La resistencia de las bacterias hacia los antibióticos y la aparición de nuevas cepas de virus, además de los nuevos descubrimientos sobre la interacción del agente infeccioso con el sistema inmune del huésped, ha impulsado la investigación hacia el desarrollo de nuevas vacunas que sean más eficientes que las actuales, ya que, la vacunación es considerada por la Organización Mundial de la Salud como la estrategia más efectiva para el control de enfermedades infecciosas, por su costo y efectividad. La vacuna ideal debe de cumplir con ciertos requisitos, como una protección sistémica e inmunidad humoral, además de ser segura, eficaz y con bajos costos de producción.

Las vacunas de nueva generación que contienen antígenos recombinantes irán aumentando de forma paulatina. Desafortunadamente, estos antígenos son, por lo general, poco inmunogénicos. Por lo tanto, se requerirán adyuvantes para que estos antígenos se puedan utilizar en vacunas eficaces. Se ha demostrado que las partículas virales y las partículas tipo virus (PTVs), tienen características favorables para su uso como adyuvantes en formulaciones vacunales, ya que al adherirles antígenos en la superficie, son capaces de estimular una respuesta inmune alta hacia los antígenos adheridos. Las PTVs son partículas autoensambladas que se forman espontáneamente tras la expresión de una o varias proteínas virales y que no poseen información genética para generar partículas infecciosas; por lo general, las PTVs asemejan la forma del virus original. A la fecha, existen dos formas de adherir antígenos a la superficie de las partículas virales o a las PTVs: mediante la generación de fusiones genéticas o por conjugación química.

El virus de la mancha anular de la papaya (PRSV, por sus siglas en inglés) es miembro de la familia *Potyviridae* y del género *potyvirus*. Este género comprende a virus filamentosos de un tamaño que va desde los 700 a 900 nm, con un genoma de ARN de cadena sencilla. El análisis de la secuencia de la proteína de la cápside (PC) de los aislados virales del PRSV hasta ahora reportados, contiene un gran número de aminoácidos repetidos lisina-ácido glutámico (KE) en su región amino. Las cadenas laterales de ambos aminoácidos son utilizadas con frecuencia para la generación de conjugados proteicos mediante el uso de entrecruzadores químicos. Además, se ha demostrado en otros *potyvirus* que la región

amino de la PC es la más inmunogénica, lo que sugiere que ésta se encuentra expuesta en la superficie de las partículas virales. De acuerdo a estas características estructurales, el presente trabajo se enfocó en evaluar a la PC del PRSV expresada en *Escherichia coli* como un adyuvante al que se le pueden conjugar antígenos completos en la superficie, capaz de aumentar la producción de anticuerpos antígeno-específicos.

2. Antecedentes

2.1 Vacunas y adyuvantes

Durante los últimos 200 años las vacunas se han utilizado ampliamente para prevenir infecciones. Desde el desarrollo de la primera vacuna contra la viruela, desarrollada por Edward Jenner, múltiples estrategias de vacunación han sido probadas en animales y humanos, cada una con diferentes niveles de eficacia. Sin embargo, la aparición de nuevas enfermedades infecciosas y una incapacidad en el desarrollo de nuevas vacunas a un bajo costo y en gran producción, ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias de vacunación (Lacasse *et al.* 2008). La investigación fundamental en inmunología, biología celular y molecular y la vacunología; ha tratado de identificar los mecanismos de las interacciones entre el huésped y el patógeno con el fin de proporcionar una base para el diseño de vacunas capaces de inducir las diferentes respuestas inmunológicas necesarias para prevenir y controlar las enfermedades infecciosas más complejas (Jennings y Bachmann 2008).

Las vacunas tradicionales consisten principalmente en patógenos vivos atenuados, microorganismos enteros inactivados o toxinas bacterianas inactivadas. En general, esta estrategia de vacunación ha tenido éxito para la inducción de anticuerpos que neutralizan los virus o toxinas bacterianas, inhibiendo la unión de los microorganismos a las células o promoviendo la fagocitosis de éstos (Singh y O'Hagan 2002). Sin embargo, con este tipo de vacunas se corre el riesgo de que haya reversión de la virulencia de las cepas atenuadas y la integración del ADN al genoma del huésped, además de que se puede producir la enfermedad en personas inmunodeprimidas. Por otra parte, es muy difícil o imposible el crecimiento de ciertos patógenos *in vitro*, haciendo imposible el desarrollo de vacunas a partir de éstos (Brennan *et al.* 2001; Singh y O'Hagan 2002).

Debido a estas limitantes, se han buscado otras estrategias para el desarrollo de vacunas que tengan ciertas ventajas sobre las vacunas tradicionales. Estas nuevas estrategias incluyen; proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, conjugados de proteínas con polisacáridos y ADN plasmídico. Aunque este tipo de estrategias tiene ciertas ventajas sobre las tradicionales, por lo general este tipo de vacunas es poco inmunogénico, ya que carecen de muchas características que tiene el patógeno original (Singh y O'Hagan 2002). Además,

mientras se incrementa la inmunogenicidad de los antígenos basados en proteínas recombinantes, también aumenta la reactogenicidad, conduciendo a la aparición de efectos secundarios al utilizarlas (Bachmann y Jennings 2010).

Los adyuvantes del latín *adjuvare* que significa “ayudar”, se definen generalmente como compuestos que pueden aumentar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno. Con la finalidad de reducir la reactogenicidad de las actuales vacunas, las nuevas vacunas tienen una composición más definida que a menudo les da menor inmunogenicidad, comparadas con las vacunas de bacterias y virus atenuados. Por lo tanto, se requiere de adyuvantes para que los componentes de las nuevas vacunas induzcan respuesta inmune potente y persistente, además de beneficios adicionales, como el uso de menos antígenos y menor número de refuerzos. Por otra parte, se busca que las nuevas vacunas, además de inducir anticuerpos específicos, induzcan a una fuerte respuesta celular, incluyendo linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos (LTC) (Guy 2007).

Los adyuvantes pueden usarse para mejorar la respuesta inmune hacia antígenos vacunales de diferentes maneras: incrementando la inmunogenicidad de antígenos débiles, aumentando la velocidad y duración de la respuesta inmune en contra del antígeno, modulando la avidéz de los anticuerpos, la especificidad de sus isotipos o la distribución de las subclases, estimulando LTC, induciendo la inmunidad de las mucosas, mejorando la respuesta inmune en individuos en la etapa de senescencia o inmunodeprimidos, disminuyendo las dosis de antígeno en vacunas y ayudando a superar la competencia de antígenos en vacunas multivalentes (Singh y O'Hagan 2002).

Un adyuvante ideal, debe inducir dos respuestas del sistema inmune, las respuestas humorales y citotóxicas, para poder hacer frente a las enfermedades crónicas infecciosas, como las causadas por el virus de la hepatitis C humana (VHC) y el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, así como a algunas multifactoriales, como el cáncer (Leclerc *et al.* 2007).

Diversos compuestos se han analizado para su uso como adyuvantes; éstos incluyen sales minerales, productos microbianos, emulsiones, saponinas, citocinas, polímeros, macropartículas y liposomas (Awate *et al.* 2013). Los adyuvantes se clasifican en dos

categorías de acuerdo a su modo de acción: los potenciadores de respuesta inmune y los sistemas de entrega o presentadores de antígenos. Los potenciadores de la respuesta inmune activan la inmunidad innata directamente, proporcionando la estimulación de la inflamación, necesaria para una óptima activación y proliferación de las células presentadoras de antígenos (CPA) como las células dendríticas. El mecanismo de los presentadores de antígeno, consiste en identificar y presentar los antígenos en mayor cantidad a las CPA y así estimular una mayor producción de anticuerpos específicos. Por lo tanto, los de sistema de entrega promueven la interacción entre antígenos y CPA y los potenciadores son los que hacen que haya una mayor proliferación de estas células por medio de la inflamación (O'Hagan y Valiante 2003; Pashine *et al.* 2005). Además, también se ha comprobado que los adyuvantes de sistema de entrega también activan a la inmunidad innata (Awate *et al.* 2013).

Sin embargo, los recientes avances en la investigación inmunobiológica, han revelado diversos mecanismos de acción de los adyuvantes. La evidencia disponible sugiere que los adyuvantes emplean uno o más de los siguientes mecanismos para obtener la respuesta inmune: liberación sostenida del antígeno en el sitio de inyección o efecto de depósito, regulación de citocinas y quimiocinas, reclutamiento celular en el sitio de inyección, aumento de la captación y presentación de antígenos a las CPA, activación y maduración de las CPA (incremento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 y sus moléculas co-estimuladoras) además de la migración a los ganglios linfáticos y, activación de los inflamomas (Fig. 1) (Awate *et al.* 2013).

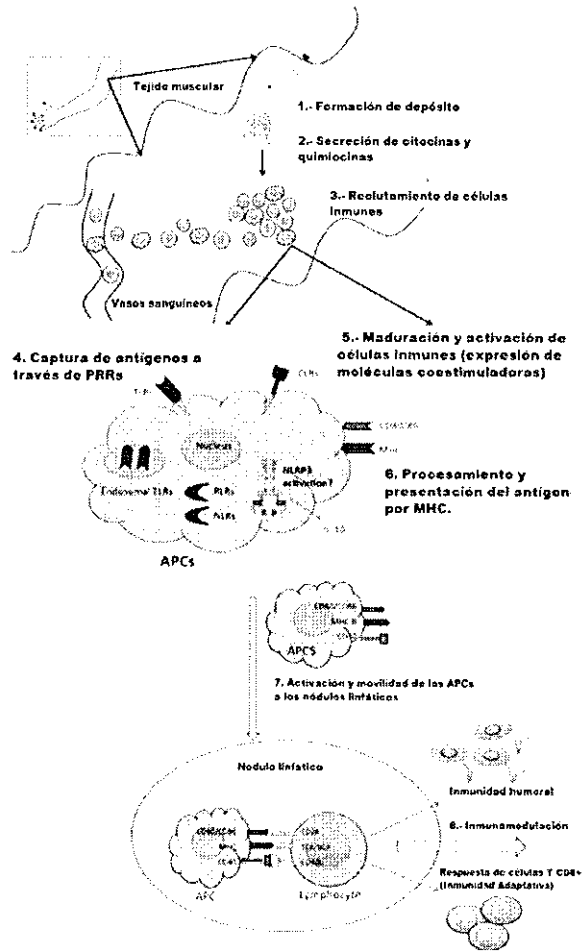


Figura 1. Mecanismos de acción propuestos de los adyuvantes (Awate *et al.* 2013). (1) Algunos adyuvantes presumiblemente forman un depósito en el sitio de inyección, el cual es asociado con la liberación lenta del antígeno. (2) Otros adyuvantes se asocian con la secreción transitoria de citocinas y quimiocinas. (3) Las citocinas y quimiocinas están involucradas en el reclutamiento de diferentes células inmunes en el sitio de inyección. Estas células secretan más citocinas y quimiocinas, y a su vez atraen a otras células inmunes. Todos estos eventos conducen a la formación de un entorno local inmunocompetente en el lugar de la inyección. (4) Las CPA reclutadas expresan varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR) tanto en la superficie (Receptores Tipo Toll [TLR], Receptor de Lectina Tipo C) como intracelularmente (Receptores Tipo NOD y receptores tipo RIG-U), que se reconocen y/o son activados por los adyuvantes. (5) Esto conduce a la maduración y activación de las CPA reclutadas. Las CPA maduras regulan la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y moléculas co-estimuladoras. (6) También se caracterizan por el aumento de la capacidad para procesar y presentar antígenos. (7) Las CPA maduras migran a los ganglios linfáticos para interactuar con células B y T. (8) Activan las células B secretoras de anticuerpos y/o respuestas de las células T citotóxicas CD8+.

Desafortunadamente, muchos de los adyuvantes más potentes provocan efectos secundarios considerables, tales como toxicidad e inflamación, por lo tanto, no se permiten para su uso en humanos. Por este motivo, se necesitan adyuvantes que sean efectivos y tolerados por los organismos (Lechner *et al.* 2002). En este sentido, ha surgido un interés en el uso de adyuvantes particulados o sistemas de entrega de antígenos como una alternativa a los adyuvantes inmunoestimuladores. Dentro de esta categoría se encuentran las emulsiones, complejos estimulantes del sistema inmune, liposomas, virosomas y partículas tipo virus. Gracias a que éstos tienen dimensiones comparables a los patógenos, el sistema inmune los reconoce con facilidad (Singh y O'Hagan 2002).

2.2 Partículas tipo virus (PTVs)

Las partículas tipo virus son sistemas de autoensamblaje que se forman espontáneamente tras la expresión de una o varias proteínas virales asemejando la forma original del virus, pero con ausencia de su genoma, por lo cual no pueden replicarse y no son infecciosas (Fig. 2) (Bachmann y Jennings 2010; Pokorski y Steinmetz 2011). Generalmente, tienen forma icosaédrica o filamentosa. Poseen las mismas propiedades inmunológicas de los virus, ya que conservan su estructura repetitiva, haciendo que induzcan a la inmunidad innata a través de la activación de receptores de patrones moleculares asociados a patógenos. Los genes que codifican las PTVs se han adquirido de fuentes diversas, incluyendo virus animales, virus que infectan plantas, bacteriófagos y levaduras. Estos genes pueden ser expresados de forma recombinante en una variedad de huéspedes, entre los que se encuentran bacterias, levaduras, plantas, insectos y células de mamífero (Jennings y Bachmann 2008).

Las PTVs combinan las ventajas de las vacunas basadas en virus atenuados y las vacunas de subunidades recombinantes en un solo sistema, ya que tienen la misma estructura que induce una alta respuesta inmune y, por la ausencia de genoma, no son infecciosas. Por lo tanto, se evitan los problemas de seguridad de las vacunas con virus atenuados relacionados con la reversión de mutantes y su aplicación en individuos inmunodeprimidos. Por otro lado, debido a su naturaleza, las PTVs se pueden producir a gran escala y a bajos costos (Bachmann y Jennings 2010).

Las PTVs muestran los antígenos de una manera ordenada y repetitiva y así inducen respuestas inmunes humorales rápidas. Por su naturaleza particulada y sus dimensiones las PTVs son reconocidas eficientemente por las células dendríticas (DCs) y de esta forma pueden ser transportadas a los ganglios linfáticos para su posterior presentación inducir una óptima respuesta inmune (Jennings y Bachmann 2008). La estructura repetitiva y cristalina de las PTVs es importante para la inducción de la respuesta inmune, ya que una proteína estructural por sí sola no es capaz de inducir una respuesta (Leclerc *et al.* 2007).

Las PTVs representan una plataforma segura de vacunación capaz de inducir fuertes respuestas de células T y B. Además de ser vacunas eficaces contra el virus correspondiente del que se derivan, también se pueden utilizar para presentar epítomos extraños al sistema inmunitario, lo cual se puede lograr mediante fusión genética o conjugación química (Jennings y Bachmann 2008; Noad y Roy 2003).

Recientemente, las PTVs han sido objeto de atención debido a su potencial como una nueva estrategia de vacunación. Se ha demostrado en numerosos trabajos que diferentes PTVs son eficientes como acarreadores de antígenos, capaces de inducir respuestas inmunes humorales. Por ejemplo, PTVs del virus de la influenza, papilomavirus y rotavirus indujeron altos títulos de anticuerpos neutralizadores. Además, algunas PTVs indujeron la producción de LTC (Lacasse *et al.* 2008). La activación fuerte de la respuesta inmune se debe a que los epítomos expuestos en la superficie viral están arreglados en una forma altamente repetitiva, de modo que son capaces de activar directamente a los receptores de células B, además de que favorecen una presentación cruzada hacia el complejo mayor de histocompatibilidad I, desencadenando una respuesta de linfocitos T citotóxicos (Jennings y Bachmann 2008).

A la fecha, las PTVs que se utilizan como vacunas se basan en el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (VHB) y la proteína de la cápside L1 del virus del papiloma humano (VPH) (Fig. 2) (Kalnciema *et al.* 2012). Por otro lado, se tiene menor grado de avance en PTVs formadas tras la expresión de PCs de virus vegetales, como el virus rayado fino del maíz (Hammond y Hammond 2010), el virus del mosaico de la papaya (PapMV) (Leclerc *et al.* 2007; Denis *et al.* 2007), el virus del mosaico del caupí (CPMV) (Saunders *et al.* 2009) y, de particular relevancia para el presente trabajo, algunos potyvirus, como el virus

del mosaico del zacate Johnson (Jagadish *et al.* 1991), el virus del mosaico estriado de la caña de azúcar (Hema *et al.* 2008) y el virus de la papa Y (PVY) (Kalnciema *et al.* 2012).

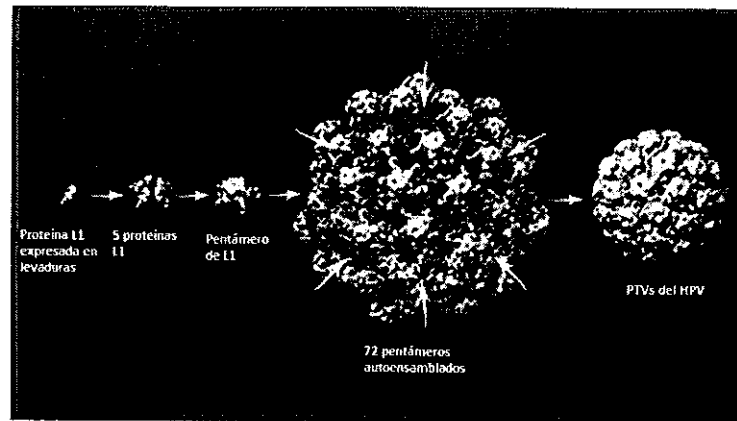


Figura 2. Formación de PTVs compuestas por la proteína de la cápside del virus del papiloma humano (VPH).

Dentro de los adyuvantes, las partículas virales y las PTVs pertenecen a la categoría de sistemas de entrega o presentadores de antígenos. A éstas se les puede fusionar un antígeno a su superficie, utilizándolas como una plataforma de presentación altamente inmunogénica (Noad y Roy 2003). Existen dos formas de adherir antígenos a la superficie de las partículas virales: mediante la generación de fusiones genéticas, que consisten en la adición de la secuencia codificante de un antígeno de interés a la secuencia codificante de la PTV o mediante conjugación química (Cantin *et al.* 2011). La fusión genética de epítomos extraños a la superficie de partículas virales (PV) o PTVs, es muy limitada en cuanto al tamaño de los epítomos a fusionar, ya que no se pueden fusionar secuencias de más de 30 aminoácidos sin comprometer la capacidad de la proteína de autoensamblarse en partículas (Chatterji *et al.* 2004).

2.3 Conjugación química

La conjugación química consiste en acoplar químicamente una proteína o un péptido por unión covalente en la superficie de una proteína viral por medio de un entrecruzador

químico (Fig. 3). En general, la reactividad química de las proteínas depende de las cadenas laterales de algunos aminoácidos y de sus extremos amino y carboxilo terminal (Farkaš y Bystrický 2010). Esta unión se lleva a cabo, por lo general, por la presencia de lisinas y cisteínas presentes en la superficie de las partículas (Cantín *et al.* 2011).

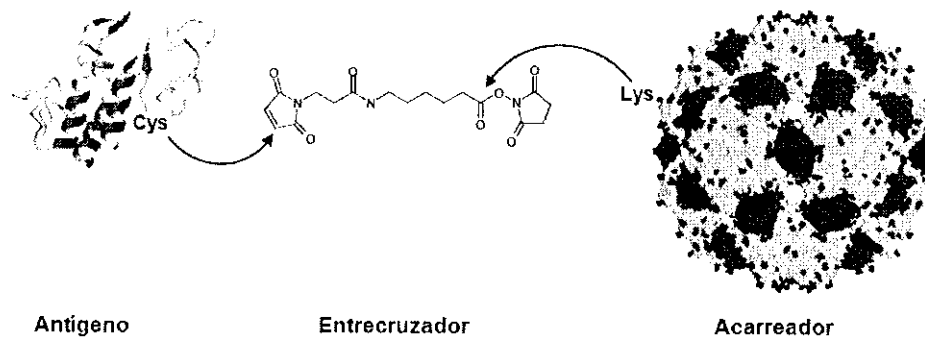


Figura 3. Conjugación química de un antígeno con un acarreador por medio de un entrecruzador. Los aminoácidos (cisteínas) presentes en el antígeno reaccionan con el grupo éster del entrecruzador, mientras que otro aminoácido (lisinas) presentes en el acarreador reaccionan con la maleimida del entrecruzador.

La conjugación química de antígenos a la superficie de PTVs o partículas virales, reduce las limitaciones para el tamaño y la naturaleza de los epítopos que se puedan unir a la superficie de éstas (Natilla y Hammond 2011).

2.4 Virus vegetales y partículas tipo virus como acarreadores de antígenos mediante conjugación química

Las partículas virales tienen una gran variedad de aplicaciones como biomateriales, vacunas, herramientas químicas y materiales electrónicos moleculares (Natilla y Hammond 2011). En el desarrollo de nuevos materiales para el uso en biomedicina, es fundamental entender las propiedades *in vivo* de éstos y sus posibles efectos tóxicos. Además, se ha demostrado que las PV y las PTVs tienen características favorables para su uso como adyuvantes en formulaciones vacunales (Bachmann y Jennings 2010). Entre los principales

avances tecnológicos en virología vegetal del siglo 21, se encuentra el uso de los virus quiméricos y de las PTVs como modelos biológicos, aplicados en biotecnología. Los virus de plantas son excelentes candidatos como nanomateriales, debido a que poseen una geometría bien organizada y definida, uniformidad de tamaño y una superficie bien definida con características que permiten la unión de otras moléculas (Natilla y Hammond 2011). Además, los virus que infectan a las plantas se consideran seguros, ya que los humanos no son hospederos naturales. Existen estudios que demuestran que virus que infectan plantas, como el CPMV, no causan síntomas de infección en ratones (Steinmetz 2010).

Los mecanismos que hacen a las PV al igual que las PTVs excelentes inmunógenos se debe a 4 características; su estructura altamente repetitiva y ordenada, su naturaleza particulada, su capacidad para inducir la inmunidad innata para el acondicionamiento apropiado de la respuesta inmune adaptativa y su capacidad para replicar que conduce a diferentes cinéticas y la distribución del virus durante la infección. Estas características se pueden aprovechar para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación (Jennings y Bachmann 2008).

Existe un interés creciente en la respuesta inmune inducida por virus que infectan a plantas, ya que éstos pueden ser utilizados como presentadores de antígenos para el desarrollo de vacunas (Florindo *et al.* 2002). Tanto los virus que infectan plantas como sus PTVs generadas de forma recombinante se pueden utilizar como portadores de secuencias extrañas a éstos para exponer epítomos inmunológicos de un patógeno de interés (Kalnciema *et al.* 2012). En años recientes, el uso de PTVs de virus que infectan plantas como acarreadores de antígenos para el desarrollo de nuevos modelos de vacunas ha provocado un interés creciente. Ya sea por modificación genética o conjugación química, a éstos se les puede unir un epítomo extraño, estando este último expuesto en la superficie de la partícula (Lacasse *et al.* 2008).

El CPMV es el más estudiado y utilizado como acarreador de antígenos, además de sus otros usos en el campo de la biotecnología (Sainsbury *et al.* 2010). Se le insertó al CPMV un epítomo del rinovirus humano, lo cual no afectó su estructura (Lin *et al.* 1996). En otro estudio, se le fusionó genéticamente un péptido del virus del parvovirus canino (PVC), se inmunizaron ratones con este virus recombinante y se comprobó que los niveles de

anticuerpos totales en contra de PVC fueron más altos en comparación con ratones inmunizados con el péptido solo (Nicholas *et al.* 2002). Otro trabajo propuso al CPMV como un candidato a acarreador de antígenos para el tratamiento de tumores (Miermont *et al.* 2008).

Se ha demostrado que las cápsides de virus vegetales libres de genoma que se expresan en distintos sistemas de forma recombinante, son igual de eficaces que sus contrapartes infecciosas como acarreadoras de antígenos al sistema inmune (Saunders *et al.* 2009). A PTVs del PapMV expresadas en *Escherichia coli* a las cuales se les unió un epítipo del virus de la hepatitis C humana (VHC), indujeron una alta producción de anticuerpos específicos en contra de VHC en ratones inmunizados (Denis *et al.* 2007). Se ha demostrado también que PTVs del PapMV son capaces de inducir LTC, presentando directamente el epítipo al MHC-1 (Leclerc *et al.* 2007). En otro estudio, se utilizaron PTVs del PapMV como adyuvantes en una vacuna comercial de la influenza estacional, que está compuesta principalmente por la hemaglutinina (HA) del virus y la proteína de la nucleocápside (NP), donde se prepararon dos mezclas usando la misma vacuna, una con 30 μ g de PTVs y otra con 3 μ g de PTVs. Se demostró que el suero de ratones inmunizados con las mezclas presentó altos niveles de anticuerpos en contra de la HA y NP en comparación a la vacuna sola; además la respuesta fue dosis dependiente, ya que fue mayor en el tratamiento que contenía 30 μ g de PTVs. Por último, la mezcla fue capaz de proteger ante diferentes cepas del virus de la influenza (Savard *et al.* 2011). A la PC del virus del mosaico de la alfalfa se le fusionó genéticamente un epítipo del virus de la rabia y se produjeron PTVs en *Nicotiana benthamiana*, con las cuales se inmunizaron ratones y se demostró que indujeron altos niveles de anticuerpos específicos; así mismo, se demostró que hubo una producción de IgG e IgA en ratones alimentados con extractos de la planta productora de las PTVs (Modelska *et al.* 1998).

Al virus de la papa X (PVX) que pertenece al género de los potexvirus, se le fusionó genéticamente el epítipo R9 del VHC en el extremo 5' de la PC, este virus quimérico fue inmunizado en ratones y se demostró que fue capaz de inducir altos títulos de anticuerpos anti-R9 específicos con reacción cruzada a muchos aislados de VHC naturales (Uhde-Holzem *et al.* 2010).

Las propiedades inmunológicas de un epítipo o antígeno presentados en una PTV mediante fusión genética, dependen mucho de la posición de su fusión en la molécula acarreadora (Taylor *et al.* 2000), lo cual podría representar una desventaja. Además, una limitación importante de la fusión genética es el tamaño de la secuencia del epítipo a fusionar, el cual no excede, salvo una excepción, los 20 aminoácidos, ya que secuencias mayores afectan la formación de las PTVs, lo cual es fundamental para obtener una óptima respuesta inmune (Manuel-Cabrera *et al.* 2012). La conjugación química no presenta, en esencia, los problemas asociados a la estrategia de fusión traduccional.

Si bien, se tienen varios modelos de acarreadores de antígenos basados en virus vegetales, son pocos los trabajos en los que se emplea la conjugación química. El CPMV, de forma icosaédrica, fue el primero en que se demostró que se podían conjugar químicamente una diversidad de moléculas para distintas aplicaciones, desde moléculas pequeñas como colorantes fluorescentes hasta partículas grandes como puntos cuánticos (Chatterji *et al.* 2002). En otro estudio, se modificó la PC del CPMV, con la finalidad de conjugarle un dominio rico en lisinas de la proteína internalina B de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* de un tamaño aproximado de 22 kDa, a través del entrecruzador homobifuncional bismaleimida tetraetilenglicol [(BM(PEO)₄], además de la lisozima del bacteriófago T4 por medio del entrecruzador heterobifuncional sulfo-succinimidil 4-(N-maleimido-metil) ciclohexano-1- carboxilato (sulfo-SMCC) sin afectar la estructura del virus (A. Chatterji *et al.* 2004). Adicionalmente, se conjugaron al mismo virus carbohidratos que son constantemente producidos en tumores (Miermont *et al.* 2008).

Se ha descrito también la conjugación química de moléculas a la superficie de otros virus vegetales. Al virus del mosaico amarillo del nabo, un virus esférico, se le modificó químicamente el extremo amino para insertarle lisinas reactivas, con la intención de conjugarle químicamente diferentes materiales (Barnhill *et al.* 2007). Al virus del mosaico del tabaco (TMV), que es un virus filamentoso, se le modificó el extremo amino de la PC con la intención de insertarle lisinas en su superficie para facilitar la conjugación química. Se conjugó un complejo de proteína verde fluorescente (GFP) unida a la proteína L2 del virus del papiloma oral canino (COPV) al extremo amino modificado del TMV, se inmunizaron ratones y se demostró que el suero de ratones inmunizados con el virus

quimérico tenía altos niveles de anticuerpos específicos en contra de COPV (Smith *et al.* 2006). Por otro lado, se logró conjugar químicamente el antígeno M2E de la influenza en la superficie de PTVs del virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), utilizando tres versiones distintas de la proteína de la cápside: la proteína nativa y dos mutantes de la misma que presentan cisteínas en la superficie de las PTVs (Cantín *et al.* 2011).

2.5 Los Potyvirus y el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV)

El género Potyvirus pertenece a la familia Potyviridae, la cual es la de mayor número de virus que infectan plantas. Los virus de este género son filamentosos, flexibles y se caracterizan por tener forma de varilla, con un tamaño de 650 a 900 nm de longitud y de 11 a 13 nm de ancho. Su genoma es ARN de cadena sencilla positiva con un tamaño aproximado de 9 a 10 kb, asociado a una proteína unida covalentemente en su extremo 5' y poliadenilado en su extremo 3'. El genoma codifica para una poliproteína precursora de 350 kDa, que es subsecuentemente procesada en siete proteínas: componente asistente (P1), de inclusión cilíndrica (P3), de inclusión nuclear A (NIa), de inclusión nuclear B (NIb), proteína de la cápside (CP) y dos proteínas putativas conocidas como 6K1 y 6K2 (Fig. 4). La PC de los potyvirus (Fig. 5) se divide en tres dominios principales: N-terminal variable y C-terminal, expuestos al exterior del virión. El dominio N-terminal, aunque no está conectado directamente con la estructura del virión, es necesario para la transmisión de los potyvirus por insectos vectores; además, es el que contiene más epítomos específicos al virus (Gutiérrez y Bastos-Aristizábal 2011). La cápside está compuesta por aproximadamente 2000 subunidades de la PC (Shukla *et al.* 1988). La función principal de la PC de los potyvirus es la de envolver y proteger su ARN (Hema *et al.* 2008).

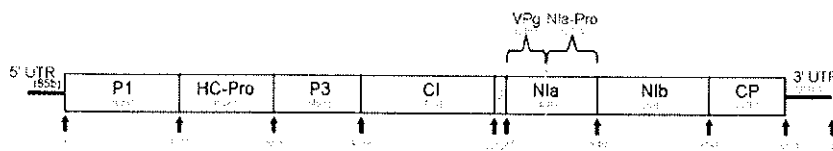


Figura 4. Organización genómica de un potyvirus (PRSV) (Gonsalves *et al.* 2010).

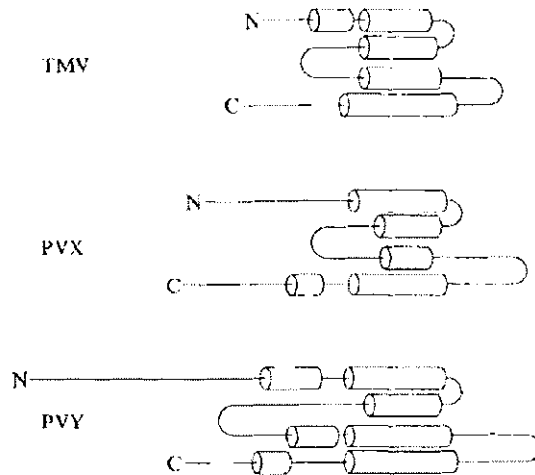


Figura 5. Esquema de las diferentes subunidades de la estructura secundaria de la PC del TMV, PVX y PVY (Shukla *et al.* 1988).

Se ha reportado el uso de algunos miembros del género Potyvirus como acarreadores de antígenos para el potencial desarrollo de vacunas. A PTVs del virus Y de la papa (PVY) expresadas en *E. coli* se les fusionó genéticamente el epítipo PreS1 del VHB en el extremo amino de la PC, añadiendo la secuencia espaciadora (G₄S)₃ entre la secuencia de la PC y el epítipo. Se midieron los niveles de IgG específicos contra VHB en el suero de ratones inmunizados con estas PTVs, los cuales fueron significativamente más altos en comparación con los niveles de IgG en ratones inmunizados sólo con el epítipo PreS1 (Kalnciema *et al.* 2012). En otro trabajo, se fusionó el péptido VP2 del VPC en el extremo amino de la PC del virus de la enfermedad de la Sharka o virus eruptivo de la ciruela (PPV), obteniéndose altos niveles de anticuerpos específicos a partir de la segunda dosis en suero de conejos inmunizados; estas PTVs quiméricas mostraron también actividad neutralizante en contra del VPC (Fernández *et al.* 1998). En otro estudio, perteneciente al mismo grupo de trabajo, se fusionó genéticamente la proteína estructural VP60 del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) a la PC del PPV sin afectar la estructura del virus; se inmunizaron conejos con el virus quimérico, el cual fue capaz de inducir altos niveles de anticuerpos específicos a RHDV, además de que fue capaz de dar protección a los conejos en contra de la enfermedad (Fernández *et al.* 2001). Asimismo, se siguieron dos estrategias de vacunación para el tratamiento de cáncer de cuello uterino basadas en PTVs

del virus de la papa A (PVA) fusionadas genéticamente a la oncoproteína E7 del VPH. En la primera, se insertó la proteína E7 al extremo amino de la PC del PVA y en la segunda se suprimieron los últimos cinco aminoácidos del extremo carboxilo de la PC y se insertó la secuencia de E7. Ambas construcciones indujeron respuestas más fuertes de LTC en comparación a la respuesta inducida por E7 *per se*. Más aún, proveyeron protección ante el desarrollo de tumores en un modelo de ratones inmunizados (Pokorna *et al.* 2005).

El virus de la mancha anular de la papaya es un miembro del género Potyvirus y es la causa de una enfermedad que afecta a los cultivos de papaya y cucurbitáceas alrededor del mundo. El PRSV se divide en dos tipos, el P, que infecta a los cultivos de papaya y cucurbitáceas y el W, que infecta sólo a los cultivos de cucurbitáceas. Los dos tipos son serológicamente indistinguibles y son transmitidos mayormente por diferentes especies de áfidos. La infección por PRSV se caracteriza típicamente por la aparición de una mancha anular en la fruta de los árboles de papaya infectados (Fig. 6). Como miembro de este género, el PRSV es un virus filamentosos flexible, sin envoltura y consta de una sola cadena positiva sencilla de ARN, cubierta por un solo tipo de proteína. El genoma consiste en 10,326 nucleótidos seguidos por una extensión de secuencia denominada poliA (Tripathi *et al.* 2008). Su tamaño es de 780nm de largo y 12nm de ancho (Yeh *et al.* 1992). Se ha reportado previamente que el extremo amino de la PC de los aislados virales del PRSV hasta ahora analizados contiene un gran número de repetidos lisina-KE (Fig. 7) (Silva-Rosales *et al.* 2000). Por otra parte, se ha demostrado que el extremo amino de otro potyvirus, el PPV, es la región más inmunogénica, por lo tanto es la más efectiva para inducir anticuerpos específicos de cualquier epítipo que esté unido en esta región (Fernández *et al.* 2002).

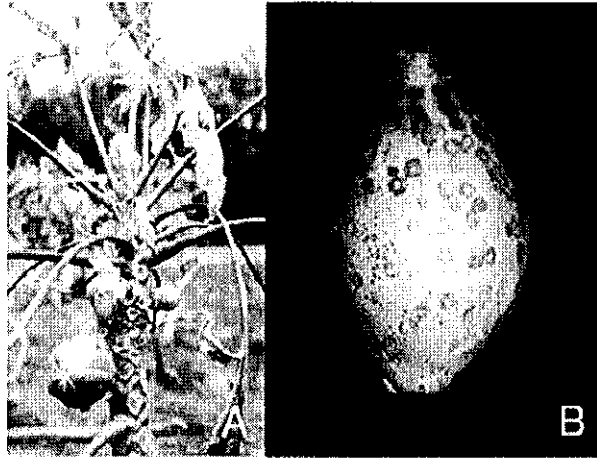


Figura 6. Síntomas del PRSV (Tripathi *et al.* 2008). Árbol de papaya infectado con PRSV (A). Patrón anillado característico en frutos de papaya (B).

En un estudio se demostró que el extremo amino de otro miembro de los potyvirus, el virus del jaspeado del tabaco (TEV), está expuesto en su superficie, además de que tiene lisinas reactivas, lo cual lo hace un excelente candidato para conjugarle químicamente un antígeno, sin necesidad de modificarlo genéticamente (Manuel-Cabrera *et al.* 2012). Al igual que otros virus filamentosos, la estructura del PRSV aún no se ha determinado, lo cual hace difícil saber qué regiones del virus se encuentran en su superficie. Sin embargo, experimentos *in vitro* con otros potyvirus nativos han demostrado que los extremos amino y carboxilo terminal de la PC se pueden quitar por medio de un tratamiento con tripsina sin influir en la estructura del virión y la infectividad, lo que sugiere que ambos extremos están expuestos en su superficie (Shukla *et al.* 1988).

NH- SKNEAVDAGLNEKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKDDASDGNDESTST
 KTGETDRDVENVGTSGTFTVPRIKSFTDKMILPRIKGTKVNLNLHLLQYN
 PQQIDISNTRATQSQFEKWYEGVRNDYGLNDNEMQVMLNGLMIG
 WCIENGTSPDISGVWVMMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQIMAHF
 SNAAEAYIAKRNATERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEVNSKTPD
 RAREAHMQMKAAALRNTNRRMFGMDGSVSNKEENTERHTVEDV
 NRDMHSLGMRN **-COOH**

Figura 7. Secuencia de aminoácidos de la PC del PRSV. Hacia el extremo amino (NH) se encuentran lisinas (K) reactivas expuestas en la superficie del virus, las cuales son candidatas a conjugación química

Existe un trabajo en el que se ha usado la PC del PRSV como acarreadora de antígenos mediante la estrategia de fusión genética. En dicho trabajo, se expresó la PC del PRSV en *E. coli*, fusionándole un péptido de la proteína estructural VP2 del parvovirus canino en el extremo carboxilo, en el extremo amino, en ambos extremos, o bien, substituyendo el extremo amino por la secuencia del péptido. Se encontró que la unión del péptido con el extremo carboxilo indujo una mayor proliferación de anticuerpos específicos en contra del parvovirus canino (Chatchen *et al.* 2006).

3. Justificación

En los últimos años, el interés en las investigaciones en modelos de vacuna-adyuvante utilizando partículas tipo virus se ha incrementado, principalmente por la inmunogenicidad que confieren éstas a los antígenos. De acuerdo al análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína de la cápside en varios aislados del virus de la mancha anular de la papaya, se ha determinado que es altamente probable que esta cápside viral contenga lisinas reactivas en su superficie, que son susceptibles a conjugación química para la presentación de antígenos. Sólo existe un trabajo relacionado con la expresión de la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya en *Escherichia coli* y su uso como acarreador de un epítipo mediante fusión genética, sin embargo, en dicho trabajo no se demostró la formación de partículas tipo virus. Más aun, no se ha explorado la posibilidad de conjugar secuencias aminoacídicas más grandes a la proteína de la cápside mediante conjugación química.

4. Hipótesis

La proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya expresada en *Escherichia coli* se ensambla en partículas tipo virus y se une a antígenos mediante conjugación química, induciendo una producción alta de anticuerpos antígeno-específica al administrarse en ratones BALB/c.

5. Objetivo general

Evaluar la actividad adyuvante de la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya expresada en forma recombinante al conjugarle un antígeno químicamente.

5.1 Objetivos particulares

1. Expresar y purificar la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya a partir de una cepa de *Escherichia coli* transformada con un plásmido que expresa su secuencia codificante.
2. Demostrar la formación de partículas tipo virus constituidas por la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya.
3. Determinar la disponibilidad de lisinas reactivas para conjugación química en la superficie de las partículas tipo virus formadas por la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya.
4. Conjugar químicamente una proteína modelo a la superficie de las partículas tipo virus formadas por la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya.
5. Medir el título de anticuerpos antígeno-específicos, en ratones BALB/c inmunizados con el conjugado proteico.

6. Materiales y métodos

6.1 Secuencia del gen de la proteína de la cápside del PRSV

En un trabajo previo (Palomino 2010), se insertó la secuencia del gen de la proteína de la cápside del PRSV en el plásmido pET-28a(+) (Novagen). En el presente trabajo se analizó este plásmido para confirmar la presencia del gen de la PC del PRSV mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos para el gen. Los iniciadores fueron diseñados mediante el software CLC Main Workbench 5.5, mientras que las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 95°C/5 minutos (m), 5 ciclos de 95°C/ 30 s, 58°C/30 s, 72°C/40 s, 40 ciclos de 95°C/30 s, 60°C/30 s, 72°C/40 s, 1 ciclo de 72°C/ 7 m,

4°C/∞. El producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y como marcador de peso molecular (MPM) se utilizó el marcador 1kb PLUS (Invitrogen). Una vez confirmada la presencia del gen, el plásmido fue extraído de la cepa de *E. coli* TOP10 no expresante, mediante el kit Gene Jet Plasmid Miniprep (Fermentas), siguiendo las instrucciones del proveedor. Después, se transformó la cepa de *E. coli* One Shot® BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen), con el plásmido, siguiendo las instrucciones del proveedor.

6.2 Expresión y purificación de la proteína de la cápside del PRSV

Se tomó una colonia fresca (no más de una semana de haberse sembrado) de la cepa de *E. coli* PRSVcp-pET28 en medio Luria-Bertani (LB) semisólido con 50 µg/mL de kanamicina y se inoculó en 3 mL de medio de cultivo LB líquido y se incubó en un agitador durante la noche a una temperatura de 37°C a 250 rpm. Se agregó 200 µL del preinóculo para generar dos cultivos de 5 mL de medio LB (50 µg/mL de kanamicina) en tubos tipo Falcón de polipropileno de 50 mL. Los inóculos se dejaron incubando por 4 horas (h) a 37°C a 250 rpm, hasta obtener una D.O. de 0.8 a 1.0 a 600 nm. Una vez obtenida la absorbancia indicada, se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Promega) a una concentración final de 1 mM a uno de los dos tubos con 5 mL de cultivo (control positivo) y se incubaron ambos tubos en un agitador por 4 h a 37°C y 250 rpm. Pasado el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó (4,470 g, 15 m a 4°C) para obtener el paquete celular. El paquete se resuspendió (v/v) en amortiguador PBS (10 mM fosfatos, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl a un pH de 7.4; Sigma) suplementado con inhibidor de proteasas Complete EDTA-free (Roche) al 1X y Tritón X-100 al 0.1%. Una vez resuspendido el paquete, se lisaron las células mediante sonicación por 10 ocasiones en intervalos de 10 segundos (s) con el sonicador XL-2000 (Misonix). El producto de lisado se analizó mediante electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie, así como por ensayo de inmunodetección en placa tipo ELISA con el kit PSA 53500/0288 específico para el PRSV (Agdia).

Una vez que se confirmó la expresión de la PC del PRSV, los productos de lisado (inducido y no inducido) fueron separados en fracción soluble e insoluble por medio de centrifugación (4,470 g por 15 m a 4°C). Las dos fracciones fueron analizadas mediante

electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 12% y ensayo western blot (WB) anti-PRSV.

A continuación se describe el ensayo WB anti-PRSV. Las dos fracciones fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare). La membrana se incubó 4 h en agitación constante a temperatura ambiente (TA) con amortiguador de bloqueo [TBS (100mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.4) suplementado con leche en polvo descremada al 5% y Tween-20 al 0.05%]. Posteriormente, la membrana se lavó 5 veces con amortiguador de lavado (TBS con Tween-20 al 0.1%). La membrana se dejó incubando con el anticuerpo anti-PRSV Alk Phos Enzyme Conjugate SRA 53500/0096 (Agdia) diluido 1/100 en amortiguador de bloqueo, durante 4 h en agitación constante a TA. Después de la incubación, se lavó 5 veces con amortiguador de lavado. La membrana se reveló con el sistema de sustrato líquido 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) y nitroazul de tetrazolio (NBT) de Sigma.

Para favorecer la expresión de la PC del PRSV en la fracción soluble, se realizó la inducción a diferentes condiciones de temperatura, concentración de IPTG y tiempo de inducción. Se evaluaron tres temperaturas: 23, 30 y 37°C, así como dos concentraciones de IPTG: 0.5 mM y 1 mM. Se tomaron muestras celulares a los tiempos 1, 2, 3 y 4 h post-inducción. Para todas las inducciones, se partió de una colonia fresca de la cepa de *E. coli* PRSVcp-pET28 inoculada en LB semisólido con 50 µg/mL de kanamicina, la cual se inoculó en 3 mL de LB líquido con 50 µg/mL de kanamicina para preparar el preinóculo y de éste se tomaron 600 µL para generar un cultivo de 30 mL, el cual fue dividido en tres cultivos (10 mL c/u) para evaluar la expresión a las concentraciones 0.5 y 1 mM de IPTG y contar con un control negativo no inducido. Se obtuvo solamente la fracción soluble de las inducciones y se cuantificó la concentración de proteína total por el método de Bradford. Todas las fracciones se analizaron mediante electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 12%, cargando 9.8 µg de proteína por carril. Además, se analizaron las fracciones mediante ensayo ELISA.

Una vez que se obtuvo la PC del PRSV en la fracción soluble, se hizo una inducción en un volumen mayor de cultivo para su posterior purificación. Para esto, se preparó un inóculo de 3 mL y se incubó toda la noche a 37°C y 250 rpm. Se agregó 2mL del preinóculo a 250

mL de LB en un matraz Erlenmeyer estéril de 1 L de capacidad. El inóculo se dejó incubando por 4 h a 37°C y 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. Una vez obtenida la absorbancia indicada, se agregó IPTG en una concentración final de 1 mM y se dejó incubando 4 h a 30°C y 250 rpm. Pasado el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó a 4,470 g por 15 m para obtener el paquete celular. El paquete se resuspendió en 25 mL de amortiguador de lisis y unión (Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM e inhibidor de proteasas complete EDTA- free al 1X, pH 7.2) y se lisaron las células mediante sonicación por 10 ocasiones en intervalos de 10 s. El producto del lisado se centrifugó a 4470 g por 15 m, recuperando 25 mL de la fracción soluble. La confirmación de la expresión se analizó SDS-PAGE.

La PC del PRSV se purificó mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare). Los 25 mL de fracción soluble se pasaron a través de la columna por medio de jeringa; después, la columna se lavó con 30 mL de amortiguador de lavado (Tris-HCl 10mM, NaCl 300mM, imidazol 40mM, pH 7.2), y se eluyó la proteína con 8 mL de amortiguador de elución (Tris-HCl 10mM, NaCl 300mM, imidazol 500mM, pH 7.2). En el paso de elución se colectaron 12 fracciones de 500µL; además, se colectaron muestras del volumen no retenido y de lavado para su posterior análisis por medio de SDS-PAGE.

6.3 Determinación de la formación de partículas tipo virus

Para determinar la formación de las PTVs, se analizó una muestra de purificado, la cual estaba en amortiguador de elución (Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM a un pH 7.2). La muestra se analizó en un microscopio de transmisión electrónica Philips Morgagni 208. Se hizo una mezcla con 6 µL de muestra más 6 µL de ácido fosfotúngstico (6% pH 6.8) y de ésta se tomaron 3 µL para colocarlos en una celda Formvar film 300 Square Mesh Copper (Electron Microscopy Sciences). La muestra se observó en el microscopio con un aumento de 56KX.

6.4 Determinación de la disponibilidad de lisinas reactivas para conjugación química en la superficie de las partículas tipo virus

Para los ensayos de determinación de lisinas reactivas y de conjugación, fue necesario un cambio de amortiguador a las PTVs purificadas. Las fracciones positivas obtenidas en la purificación se dializaron con PBS suplementado con EDTA (10 mM) por 12 h en membrana de celulosa D9777-100FT (Sigma-Aldrich). Al producto de diálisis se le agregó PEG 8000 al 4% y se dejó incubando en agitación constante por 1 h a 4°C; transcurrido el tiempo, se dejó incubando 1 h a TA. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 7,800 g por 30 m, el precipitado se resuspendió en PBS suplementado con EDTAv/v. El producto de la precipitación fue concentrado mediante las unidades de centrifugación Amicon Ultra-4 30K (Merck-Millipore) siguiendo las instrucciones del proveedor y al final se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford.

Para determinar las lisinas reactivas en la superficie de las PTVs, se utilizó el reactivo EZ-link Sulfo-Hidroxisuccinimidil (NHS)-biotina [Sulfo-NHS-biotina] (Pierce). Se agregaron 100 excesos molares del reactivo a una muestra de purificado de PTVs a una concentración de 0.31 mg/mL y se dejó incubando por 10 m a TA. Se analizó la conjugación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y WB anti-biotina.

El ensayo WB-anti-biotina se realizó siguiendo el procedimiento que se describe a continuación. La muestra incubada con el reactivo Sulfo-NHS-biotina fue separada mediante SDS-PAGE e inmovilizada a membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare). La membrana se incubó 1 h en agitación constante a TA con amortiguador de bloqueo (PBS, Tween-20 al 0.05% y leche descremada en polvo al 5%). Posteriormente, se lavó 5 veces con PBS-Tween-20 al 0.1%. Después del lavado, se incubó la membrana con estreptavidina-peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich) diluida 1:1,000 en amortiguador PBS Tween-20 al .05% y albúmina sérica bovina al 2.5%, por 2 h a TA con agitación orbital suave. Se repitieron los lavados y finalmente la membrana fue revelada en una solución colorimétrica de sustratos para HRP (BioRad) incubándola por 5 m, agregando primero solución A (5 mg de HRP diluido en 1.5 mL de metanol frío) e inmediatamente se le añadió la solución B (8.333 mL de PBS más 10 μ L de peróxido de hidrógeno).

6.5 Conjugación química de la proteína verde fluorescente a la superficie de las partículas tipo virus

Se realizó un ensayo de conjugación de las PTVs del PRSV a la proteína verde fluorescente expresada en *E. coli*, también generada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ).

Se realizó la conjugación entre GFP y las PTVs mediante el entrecruzador químico Sulfo-m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide-ester (MBS) [Sulfo-MBS] (Pierce Thermo Scientific). Previo a la conjugación, los grupos sulfhidrilo de las PTVs fueron bloqueados con el reactivo *N*-Ethylmaleimide (NEM) (Pierce Thermo Scientific) y los grupos amino de la GFP fueron bloqueados con Sulfo-*N*-hydroxysulfosuccinimide (NHS)-Acetate [SNA] (Pierce Thermo Scientific). El bloqueo de los grupos sulfhidrilo de las PTVs se realizó de la siguiente manera. A 100 μ L de PTVs purificadas con una concentración de 1.26 mg/mL se le agregaron 5 excesos molares de NEM y la reacción se dejó incubando por 1 h a TA. Posterior a la reacción de bloqueo, se eliminaron los excesos de NEM mediante las unidades de filtración Amicon Ultra-0.5 30K (Merck-Millipore), siguiendo las instrucciones del proveedor. Por otro lado, los grupos amino de la GFP fueron bloqueados con la siguiente metodología. A 100 μ L de muestra de GFP purificada en amortiguador PBS suplementado con EDTA (10mM) con una concentración de 0.67 mg/mL, se le agregaron 25 excesos molares de SNA y la reacción se dejó incubando por 1 h a TA. Posteriormente, se eliminaron los excesos de SNA mediante las unidades de filtración Amicon Ultra-0.5 10K (Merck-Millipore), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Una vez que se bloquearon los grupos sulfhidrilo de las PTVs y los grupos amino de GFP, se condujo la reacción de conjugación. Se llevaron a cabo cuatro reacciones de conjugación utilizando 20, 40, 80 y 160 excesos molares de Sulfo-MBS con respecto a las PTVs. Para cada reacción de conjugación se tomaron 20 μ L de la reacción PTVs-NEM y 20 μ L de GFP-SNA con una concentración final de 0.63 mg/mL de PTVs y 0.335 mg/mL de GFP. Se agregaron los excesos molares correspondientes de Sulfo-MBS y se dejaron incubando durante la noche a 4°C. Los conjugados fueron analizados mediante electroforesis y WB anti-His tag (Fig. 8).

Para analizar la conjugación de la GFP, se realizó un ensayo WB anti-His tag, que detecta a la GFP etiquetada con seis histidinas. Se procedió del mismo modo que el WB anti-biotina en los primeros pasos. Después del bloqueo, la membrana se dejó incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo Anti-His6 (Roche) diluido a una concentración de 0.5 µg/mL en amortiguador de bloqueo. Al siguiente día, la membrana se colocó en agitación constante a TA durante 1 h. Posteriormente, se hicieron 5 lavados con PBS-Tween-20 al 0.1%. Se agregó el segundo anticuerpo Donkey Anti-Mouse IgG HRP Affinity Purified PAb (R&D Systems) diluido 1:1,000 en PBS, con Tween-20 al 0.05% y leche descremada en polvo al 2.5% y se dejó incubando en agitación constante 3 h a TA. Se repitieron los lavados y se reveló la membrana como se describió anteriormente.

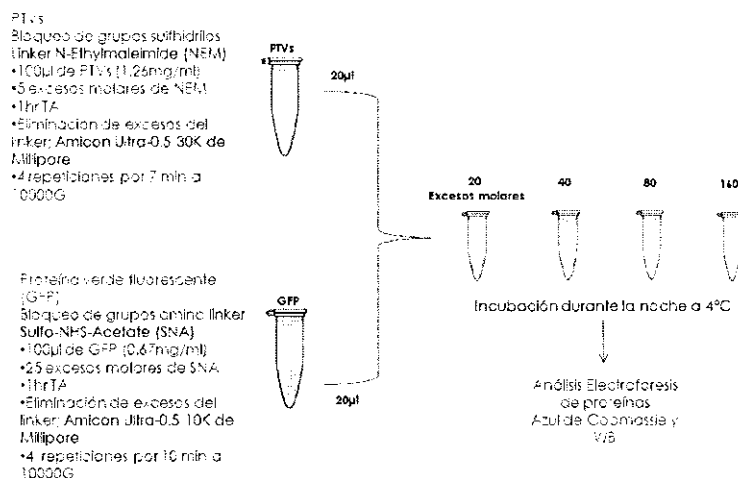


Figura 8. Esquema de conjugación. Se realizaron reacciones de conjugación utilizando 20, 40, 80 y 160 excesos molares de Sulfo-MBS con respecto a las PTVs. Para cada reacción se tomaron 20 µL de la reacción PTVs-NEM y 20 µL de GFP-SNA. Se agregaron los excesos molares correspondientes de Sulfo-MBS y se dejaron incubando durante la noche a 4°C.

6.6 Medición de anticuerpos antígeno-específicos en ratones BALB/c inmunizados

Para los ensayos de inmunización se utilizaron 22 ratones hembra BALB/c de 5 semanas de edad, las cuales fueron mantenidas en condiciones libres de patógenos en el Laboratorio de

Experimentación Animal de CIATEJ. Se conformaron 5 grupos de 4 ratones (Fig. 6) cada uno y un grupo de 2 ratones como control negativo. El grupo 1 (G1) fue inmunizado con 10 μ g de GFP, el grupo 2 (G2) con 10 μ g de PRSV, el grupo 3 (G3) con una mezcla de 10 μ g de GFP y adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) con un refuerzo de 10 μ g de GFP y adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich), el grupo 4 (G4) con una mezcla de 10 μ g de GFP y 10 μ g de PRSV, el grupo 5 (G5) con una mezcla de 10 μ g de GFP y 1 μ g de PRSV y el grupo 6 (G6) con amortiguador de fosfatos (Fosfato de Sodio 10 mM, NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, pH 7.2) como control negativo.

Se obtuvo el suero preinmune antes de la primera inmunización. La primera inmunización se realizó el día 1, inoculando a los ratones por vía subcutánea 100 μ L de volumen de las respectivas mezclas. Al día 14 se obtuvo el suero inmune. La segunda inmunización se realizó al día 15 y al día 30 se obtuvo el segundo suero inmune (Fig. 9).

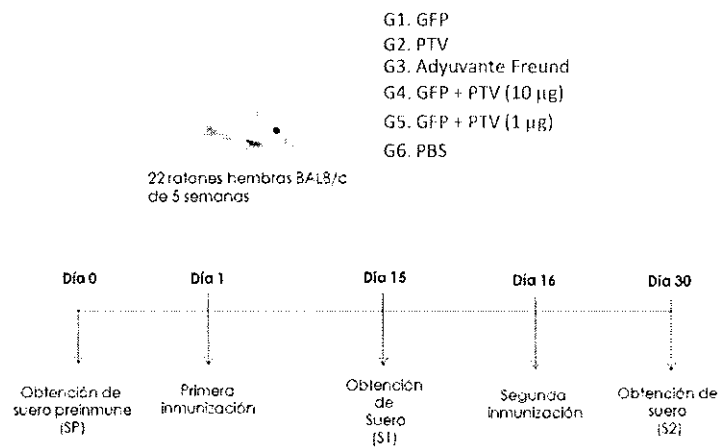


Figura 9. Esquema de inmunización. Los tratamientos a evaluar incluyeron: el grupo 1 (G1) inmunizado con 10 μ g de GFP, el grupo 2 (G2) con 10 μ g de PTV-PRSV, el grupo 3 (G3) con una mezcla de 10 μ g de GFP y adyuvante de Freund, el grupo 4 (G4) con una mezcla de 10 μ g de GFP y 10 μ g de PTV-PRSV, el grupo 5 (G5) con una mezcla de 10 μ g de GFP y 1 μ g de PTV-PRSV y el grupo 6 (G6) con PBS como control negativo. La primera inmunización se realizó el día 1, inoculando por vía subcutánea 100 μ L de volumen de las respectivas mezclas. La segunda inmunización se realizó al día 15.

Los ratones fueron sangrados por la cola obteniendo 250 μ L de sangre. Para obtener los sueros, la sangre se dejó incubando 1 h a 37°C y posteriormente se incubó 2 h a 4°C. Después de esta incubación, se centrifugó a 10,000 g por 10 m y se colectó el suero, que se almacenó a -80°C para su posterior análisis mediante ELISA.

Para la determinación de anticuerpos específicos a GFP se analizaron los tres sueros de los 6 diferentes grupos de ratones; el suero preinmune (SP), primer suero inmune (S1) y el segundo suero inmune (S2). Se hicieron mezclas de los sueros (pool) de los diferentes ratones para cada grupo. Además, se hicieron tres diluciones de las mezclas: 1:1000, 1:10,000 y 1:100,000 por duplicado, en amortiguador de fosfatos.

Se realizó el ensayo ELISA para medir los niveles relativos de anticuerpos específicos a GFP, utilizando la siguiente metodología. Se sensibilizó una placa de 96 pozos con 1 μ g de GFP/pozo. La GFP se diluyó en amortiguador de Carbonato (Carbonatos 10 mM, pH 9.6) y se incubó en la placa toda la noche a una temperatura de 4°C. Después de la incubación, la placa se lavó 5 veces con el amortiguador de lavado (PBS-Tween al 0.1%). Se agregaron 100 μ L de las diferentes muestras de las diluciones de los sueros; 1:1,000, 1:10,000 y 1:100,000 (diluidas en PBS-Tween al 0.05% con leche descremada en polvo al 5%) en los pozos correspondientes y se incubó la placa a 4°C toda la noche. Se lavó la placa 5 veces y se agregaron 100 μ L de anticuerpo Donkey Anti-Mouse IgG HRP Affinity Purified PAb (R&D Systems) en una dilución 1:1,000 en PBS, Tween-20 al 0.05% y leche descremada en polvo al 2.5% y incubó con agitación constante por 4 h a TA. Se lavó de nuevo la placa 5 veces y para el revelado se agregaron 150 μ L del substrato 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich), deteniendo la reacción después de 10 m mediante la adición de 150 μ L de ácido sulfúrico 1 N. Se midió la absorbancia a 450 nm. Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de ANOVA (análisis de varianza), seguido de una comparación por pares con la prueba de Tukey-Kramer utilizando el paquete estadístico JMP3.2 (SAS Institute).

7. Resultados y Discusión

7.1 Confirmación de la presencia del gen de la proteína de la cápside del PRSV en el plásmido de expresión

Los iniciadores específicos para la PC del PRSV que fueron utilizados para verificar su presencia en el plásmido pET28a(+) se describen a continuación. El iniciador PRSV-forward (TTTGGTCTCAAGGTATGGGAAATGAAGCTGTGGATGC) tiene una temperatura de alineamiento (t_m) de 58.33°C. El iniciador PRSV-reverse (TTTGGTCTCTAAGCTCAGTTGCGCTTACCCAGGA) tiene una t_m de 58.49°C. Se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con SYBR Safe la presencia de amplificación del gen de la PC del PRSV, mediante la presencia de un producto de 864 pb (Fig. 10) segmento que está presente en la construcción genética. En el gel de agarosa se pudo observar una banda de aproximadamente 900 pb, la cual corresponde a la CP del PRSV.

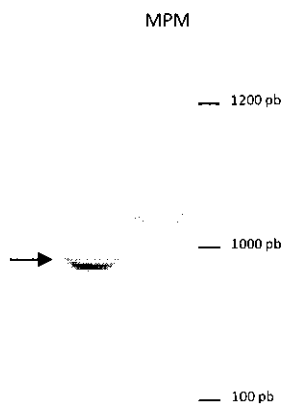


Figura 10. Detección del producto de amplificación de la secuencia codificante de la PC del PRSV en gel de agarosa al 1%. La flecha señala la banda que corresponde al peso esperado de 864 pb de la secuencia nucleotídica de la PC del PRSV.

Una vez que se confirmó que el gen de la PC del PRSV estaba presente, se hizo la extracción del plásmido a partir de una cepa almacenada a -80°C y después se introdujo en la cepa químicamente competente de *E. coli* One Shot® BL21 Star™ (DE3), a la cual se le denominó *E. coli* PRSVcp-pET28.

7.2 Expresión y purificación de la proteína de la cápside del PRSV

Para determinar si se estaba expresando la PC del PRSV en la cepa de *E. coli*, se realizó una prueba a pequeña escala (5 mL) y se pudo observar, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción de Coomassie, la presencia de una proteína abundante de 30 kDa, aproximadamente, en este caso sólo se presentó en el cultivo bacteriano inducido con IPTG y no se observó en el cultivo no inducido como se esperaba. El tiempo de inducción fue de 4 h y la temperatura fue de 37°C , utilizando una concentración de 1mM de IPTG (Fig. 11). Esta banda debía corresponder a la PC del PRSV y para confirmar esto se realizó un ensayo ELISA, en donde la muestra inducida dio un resultado positivo con una absorbancia incluso mayor que la del control positivo del kit; por el contrario, la muestra no inducida arrojó una absorbancia relativamente baja (Graf. 1). Cabe mencionar que el ensayo ELISA utilizado sólo confirmó la presencia de la PC, sin considerar su interpretación como un resultado cuantitativo. Con esto, se demostró que la PC del PRSV se expresa en la bacteria, sin embargo, se analizó la proteína total de la bacteria, por lo que era necesario determinar si la proteína se estaba acumulando en la fracción bacteriana soluble o insoluble.

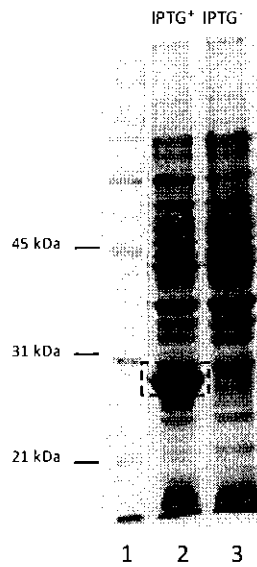


Figura 11. Análisis de la expresión de la PC del PRSV en lisado bacteriano total mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Muestra de cultivo inducido con IPTG Carril 3: Muestra de cultivo no inducido. En ambas muestras se cargó una alícuota de 7.5 μ l de lisado. Dentro del recuadro se resalta la presencia de una proteína que corresponde al peso esperado de la PC del PRSV (30 kDa).

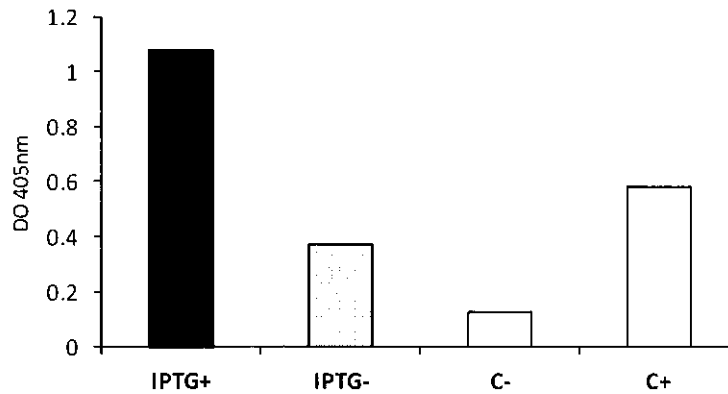


Gráfico 1. Inmunodetección por ensayo ELISA de la PC del PRSV en lisado bacteriano total. Barras en negro muestra de lisado inducido (IPTG⁺); en gris muestra de lisado bacteriano no inducido (IPTG⁻); en blanco controles (C) técnicos del kit de ELISA.

Una vez que se comprobó la expresión de la PC, se realizó otro experimento de inducción con las mismas condiciones que la inducción anterior, con la diferencia de que después de cosechar las bacterias y lisarlas, se separaron las fracciones en fracción soluble (FS) y fracción insoluble (FI). Los resultados de los análisis mediante SDS-PAGE (Fig. 12) y WB (Fig. 13) mostraron que la mayoría de la PC del PRSV se encontraba en cuerpos de inclusión (FI), mientras que la forma soluble de la misma proteína estaba en menor proporción.

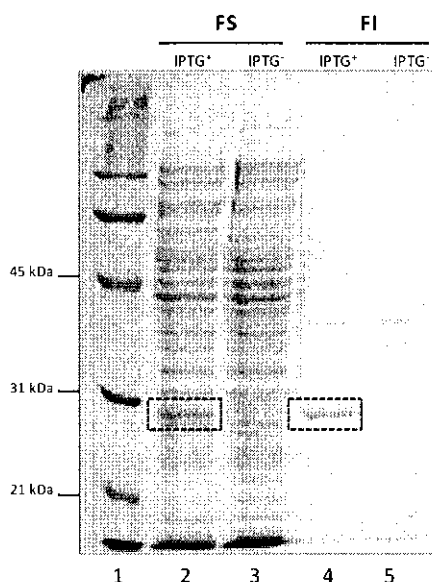


Figura 12. Análisis de la expresión de la PC del PRSV en fracción soluble e insoluble mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Fracción soluble (FS) inducida (IPTG⁺); Carril 3: FS no inducida (IPTG⁻); Carril 4: Fracción insoluble (FI) inducida (IPTG⁺); carril 5: FI no inducida (IPTG⁻). Dentro del recuadro se resalta la presencia de una proteína que corresponde al peso esperado de la PC del PRSV (30 kDa).

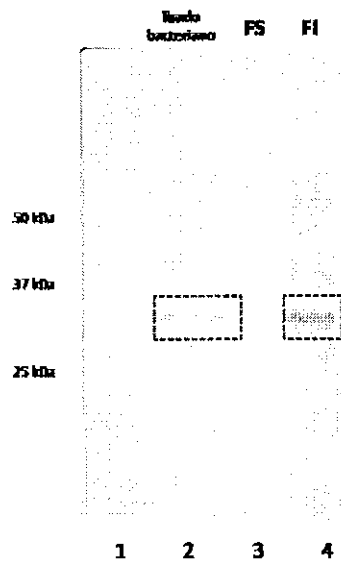


Figura 13. Inmunodetección por ensayo WB de la PC del PRSV en fracción soluble e insoluble de cultivos bacterianos inducidos (IPTG+). Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Lisado bacteriano total; Carril 3: Fracción soluble (FS); Carril 4: Fracción insoluble (FI). Dentro del recuadro se resalta la presencia de una proteína que corresponde al peso esperado de la PC del PRSV (30 kDa).

En las condiciones de inducción utilizadas (37°C e IPTG 1 mM) sólo se obtenía la PC en la FS, lo cual no era conveniente para el propósito de este trabajo, ya que el proceso de solubilización de la proteína, que es desnaturalizante, puede afectar el ensamblaje de ésta en PTVs. Por lo tanto, se probaron las diferentes condiciones descritas anteriormente con la intención de obtener la mayor cantidad de PC en la fracción soluble. De esta forma, el análisis de la PC del PRSV se realizó en la fracción soluble. Para este propósito, se cuantificó la proteína soluble total por el método de Bradford para cada condición a fin de colocar la misma cantidad de proteína en los geles SDS-PAGE. El análisis se hizo con una concentración final de proteína soluble total de 9.8 µg.

El análisis de la expresión de la PC del PRSV a una temperatura de 23°C muestra la presencia de la proteína de interés. Tanto en el análisis SDS-PAGE (Fig. 14) y ELISA (Graf. 2) muestran la expresión de la proteína desde el tiempo de 1 h post-inducción incrementando su expresión en los tiempos siguientes. Del mismo modo, no se observa una diferencia importante al utilizar dos concentraciones distintas de IPTG (0.5 mM y 1 mM).

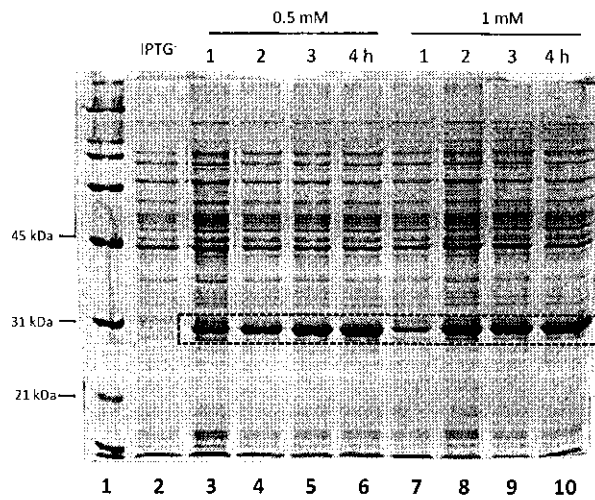


Figura 14. Análisis de la expresión mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie de la PC del PRSV en fracción soluble de cultivos bacterianos inducidos a 23°C. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Cultivo no inducido (IPTG⁻); Carriles 3, 4, 5 y 6: Cultivos inducidos con IPTG (0.5 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 h posteriores a la inducción, respectivamente; carriles 7, 8, 9 y 10: Cultivos inducidos con IPTG (1 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 h posteriores a la inducción, respectivamente. En todos los casos se cargaron en 9.8 µg de proteína total de la fracción soluble en cada carril. Dentro del recuadro se resalta la banda que corresponde al peso esperado de la PC del PRSV (30 kDa).

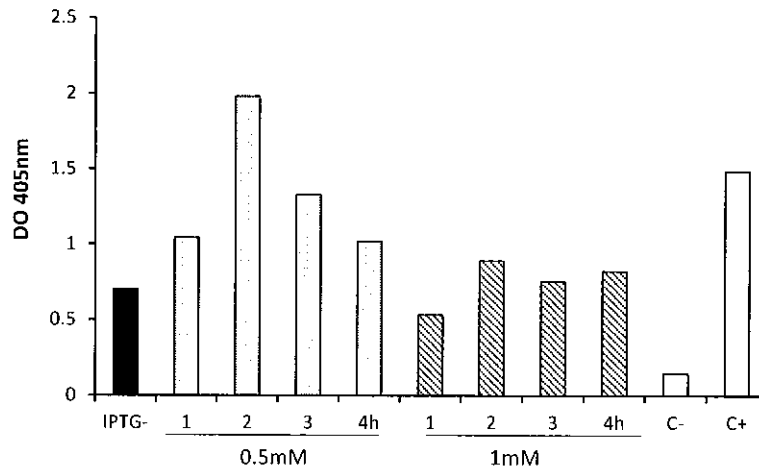


Gráfico 2. Inmunodetección por ensayo ELISA de la PC del PRSV en fracción soluble de cultivos bacterianos inducidos (IPTG⁺) a 23°C. En negro la muestra de lisado bacteriano no inducido (IPTG⁻); en gris cultivos inducidos con IPTG (0.5 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 h posteriores a la inducción; en trama cultivos inducidos con IPTG (1 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 h posteriores a la inducción; en blanco controles técnicos (C) del kit de ELISA.

Del mismo modo, se analizó la expresión de la PC del PRSV a 30°C. Se observó una mayor acumulación de la proteína de interés en comparación con la temperatura de 23°C. Los análisis SDS-PAGE (Fig. 15) y ELISA (Graf. 3) no sólo mostraron mayores niveles de acumulación de la proteína, sino que además hay una diferencia en la expresión al inducir con distintas concentraciones de IPTG, siendo la concentración de 1 mM la que generó la mayor acumulación de la PC.

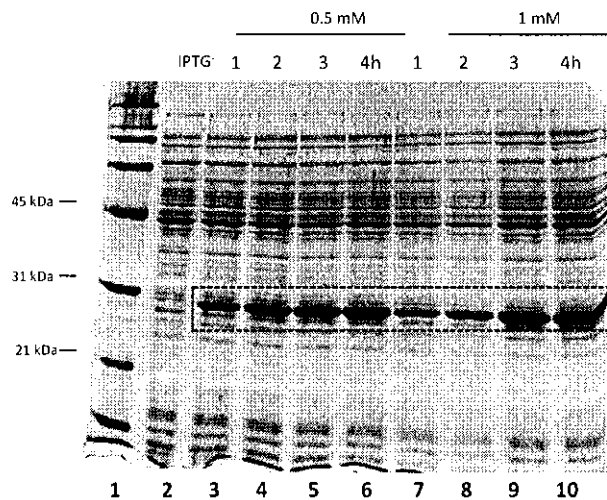


Figura 15. Análisis de la expresión mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie de la PC del PRSV en fracción soluble de cultivos bacterianos inducidos a 30°C. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Cultivo no inducido (IPTG); Carriles 3, 4, 5 y 6: Cultivos inducidos con IPTG (0.5 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 h posteriores a la inducción, respectivamente; carriles 7, 8, 9 y 10: Cultivos inducidos con IPTG (1 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 h posteriores a la inducción, respectivamente. En todos los casos se cargaron en 9.8 µg de proteína total de la fracción soluble en cada carril. Dentro del recuadro se resalta la banda que corresponde al peso esperado de la PC del PRSV (30 kDa).

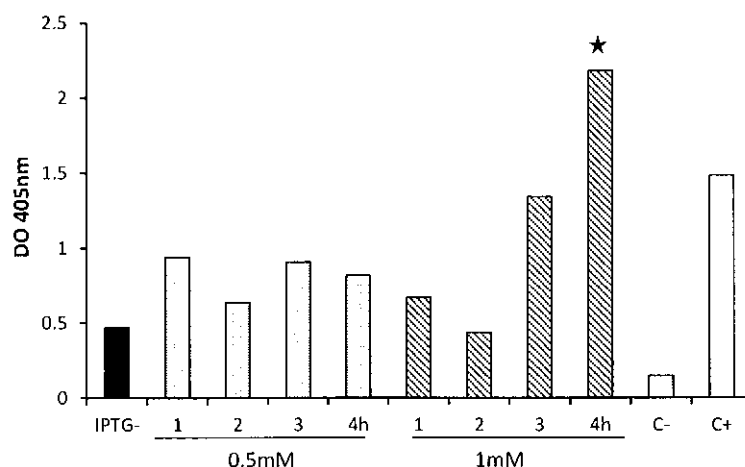


Gráfico 3. Inmunodetección por ensayo ELISA de la PC del PRSV en fracción soluble de cultivos bacterianos inducidos (IPTG⁺) a 30°C. En negro la muestra de lisado bacteriano no inducido (IPTG⁻); en gris cultivos inducidos con IPTG (0.5mM) colectados 1, 2, 3 y 4 horas posteriores a la inducción; en trama cultivos inducidos con IPTG (1 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 h posteriores a la inducción; en blanco controles técnicos (C) del kit de ELISA. La detección de la expresión de la PC ocurre a partir de la primera hora de inducción. La estrella denota la condición donde se observa una mayor acumulación de la PC.

Por el contrario, el análisis de la expresión de la PC del PRSV a 37°C indica que la proteína no se acumula a niveles observables en fracción soluble en ningún tiempo de inducción ni en las dos concentraciones distintas de IPTG (Fig. 16). Al no observar la banda del tamaño esperado en el gel SDS-PAGE, no se analizó la expresión por ELISA.

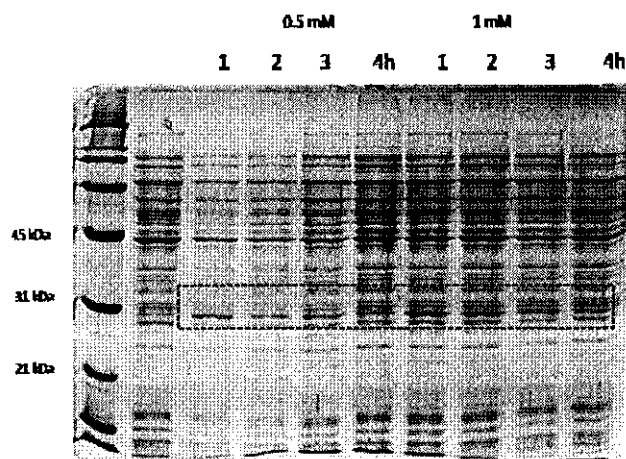


Figura 16. Análisis de la expresión mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie de la PC del PRSV en fracción soluble de cultivos bacterianos inducidos a 37°C. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Cultivo no inducido (IPTG⁻); Carriles 3, 4, 5 y 6: Cultivos inducidos con IPTG (0.5 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 horas posteriores a la inducción, respectivamente; carriles 7, 8, 9 y 10: Cultivos inducidos con IPTG (1 mM) colectados 1, 2, 3 y 4 h posteriores a la inducción, respectivamente. En todos los casos se cargaron 9.8 µg de proteína total de la fracción soluble en cada carril. Dentro del recuadro se resalta la banda que corresponde al peso esperado de la PC del PRSV (30 kDa).

De acuerdo a los resultados anteriores, se estableció que la expresión de la PC del PRSV se induce a una temperatura de 30°C mediante la adición de IPTG 1 mM e incubación por 4 h. Estas condiciones sirvieron para llevar a cabo la expresión en un volumen mayor para la posterior purificación de la PC. De este modo, siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior, se logró purificar la PC del PRSV mediante cromatografía de afinidad en columnas de Sulfato de Níquel (Fig. 17). Se analizó la fracción no retenida (FNR), fracción de lavado (FL) y fracciones de elución (FE) mediante SDS-PAGE, encontrando la mayor cantidad de la PC en las fracciones de elución 2, 3, 4 y 5. Para determinar si se había retenido alguna proporción de la PC del PRSV en la columna de afinidad, se realizó una elución con una concentración más alta de imidazol (1 M). Aunque sí se retenía la PC, los niveles retenidos eran muy bajos, de forma que 500 mM de imidazol son suficientes para recuperar la mayor cantidad de proteína (Figura 17).

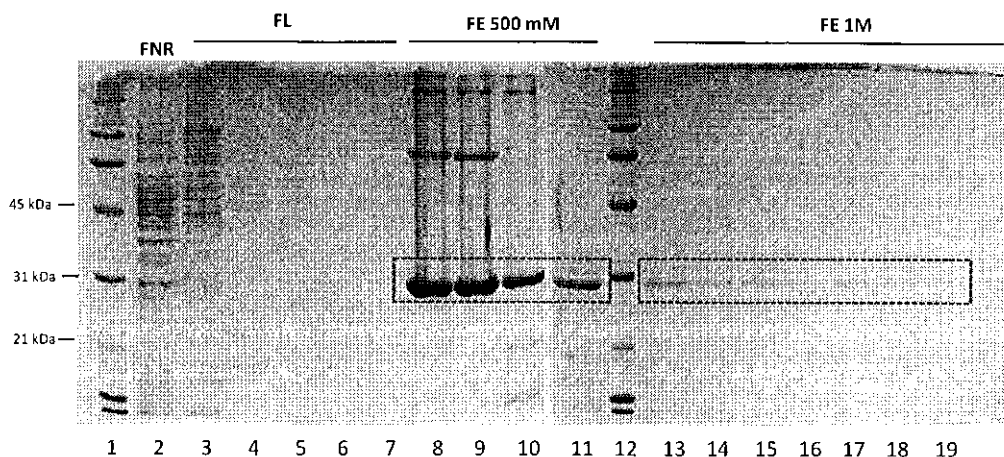


Figura 17. Análisis de la expresión mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie de la PC del PRSV en las fracciones obtenidas durante la purificación por cromatografía de afinidad en columnas de Sulfato de Níquel. Carril 1 y 12: Marcador de peso molecular; Carril 2: Fracción no retenida (FNR); Carriles 3 al 7: Fracciones de lavado (FL); carriles 8 al 11: Fracciones de elución (FE) utilizando imidazol 500 mM; carriles 13 al 19: FE utilizando imidazol 1M. Dentro del recuadro se resalta la banda que corresponde al peso esperado de la PC del PRSV (30 kDa).

Cabe señalar que las columnas cargadas con Sulfato de Níquel adherido a una matriz inerte se utilizan de forma rutinaria para purificar proteínas que tienen etiquetas de histidina. Sin embargo, la PC del PRSV que se expresó en este estudio carece de esta etiqueta. De cualquier modo, la PC se unía a la columna, probablemente debido a que el extremo amino de ésta tiene una carga positiva con un pK_8 , el cual es más alto que el de la histidina, que es de 6.5.

Antes de conducir los ensayos para determinar la presencia de lisinas reactivas y para realizar la conjugación química, se llevó a cabo un tratamiento de diálisis de la PC del PRSV después de la purificación para intercambiarla solución amortiguadora Tris-HCl a solución de fosfatos, debido a que los grupos amino que se encuentran en el Tris-HCl interfieren con los entrecruzadores sulfo-NHS-biotina y sulfo-MBS. Además, el producto de diálisis se filtró posteriormente con las unidades de filtración Amicon 30 kDa con la finalidad de eliminar monómeros de la PC del PRSV y proteínas más pequeñas de *E. coli*.

El análisis de la PC tratada mostró resultados favorables, ya que las PTVs quedaron más puras (Fig. 18). La concentración final de proteína fue de 1.26 mg/mL.

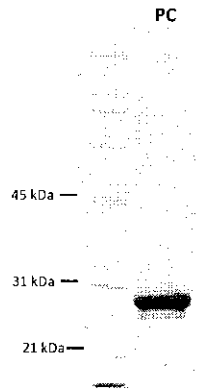


Figura 18. Análisis de la expresión mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie de la PC del PRSV posterior a la diálisis. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: PC recombinante del PRSV.

A diferencia del estudio hecho por (Kalnciema *et al.* 2012) en donde las PTVs del PVY son inestables en presencia de EDTA y altas concentraciones de sal (1 M de NaCl), las PTVs del PRSV generadas en este estudio son estables en presencia de EDTA y a una concentración de 300mM de Cloruro de Sodio. Sin embargo, hay que señalar que las PTVs del PVY tenían fusionado un epítipo a la PC. El rendimiento obtenido de la PC del PRSV en este estudio fue de 1250 mg/L de cultivo, mayor al reportado previamente por Chatchen *et al.* 2006 para la CP del PRSV expresada en *E. coli*, que también tenía una fusión genética de un epítipo (Chatchen *et al.* 2006).

7.3 Determinación de la formación de partículas tipo virus

Por medio de microscopía electrónica de transmisión, se logró observar la formación de las partículas tipo virus conformadas por la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya (Fig. 19A). Dichas partículas tuvieron una longitud promedio de 200 nm y 10 nm de diámetro, relativamente más cortas que las del virus nativo (Fig. 19B), que son de 780 nm de largo y 12 nm de diámetro (Yeh *et al.* 1992; Gonsalves y Ishii 1980). Debido a la presencia de imidazol en la muestra (remanente del proceso de purificación) no

se logró observar gran cantidad, debido probablemente a la desestabilización de una proporción de las partículas. Se recomienda el cambio de amortiguador que contiene imidazol por uno de fosfatos (fosfatos 10 mM, NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, pH 7.2) como en el paso previo a la determinación de las lisinas reactivas. A diferencia de un estudio previo sobre la proteína recombinante de la cápside del PRSV (Chatchen *et al.* 2006), en este estudio sí se demostró la formación de PTVs. Por último, las PTVs comparadas el aislado del PRSV, se logró observar una similitud de estructura y tamaño entre este y las partículas.



Figura 19. Confirmación de las PTVs por microscopía electrónica de transmisión. Partículas tipo virus conformadas por la PC e del PRSV recombinantes (A) y Aislado viral nativo de PRSV (B).

7.4 Determinación de la disponibilidad de lisinas reactivas para conjugación química en la superficie de las partículas tipo virus

En base a la secuencia de aminoácidos de la PC del PRSV (Silva-Rosales *et al.* 2000) se proponía en este trabajo que el extremo amino, ya que estaba expuesto en la superficie de las partículas, debía tener por ende un alto número de lisinas expuestas al medio acuoso. De este modo, se llevó a cabo una reacción de las PTVs con el reactivo Sulfo-NHS-SS-biotina, en donde el grupo éster (NHS) de este último reacciona eficientemente y específicamente con los grupos amino terminal de proteínas, así como amino épsilon presentes en las lisinas, formando enlaces estables; del otro extremo del reactivo se encuentra una biotina, la cual tiene una alta afinidad con la estreptavidina/avidina, la cual, al acoplarse a una enzima

adecuada, sirve para identificar los productos de conjugación química en un ensayo WB (Fig. 20); asimismo, la biotina se puede dissociar del reactivo en condiciones reductoras por la presencia de un enlace S-S. Por medio de esta reacción se logró demostrar mediante WB que las PTVs conformadas por la PC del PRSV expresadas en *E. coli* tienen lisinas reactivas en su superficie (Fig. 21), por la presencia de una banda biotinilada con el peso aproximado de la PC del PRSV (30 kDa).

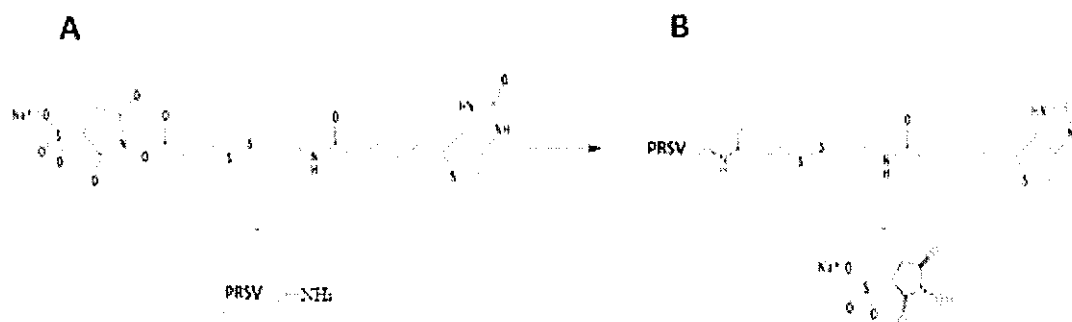


Figura 20. Estructura química del reactivo Sulfo-NHS-SS-Biotina. Reacción del Sulfo-NHS-SS-Biotina + PTVs del PRSV con su extremo amino en la superficie (A). Sustitución del grupo éster por las PTVs del PRSV (B).

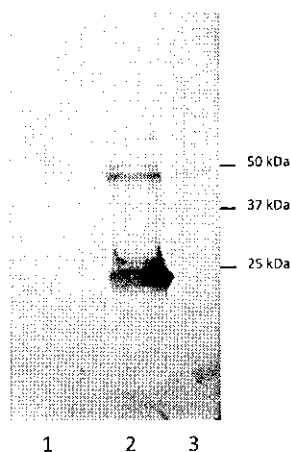


Figura 21. Análisis de la presencia de lisinas reactivas en la superficie de PTVs del PRSV mediante WB. Carril 1: PTVs del PRSV sin Sulfo-NHS-biotina; Carril 2: PTVs del PRSV con Sulfo-NHS-biotina; Carril 3: Marcador de peso molecular.

7.5 Conjugación química de la proteína verde fluorescente a la superficie de las partículas tipo virus

Una vez que se había demostrado que las PTVs del PRSV tenían grupos aminos expuestos al medio acuoso, se condujo un experimento para conjugadas a un antígeno modelo, que en este caso fue la GFP. De este modo, se lograron observar productos de conjugación de la PTVs a la GFP, usando cuatro diferentes concentraciones de sulfo-MBS, como muestra el análisis mediante SDS-PAGE (Fig. 22) y WB (Fig. 23). Los conjugados muestran un peso aproximado de 60 kDa, lo que corresponde a la suma de los pesos de la PC del PRSV y la GFP. No obstante, los conjugados generados presentaron problemas de inestabilidad, ya que al dejarlos incubando durante la noche a 4°C formaban un precipitado. Por otro lado, cuando los ensayos de conjugación se escalaron a un mayor volumen, con la finalidad de obtener suficiente conjugado para realizar los ensayos de inmunización de ratones, las reacciones presentaron un precipitado al momento de adicionar el sulfo-MBS. Por lo tanto, se decidió no utilizar los conjugados para la inmunización de los ratones, pero al menos generar mezclas de PTVs y GFP y evaluar la producción de anticuerpos inmunizados con tales mezclas.

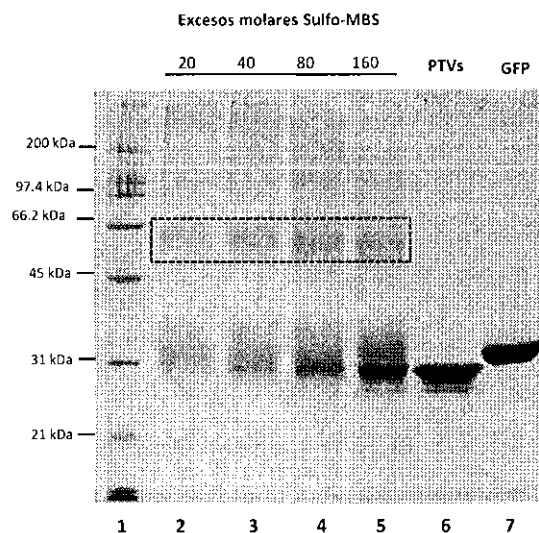


Figura 22. Análisis de la expresión mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie de la conjugación PTVs-GFP. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carriles 2, 3, 4 y 5: Conjugaciones con 20, 40, 80 y 160 excesos molares de sulfo-MBS, respectivamente; Carril 6: PTVs; Carril 7: GFP. Dentro del recuadro se resalta la banda que corresponde al peso esperado del conjugado (60 kDa).

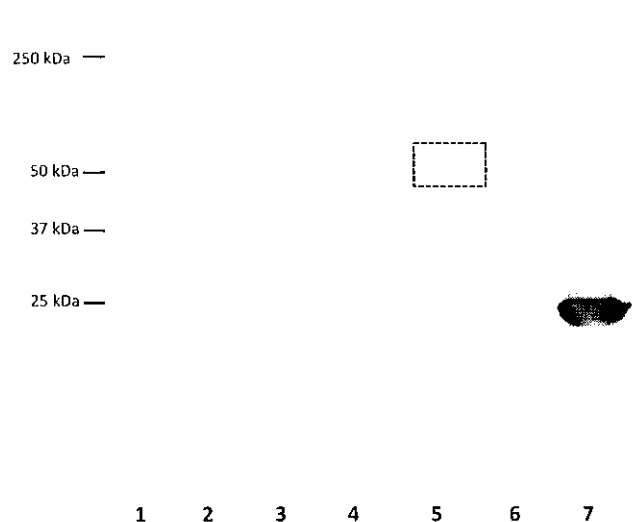


Figura 23. Inmunodetección por ensayo WB de la GFP en los ensayos de conjugación PTVs-GFP. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carriles 2, 3, 4 y 5: Conjugaciones con 20, 40, 80 y 160 excesos molares de sulfo-MBS, respectivamente; Carril 6: PTVs; Carril 7: GFP. Dentro del recuadro se resalta la banda que corresponde al peso esperado del conjugado (60 kDa).

7.6 Medición de anticuerpos antígeno-específicos en ratones BALB/c inmunizados con mezclas PTVs-GFP

Se realizó un experimento para determinar si una mezcla de PTVs con GFP sin conjugar induce la producción de anticuerpos específicos contra GFP. De este modo, se conformaron 6 grupos de ratones BALB/c hembra a los que se les administró por vía subcutánea los tratamientos: 10 μg de GFP (G1), 10 μg de PRSV (G2), una mezcla de 10 μg de GFP y adyuvante de Freund (G3), una mezcla de 10 μg de GFP y 10 μg de PRSV (G4), una mezcla de 10 μg de GFP y 1 μg de PRSV (G5) y amortiguador de fosfatos (G6). Los tratamientos G4 y G5 serían los de prueba, el tratamiento G1 serviría como punto de comparación de los tratamientos de prueba, el tratamiento G2 serviría para confirmar la especificidad del ensayo, el tratamiento G3 serviría como un testigo positivo, mientras que el tratamiento G6 serviría como testigo negativo. Se demostró mediante ELISA que las mezclas de PTV-GFP lograron inducir una cantidad de anticuerpos anti-GFP mayor que la inducida al inmunizar con la GFP sola después de la segunda inmunización. Esto concuerda con estudios previos sobre la utilización de virus vegetales como acarreadores de antígenos,

en donde se observa que a partir de la segunda inmunización se logra aumentar la cantidad de IgG específica (Modelska *et al.* 1998). Asimismo, se observó en este estudio que la producción de anticuerpos anti-GFP es dosis-dependiente, ya que fue mayor en el grupo inmunizado con 10 μ g de PTVs que en aquél inmunizado con 1 μ g. El isotipo IgG1 fue el que se indujo en mayor medida (datos no mostrados), sugiriendo que las PTVs influenciaron en el reclutamiento de linfocitos hacia la zona de inmunización.

El grupo inmunizado con la mezcla GFP y adyuvante de Freund fue el que presentó los títulos más altos de IgG anti-GFP, los cuales se observaron desde el primer suero inmune (S1); esto era de esperarse, ya que el adyuvante de Freund siempre induce una fuerte respuesta de anticuerpos y es utilizado de forma rutinaria en laboratorio para la alta producción de anticuerpos contra una molécula de interés. Por otro lado, el grupo inmunizado con las PTVs solas, no presentó IgG anti-GFP, lo cual indica que las PTVs no generan una respuesta cruzada con GFP. Por último, el grupo inmunizado con amortiguador de fosfatos tampoco generó anticuerpos GFP-específicos (Graf. 4).

El aumento en los niveles de anticuerpos en contra de GFP que se determinó en este estudio, posiblemente se debe a que las PTVs del PRSV ayudan a reclutar células de la inmunidad innata que producen citocinas y quimiocinas en el sitio de inyección, al igual que los adyuvantes particulados. Además, las partículas causan muerte celular y daño tisular en el sitio de inyección, produciendo una respuesta inflamatoria (Awate, Babiuk, and Mutwiri 2013).

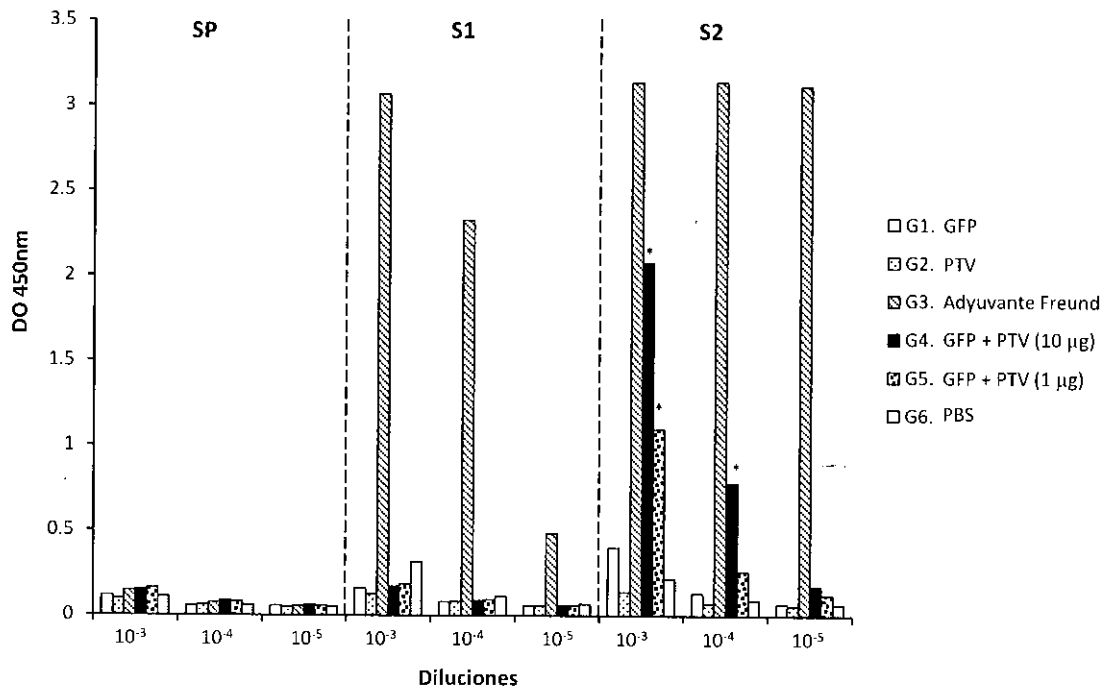


Gráfico 4. Medición de anticuerpos antígeno-específicos en ratones BALB/c inmunizados. SP: suero preinmune; S1: primer suero inmune; S2: segundo suero inmune y G (grupos) evaluados.

Un estudio sugiere que las PTVs del PapMV son reconocidas eficientemente por el sistema inmune y producen la secreción de citocinas Th1 y Th2, por lo tanto podrían ser consideradas como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) (Savard *et al.* 2011), por lo que inducen una respuesta humoral alta cuando se mezclan con una vacuna trivalente contra el virus de la influenza estacional. En este mismo estudio, se mostró además que la adición de 30 µg de PTVs de PapMV fue más eficiente que la adición de 3 µg en mejorar la respuesta humoral en contra de TIV, midiéndose un aumento de más de 3.5 veces de IgG y de 8 veces del isotipo de IgG2a subsecuentes.

8. Conclusiones

Con los experimentos realizados en el presente estudio se demostró lo siguiente:

1. La cepa BL21 de *E. coli* es capaz de producir la proteína de la cápside del PRSV utilizando técnicas simples de cultivo y de purificación.
2. La proteína de la cápside del PRSV se ensambla en partículas tipo virus al expresarse en un sistema bacteriano a partir de la secuencia nativa que codifica para esta proteína proveniente de un aislado de campo del PRSV.
3. Las PTVs del PRSV contienen lisinas en su superficie y se pueden acoplar antígenos vacunales a éstas mediante conjugación química.
4. Se logró conjugar GFP a las partículas tipo virus.
5. Al mezclar las partículas tipo virus del PRSV con un antígeno modelo, se induce una mayor producción de IgG específica.
6. Debido a que los conjugados a las PTVs no son estables, se sugiere seguir haciendo ensayos de conjugación química con otras estrategias y diferentes antígenos.
7. El uso de las partículas tipo virus de virus vegetales como acarreadores de antígenos o adyuvantes, da una ventaja con respecto al uso de PTVs conformadas por virus patógenos de humanos, ya que puede haber una inmunidad previa ante éstos, bloqueando la capacidad de estas PTVs de presentar nuevos antígenos al sistema inmune.

9. Literatura Citada

- Awate S., Babiuk L. A. y Mutwiri G. 2013. "Mechanisms of Action of Adjuvants." *Frontiers in Immunology* (4): 1–10.
- Bachmann M. F. y Jennings G. T. 2010. "Vaccine Delivery: a Matter of Size, Geometry, Kinetics and Molecular Patterns." *Nature Reviews Immunology* 10: 787–796.
- Barnhill H. N., Reuther R., Lee Ferguson P., Dreher T. y Wang Q. 2007. "Turnip Yellow Mosaic Virus as a Chemoaddressable Bionanoparticle." *Bioconjugate Chemistry* 18 (3): 852–9.
- Brennan F. R., Jones T. D. y Hamilton W. D. 2001. "Cowpea Mosaic Virus as a Vaccine Carrier of Heterologous Antigens." *Molecular Biotechnology* 17 (1): 15–26.
- Cantin G. T., Resnick S., Hongfan J., O'Hanlon R., Espinosa O., Stevens A., Payne J., Glenn N. R., Rasochova L., y Allen J. R. 2011. "Comparison of Methods for Chemical Conjugation of an Influenza Peptide to Wild-Type and Cysteine-Mutant Virus-Like Particles Expressed in *Pseudomonas*." *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 17 (3): 217–224.
- Chatchen S., Jurícek M., Rueda P. y Kertbundit S. 2006. "Papaya Ringspot Virus Coat Protein Gene for Antigen Presentation in *Escherichia Coli*." *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (1): 16–21.
- Chatterji A., Burns L., Taylor S. S., Lomonosoff G. P., Johnson J. E., Lin T. y Porta C. 2002. "Cowpea Mosaic Virus: From the Presentation of Antigenic Peptides to the Display of Active Biomaterials." *Intervirology* 45 (4-6): 362–370.
- Chatterji A., Ochoa W., Shamieh L., Salakian S. P., Wong S. M., Clinton G., Ghosh P., Lin T. y Johnson J. E. 2004. "Chemical Conjugation of Heterologous Proteins on the Surface of Cowpea Mosaic Virus." *Bioconjugate Chemistry* 15 (4): 807–813.
- Denis J., Majeau N., Acosta-Ramirez E., Savard C., Bedard M., Simard S., Lecours K., Bolduc M., Pare C., Willems B., Shoukry N., Tessier P., Lacasse P., Lamarre A., Lapointe R., Lopez M. C. y Leclerc D. 2007. "Immunogenicity of Papaya Mosaic Virus-like Particles Fused to a Hepatitis C Virus Epitope: Evidence for the Critical Function of Multimerization." *Virology* 363 (1): 59–68.
- Farkaš P., y Bystrický S. 2010. "Chemical Conjugation of Biomacromolecules: A Mini-review." *Chemical Papers* 64 (6): 683–695.
- Fernández-Fernández M. R., Martínez-Torrecedrada J. L., Casal J. I. y García J. A. 1998. "Development of an Antigen Presentation System Based on Plum Pox Potyvirus." *FEBS Letters* 427 (2): 229–235.

- Fernández-Fernández M. R., Martínez-Torrecedra J. L., Roncal F., Domínguez E. y García J. A. 2002. "Identification of Immunogenic Hot Spots Within Plum Pox Potyvirus Capsid Protein for Efficient Antigen Presentation." *Journal of Virology* 76 (24): 12646–12653.
- Fernández-Fernández M. R., Mouriño M., Rivera J., Rodríguez F., Plana-Duran J. y García J. A. 2001. "Protection of Rabbits Against Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Immunization with the VP60 Protein Expressed in Plants with a Potyvirus-based Vector." *Virology* 280: 283–291.
- Florindo M. I., Aragao M. E. F. de, da Silva A. C. M., Otoch M. L., Fernandes De Melo D., Lima J. A. A. y Silva-Lima M. G. 2002. "Immune Response Induced in Mice Oral Immunization with Cowpea Severe Mosaic Virus." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (7): 827–835.
- Gonsalves D. y Ishii M. 1980. "Purification and Serology of Papaya Ringspot Virus." *Phytopathology* 70: 1028–1032.
- Gonsalves D., Tripathi, S., Carr, J. B., y Suzuki, J. Y. 2010. "Papaya ringspot virus". *Plant Health Instr. doi*, 10.
- Gutiérrez P., Bastos-Aristizábal S. Y Marín M. 2011. "Modelación Estructural de la Proteína de la Cápsida del Virus A de la Papa (PVA, potyvirus)." *Actual Biol* 33 (94): 93–102.
- Guy B. 2007. "The Perfect Mix: Recent Progress in Adjuvant Research." *Nature Reviews. Microbiology* 5 (7): 505–517.
- Hammond R. W. y Hammond J. 2010. "Maize Rayado Fino Virus Capsid Proteins Assemble into Virus-like Particles in Escherichia Coli." *Virus Research* 147 (2): 208–215.
- Hema M., Subba Reddy Ch. v., Savithri H. S. y Sreenivasulu P. 2008. "Assembly of Recombinant Coat Protein of Sugarcane Streak Mosaic Virus into Potyvirus-like Particles." *Indian Journal of Experimental Biology* 46 (11): 793–796.
- Jagdish M. N., Ward C. W., Gough K. H., Tulloch P. A., Loyce A. Whittaker y Shukla D. D. 1991. "Expression of Potyvirus Coat Protein in Escherichia Coli and Yeast and Its Assembly into Virus-like Particles." *The Journal of General Virology* 72: 1543–1550.
- Jennings G. T. y Bachmann M. F. 2008. "The Coming of Age of Virus-like Particle Vaccines." *Biological Chemistry* 389 (5): 521–536.
- Kalnciema I., Skrastina D., Ose V., Pumpens P. y Zeltins A. 2012. "Potato Virus Y-like Particles as a New Carrier for the Presentation of Foreign Protein Stretches." *Molecular Biotechnology* 52 (2): 129–139.

- Lacasse P., Denis J., Lapointe R., Leclerc D.yLamarre A. 2008. "Novel Plant Virus-based Vaccine Induces Protective Cytotoxic T-lymphocyte-mediated Antiviral Immunity through Dendritic Cell Maturation." *Journal of Virology* 82 (2): 785–794.
- Lechner F., Jegerlehner A., Tissot A. C., Maurer P., Sebbel P., Renner W. A., Jennings G. T., yBachmann M. F. 2002. "Virus-Like Particles as a Modular System for Novel Vaccines." *Intervirology* 45 (4-6): 212–217.
- Leclerc D., Beauseigle D., Denis J., Morin H., Paré C., Lamarre A.yLapointe R. 2007. "Proteasome-independent Major Histocompatibility Complex Class I Cross-presentation Mediated by Papaya Mosaic Virus-like Particles Leads to Expansion of Specific Human T Cells." *Journal of Virology* 81 (3): 1319–1326.
- Lin T., Porta C., Lomonosoff G.yJohnson J. E. 1996. "Structure-based Design of Peptide Presentation on a Viral Surface: The Crystal Structure of a Plant/animal Virus Chimera at 2.8 Å Resolution." *Folding & Design* 1 (3): 179–187.
- Manuel-Cabrera C. A., Márquez-Aguirre A., Hernández-Gutiérrez R., Ortiz-Lazareno P. C., Chavez-Calvillo G., Carrillo-Tripp M, Silva-Rosales L.yGutiérrez-Ortega A. 2012. "Immune Response to a Potyvirus with Exposed Amino Groups Available for Chemical Conjugation." *Virology Journal* 9 (1): 75–86.
- Miermont A., Barnhill H., Strable E., Lu X., Wall K. A., Wang Q., Finn M. G.yHuang X. 2008. "Cowpea Mosaic Virus Capsid: a Promising Carrier for the Development of Carbohydrate Based Antitumor Vaccines." *Chemistry-A European Journal* 14: 4939–4947.
- Modelska A., Dietzschold B., Sleysh N., Fu Z. F., Steplewski K., Hooper D. C., Koprowski H.yYusibov V. 1998. "Immunization Against Rabies with Plant-derived Antigen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5): 2481–2485.
- Natilla A., yHammond R. W. 2011. "Maize Rayado Fino Virus Virus-like Particles Expressed in Tobacco Plants: A New Platform for Cysteine Selective Bioconjugation Peptide Display." *Journal of Virological Methods* 178 (1-2): 209–215.
- Nicholas B. L., Brennan F. R., Martinez-Torrecedrada J. L., Casal J. I., Hamilton W. D.yWakelin D. 2002. "Characterization of the Immune Response to Canine Parvovirus Induced by Vaccination with Chimaeric Plant Viruses." *Vaccine* 20 (21-22) 2727–2734.
- Noad R.yRoy P. 2003. "Virus-like Particles as Immunogens." *Trends in Microbiology* 11 (9): 438–444.
- O'Hagan D. T.yValiante N. M. 2003. "Recent Advances in the Discovery and Delivery of Vaccine Adjuvants." *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (9): 727–735.

- Palomino Hermosillo Y. A. 2010. "Expresion Heterologa del Antigeno de Nucleocapside del Virus de la Mancha Anular de la Papaya y su Potencial uso como Adyuvante Vacunal". Tesis para obtener el titulo de maestro en ciencias de los alimentos. *Instituto Tecnologico de Tepic*.
- Pashine A., Valiante N. MyUlmer J. B. 2005. "Targeting the Innate Immune Response with Improved Vaccine Adjuvants." *Nature Medicine* 11 (4): 63–68.
- Pokorna D., Cerovska N., Smahel M., Moravec T., Ludvikova V., Mackova J., Synkova H., Duskova M., Hozak P.yVeleminsky J. 2005. "DNA Vaccines Based on Chimeric Potyvirus-like Particles Carrying HPV16 E7 Peptide (aa 44-60)." *Oncology Reports* 14 (4): 1045–1053.
- Pokorski J. K.ySteinmetz N. F. 2011. "The Art of Engineering Viral Nanoparticles." *Molecular Pharmaceutics* 8 (1): 29–43.
- Sainsbury F., Cañizares M. C.yLomonossoff G. P. 2010. "Cowpea Mosaic Virus: The Plant Virus-based Biotechnology Workhorse." *Annual Review of Phytopathology* 48: 437–455.
- Saunders K., Sainsbury F.yLomonossoff G. P. 2009. "Efficient Generation of Cowpea Mosaic Virus Empty Virus-like Particles by the Proteolytic Processing of Precursors in Insect Cells and Plants." *Virology* 393 (2): 329–337.
- Savard C., Guérin A., Drouin K., Bolduc M., Laliberté-Gagné M. A., Dumas M. A., Majeau N.yLeclerc D. 2011. "Improvement of the Trivalent Inactivated Flu Vaccine Using PapMV Nanoparticles." *PloS One* 6 (6): e21522
- Shukla D. D., Strike P. M., Tracy S. L., Gough K. H.yWard C. W. 1988. "The N and C Termini of the Coat Proteins of Potyviruses Are Surface-located and the N Terminus Contains the Major Virus-specific Epitopes." *Journal of General Virology* 69 (7): 1497–1508.
- Silva-Rosales L., Becerra-Leor N., Ruiz-Castro S., Téliz-Ortiz D.y Noa-Carranza J. C. 2000. "Coat Protein Sequence Comparisons of Three Mexican Isolates of Papaya Ringspot Virus with Other Geographical Isolates Reveal a Close Relationship to American And." *Archives of Virology* 145: 835–843.
- Singh M.yO'Hagan D. T. 2002. "Recent Advances in Vaccine Adjuvants." *Pharmaceutical Research* 19 (6): 715–728.
- Smith M. L., Lindbo J. A., Dillard-Telm S., Brosio P. M., Lasnik A. B., McCormick A. A., Nguyen L. V.yPalmer K. E. 2006. "MODIFIED TOBACCO MOSAIC VIRUS PARTICLES AS SCAFFOLDS FOR DISPLAY OF PROTEIN ANTIGENS FOR VACCINE APPLICATIONS." *Virology* 348: 475–488.

- Steinmetz N. F. 2010. "Viral Nanoparticles as Platforms for Next-generation Therapeutics and Imaging Devices." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6 (5): 634–641.
- Taylor K. M., Lin T., Porta C., Mosser A. G., Giesing H. A., Lomonossoff G. P. y Johnson J. E. 2000. "Influence of Three-dimensional Structure on the Immunogenicity of a Peptide Expressed on the Surface of a Plant Virus." *Journal of Molecular Recognition : JMR* 13 (2): 71–82.
- Tripathi S., Suzuki J., Ferreira S. A. y Gonsalves D. 2008. "Papaya Ringspot virus-P: Characteristics, Pathogenicity, Sequence Variability and Control." *Molecular Plant Pathology* 9 (3): 269–280.
- Uhde-Holzem K., Schlösser V., Viazov S., Fischer R. y Commandeur U. 2010. "Immunogenic Properties of Chimeric Potato Virus X Particles Displaying the Hepatitis C Virus Hypervariable Region I Peptide R9." *Journal of Virological Methods* 166 (1-2): 12–20.
- Yeh S. D., Jan F. J., Chiang C. H., Doong T. J., Chen M. C., Chung P. H. y Bau H. J. 1992. "Complete Nucleotide Sequence and Genetic Organization of Papaya Ringspot Virus RNA." *The Journal of General Virology* 73: 2531–2541.