



*Universidad Nacional de Córdoba*  
*Facultad de Ciencias Agropecuarias*  
*Escuela para Graduados*



---

# **OBTENCIÓN DE MANÍ TRANSGÉNICO MEDIANTE EL SILENCIAMIENTO DE UN GEN ALERGÉNICO**

Paola Carmen Faustinelli

Tesis  
Para optar al Grado Académico de  
Doctora en Ciencias Agropecuarias

*Córdoba, 2012*

# **OBTENCIÓN DE MANÍ TRANSGÉNICO MEDIANTE EL SILENCIAMIENTO DE UN GEN ALERGÉNICO**

Paola Carmen Faustinelli

## **Comisión Asesora de Tesis**

**Directora:** Prof. (PhD) Peggy OZIAS-AKINS

**Asesores:** Dra. Karina Grunberg (Codirectora)  
Dra. Marta Ojeda

## **Tribunal Examinador de Tesis**

Dra Karina Grunberg

Dr. Ramón Asis

Dr. Marcelo Desimone

## **Presentación formal académica**

16 Octubre 2012

Escuela de Graduados

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

## AGRADECIMIENTOS

Es mi deseo expresar el más profundo agradecimiento a todos quienes han contribuido a que lograra este objetivo, tanpreciado a mi vocación científica.

En primer lugar, quiero agradecerle a mi esposo Armando, por el apoyo y la confianza depositada siempre en mí, por animarse a cruzar un continente con nuestro hijo, a trabajar en pos de nuestros sueños, a desear conmigo a nuestra hija y de su valentía por compartir esta aventura durante 5 inolvidables años...

A Peggy, quién sin conocerme, me ofreció formar parte de sus proyectos. A ella le agradezco no sólo la posibilidad de brindarme un futuro que me permitieron crecer profesionalmente, sino también su confianza, su comprensión durante mi embarazo, su generosidad y calidez humana...

A Karina, quien siempre tuvo fe en mí, alentándome a progresar y cumplir sueños como éste...

A Mario, por su tiempo y dedicación en la corrección de esta tesis; su amistad, confianza y oportunidades brindadas... gracias!

A Laura con quien he compartido de todo; gracias por valorar el significado más profundo de la palabra amistad.

A Miss Jackie, Chu Ye, Miss Anne, Sulekha, Evelyn P., Guna, Goel, Aki, Alfred, Joann, Jane, Melisa, Rippy y Pawan, Sherrie, Jenn, Socorro, Evelyn F., Pam, Sarita, a todos mis amigos Tifteanos, quienes siempre me enseñaron generosamente desde “picked peanut”, técnicas moleculares hasta el sentido más profundo de una amistad multicultural enriquecedora... Thanks for all... I love you guys!!

A los amigos cosechados en Our Divine Savor Catholic Church: Carmen, Juan Carlos, Anita, Gaby y Juan Carlitos, Juana y familia, Dulce y familia, Cruz y familia, Mago y familia, Francisco, Debbie... quienes me incluyeron en sus actividades y familias, permitiendo compartir eventos inolvidables... y en especial, a nuestro incondicional amigo “Pocho”, por su apoyo espiritual e incondicional en momentos únicos y especiales.

A mis amigos argentinos, que a pesar de la distancia, se mantuvieron cerca, valorando la palabra “amistad” en todos sus sentidos.

A mi familia, por el cariño mantenido durante todo este recorrido. Especialmente, le quiero agradecer a mi mamá por siempre estar cerca, por sus encomiendas, sus regalitos, sus cartas, por ayudarme durante el nacimiento de mi hija, por sus visitas junto con mi papá. Gracias Marciata!! por tus buenas ondas.

Y por último aunque no por ello menos importante, quiero agradecer con el corazón a Marcial y Josefina; mis soles, mis sentimientos más genuinos. A ustedes les debo mi existir, mi felicidad. Gracias por siempre valorar lo que hago, abrazarme espontáneamente, besarme con dulzura, decirme con total sinceridad “mami, te amo”. Sin ustedes esto no tendría sentido. Los amo!

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis resume 5 años inolvidables de mi vida*

*por eso se la dedico a:*

*Armando, por ser mi compañero y mi apoyo incondicional;*

*Marcial, porque sé de su esfuerzo por seguir a la mami; y a*

*Josefina, por ser parte de los frutos cosechados en aquel país.*

**LOS AMO...**

*Ser, digno de ser*

## RESUMEN

Argentina se ha consolidado como primer exportador mundial de maní (*Arachis hypogaea* L.) y Córdoba en la primera provincia productora con un aporte de más del 80% al total nacional. No se cuenta hasta el momento con terapias para tratar reacciones alérgicas producidas por maní en pacientes sensibles y solo se pueden prevenir evitando su consumo. Las semillas de maní contienen 11 proteínas alérgicas, dentro de las cuales se encuentra una de las más alérgicas, la Ara h 2. Si bien en Argentina, el consumo de maní es errático, son objetivos del sector el desarrollo constante de nuevas variedades que le permitan completar la actual oferta comercial, siempre en pos de mejorar la competitividad del país, ofreciendo opciones para nichos de mercados particulares en países donde, para este caso particular, el consumo de maní es generalizado y donde los problemas alérgicos derivados del mismo son notables. El objetivo de este trabajo fue silenciar mediante la técnica de ARN de interferencia, el gen *ara h 2* responsable de la presencia de una proteína alérgica en la semilla de maní, lo cual permitió obtener líneas transgénicas potencialmente menos alérgicas. Embriones somáticos de maní variedad Georgia Green fueron transformados vía biobalística, con la construcción diseñada y obtenida en el laboratorio, *ara h 2* ARNi, la cual contenía inserto el fragmento *ara h 2* en posiciones sentido y antisentido, flanqueando con un segmento del gen GUS lo que permitía formar un rulo ó hairpin. El silenciamiento génico vía ARNi fue exitoso pudiéndose obtener 4 líneas de maní con un contenido reducido y en algunos casos, nulo de proteínas alérgicas del tipo Ara h 2 y por homología, de Ara h 6. En dos sublíneas se produjo una reducción de la proteína Ara h 2 de un ~90% aún suficiente para activar reacciones alérgicas en ratones. En una de las línea transgénica se logró una reducción importante no solo en el contenido de la proteína Ara h 2 sino también de la proteína Ara h 6, y en otra, a pesar de contener múltiples inserciones del transgen, no se detectaron ninguna de las dos bandas correspondientes a estas proteínas por los métodos de inmunodetección utilizados. La obtención de estas líneas ofrecen la posibilidad de mitigar el efecto de las alergias inducidas por maní pudiéndose utilizar en investigaciones que logren evitar las hipersensibilizaciones ó producir reacciones inmunológicas más tardías, permitiendo quizás disminuir el porcentaje de niños afectados.

**Palabras Claves:** *Arachis hypogaea* L., ARN de interferencia, transformación de maní, proteínas alérgicas, maní hipoalérgico.

## ABSTRACT

Argentina strengthened its position as the world leading exporter of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) and Córdoba as the first producing province that contributes with more than 80% of the gross national production. So far, there is no therapy to treat allergenic reactions produced by peanuts in sensitive patients; therefore, the only way of preventing such reactions is to avoid consumption. Peanut seeds contain 11 recognized allergenic proteins, among them the Ara h 2 as the most allergenic one. While in Argentina peanut consumption is erratic, the novelty of this project is based on our country's large export capacity. The focus on the development of new hypoallergenic varieties that complement the existing commercial offer would allow Argentina to improve its competitiveness, as well as the supply options for particular market niches in countries where peanut consumption is widespread and the allergic problems are significant. The objective of this study was to silence one of the most immunodominant allergens in peanuts, Ara h 2, using RNA interference allowing the recovery of transgenic lines with a potentially reduced allergenic content. Somatic embryos of Georgia Green peanut were transformed via biolistics, with the *ara h 2* RNAi construction obtained in the laboratory. The construction contained an inserted *ara h 2* gen fragment, in sense and antisense positions, separated by a GUS gene segment that allowed the formation of a loop or hairpin. Gene silencing through RNAi was successful, and 4 lines of peanut with reduced, and in some cases null content of allergenic proteins of the Ara h 2 type and, by homology of Ara h 6, were obtained. In the B3.3.1 and B3.3.2 sublines, there was a ~ 90% reduction of the Ara h 2 protein, still enough to activate allergenic reactions in mice. In the line B4.6.1 transgenic line, there was a decrease in both the content of the Ara h 2 protein and also in the content of Ara h 6; and in the B11.1.1 line none of the bands could be detected by Western blot or by immunodetection, despite containing multiple insertions of the transgene. The acquisition of these lines with a partial or total reduction of the Ara h 2 and/or Ara h 6 proteins could mitigate the effect of peanut-induced allergies. Although a hypoallergenic peanut could not be obtained, these developments foster further research to obtain peanuts varieties that avoid hypersensitization or which produce delayed immune reactions, resulting at the end in a decreased percentage of affected children.

**Key words:** *Arachis hypogaea* L., RNA interference, peanut transformation, allergenic proteins, hypoallergenic peanut.

# TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
EL CULTIVO DEL MANÍ Y SU IMPORTANCIA REGIONAL .....	1
ALERGIAS CAUSADAS POR EL CONSUMO DE MANÍ .....	4
LA BIOTECNOLOGÍA EN EL MEJORAMIENTO VEGETAL .....	10
EL SILENCIAMIENTO GÉNICO EN PLANTAS .....	12
REGENERACIÓN DE PLANTAS POR CULTIVO DE TEJIDOS .....	15
EVALUACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS .....	16
DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA .....	17
HIPOTESIS .....	19
OBJETIVOS .....	19
<b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
CONSTRUCCIÓN DE UN CASETE DE TRANSFORMACIÓN USANDO UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA PROTEÍNA ARA H 2 COMO TRANSGEN. ....	20
TRANSFORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE MANÍ VARIEDAD GEORGIA GREEN MEDIANTE BIOBALÍSTICA .....	22
REGENERACIÓN VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE LOS EMBRIONES TRANSFORMADOS PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS COMPLETAS .....	23
ANÁLISIS MOLECULARES PARA DEMOSTRAR EL CARÁCTER TRANSGÉNICO DE LAS PLANTAS LOGRADAS .....	24
EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ALERGÉNICO DE LAS SEMILLAS OBTENIDAS DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS MEDIANTE ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	30
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	32
OBTENCIÓN LÍNEAS TRANSGÉNICAS .....	32
EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: SDS PAGE, WESTERN BLOT Y GELES EN 2 D .....	36
EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: SOUTHERN BLOT .....	40
EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: CONTROL PATRÓN PROTEICO (ARA H 6, ARA H 1, ARA H 3) POR WESTERN BLOT .....	42
EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: INMUNODETECCIÓN .....	47
EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: BIOENSAYOS .....	50
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	57



## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 3.1:</b> Obtención de embriones somáticos de maní variedad Georgia Green transformados mediante biobalística .....	34

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.1:</b> Esquemas de posibles progenitores de maní .....	10
<b>Figura 3.1:</b> Construcción <i>ara h 2</i> ARNi.....	33
<b>Figura 3.2:</b> Obtención y regeneración de embriones somáticos de maní variedad Georgia Green .....	35
<b>Figura 3.3:</b> Amplificación del fragmento <i>ara h 2</i> -GFP por PCR (790 pb).....	36
<b>Figura 3.4:</b> SDS-page y Western blot de las líneas transgénicas con el gen <i>ara h 2</i> silenciado.....	37
<b>Figura 3.5:</b> Electroforesis en un gel de dos dimensiones (“2D-DIGE”) de las líneas B3.3.1/5 y B3.3.2/15 con el gen <i>ara h 2</i> silenciado y de las líneas no transgénicas (control) .....	39
<b>Figura 3.6:</b> Southern blot de líneas transgénicas con el gen <i>ara h 2</i> silenciado .....	41
<b>Figura 3.7:</b> SDS-page y Western blot de las líneas transgénicas obtenidas.....	44
<b>Figura 3.8:</b> Secuencia de nucleótidos alineadas.....	46
<b>Figura 3.9:</b> Inmunodetección (“IgE binding”) de las proteínas Ara h 2 y Ara h 6 en las tres líneas transgénicas obtenidas.....	49
<b>Figura 3.10:</b> Bio-ensayo con ratones. Inducción de anafilaxia sistémica en ratones sensibilizados oralmente con proteínas de maní .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2.4 D:** ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- 2D-DIGE:** Gel en dos Dimensiones
- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- ANA:** ácido  $\alpha$ -naftalenacético
- ANRds:** Ácido Ribonucleico de doble cadena
- ANRm:** Ácido Ribonucleico mensajero
- ANRsi:** Ácido Ribonucleico pequeño de interferencia
- ARN:** Ácido Ribonucleico
- ARNi:** Ácido Ribonucleico de interferencia
- BA:** 6-bencilaminopurina
- cADN:** Ácido Desoxirribonucleico complementario
- CTAB:** bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- GFP:** Proteína Verde Fluorescente (Green Fluorescent Protein)
- GUS:** beta-glucuronidasa
- IgE:** Inmunoglobulinas E
- kb:** kilobases
- kDa:** kilodalton
- KIN:** 6-Furfurylaminopurina
- M:** molar
- MS0:** Medio Basal Murashige and Skoog (1962)
- NaOH:** Hidróxido de Sodio
- PBS-T:** solución buffer fosfato con detergente tween-20
- PCR:** Reacción en Cadena de Polimerasa
- pI:** punto isoeléctrico
- Picloram:** ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
- PVDF:** Poli-vinil-denedi-floride
- qq/ha:** quintales por hectárea
- RFA:** Radiación Fotosintéticamente Activa
- RISC:** Complejo de Silenciamiento inducido por Ácido Ribonucleico (RNA Induced Silencing Complex)
- SDS:** dodecil-sulfato de sodio
- Semillas T1, T2, Tn:** número de generación transgénica establecida de semillas
- t:** toneladas
- T-ADN:** Ácido Desoxirribonucleico de transferencia
- TDZ:** thidiazuron
- $\mu$ g:** microgramos

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### EL CULTIVO DEL MANÍ Y SU IMPORTANCIA REGIONAL

El género *Arachis* de la familia *Fabaceae* es endémico de Sudamérica. Se han descrito dentro del mismo unas 80 especies de acuerdo a criterios morfológicos y sexuales (Bertioli *et al.*, 2011). *Arachis hypogaea*, clasificada por Linneo en 1753 comúnmente conocida como maní, cacahuete, amendoim, entre otros, es una de las especies más importante desde el punto de vista de su valor nutricional, debido principalmente al elevado contenido de aceite (42-52%) y proteínas (25-32%) de sus semillas (Roca & Mroginsky, 1993).

El maní es un cultivo estival de crecimiento indeterminado que se siembra en el Hemisferio Sur en los meses de setiembre a enero. Es una planta herbácea con hojas tetrafoliadas y de unos 45 cm de alto. Desarrolla flores amarillas cerca de la porción inferior del tallo. Las flores se autopolinizan, pierden sus pétalos y el ginóforo o “clavo” en cuyo ápice se encuentra la estructura del gineceo conteniendo el o los ovarios fertilizados, comienza a elongarse describiendo una trayectoria descendente. El fruto es una legumbre geotrópica positiva, lo cual significa que el ovario fecundado es introducido en el terreno donde se desarrollarán las vainas o “cajas”. Cada caja puede contener en su interior de 1 a 3 semillas. Murty *et al.* (1980) observaron la ocurrencia de cleistogamia por lo que la hibridación natural, es poco común pudiéndose observar un porcentaje de cruzamiento que oscila entre 0,75 y 2,50 %.

Este cultivo requiere suelos livianos, de textura franco arenosa, profundos con buen drenaje, libres de sales, lo que le permite un buen desarrollo del sistema radicular. Es poco tolerante al anegamiento. Es muy sensible a la falta de calcio y su déficit puede inhibir completamente la formación de frutos. El requerimiento de agua durante el ciclo vegetativo en la zona de producción argentina es de 500 a 600 mm, mientras que las

necesidades mínimas en ciertos ambientes varían entre 250 y 300 mm para las variedades precoces.

La temperatura óptima para todas las fases del ciclo vegetativo puede variar entre 21 y 27 C. A los 12 C el crecimiento de los órganos queda detenido y a más de 30 C, aumenta notablemente la transpiración y distintos órganos comienzan a deshidratarse. Es considerada una planta tipo C<sub>3</sub> aunque no se satura a intensidades lumínicas ligeramente inferiores a las producidas por la luz solar plena, lo que explica, su adaptación a las diferentes condiciones lumínicas de las regiones húmedas, subhúmedas y áridas.

El primer paso de la cosecha es el “arrancado” o descalce de las plantas y su posterior disposición sobre el terreno con el sistema radicular y la fructificación hacia arriba, lo cual permite un secado uniforme. Este momento de cosecha es difícil de determinar por su crecimiento indefinido y la fructificación continua, por lo que exige precisar un punto óptimo en cuanto a la cantidad de frutos maduros presentes, que maximice el rendimiento agronómico. Para determinarlo, generalmente se abren las vainas y se observa el color que predomina en la parte interior de la cáscara. Este color debe tender al pardo-negro para determinar al fruto como maduro. Al “arrancado” le sigue el descapotado, que implica la separación de la vaina del resto de la planta, para luego secar cápsulas, ventilar, limpiar y almacenar en lugares secos los frutos o vainas (Derka y Sánchez, 2006; Fernández y Giayetto, 2006).

En el último quinquenio, Argentina se ha consolidado como primer exportador mundial de maní para consumo directo o “maní confitería” situándose actualmente por sobre los tradicionales competidores, China y Estados Unidos. En el contexto de la producción nacional, Córdoba es la primera provincia productora con un aporte de más del 80% al total nacional, lo que la convierte actualmente en uno de los principales exportadores mundiales de maní. La cadena de valor del maní tiene gran relevancia socioeconómica por su gran impacto en la generación de empleo, y por los importantes efectos multiplicadores sobre el resto de la economía, tanto regional como nacional (Bongiovanni *et al.*, 2008). En los últimos cuarenta años, la producción total de maní ha sido oscilante, aunque los rendimientos han ido creciendo paulatinamente. En la campaña

2009/10, la superficie sembrada fue de 221.000 hectáreas en todo el país, con una producción de 610.000 t (28 qq/ha), lo que llevaría el valor bruto de la producción a más de 580 millones de dólares (López, 2011).

Argentina está exportando más de 600 mil toneladas por año en manufacturas de maní (maní confitería, maní blanchado, pasta y manteca de maní, aceites, harinas y pellets de maní) a más de 70 destinos (López, 2011). El mercado europeo es el principal demandante de las exportaciones locales exigiendo niveles de calidad elevados, principalmente estructurados sobre aspectos higiénico-sanitarios y fitosanitarios. En este escenario, las exportaciones argentinas tienen una clara ventaja de acceso respecto al maní proveniente de Asia y África por la frecuente presencia de aflatoxinas en productos de estos orígenes.

Actualmente, se cuenta con el primer producto de la Provincia de Córdoba lanzado al ruedo internacional, el “Córdoba Peanuts – Pure Delicatessen”. Este producto se obtuvo después de muchos años de trabajo conjunto entre la Cámara Argentina del Maní, Agencia ProCórdoba y Fundación Export-Ar, el cual se presentó en la mega feria internacional Snackex 2007, en la ciudad de Barcelona, España. La marca MANÍ DE CÓRDOBA obtuvo un sello de Calidad Total y una Identificación de Origen Certificada. Estos sellos garantizan un alimento de máxima pureza, sanidad total y cuya elaboración responde a las más estrictas normas de seguridad alimentaria como así también certifica atributos nutricionales y sensoriales particulares. Esta situación ventajosa para Argentina es la que le permite posicionarse claramente como el primer proveedor mundial de maní de alta calidad, profundizando su calificada inserción internacional y capitalizando los beneficios de una demanda internacional sostenida que se manifiesta en el factor precio (Bongiovanni *et al.*, 2008).

El maní es un alimento altamente nutritivo debido a su composición rica en proteínas, ácidos grasos saturados e insaturados, carbohidratos y fibras. Es una fuente importante de vitaminas E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, tiamina, niacina y minerales como cobre, manganeso, fósforo, hierro, magnesio, calcio, selenio y zinc. Se le atribuyen propiedades benéficas para la salud, como la de disminuir los niveles de colesterol en sangre y los

riesgos de enfermedades cardíacas debido a los contenidos de grasas mono-insaturadas. También, es una fuente considerable de ácido fólico, una vitamina hidrosoluble necesaria para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina. Esta vitamina se la considera indispensable para una mujer que desea quedar embarazada, puesto que se requiere niveles adecuados en el organismo antes de la concepción para prevenir defectos de nacimiento en el cerebro (anencefalia) y la columna vertebral (espinas bífidas) del bebé debido al mal cierre del tubo neuronal en los extremos cefálico y caudal, respectivamente. Contiene también fitoesteroles, compuestos que ayudan a disminuir el nivel de colesterol interfiriendo con su absorción a nivel intestinal y contribuyen a la protección del organismo contra el cáncer de colon, próstata y mamas. Posee además una fitoalexina, el resveratrol, que detenta propiedades antioxidantes y anti-cancerígenas que prolongan la longevidad de las células ([www.peanut-institute.org](http://www.peanut-institute.org)). Esto permite nutricionalmente, considerar al maní como un alimento rico y recomendable para la salud.

## **ALERGIAS CAUSADAS POR EL CONSUMO DE MANÍ**

Las alergias constituyen una enfermedad multifactorial y compleja, definida generalmente como una hipersensibilidad inmune adversa a sustancias ambientales inofensivas llamadas alérgenos. Éstos se distinguen por su habilidad para inducir respuestas inmunológicas específicas en individuos genéticamente predispuestos, mediante la producción de un elevado nivel de Inmunoglobulinas E (IgE). Éstas son una clase de anticuerpos que juegan un rol central en las alergias debido a su destreza en la unión de receptores específicos de mastocitos y en la activación de la síntesis y liberación de histaminas.

Las reacciones alérgicas más comunes incluyen eczemas, dermatitis atópicas, urticaria, asma, conjuntivitis, queratitis, sinusitis, vómitos, diarreas, y hasta síntomas más serios como anafilaxia donde se presentan dificultades para respirar, pérdida del conocimiento e incluso la muerte. Los alérgenos, luego de ser introducidos al sistema inmune en el humano, inician una serie de reacciones en cadena que clínicamente definen los síntomas de una alergia. Los síntomas respiratorios pueden efectivamente controlarse con drogas antialérgicas o terapias inmunológicas específicas. En el caso de las alergias

producidas por la ingesta de alimentos, no se cuenta hasta el momento con terapias establecidas y se pueden prevenir solo evitando el consumo del alimento alergénico (Singh and Bhalla, 2008), los que pueden producir trastornos nutricionales serios tanto en niños como adultos.

Las alergias se han convertido en un problema muy grave y complejo que afecta aproximadamente a un cuarto de la población mundial. Las producidas por los alimentos en general, afectan aproximadamente a un 6-8 % de los adolescentes con una tendencia creciente. Alrededor del 20 % de la población española es alérgica, aunque un gran número de los afectados ni siquiera lo sabe y en los últimos 10-15 años, la incidencia de las mismas se ha duplicado llegando a afectar a 2 de cada 10 personas. Estas circunstancias afectan seriamente la economía de cualquier país, estimándose un costo anual en Europa de unos 45 mil millones de Euros.

Más difícil de cuantificar es el desmejoramiento en la calidad de vida no solo del paciente sino de la familia que lo rodea. Las alergias producidas por la leche y el huevo son generalmente superadas por los niños al alcanzar cierta edad, pero en el caso de las originadas por nueces o pescado no ocurre lo mismo e inclusive se cuenta con síntomas más riesgosos en los adultos. A esto se le suma las diferentes clases de alergias existentes provocadas por un grupo aún más diverso de causas, lo cual requiere de tratamientos intensivos enfocados al caso en particular. No hay por el momento una solución simple a este inconveniente, a lo cual se le suma la falta en la generación de conocimientos adicionales por parte de los investigadores tanto del área social como del científico, para poder definir estrategias multidisciplinarias y hacer frente a largo plazo de estas dolencias (Gilissen *et al.*, 2005b).

En el caso particular del maní, se lo considera uno de los principales causantes de alergias en más de un 8% de los niños menores de 4 años en los Estados Unidos y de un 2% de la población mayor de 10 años. Se estima que tanto el maní como otras nueces son responsables del 80% de las 30.000 reacciones anafilácticas que se registran anualmente en los departamentos de emergencia de ese país, dentro de las cuales 200 son fatales (Burks, 2003). En Inglaterra, son informados uno de cada 200 casos de alergias debido a



maní y esta sensibilización se ha incrementado de un 1.1% a un 3.3%, desde el año 1994 al 1996. En un estudio realizado a 7.768 niños de una escuela primaria en Montreal, Canadá, el 1.5% resultó alérgico a maní. En un grupo de 580 pacientes en Francia con antecedentes de alergia a algún alimento, 60 presentaron reacciones severas y hasta fatales, y un 37% fueron sensibles a maní (Roy *et al.*, 1999; Sicherer *et al.*, 2003). En Australia, un 1% de la población se ve afectada a este tipo de alergias pero lo más alarmante es que el 20% no supera esta afección sino que se transforma en una dolencia de por vida; de esta población afectada más del 2% son niños ([www.pca.com.au](http://www.pca.com.au)).

Las alergias son ocasionadas por proteínas y a pesar de que los alimentos contienen millones de ellas solo algunas han sido documentadas como alérgenos (Herman *et al.*, 2003). Un grupo importante de proteínas producidas por las plantas son las relacionadas con la patogenicidad (PRs), que se vinculan con las respuestas específicas inducidas por infecciones originadas por hongos, bacterias o virus, o por factores ambientales desfavorables. Estas proteínas han sido calificadas dentro de 14 familias y se las relacionan a un complejo de resistencia de la planta frente a factores bióticos y/o abióticos adversos (Breiteneder and Ebner, 2001).

Las semillas no solo son un órgano de propagación y dispersión sino también el tejido vegetal más cosechado por el hombre. La cantidad de proteína presente en las semillas varía, sobre la base del peso seco, desde un 10% (en cereales) a un 40% (en ciertas legumbres y oleaginosas), las que constituyen una de las fuentes de proteína más importantes. En general, las proteínas presentes en las semillas maduras controlan funciones metabólicas, estructurales y un grupo considerable de ellas, sirven como fuente de aminoácidos que serán utilizados durante la germinación y el desarrollo de la plántula (Shewry *et al.*, 1995).

En maní, la concentración proteica es significativa y variable de acuerdo al proceso formativo de la semilla. Estudios realizados por Basha (1988) revelaron que la concentración proteica se incrementa gradualmente a medida que la semilla madura y luego disminuye debido a la disociación en estructuras menores, que sirven de fuente de aminoácidos necesarios para desencadenar el proceso de la germinación. Esto pone de

manifiesto la importancia que tienen las proteínas como sustancias de reserva en la semilla, como indicadores de procesos metabólicos pasivos o activos, y también, como parte del complejo de defensa frente a factores adversos.

La ingesta de maní por parte de una persona alérgica puede producir reacciones con síntomas como hinchazón de labios y lengua, picazón, erupción, asma, dolor abdominal, vómitos, pérdida del conocimiento hasta cuadros sistémicos que inducen shock anafilácticos los cuales pueden provocar la muerte (Pham and Rudner, 2000). Estas reacciones ocurren típicamente pocos minutos después de la ingestión. Dosis tan pequeñas como 100 µg de proteínas de maní son suficientes para provocar estos síntomas indicando que trazas de maní ingeridas fortuitamente pueden poner en riesgo la vida de un paciente (Hourihane *et al.*, 1997). La hipersensibilización a maní usualmente comienza en etapas tempranas de la niñez y en general persisten a través de toda la vida, con un pequeño porcentaje de jóvenes que desarrollan tolerancia (Kleber-Janke *et al.*, 1999; Carr, 2005). El uso más frecuente de maní y sus derivados en diferentes alimentos han sido la causa de ingestas accidentales casi inevitables. En un estudio realizado en los Estados Unidos en un periodo de 5 años, se pudo observar que más del 50% de los pacientes alérgicos a maní experimentan al menos una ingesta del tipo accidental (Sicherer *et al.*, 2003).

Las semillas de maní contienen 11 proteínas reconocidas y catalogadas como alergénicas, Ara h 1 – Ara h 11. La nomenclatura que se utiliza para denominar a los alergénicos consiste en las tres primeras letras del género/especie como es el caso de la primera proteína aislada de maní (*Arachis hypogaea*) denominada **Ara h 1**. Se han realizado estudios para determinar la naturaleza de los múltiples alérgenos en maní mediante el análisis de diferentes variedades sembradas en el mundo y se demostró que la proporción de proteínas alérgicas provenientes de los cotiledones no varía significativamente a lo largo de las distintas variedades estudiadas (Taylor *et al.*, 1981).

Las proteínas Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3, las cuales actúan como aminoácidos de reserva dentro de la semilla, resultaron ser las más alergénicas en maní. Ara h 1 es una glicoproteína de 63.5 kD la cual presenta homología con la familia de las vicilinas, proteínas de reserva en las semillas de las legumbres. Análisis de niveles de transcripción

mediante Northern blot indicaron que los transcritos de *ara h 1* de 2.3 kb son abundantes en cotiledones maduros de maní (Burks *et al.*, 1991). Se identificaron 23 diferentes epítomos lineares de IgE dentro de los cuales, 4 son inmunodominantes y son reconocidos por más del 80% de los pacientes alérgicos a maní. Ara h 1 posee una estructura de homotrímero muy estable, donde los epítomos se insertan formando un *cluster* o conglomerado lo cual podría justificar la extrema alergenicidad exhibida por esta molécula (Burks *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2007).

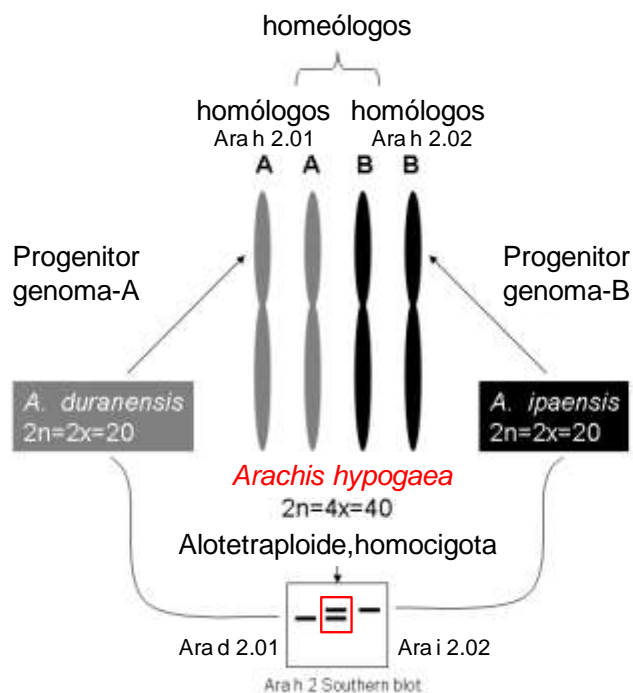
Ara h 2 es una proteína conglutina perteneciente a la familia de las prolaminas, resistente al calor y a la digestión, con un punto isoeléctrico de 5.2 (Koppelman *et al.*, 2004). En la planta, Ara h 2 es una importante fuente de aminoácidos al momento de la germinación (Breiteneder and Radauer, 2004). Esta proteína tiene la propiedad de inhibir a la tripsina, enzima que actúa en la degradación proteica. Al mismo tiempo, Ara h 2 protege a Ara h 1 de la acción degradadora de la tripsina. Estudios sobre la estructura secundaria de esta proteína permitieron sugerir que presenta una extraordinaria estabilidad la cual se debe a los doble enlaces disulfuro compuestos principalmente por hélices- $\alpha$  y ocasionales estructuras en formas de lazos, las cuales pueden ser levemente alteradas como por ejemplo, por calor (tostado) sin modificar su función (Maleki *et al.*, 2003).

Ara h 3 fue, en primera instancia, identificada como una proteína de 14 kD pero luego de la caracterización a nivel molecular, se estableció que su peso molecular es de aproximadamente 60 kD. Esta proteína presenta homología de secuencia con la glicina, proteína de almacenamiento en las legumbres, que funciona como fuente de nitrógeno durante el desarrollo de la planta (Kang *et al.*, 2007). Las inmunoglobulinas del suero de pacientes sensibilizados con maní reconocen a esta proteína en más del 45% de los casos (Xiang *et al.*, 2002).

Chatel *et al.* (2003) mediante análisis de espectrometría de masa, determinaron que Ara h 2 presenta dos isoformas de 16.670 y 18.050 Da asignadas a Ara h 2.01 y Ara h 2.02, respectivamente. La diferencia en peso molecular es debida a una inserción extra de 12 aminoácidos en la posición 75 que posee Ara h 2.02. En esta inserción se ubica una tercera copia de uno de los mayores epítomos inmunogénicos lineares de unión a IgE, el

DPYSPS, el cual está presente dos veces en la secuencia de Ara h 2 publicada originariamente (Genbank L77197). Se han identificado 10 epítomos de unión a IgE en Ara h 2, tres de los cuales contienen la secuencia de aminoácidos DPYSPS, la cual es necesaria para la unión de las inmunoglobulinas (Chatel *et al.*, 2003).

El maní cultivado, *Arachis hypogaea* L., es un alotetraploide ( $2n=4x=40$ ) con una constitución genómica AABB. Si bien el origen de la especie ha dado lugar a muchos debates, actualmente hay un consenso generalizado de que es producto de un cruzamiento entre dos especies silvestres diploides sudamericanas *Arachis duranensis*, donante del genoma A, y *Arachis ipaensis*, donante del genoma B (Smartt *et al.*, 1978; Seijo *et al.*, 2004). En base a comparaciones genómicas, a la caracterización de secuencias de cADN (Kleber-Janke *et al.*, 1999, Chatel *et al.*, 2003, Ramos *et al.*, 2006) y al análisis de Southern blot se identificaron dos genes que codifican las dos isoformas de *ara h 2*, denominadas *ara h 2.01* y *ara h 2.02*. Estos genes demostraron poseer una similitud de secuencia del 100% con sus ancestros silvestres denominados *ara d 2.01* y *ara i 2.02* respectivamente. De esta manera, en *A. hypogaea*, *ara h 2.01* fue asignada al subgenoma A, y la otra copia codificando *ara h 2.02*, lo fue al subgenoma B. Estos resultados en conjunto han permitido determinar que los genes que codifican estas isoformas son genes homeólogos que poseen una homología de secuencia del 91,9% y representan a los genes ortólogos provenientes de cada uno de sus ancestros diploides (Figura 1.1) (Ozias-Akins *et al.*, 2009).



**Figura 1.1: Esquema de posibles progenitores en maní.** Los cromosomas representan 1 de los 10 pares encontrados en el maní alotetraploide cultivado. Los dos pares cromosómicos son homólogos del subgenoma A y B, y estos son a su vez, homeólogos entre sí (Ramos *et al.*, 2006). Los dos alelos de Ara h 2 en el genoma homólogo A son idénticos entre ellos (homocigotas) como ocurre con los otros dos en el genoma homólogo B. Sin embargo, los genes de Ara h 2 en los genomas A y B dentro del cultivar Georgia Green difieren en 36 pb (inserción/delección) y en 8 nucleótidos polimórficos. Estas 36 pb en Ara h 2.02 son el resultado de una adición de 12 aminoácidos y de 2 de los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) que resultaron de una sustitución conservadora de aminoácidos (Ozias-Akins *et al.*, 2009).

Estudios efectuados por Koppelman *et al.* (2004) con un grupo de pacientes sometidos a una serie de ensayos *in vitro* y *in vivo* pudieron demostrar que Ara h 2 es una de las proteínas más alergénicas en maní. Estos resultados fueron corroborados por los de Palmer *et al.* (2005) quienes estudiaron esta misma proteína desde un punto de vista funcional demostrando que es un potente alergénico ya que puede activar células sensibilizadas a concentraciones muy bajas, demostrando así que es mucho más peligrosa que Ara h 1. La diferencia encontrada entre Ara h 2 con respecto a otros alergénicos presentes en maní se debe quizás a que los epítomos inmunodominantes que se unen a las IgE son muy resistentes a la digestión enzimática (Sen *et al.*, 2002). A la vez, estos epítomos son muy reactivos ya que se requieren en pequeñas cantidades para producir una reacción alérgica (Hourihane *et al.*, 1997). Esta proteína es una de las que clínicamente

produce más reacciones ya que más del 90% de los pacientes alérgicos a maní posee IgE que reconocen a esta proteína en particular (Burks *et al.* 1995).

Los alérgenos del maní son producidos mediante los mecanismos normales de síntesis proteica, en los que el ADN es transcrito en ARN, el cual será traducido en una proteína. Cuando el maní es ingerido, las proteínas alergénicas son reconocidas por los antígenos de los individuos sensibles a maní. Por ejemplo, los anticuerpos de Ara h 2 reconocen los sitios específicos del antígeno lo que dispara una cadena de eventos que consisten, entre otros, en la liberación de una serie de agentes activos incluidos histamínicos y leucotrienos. Estos compuestos producidos alrededor de los tejidos son los que causan las reacciones alérgicas locales o sistémicas (Dodo *et al.*, 2005).

## **LA BIOTECNOLOGÍA EN EL MEJORAMIENTO VEGETAL**

Gregor Mendel, monje y científico austriaco del siglo XIX, sentó los fundamentos de la genética moderna al determinar que partículas invisibles son las portadoras de los rasgos o atributos que se transmiten de generación en generación. En 1953, Watson y Crick establecieron la estructura del código genético contenido en todas las células vivas: el ácido desoxirribonucleico “ADN”. Posteriormente, se continuó con investigaciones que abordaron temas sobre los mecanismos de transferencia de una porción específica de ADN desde un organismo a otro para otorgarle un nuevo rasgo diferencial al receptor. Todos estos nuevos conocimientos dieron lugar a lo que conocemos hoy como Biotecnología.

Si bien muchas de las técnicas empleadas no son nuevas, la biotecnología vegetal permite la transferencia de genes deseados de un individuo o especie a otra de manera precisa y controlada, dentro de un período de tiempo relativamente breve (Mackey y Santerre, 2000). El uso de estas técnicas ha tenido importantes consecuencias tanto en la agricultura como en el medio ambiente y la economía global. Estas aplicaciones prometen grandes beneficios no solo en el manejo del cultivo sino también en la mejora de la calidad del producto ofrecido lo que beneficia directamente al consumidor, tales como mayores niveles de vitaminas en frutas y verduras, mejor composición de ácidos grasos y hasta incluso la reducción del nivel de alérgenos en los alimentos (Taylor and Hefle, 2001).

La Biotecnología emplea un compendio de técnicas que permiten producir alimentos con nuevas características. Para esto, en primera instancia, se deben identificar el o los genes responsables del atributo deseado para poder extraerlo del organismo donante. Luego se le adicionan otras secuencias de ADN complementarias, que permiten su expresión en el organismo receptor y toda esta construcción es introducida en el genoma de una célula receptora donde se expresará y transmitirá a la descendencia. Estas células son cultivadas y regeneradas bajo condiciones controladas de laboratorio hasta la obtención de una planta ideal, la cual poseerá los rasgos de la especie o variedad original con un nuevo atributo de expresión estable y efectiva.

Actualmente, debido a la relevancia que ha adquirido la obtención de variedades transgénicas con atributos que les otorguen una mejor calidad, un mayor tiempo de conservación post-cosecha e inclusive que permitan un menor uso de agroquímicos por la inducción de resistencias a insectos, enfermedades y herbicidas (Roca y Mroginski, 1993), ha convertido a la manipulación genética en una herramienta valiosa y eficaz para la introducción de genes de interés en distintas especies (Ozias-Akins and Gill, 2001). No obstante, para lograr plantas transformadas con buenas características agronómicas, es necesario contar con metodologías eficientes para regenerar plantas completas a partir de un explante con la porción de genoma foráneo que se exprese (Baker and Wetzstein, 1992; Ozias-Akins *et al.*, 1992).

## **EL SILENCIAMIENTO GÉNICO EN PLANTAS**

Los métodos para transferir genes a plantas ofrecen la posibilidad de introducir y transmitir genes de interés de diferente procedencia, en forma específica, a plantas receptoras, sin alterar otras características de las mismas. El bombardeo de micro-partículas es un proceso en el cual, ADN adherido sobre micro-proyectiles es acelerado por la fuerza de un gas comprimido. Las moléculas biológicas aceleradas a alta velocidad son dirigidas hacia el blanco y debido a la aceleración, los micro-proyectiles atraviesan la barrera de la pared y membrana celular, introduciendo en el interior de la célula el ácido nucleico que portan.

Esta metodología tiene muchas ventajas ya que posibilita la utilización de una gran variedad de células y tejidos, es operativamente sencilla, la construcción del plásmido es simple, no se necesita en gran cantidad, y no se cuenta con contaminantes como ocurre en las transformaciones mediadas por *Agrobacterium* (Echenique & Spangenberg, 1999). Este bombardeo produce ruptura del ADN genómico, lo que permite que, en el proceso de reparación, se incorpore azarosamente, el ADN foráneo presente en el citoplasma mediante una recombinación inespecífica. Una vez integrado, el transgen se transcribe siguiendo el ciclo del flujo de información genética que conceptualiza el dogma central de la biología molecular, permitiendo manipular la traducción de las proteínas.

El ARN de interferencia (ARN $i$ ) es una de las herramientas más novedosas utilizadas para el silenciamiento de genes de manera rápida, sencilla y precisa debido a la especificidad de su secuencia. Este proceso ocurre naturalmente en las células para silenciar transposones, genes repetidos y posibles virus. Este fenómeno fue descubierto en *Caenorhabditis elegans* mediante la inyección de ARN de doble cadena (ARN $ds$ ) dentro del parásito, lo cual producía el inicio de una degradación específica del ARN mensajero (ARN $m$ ) que contenía la misma secuencia del ARN $ds$  introducido (Bonetta, 2004).

El proceso descrito genera pequeños fragmentos de ARN de unos 21 a 26 nucleótidos, los cuales actúan específicamente sobre el bloqueo y/o reducción de la expresión de aquellos genes objeto de estudio (Parrish *et al.*, 2000; Tijsterman *et al.*, 2002). Esta metodología ha sido utilizada en un gran rango de organismos modelos principalmente para dilucidar la función de determinados genes. Las ventajas que ofrece esta herramienta son numerosas, destacándose su carácter dominante lo que permite observar los fenotipos resultantes en una generación T $_1$ ; la posibilidad de control génico en tejidos específicos y la reducción en paralelo tanto de genes principales como redundantes; además de posibilitar su uso en gran escala dado que se pueden emplear millones de construcciones de ARN $i$  para realizar un chequeo amplio y simultáneo de la función de un gen (Small, 2007).

La mayor dificultad que se debe afrontar es la falta de especificidad, por ejemplo de los ARN $si$  (Small Interfering RNA) y el carácter transitivo de su silenciamiento, ya que



el ARNi contra un gen específico se disemina sobre secuencias con las cuales presenta homología, produciendo el silenciamiento de genes semejantes. Sin embargo, esta herramienta tiene un importante valor en los proyectos donde se requiere la reducción de la expresión o el silenciamiento génico, como fue el caso del aceite de algodón al cual se le eliminó la toxina gossypol, un aldehído polifenólico que permeabiliza las células y actúa como un inhibidor para varias enzimas deshidrogenasas, afectando principalmente al corazón (Sunilkumar *et al.*, 2006).

Las moléculas de ARNi pueden ser *microARN* o *ARNsi* según su procedencia. Los *microARN* son codificados naturalmente por el genoma de la célula, en cambio, los *ARNsi* son fragmentos pequeños generados mediante el mecanismo de silenciamiento génico, los cuales poseen homología de secuencia con el ARN mensajero (*ARNm*) que les dio origen. El proceso de silenciamiento génico por ARNi es complejo y se basa en la complementariedad de las bases entre la molécula de *ARNsi* y la molécula de *ARNm*. Si esta complementariedad de bases es perfecta se producirá la hidrólisis o clivaje del *ARNm*, mientras que si no lo es, simplemente se inhibirá la traducción al impedir la unión del *ARNm* con el ribosoma.

Uno de los mecanismos de silenciamiento génico mejor caracterizado es el que se inicia con la incorporación a la célula de una molécula larga de ARN de doble cadena, conocida como *ARNds* (Double-Stranded RNA). Esta molécula puede ser introducida artificialmente en el citoplasma y ser reconocida por la enzima Dicer o ribonucleasa III encargada de fragmentar el *ARNm* en pequeñas moléculas de cadena doble, llamadas *ARNsi*. Cada una de estas moléculas es incorporada a un complejo multi-proteínico conocido como RISC (RNA Induced Silencing Complex). Este complejo separa las dos hebras de la molécula de *ARNsi* quedando una de las hebras incorporada en el complejo. La hebra que queda en el complejo es usada como matriz para reconocer a la molécula de *ARNm* que presenta homología de secuencia con la misma. Si la complementariedad con la molécula del mensajero es perfecta, el complejo RISC lo degrada y los fragmentos generados sirven para amplificar la señal de marcado y destrucción. Si la complementariedad no es perfecta, el complejo RISC solamente evita su unión al ribosoma. En ambos casos, se produce el silenciamiento post-transcripción del gen

complementario a la secuencia de la molécula de ARN<sup>si</sup>. También es posible que el complejo RISC unido a la hebra matriz del ARN<sup>si</sup> pueda llevar a cabo el silenciamiento génico a nivel del núcleo, ya que puede entrar al mismo y reconocer secuencias específicas del genoma pudiendo alterar el patrón de metilación del ADN y de las histonas provocando el silenciamiento del gen antes de que llegue incluso a transcribirse (Silenciamiento Génico a Nivel de Transcripción) (Grennan, 2005).

## **REGENERACIÓN DE PLANTAS POR CULTIVO DE TEJIDOS**

La teoría propuesta por el botánico Gottlieb Haberlandt, en el año 1902, define a la totipotencia como la capacidad que tiene toda célula vegetal de dividirse y diferenciarse en cualquier otro tipo celular para formar una planta completa. Esta hipótesis dio lugar a una nueva alternativa de propagación, la del cultivo de tejidos *in vitro*, que comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido u órgano) se cultiva en un medio aséptico de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. La regeneración de plantas *in vitro* puede darse directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la embriogénesis somática o de la organogénesis (Litz and Jarret, 1993).

La embriogénesis somática permite la inducción de embriones a partir de callos. Se ha definido como embriones somáticos, asexuales o adventicios a los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Estos embriones son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno; estas estructuras deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales (Litz and Jarret, 1993). Por otro lado, la organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir directamente de los explantes o a partir de callos. El término organogénesis *de novo* en el cultivo de tejidos, se refiere a la diferenciación de órganos dentro del explante (Thorpe, 1980).

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática ha tenido ciertas ventajas por sobre la organogénesis, debido a que en ésta los embriones poseen ambos meristemas,

el radicular y el foliar. Para el desarrollo de embriones somáticos es necesario en primera instancia inducir la formación de callo a partir del explante original, cultivándolo en un medio inicial con auxinas del tipo 2,4 D o picloram, y en oscuridad (Baker and Wetzstein, 1995). El incremento en la concentración de auxinas, dentro de los rangos fisiológicos, aumenta el número de embriones formados por explante, sin embargo, la probabilidad de que estos embriones sean normales, decrece a medida que esta concentración se incrementa (McKently, 1991a).

En maní, plantas enteras pueden regenerarse por cultivo de tejidos vía organogénesis a partir de explantes obtenidos de cotiledones, hojas inmaduras y otros (McKently *et al.*, 1991b; Cheng *et al.*, 1992; Faustinelli *et al.*, 2009), o vía embriogénesis somática desde embriones cigóticos generados a partir de explantes idénticos (Hazra *et al.*, 1989; Ozias-Akins, 1989; Baker & Wetzstein, 1992).

## **EVALUACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS**

Una vez realizada la introducción de ADN foráneo en las células vegetales, se continúa con un análisis molecular y bioquímico del material transformado. Se considera que todo tejido, yema o brote que sobrevive en un medio de cultivo selectivo es transgénico porque tiene incorporado una construcción que contiene un gen de selección (generalmente una resistencia a antibiótico) y por consiguiente, el gen de interés. Sin embargo, hay metodologías que permiten confirmar molecularmente la presencia del transgen. Uno de ellos es el análisis por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que determina la presencia o ausencia de una secuencia de ADN mediante la amplificación a través de cebadores (primers) diseñados específicamente para la misma. Un resultado positivo indica que en la muestra existe el transgen introducido aunque no se confirma su funcionalidad. Para ello, métodos como el de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-page) y Western blotting son usados para analizar la expresión del transgen mediante la detección de proteínas sintetizadas, comparándolas con extractos de semillas control (no transgénicas).

Estas técnicas permiten revelar la presencia o ausencia de una proteína específica, y también precisar el tamaño y la cantidad presente de la misma. El análisis proteómico comparativo en dos dimensiones Gel/Espectrofotómetro de Masa permite ver equivalencias sustanciales en la composición proteica de una semilla transgénica en paralelo con una no transgénica, lo que facilita visualizar la ausencia o reducción de las proteínas objeto de silenciamiento y la cuantificación de su expresión.

Para evaluar la complejidad de la inserción y el número de copias del transgen logrados se emplea la técnica de Southern Blot, prueba que requiere hibridar membranas con sondas diseñadas específicamente. La evaluación del potencial alergénico de las semillas obtenidas puede obtenerse mediante inmunodetección de proteínas en el suero o plasma de humanos como así también, mediante bioensayos, ya que, bajo condiciones controladas de laboratorio, permiten evaluar cuali y cuantitativamente el efecto que un agente determinado produce sobre organismos vivos, cuidadosamente seleccionados. Esto permite diagnosticar la eficacia del gen introducido, la funcionalidad del mismo, lo que confiere al individuo transformado el atributo incorporado.

## **DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA**

En Argentina, el consumo de maní es errático y su destino principal es la elaboración de aceites mezclas, seguido por el uso como saborizante en la industria de panificación y confitería. En el caso de la manteca de maní, su consumo es irrelevante. La industria de las golosinas con chocolate utiliza un sucedáneo de la manteca que corresponde a una pasta de maní tostado en emulsión con un aceite hidrogenado. Estos detalles indican que en Argentina el problema de alergias al maní no entra dentro del grupo de enfermedades crónicas, por lo que la originalidad de este proyecto se sustenta sobre la gran capacidad exportadora con la que cuenta el país. Sin embargo, ante una oferta decreciente de los principales competidores en el mercado internacional, EE.UU. y China, Argentina deja una demanda insatisfecha. El país podría aumentar sus exportaciones no solo en volumen sino también en calidad de producto ofrecido. Apuntar al desarrollo de nuevos genotipos que satisfagan las demandas de mercados como el de Estados Unidos y Canadá, mejoraría la competitividad de Argentina como país exportador,

ya que ofrecería opciones para nichos de mercados particulares en países donde el consumo de maní es generalizado y donde desafortunadamente, no hay tratamiento para este tipo de alergias salvo el de evitar el consumo.

En base a estos antecedentes se propone la siguiente hipótesis:

## **HIPÓTESIS**

- ✚ El silenciamiento del gen *ara h 2*, uno de los más alergénicos en *Arachis hypogaea* L., permitiría obtener una variedad de maní transgénica con menor potencial alergénico.

## **OBJETIVO GENERAL**

- ✚ Obtener plantas de maní transgénicas con un potencial alergénico menor mediante el silenciamiento de la proteína Ara h 2.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 - Construir un casete de transformación usando un fragmento del gen de la proteína Ara h 2 como transgen.
- 2 - Transformar embriones somáticos de maní variedad Georgia Green mediante biobalística.
- 3 - Regenerar vía embriogénesis somática los embriones transformados para obtener plantas completas.
- 4 - Demostrar mediante análisis moleculares el carácter transgénico de las plantas logradas.
- 5 - Evaluar el potencial alergénico de las semillas obtenidas de las plantas transgénicas mediante ensayos biológicos.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### CONSTRUCCIÓN DE UN CASETE DE TRANSFORMACIÓN USANDO UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA PROTEÍNA Ara h 2 COMO TRANSGEN.

El casete utilizado para transformar embriones de maní se diseñó con un fragmento del gen de la proteína Ara h 2 como transgen, el cual una vez integrado al genoma de la planta permitiría producir un silenciamiento génico del tipo post-transcripcional de la proteína objetivo.

Un fragmento de ADN que corresponde al gen *ara h 2* se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) a partir del clon cADN *ara h 2* con los cebadores AGCGGATAACAATTTACACAGGA (#222) y CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC (#221) diseñados como parte de este trabajo, con el software Vector NTI Suite 8 (Invitrogen). El producto se digirió con la enzima HaeIII. Siguiendo el mismo procedimiento, se amplificó el inserto de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) a partir del plásmido pEGFP con los cebadores AAGGGCGAGGAGCTGTTCAC (#133) y TTCTGCTGGTAGTGGTCCGC (#134). El producto también se digirió con la enzima de restricción HaeIII. Ambos productos de digestión fueron ligados obteniendo una mezcla de fragmentos que se utilizó como matriz en una reacción de PCR con los cebadores CGGAATTCCGTACCCCGACCACATGAAGCA (#306) y GGGTACCCGCACTGTTGAGGCAAGTT (#309). Esta amplificación fue digerida con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI, para luego ser purificada mediante una precipitación con etanol. El pellet se disolvió nuevamente y se ligó con el plásmido vector pBlueScript II (SK+) digerido con las mismas enzimas, para luego seguir con el proceso de transformación de las células competentes y obtener así las colonias transformadas mediante selección en placas conteniendo el antibiótico ampicilina. El constructo conteniendo el fragmento *ara h2*-GFP se aisló mediante minipreparaciones, controlándose su calidad por digestión.

El vector utilizado para lograr la construcción objetivo fue, el pFGC1008 (Genbank accn AY310333) obtenido del Centro de Fuentes Biológicas de *Arabidopsis* de la Universidad del Estado de Ohio, USA (Stock #CD3-446). Este vector tiene su base en el binario pCAMBIA1200 el cual posee el gen de resistencia a Cloramfenicol para su selección en bacterias y el gen pMas1' de resistencia a higromicina como gen de selección en planta. Contiene el casete del promotor CaMV 35S junto con el terminador OCS (Octopina sintetasa), el cual es lo suficientemente fuerte como para controlar la transcripción de una cantidad suficiente de ARN de interferencia. A su vez, permite el clonado de fragmentos invertidos a través de dos sitios únicos de reconocimiento por enzimas de restricción, que flanquean un fragmento del gen que codifica la producción de beta-glucuronidasa (GUS) de 335 pb. Esta porción de GUS es la que permite la formación del rulo (hairpin) durante la formación de ARN. La elección de este vector binario se debió a su uso en la producción de mutantes por ARN interferasa. Esto permite el uso de estrategias de clonado basado en la inclusión de dos sitios de clivaje con dos enzimas de restricción cada uno. La construcción se realizó a través de dos procesos de clonado.

En el primero, se amplificó por PCR el fragmento *ara h 2* ligado a GFP, a partir de la colonia obtenida previamente (pBS - *ara h<sub>2</sub>* - GFP), con los cebadores CGACTAGTGGCGCGCCTACCCCGACCACATGAAGCA (#671) y CCTTAATTAACGATTTAAATGCGCACTGTTGAGGCAAGTT (#672) diseñados oportunamente con el Software Vector NTI 8. Este fragmento se ligó al vector pFGC1008 en el sitio de restricción para las enzimas AscI y SmaI. En el segundo clonado, se utilizó este plásmido como templado para la segunda amplificación pero para obtener por PCR sólo el fragmento de *ara h 2* con los cebadores CGACTAGTGGCGCGCCTACCCCGACCACATGAAGCA (#671) y CGACTAGTAGTCAGGATCCGTAC (#693). Luego se insertó en el mismo vector pero en los sitios de corte para las enzimas de restricción PacI y SpeI. Este segundo fragmento ligado en una orientación opuesta con respecto al primero, produjo una repetición invertida separada por el fragmento GUS.



El ADN del plásmido fue aislado usando el kit Qiagen Plasmid Maxi/Midi (Qiagen, Valencia, CA) y cuantificado mediante un espectrofluorómetro (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit - Invitrogen P7589).

## **TRANSFORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE MANÍ VARIEDAD GEORGIA GREEN MEDIANTE BIOBALÍSTICA.**

En este proyecto, se utilizó el protocolo ya publicado en Ozias-Akins *et al.* (1993), donde se detallan las condiciones óptimas ajustadas para maní tanto para la regeneración *in vitro* vía embriogénesis somática como para la transformación genética vía biobalística. En este último, sólo se modificó la etapa de selección en medio líquido luego del bombardeo reemplazándola por una etapa de selección en medio sólido, ya que los resultados no se ven alterados y permite un ahorro en el tiempo de mantenimiento consumido.

Georgia Green es una de las variedades tipo runner de maní reconocidas en Estados Unidos por su alto rendimiento y resistencia al virus TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus). Embriones somáticos de esta variedad fueron obtenidos a partir de embriones cigóticos maduros sin la porción radicular (McKently *et al.*, 1991a). Para esto, la superficie de las semillas fue desinfectada con etanol 70% durante 3 minutos seguido por una inmersión en hipoclorito de sodio 2.5% con agitación durante 20 minutos. Posteriormente, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Los embriones somáticos fueron repicados cada 3-4 semanas en un medio de mantenimiento (MS #2) conteniendo sales y vitaminas de Murashige and Skoog (MS) (1962), 3 mg l<sup>-1</sup> de Picloram, 1 g l<sup>-1</sup> glutamina, 3% de sacarosa y 0.8% de agar (A1296, Sigma, St. Louis, MO). El pH fue ajustado a 5.8 antes de esterilizarse en autoclave a 121 C durante 20 minutos. La glutamina esterilizada por filtración fue adicionada al medio después de que se esterilizó. Todos los embriones se desarrollaron en condiciones de oscuridad a 26±2 C.

Los embriones somáticos de no más de 9 meses y que se encontraban en la fase activa de crecimiento se transformaron vía biobalística utilizando un acelerador de partículas PDS1000/helium-driven (Bio-Rad, Hercules, CA). Se realizaron un total de

siete bombardeos sobre seis platos por experimento, usando la construcción ara h 2 ARNi obtenida como resultado de la consecución del objetivo específico 2.1.

Previo al evento de transformación, los embriones fueron agrupados en un área de 2 cm de diámetro en el centro de una caja de Petri. Posteriormente, se los sometió a 2-3 horas de deshidratación con el fin de disminuir la presión de turgencia de las células y así, aumentar las probabilidades de supervivencia del tejido bombardeado.

Las condiciones de bombardeo empleadas fueron: *i*), la cámara de vacío se ajustó a 700 mm de mercurio; *ii*) los disparos se realizaron a una presión de gas de helio de 1800 psi; *iii*) el tejido objetivo se colocó a 5 cm por debajo de la malla de retención; *iv*) se utilizaron partículas de oro de 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro suspendidas en agua estéril desionizada ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ). Esta suspensión acuosa (50  $\mu\text{l}$ ) fue mezclada con 5  $\mu\text{l}$  de ADN ( $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  (2.5 M) y 20  $\mu\text{l}$  de espermidina (0.1 M). Esta suspensión fue agitada durante 2 minutos y precipitada a 10.000 rpm durante 10 segundos. El ADN adherido a las micropartículas de oro se lavó con etanol 100% para finalmente ser resuspendido mediante sonicación en 60  $\mu\text{l}$  de etanol 100%.

## **REGENERACIÓN VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE LOS EMBRIONES TRANSFORMADOS PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS COMPLETAS.**

A los 2-3 días del bombardeo, los embriones se repicaron cada 3-4 semanas en el medio de mantenimiento para la inducción de embriogénesis, al que se lo suplementó con  $20 \text{ mg l}^{-1}$  de higromicina (Sigma) para favorecer la regeneración selectiva de embriones transgénicos. Cuando el período de cultivo finalizó, aquellos embriones que mostraron nuevos crecimientos fueron seleccionados y transferidos a un medio MS basal conteniendo  $20 \text{ mg l}^{-1}$  de higromicina por otras 4 semanas. Cuando un embrión resistente fue recuperado, se lo identificó de acuerdo al siguiente sistema: Número de evento de transformación; Número de caja de Petri bombardeada; Número de aglomerados (“cluster” en inglés) resistente a higromicina; Número de planta primaria; por ejemplo: B3.2.1/8. Las designaciones T1 y T2 se refirieron al número de generación transgénica establecida de semillas.

Los embriones que mostraron un desarrollo normal del eje embrionario se transfirieron a unas cajas de cultivo con ventilación, conteniendo un medio MS de elongación al cual se le adicionó 0.5 mg l<sup>-1</sup> de kinetina (KIN) y 0.25 mg l<sup>-1</sup> de 6-benzylaminopurina (BA). Aquel brote que presentó elongación fue repicado a un medio MS de enraizamiento con el agregado de 0.1 mg l<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA). Toda plántula enraizada fue trasplantada a pequeñas macetas rellenas con una mezcla comercial de vermiculita, perlita y arena (Pro-Mix “BX”), y aclimatadas gradualmente a las condiciones de invernadero.

## **ANÁLISIS MOLECULARES PARA DEMOSTRAR EL CARÁCTER TRANSGÉNICO DE LAS PLANTAS LOGRADAS.**

### **ANÁLISIS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La extracción de ADN de las plantas regeneradas, se realizó de acuerdo a la metodología de Singit *et al.* (1997), a partir de aproximadamente 70 mg de hojas nuevas no expandidas. La ampliación de un fragmento de 790 pb se realizó mediante el uso de un cebador en sentido para GFP (CAA GGA CGA CGG CAA CTA CAA GA) y otro en antisentido para GUS (AGA ACA TTA CAT TGA CGC AGG TGA). Las condiciones de la ampliación fueron las siguientes: desnaturalización a 94 C por 5 min seguidos por 35 ciclos de 94 C por 30 s, 59.3 C por 30 s, 72 C por 60 s con una extensión de 7 min a 72 C y 4 C para conservar el producto hasta su recuperación. El resultado fue detectado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% disuelto en 1X TBE (0.089 M Tris, 0.089 M ácido bórico, 0.002 M EDTA, pH 8.2).

### **ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-Page) Y WESTERN BLOT**

SDS-page es un método de electroforesis en geles de poliacrilamida con el uso de dodecil-sulfato de sodio (SDS) que permite separar polipéptidos en base a su peso molecular y detectarlas por tinción con azul de Coomasie. El tamaño de los polipéptidos puede determinarse por comparación con marcadores de peso molecular conocido.

Western blotting analiza la expresión de un transgen centrado en la detección de las proteínas específicas involucradas. En este método, las proteínas se separan en primer

lugar, mediante SDS-page y luego son transferidas a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al plano del gel.

Semillas maduras de maní, de las clases marrón y negra de acuerdo al Peanut Profile Board para maní tipo Runner, fueron molidas con nitrógeno líquido (0,1 g) para extraer sus proteínas con una solución de 0.5 M sacarosa, 0.1% Ácido Ascórbico, 0.1% Cisteína-HCl, y 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 (Chen & Dickman, 2004). El sobrenadante obtenido se precipitó durante 15 min, a 14.000 rpm, a 4 °C y fue utilizado para chequear la concentración de proteínas totales usando el método de tinción de Bradford (Bradford, 1976). Una concentración de 10 µg de proteínas fue separada por electroforesis en geles duplicados de acrilamida al 12%. La intensidad de corriente se fijó en 50 Volteos durante los primeros 35 minutos y luego a 100 volteos durante 1 hora y media aproximadamente o hasta que el marcador de frente (azul de Bromofenol) migre la distancia adecuada. A uno de los geles se lo tiñó con una solución de Azul de Coomassie permitiendo visualizar el gradiente de polipéptidos de acuerdo a su peso molecular y al otro, se lo transfirió a una membrana Immun-Blot de PoliVinilDenediFloride (PVDF) de 0,2 µm de tamaño de poro (Bio-Rad #162-0174), a una intensidad de 30 volteos durante toda la noche. Estas membranas se colocaron en una solución buffer fosfato tween (PBS-T) con leche descremada al 5% a fin de bloquear los sitios libres de las membranas con proteínas de leche, dejándolo durante 30 minutos y con agitación. La detección se realizó incubando la membrana con los anticuerpos primarios policlonales anti-Ara h 2 disuelto en leche descremada (5%) en una concentración 1:8.000 v/v y en el caso de anti-Ara h 1, Ara h 3 y Ara h 6 al 1:5.000 v/v, en una solución de buffer PBS-T durante 1 hora, a temperatura ambiente. La segunda incubación se realizó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma Cat. #A9046) diluida 1:100.000 en una solución tampón de leche descremada al 2% disuelta en buffer PBS-T, durante 30 minutos. La detección se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit de ECL-plus (Amersham Cat. #RPN2132).

## **AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS, MARCADO CON “CyDye”, Y ELECTROFORESIS EN UN GEL DE DOS DIMENSIONES (“2D-DIGE”)**

El análisis proteómico comparativo en un gen de dos dimensiones y la identificación de las proteínas por espectrometría de masa permite observar equivalencias sustanciales en la composición proteica de una semilla transgénica en paralelo con una no transgénica, pudiendo visualizar la ausencia o reducción de la proteína Ara h 2 y la cuantificación de su expresión. Estos estudios fueron realizados en el laboratorio de la Dra. J. J. Thelen, del departamento de Bioquímica, Universidad de Missouri-Columbia, Estados Unidos.

Las proteínas totales fueron aisladas de cotiledones de maní transgénicos y no transgénicos (control) usando una extracción fenólica y una precipitación con metanol (Hajduch *et al.*, 2005). Después de resuspender el pellet proteico, se procedió a la cuantificación de las proteínas totales (kit EZQ - Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para realizar el Gel en dos Dimensiones (2D-DIGE), los pellets de proteína obtenidos fueron reconstituidos en un medio IEF (30 mM Tris HCl pH 8.5, 7 M urea, 2 M tiourea, 4% (p/v) detergente CHAPS: 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato) agitados delicadamente, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugo durante 15 minutos a 8.000 rpm para remover el material indisoluble. Se tomaron 50 µg de proteínas y fueron enrasadas a un volumen final de 10 µl con medio IEF. A cada muestra de proteína se le adicionó 1 µl de colorante fluorescente “CyDye” (200 pmol) y se lo incubó en hielo durante 30 minutos, en condiciones de oscuridad. Cada reacción se detuvo con 1 µl de Lisina (10mM) en hielo por otros 10 minutos, en oscuridad. Para lograr el focado Isoeléctrico (IEF), 50 µg de proteína fueron mezclados con igual volumen de 2x IEF Buffer (8 M urea, 130 mM ditiotreitól (DTT) y 4% (p/v) CHAPS). Se las incubó durante 10 minutos en hielo, para luego adicionarle 2.25 µl de IPG Buffer (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Finalmente se ajustó el volumen final con 450 µl de IEF Buffer. Para la preparación de los geles teñidos con Azul de Coomassie G-250 (CBB), los pellets de proteínas fueron resuspendidos en Buffer de extracción IEF (8 M urea, 2 M tiourea, 2% (p/v) CHAPS, 2% (v/v) Triton X-100, 50 mM DTT) mezclándolos suavemente. Para determinar el foco isoelectrico se tomó 1 mg de Proteínas Totales y se

las mezcló con 2.25 µl de analitos (Bio-Lyte) ajustando el volumen final a 450 µl de IEF Buffer. Se centrifugó durante 5 minutos a 11.000 rpm para remover restos de material insoluble. El pool de proteínas fue transferido dentro de una bandeja de IEF y un IPG (24 cm; Amersham Biosciences, Uppsala) fue colocado delicadamente sobre las muestras de proteínas para permitir la rehidratación durante una hora previa a la adición del aceite mineral. Esta bandeja IEF fue colocada dentro de la unidad de celdas proteicas IEF (Bio-Rad). La rehidratación activa (10 h a 50 V) fue realizada y directamente ligada a un protocolo de enfocado en 3 pasos (100 V por 100 Vh, 500 V por 500 Vh y 8000 V por 99 KWh). Tiras IPG fueron removidas desde estas bandejas, removido el aceite vegetal e incubadas en buffer SDS equilibrado (1,5 M Tris-HCl, 6M Urea, 30% v/v Glicerol, 5% p/v SDS) durante 15 min con 2% (p/v) ditiotreitól seguido por otros 15 min con 2,5% (p/v) de iodoacetato. Estas tiras fueron lavadas con buffer SDS de corrida (25 mM Tris, 0.192 M Gly y 0.1% p/v SDS) y colocadas sobre geles al 12 % de acrilamida. Las tiras fueron superpuestas con agarosa al 0,5 % p/v en buffer SDS de corrida. SDS page en 2 dimensiones fue realizado en una unidad de electroforesis Ettan Dalt 12 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por 2 W/gel durante 16 horas o hasta que el marcador haya migrado fuera del gel. Los geles obtenidos fueron lavados 3 veces con agua deionizada durante 15 min y teñidos por 12 hs con Coomassie coloidal (20% v/v etanol, 1,6% v/v ácido fosfórico, 8% p/v sulfato de amonio, 0,08% p/v Azul brillante de Coomassie G-250).

### **ANÁLISIS DE GELES EN DOS DIMENSIONES (2D-DIGE) E IDENTIFICACIÓN PROTEICA POR ESPECTROMETRÍA DE MASA.**

Proteínas extraídas de cotiledones de maní no transgénico y transgénico fueron analizados como dos eventos separados usando dos tinciones de marcado, “Cy3-rojo” y “Cy5-verde”. Ambos eventos fueron analizados por cuadruplicado. La biomasa del colorante fue eliminada durante la cuantificación utilizando "dye-swaps". El marcado de las proteínas se resolvió usando ambos puntos Isoeléctricos (pI 3-10 y pI 4-7) inmovilizados por un gradiente de pH.

Estos 2D-DIGE geles fueron escaneados usando un equipo Scanner laser con filtros de emisión dual Cy3/Cy5 (FLA-5000 dual photomultiplier FUJI Medical, Stamford,

CT). Las imágenes 2D-DIGE obtenidas (16 bit TIFF) fueron analizadas usando un software ImageMaster 2-D Platinum (version 5.0, GE Healthcare, Piscataway, NJ).

La abundancia proteica fue expresada como volumen relativo de acuerdo al método de normalización provisto por el software ImageMaster. Proteínas que expresaban diferencia estadísticamente significativa fueron seleccionadas basadas en la distribución *t* de Student. Aquellos puntos proteicos que expresaban diferencia fueron digeridos con tripsina de calidad para secuenciamiento (Promega; 0.004 mg/ml en 50 mM bicarbonato de amonio) durante 16 horas a 37 C. Después fueron extraídos de su correspondiente gel usando 100 ml de la solución de extracción (60% v/v acetonitrilo, 1% v/v ácido fórmico). Luego de 10 minutos en agitación, los péptidos fueron recuperados dentro de microtubos por centrifugación a 4000 rpm durante 2 minutos. Los péptidos trípticos extraídos fueron deshidratados con una centrífuga evaporadora, y conservados a -80 C. Antes de la espectrometría de masa, las muestras digeridas se prepararon corriéndolas en columnas cromatográficas C18 (ZipTip; Millipore) para luego resuspenderlas en 10 µl de ácido fórmico al 1%. Las muestras fueron acondicionadas en acetonitrilo al 100% y luego en soluciones de 70% v/v acetonitrilo, 1% v/v ácido fórmico y finalmente, en ácido fórmico al 1% v/v. Luego de enlazar los péptidos y lavarlos con ácido fórmico (1% v/v) fueron extraídos de la matriz C18 con una solución de extracción (70 % v/v acetonitrilo, 1% v/v ácido fórmico). Una muestra de 0,5 µl de éstos péptidos fueron transferidos a un plato MALDI (96 tubos x 2 repeticiones) mezclados con 0,5 µl de la solución matriz: 10 mg/ml  $\alpha$ -ciano-4-ácido hidroxicinámico (Sigma-Aldrich Fluka, St. Louis) preparado en 70% (v/v) acetonitrilo, 1% (v/v) ácido fórmico y 10 mM fosfato de amonio. El análisis de estas muestras de proteína se realizó con un sistema MALDI de ionización por desorción con láser asistida por una matriz con un analizador de tiempo de vuelo. El equipo utilizado fue un Voyager-DE Pro MALDI-TOF-MS (Applied Biosystems, Foster City, CA). El mismo fue accionado en el ión positivo del modo reflector de extracción retardada para lograr una alta resolución y una elevada precisión de masa. Los péptidos fueron ionizados con un haz de laser nitrógeno de 337 nm y el espectro fue adquirido en pulsos a un potencial de aceleración de 20 kV, con parámetros optimizados. La calibración externa empleada se logró utilizando una mezcla comercial de péptidos (Applied Biosystems). El espectro de péptidos fue procesado automáticamente para correcciones de base, remoción de ruidos,

picos deisotópicos y ajustes de umbrales (2% intensidad pico de base) previo a su análisis en la versión local 3.2.1 del programa MS-Fit del Prospector de Proteínas (<http://prospector.ucsf.edu>) a través del software Proteomics Solution I (Applied Biosystems). El criterio de búsqueda requirió la coincidencia de al menos cuatro péptidos con un error de masa menor a 150 ppm para una asignación proteica tentativa (Hajduch *et al.*, 2005).

## **SOUTHERN BLOT**

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo un protocolo con CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) modificado y adaptado por Sharma *et al.* (2002). Una concentración de 20 µg fueron digeridos con la enzima Hind III, que corta al plásmido en un solo sitio 3' en el terminador OCS (Secuencia de la Octopina Sintetasa). Obtenidas las muestras, se sembraron en un gel de agarosa al 0.8% para realizar una corrida electroforética hasta lograr que las moléculas se separen por tamaño. Los ácidos nucleicos del gel se transfirieron a una membrana de nylon GeneScreen Plus (NEN Research Products, Boston, MA.) para ser sometidos a ensayos de hibridación. Se utilizaron dos sondas en la hibridización, una específica para la secuencia *ara h 2* (870 pb) y la otra para GUS (291 pb). La membrana se pre-hibridizó a 65 C durante 4 horas. Una sonda marcada con P32 se desnaturalizó con 0.4N NaOH y se lo adicionó al buffer. Después de 16 horas de hibridización a 65 C, la membrana se lavó a la misma temperatura con los siguientes buffers durante 15 minutos cada uno: 2x SSC, 0.1% SDS; 1x SSC, 0.1% SDS; y 0.5x SSC, 0.1% SDS. La imagen de la membrana fue capturada con un equipo de phosphorimager STORM (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA).



## **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ALERGÉNICO DE LAS SEMILLAS OBTENIDAS DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS MEDIANTE ENSAYOS BIOLÓGICOS.**

### **REACTIVIDAD DE INMUNOGLOBULINAS HUMANAS CON PROTEÍNAS DE MANÍ (“IgE binding”)**

La presencia de inmunoglobulina E (IgE) en el suero o plasma de humanos permite detectar patologías alérgicas. Estos estudios fueron realizados en el laboratorio de la Dra. S. J. Maleki, del USDA-ARS-SRRC, en New Orleans, Estados Unidos.

Las membranas de Western blots fueron tratadas con una solución de bloqueo de leche descremada al 2 % durante 15 minutos e incubadas durante toda la noche en el suero de los pacientes, diluido 1:10 en buffer PBS-T. Este suero fue obtenido de individuos alérgicos a maní colectado por el Medical Sciences (Little Rock, AR) de acuerdo a las reglamentaciones de la Universidad de Arkansas. Podemos describir a los pacientes donadores de los sueros como “CM” femenina, nacida en 1978 y el paciente “SM” masculino, nacido en 1965, quienes presentan alergia a otras nueces y la paciente “DAM” femenina, nacida en 1972 quien presenta alergia a otras nueces como así también a soja y porotos. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-T e incubadas con el anticuerpo secundario anti-human IgE en diluciones 1:10.000 o 1:100.000. Las señales fueron detectadas con el kit ECL-Plus.

### **BIO-ENSAYO CON RATONES**

En este proyecto se propuso realizar un bioensayo con ratones para evaluar si las semillas transgénicas con un menor contenido de Ara h 2 evitaban o reducían la respuesta alérgica esperada, en este caso, una disminución en la temperatura corporal. Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Jordana, del Departamento de Medicina Patológica y Molecular, División Enfermedades Respiratorias y Alergias de la Universidad de McMaster, en Ontario, Canadá.

Se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 6-8 semanas de vida compradas en los laboratorios Charles River, Canadá. Los animales fueron criados en un ambiente libre de patógenos bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Este experimento fue aprobado por

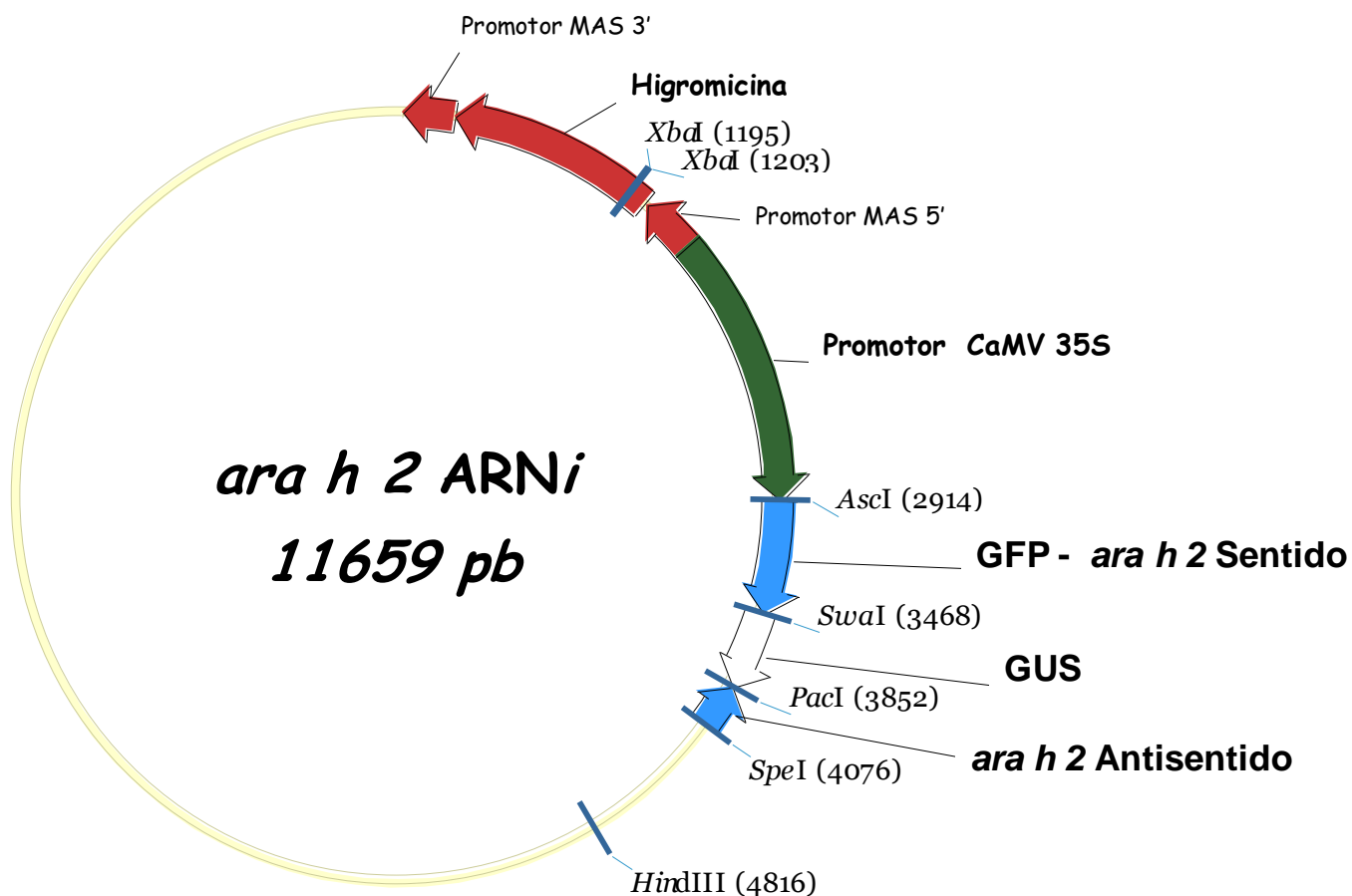
el Departamento de Ética en Investigación con Animales de la Universidad de McMaster, Canadá. La inducción de anafilaxis con maní se realizó siguiendo el modelo publicado por Sun *et al.*, 2007. Los ratones fueron sensibilizados vía oral utilizando agujas intragástricas (01-290-2B; Fisher Scientific) y una solución de 1 mg de proteínas de maní más 10 µg de la toxina cólera (CT; List Biological Laboratories) disueltos en 10 µl de agua estéril. Un grupo de 10 ratones (Grupo A) fueron sensibilizados con proteínas de maní obtenidas del polvo de maní de semillas control (PP/Arah2+) como fuente de proteínas totales de maní, y otro grupo de 15 (Grupo B) fueron tratados con proteínas de maní logradas de polvo de semillas transgénicas con la proteína Ara h 2 silenciada (PP/Arah2-) como fuente de proteínas reducidas de maní. Los animales fueron forzados a alimentarse con los preparados correspondientes una vez por semana durante 4 semanas. Los ratones del primer grupo (PP/Arah2+) fueron inyectados con 5 mg de un extracto crudo de semillas de maní control (CPE/Arah2+) disuelto en 500 µl de PBS en la cavidad peritoneal, dos semanas después de la última sensibilización. Al segundo grupo (PP/Arah2-) se lo dividió en dos subgrupos. Siete ratones (Grupo B 1) fueron inyectados con 5 mg de CPE/Arah2+ y al resto (Grupo B 2) con 5 mg de un extracto crudo obtenido de las semillas transgénicas en estudio (CPE/Arah2-). Los animales fueron cuidadosamente observados durante 40 minutos inmediatamente después de inyectados. La respuesta anafiláctica durante ese lapso de tiempo fue evaluada con la temperatura corporal, que para ratones de esa especie ronda los 38 C. Las lecturas de la temperatura rectal se realizaron cada 10 minutos con un Termómetro Rectal Digital (VWR). Los datos se expresaron como medias (SEM) y fueron analizados estadísticamente con el software SigmaStat (SPSS). Un valor de  $p > 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### OBTENCIÓN LÍNEAS TRANSGÉNICAS

La construcción *ara h 2* RNAi obtenida se representa en la Figura 3.1. El vector pFGC1008 conteniendo un gen de resistencia a higromicina, permitió la selección de aquellos embriones transgénicos inducidos en un medio de cultivo conteniendo dicho antibiótico, después del bombardeo. El fragmento *ara h 2* utilizado en esta construcción reveló una identidad de secuencia del 100% con la secuencia homeóloga L77197 (*ara h 2.01*) y con la secuencia ortóloga EF609641 (*ara d 2.01*). La misma a su vez, compartió una homología del 90% con la secuencia homeóloga *ara h 2.02* (Ramos *et al.*, 2006). La inserción lograda con el fragmento *ara h 2* en posiciones sentido y antisentido flanqueando con un segmento del gen GUS (335 pb) permitió la formación de un rulo (hairpin) durante la transcripción del ARNm. Esta estructura de ARN doble cadena fue clave en el complejo de interferencia del ARN. Una vez incorporado en este complejo, la estrategia de silenciamiento se basó en el hecho de que todo ARNm que tuviera alta homología de secuencia podría ser potencialmente identificado, degradado y finalmente silenciado (“knock out” génico) o parcialmente silenciado (“knock down” génico).

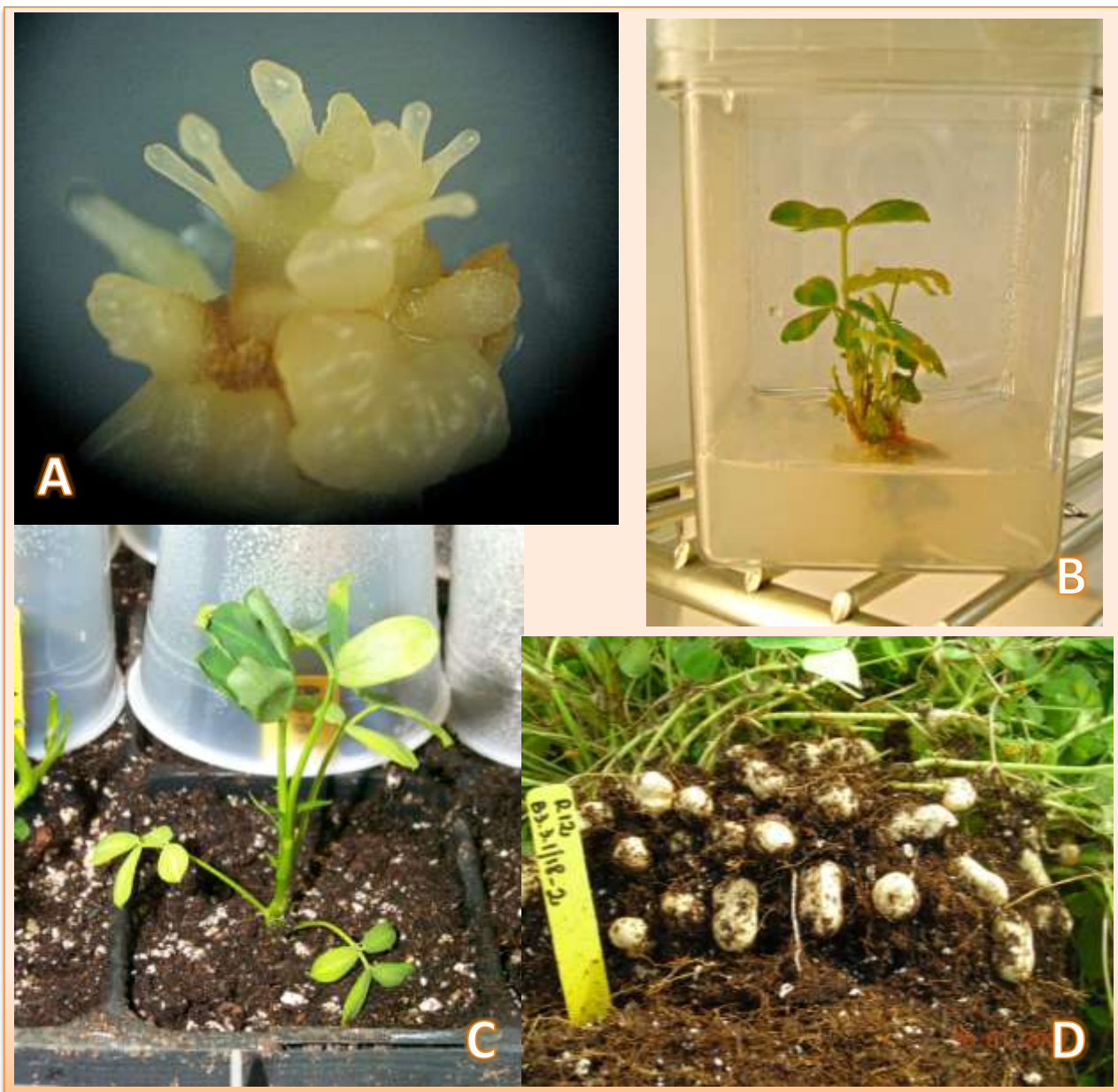


**Figura 3.1: Construcción *ara h 2* ARNi.** Vector pFGC1008 conteniendo un gen de resistencia a higromicina (selección en planta) y el fragmento *ara h 2* insertado en posición sentido (535 pb) y antisentido (222 pb), flanqueando con un segmento GUS (335 pb) (Chu Ye - Faustinelli *et al.*, 2008)

La regeneración vía embriogénesis de los embriones somáticos transformados con la construcción *ara h 2* ARNi se ejecutó siguiendo los protocolos publicados por Ozias-Akins *et al.* (1993), cuya aplicación permitió la obtención de aglomerados (clusters) resistentes a higromicina (Tabla 3.1) con una casi nula variación somaclonal y una eficaz conversión a plantas fértiles. Este resultado fue indispensable para la prosecución de los siguientes objetivos específicos que emplean el producto final “semilla” (Fig. 3.2). Estas plantas no mostraron diferencias fisiológicas ni morfológicas estadísticamente significativas, con los controles en aspectos evaluados preliminarmente, tales como peso medio de semillas, largo de raíz y porcentaje de germinación.

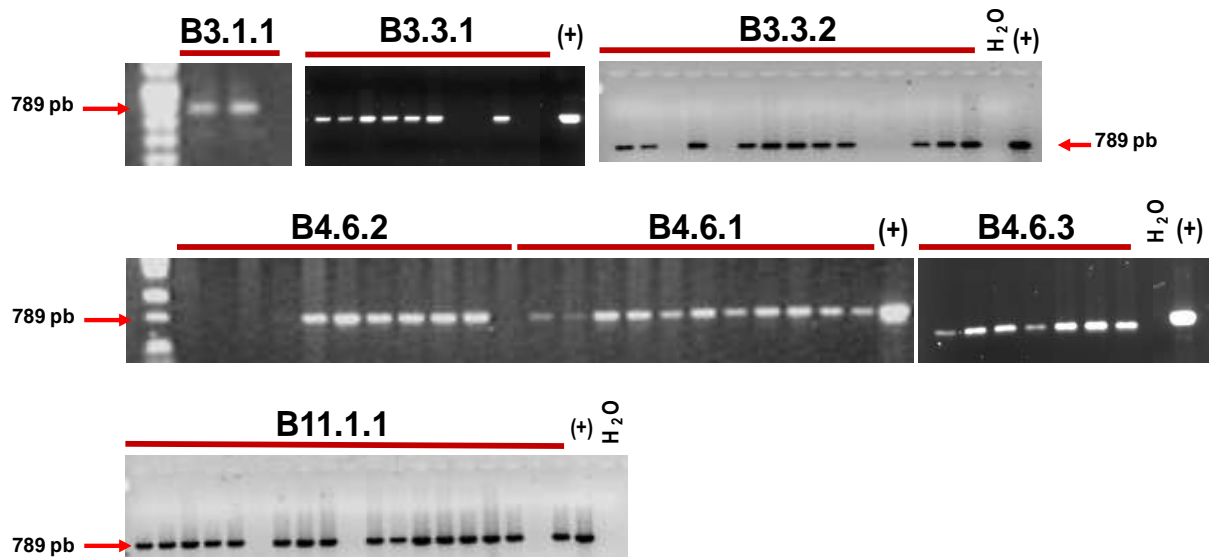
**Tabla 3.1: Obtención de embriones somáticos de maní variedad Georgia Green transformados mediante biobalística.** Líneas de maní obtenidas por cultivo *in vitro* y evaluadas por PCR como transgénicas (positivas para el transgen *ara h 2-GFP*) y no transgénicas (negativas).

Número de bombardeo	Experimento	ADN introducido	Número de plato	Número de aglomerados obtenidos resistentes a higromicina	Número de planta primaria obtenida	tr (transgénica) / no-tr (no transgénica) por PCR
1	B3	Ara h 2 ARN <i>i</i>	1	7	B3.1.1	tr
					B3.1.5	no-tr
			2	3		
			3	4	B3.3.1	tr
					B3.3.2	tr
			4	6	B3.4.3	no-tr
			5			
			6	5		
2	B4	Ara h 2 ARN <i>i</i>	1	5		
			2	13		
			3	1		
			4	3		
			5	3		
			6	10	B4.6.1	tr
				B4.6.2	tr	
					B4.6.3	tr
3	B11	Ara h 2 ARN <i>i</i>	1	11	B11.1.1	tr
			2	13		
			3	11		
4	B12	Ara h 2 ARN <i>i</i>	1	8		
			2	9		
			3	7		
			4	6		
			5	7		
			6	6		
5	B13	Ara h 2 ARN <i>i</i>	1	7		
			2	7		
			3	7		
			4	10	B13.4.5	no-tr
			5	21		
			6	16		
6	B14	Ara h 2 ARN <i>i</i>	7	1		
			8	0		
			9	0		
			10	2	B14.10.1	no-tr
			11	2		
			12	4		
7	B15	Ara h 2 ARN <i>i</i>	1	2		
			2	5		
			3	1		
			4	2		
			5	6		
			6	1		



**Figura 3.2: Obtención y Regeneración de embriones somáticos de maní variedad Georgia Green.** A. Embriones somáticos de maní bombardeados con el plásmido pFGC1008 conteniendo una porción del gen *ara h 2* clonado como fragmentos invertidos. B. Plántula regenerada transgénica, resistente a higromicina. C. Plántulas transgénicas, trasplantadas a suelo y rusticadas en invernadero. D. Cosecha de semillas de plantas transgénicas.

En síntesis, se lograron regenerar 7 líneas resistentes a higromicina confirmando la presencia del fragmento *ara h 2*-GFP por PCR (Fig. 3.3). Cuatro de estas líneas no produjeron suficiente semillas como para ser analizadas completamente. Las líneas B3.3.1, B3.3.2, B4.6.1 y B11.1.1 fueron las seleccionadas para continuar los estudios planteados.

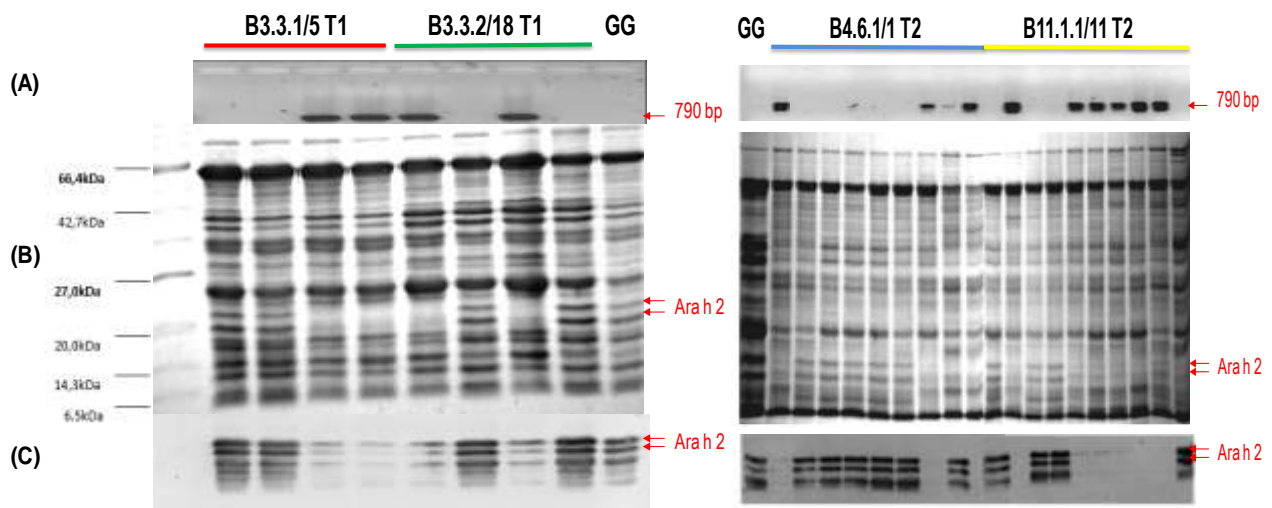


**Figura 3.3: Amplificación del fragmento *ara h 2*-GFP por PCR (790 pb).** Líneas de maní transgénicas (B3.1.1, B3.3.1, B3.3.2, B4.6.1, B4.6.2, B4.6.3 y B11.1.1) obtenidas por cultivo *in vitro* y positivas por PCR. La ampliación del fragmento se realizó mediante el uso de un cebador en sentido para GFP y otro en antisentido para *ara h 2*. Controles: (+) fragmento *ara h 2*-GFP;  $H_2O$  (agua destilada-estéril).

### EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: SDS-PAGE, WESTERN BLOT Y GELES EN 2 D.

Las proteínas totales separadas de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y detectadas por Western blot (Fig. 3.4) no mostraron alteración en su perfil en aquellas semillas transformadas con la construcción diseñada para silenciar *ara h 2*. En las semillas transgénicas, positivas por PCR, la doble banda característica de la proteína Ara h 2, de alrededor de 19.7 kDa, estuvo ausente o se reveló más tenuemente comparadas con las bandas presentes en las semillas no transgénicas, negativas por PCR.

En las líneas B3.3.1, B3.3.2 y B4.6.1, los análisis de Western blot (Fig. 3.4) permitieron identificar con el anticuerpo anti-Ara h 2 que ambos niveles de Ara h 2.01 y Ara h 2.02 fueron muy reducidos pero aún detectables. En cambio en la línea B11.1.1 (Fig. 3.4), la expresión de estas dos bandas no pudo ser detectada por esta metodología. Una tercera banda de menor peso molecular fue inmunológicamente visible en estos geles, correspondiendo muy probablemente, a formas proteolíticas de Ara h 2.



**Figura 3.4: SDS-page y Western blot de las líneas transgénicas con el gen *ara h 2* silenciado.** Se testearon semillas de la progenie T2 de las líneas transgénicas B3.3.1 y B3.3.2, y semillas de la progenie T1 de las líneas B4.6.1 y B11.1.1 con el control no transgénico Georgia Green. Cada una de las muestras fue chequeada por PCR (A) usando los cebadores que amplifican el fragmento del inserto GFP-*ara h 2*. Las proteínas fueron separadas en un gel SDS-page (B) al 15% acrilamida y teñidas con Biosafe Coomassie blue. Las muestras analizadas por Western Blot (C) fueron bloqueadas en una membrada PVDF e incubadas con el anticuerpo para la proteína Ara h 2 (1:8.000). Posteriormente, se bloquearon con el anticuerpo secundario anti-chicken y se detectó la señal con el kit ECL-Plus.

Para visualizar la ausencia o reducción de la proteína Ara h 2 y cuantificar su expresión, se realizó un análisis proteómico comparativo vía electroforesis en un gel de dos dimensiones usando proteínas totales extraídas de semillas T1 de las líneas B3.3.1 y B3.3.2. Este análisis permitió ver equivalencias sustanciales en la composición proteica de una semilla transgénica en paralelo con una no transgénica (Fig. 3.5).

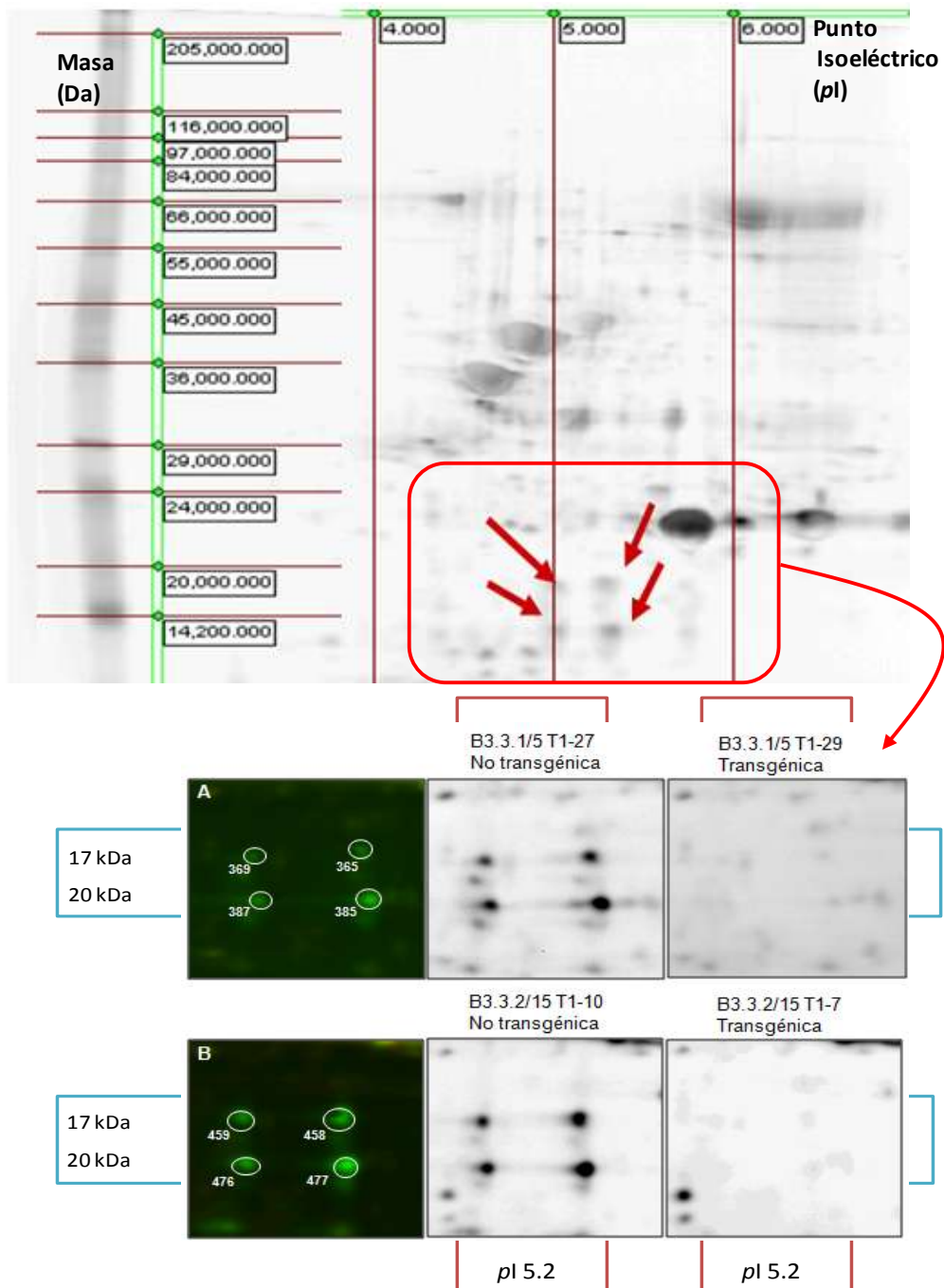


El análisis detallado de ambas líneas reveló un aglomerado simple de 2-DE puntos que fueron consistentemente diferenciados. Cuatro puntos proteicos (365, 369, 385 y 387) con masas aparentemente entre 16-20 kD fueron reducidos en promedio 13-, 7.2-, 16- y 15-plegues, respectivamente, en la línea transgénica B3.3.1 comparada con el control no transgénico. En la línea transgénica B3.3.2 se encontraron con igual masa aparente, los puntos proteicos 458, 459, 477 y 476 los cuales fueron reducidos 17-, 14-, 19- y 15-plegues, respectivamente, también cotejada con el control no transgénico.

El análisis realizado por espectrometría de masa en tándem permitió separar los puntos proteicos e identificar, con sensibilidad y exactitud, según la abundancia relativa de los iones y su separación respecto a la relación masa/carga, que los mismos correspondían a la proteína Ara h 2.02 (GenBank ID AY158467).

La abundancia proteica expresada como volumen relativo de acuerdo al método de normalización provisto por el software ImageMaster, permitió comparar la concentración de la proteína Ara h 2 de las semillas transgénicas con las no transgénicas confirmando una reducción de aproximadamente un 90% en ambas líneas, sugiriendo así un knock down génico resultado de la activación del silenciamiento génico postranscripcional.

La comparación de estos perfiles proteicos utilizando electroforesis en 2D ofrece la oportunidad de descubrir algún evento enmascarado específico del proceso proteolítico de una proteína. En nuestro caso en particular, no se observaron puntos extras ni alteraciones debidas quizás a la acumulación de moléculas precursoras de nuevas proteínas ó a la desaparición de cadenas polipeptídicas ya maduras (Fig. 3.5). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Herman *et al.* (2003) quienes lograron remover vía ARNi la proteína Gly m Bd 30 k, una de las más alergénicas en soja. La utilización de estas mismas metodologías les permitió comprobar que la eliminación de este alergénico no produjo la inducción de ninguna otra proteína detectable como consecuencia del silenciamiento.



**Figura 3.5: Electroforesis en un gel de dos dimensiones (“2D-DIGE”) de las líneas B3.3.1/5 y B3.3.2/15 con el gen *ara h 2* silenciado y de las líneas no transgénicas (control).** Muestras de proteínas extraídas de semillas transgénicas y no transgénicas fueron fraccionadas en geles de gran escala. El gel resultante fue escaneado y las diferencias entre ambos fueron analizadas automáticamente. La imagen ampliada del área seleccionada permite identificar en un rango de 10 – 20 KDa y un *pI* 5 – 5.5, cuatro punto prominentes en las semillas no transgénicas (B3.3.1/5: 365, 369, 385 y 387; B3.3.2/15: 458, 459, 477 y 476) que de acuerdo al análisis de espectrometría de masa en tándem corresponden a Ara h 2.02 (Genbank accession number 26245447) y que en las semillas transgénicas están ausentes (Laboratorio Dra. J. J. Thelen, Departamento de Bioquímica, Universidad de Missouri-Columbia, Estados Unidos) (Chu Ye - Faustinelli *et al.*, 2008).

## ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS: SOUTHERN BLOT.

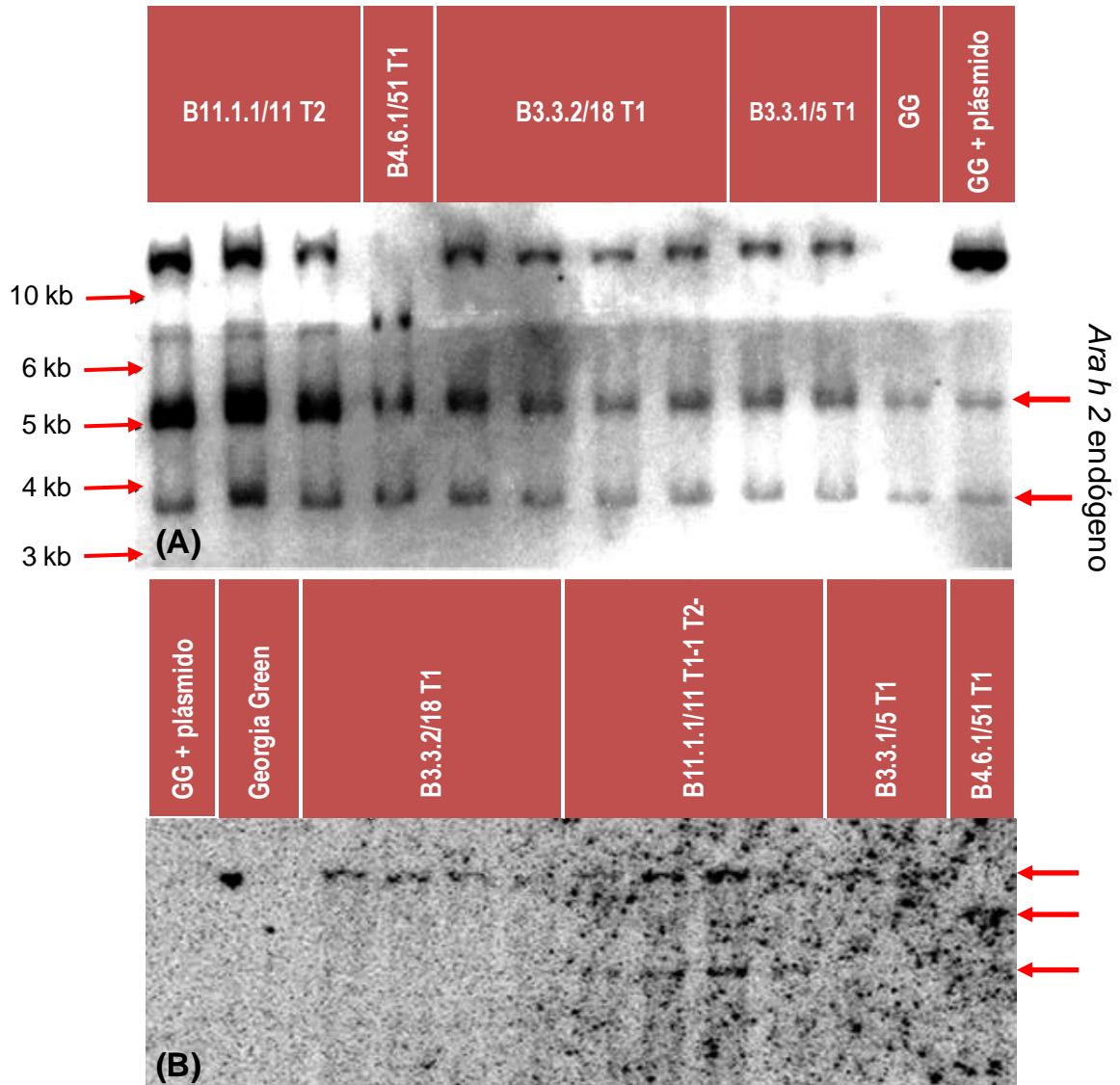
Las hibridaciones en Southern blot permitieron evaluar la complejidad de la inserción y el número de copias del transgen *ara h 2* ARNi. Se confirmaron tres eventos transgénicos independientes mediante la digestión del ADN genómico con HindIII y usando como sonda la secuencia de la región codificante *ara h 2*. Se compararon los resultados con el control en el cual se pudieron distinguir claramente las dos copias de *ara h 2* endógenas como así también, en las progenies T1 y T2 de las líneas transgénicas analizadas (Fig. 3.6 A).

Las líneas B3.3.1 y B3.3.2 mostraron ser sublíneas del mismo evento de transformación debido a que mostraron el mismo patrón obtenido por Southern blot en las seis progenies T2 analizadas. Estas líneas revelaron no solo las dos copias endógenas de *ara h 2* sino también una banda de aproximadamente 12 kb, mostrando una copia extra debida a la integración de una copia simple del transgen.

La línea transgénica B4.6.1 representada por la generación T1, también posee una copia simple del transgen pero hibridado en un fragmento de ~8 kb (Fig. 3.6 A).

Se examinaron tres progenies T2 de la línea B11.1.1 las cuales mostraron múltiples inserciones del transgen ya que se divisaron bandas de ~7 y ~13 kb (Fig. 3.6 A). Además se pudo observar que la intensidad de las dos bandas endógenas de *ara h 2* no fue proporcional a las de las plantas control sugiriendo que al menos una copia del transgen migró a la misma posición a la cual migra el fragmento de mayor peso molecular de *ara h 2* en las digestiones realizadas con *HindIII*.

Las hibridaciones fueron repetidas para explorar el número de inserciones obtenidas pero en este caso se usó como sonda a un fragmento que se liga a la secuencia GUS. Se pudo observar que todas las líneas revelaron la misma secuencia de hibridación que la observada con el gen *ara h 2* excepto que las bandas endógenas de *ara h 2* no fueron detectadas. Se pudo confirmar la inserción de una única copia del transgen en las líneas B3.3.1, B3.3.2 y B4.6.1, como así también de los tres fragmentos en la línea B11.1.1 incluido el que co-migró con el fragmento más largo de *ara h 2* (Fig. 3.6 B).



**Figura 3.6: Southern blot de líneas transgénicas con el gen *ara h 2* silenciado. (A)** ADN extraído de hojas jóvenes digerido con *HindIII* e hibridizado con una sonda específica para la región codificante de la secuencia *ara h 2*. Dos fragmentos están presentes en todas las líneas incluyendo el control, representando *ara h 2* endógeno (flechas) (Chu Ye - Faustinelli *et al.*, 2008). **(B)** ADN digerido con *HindIII* e hibridizado con una sonda específica para la región GUS (flechas) (Chu Ye - Faustinelli *et al.*, 2008).

En síntesis, los resultados obtenidos empleando el Southern blot permitieron identificar a solo tres líneas transgénicas, ya que las líneas B3.3.1 y B3.3.2 mostraron ser sublíneas del mismo evento de transformación, que mostraron el mismo patrón en las seis progenies T1 analizadas. En consecuencia, las semillas provenientes de ambas sublíneas se utilizaron indistintamente en los estudios posteriores.

## **EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: CONTROL PATRÓN PROTEICO (Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3) POR WESTERN BLOT.**

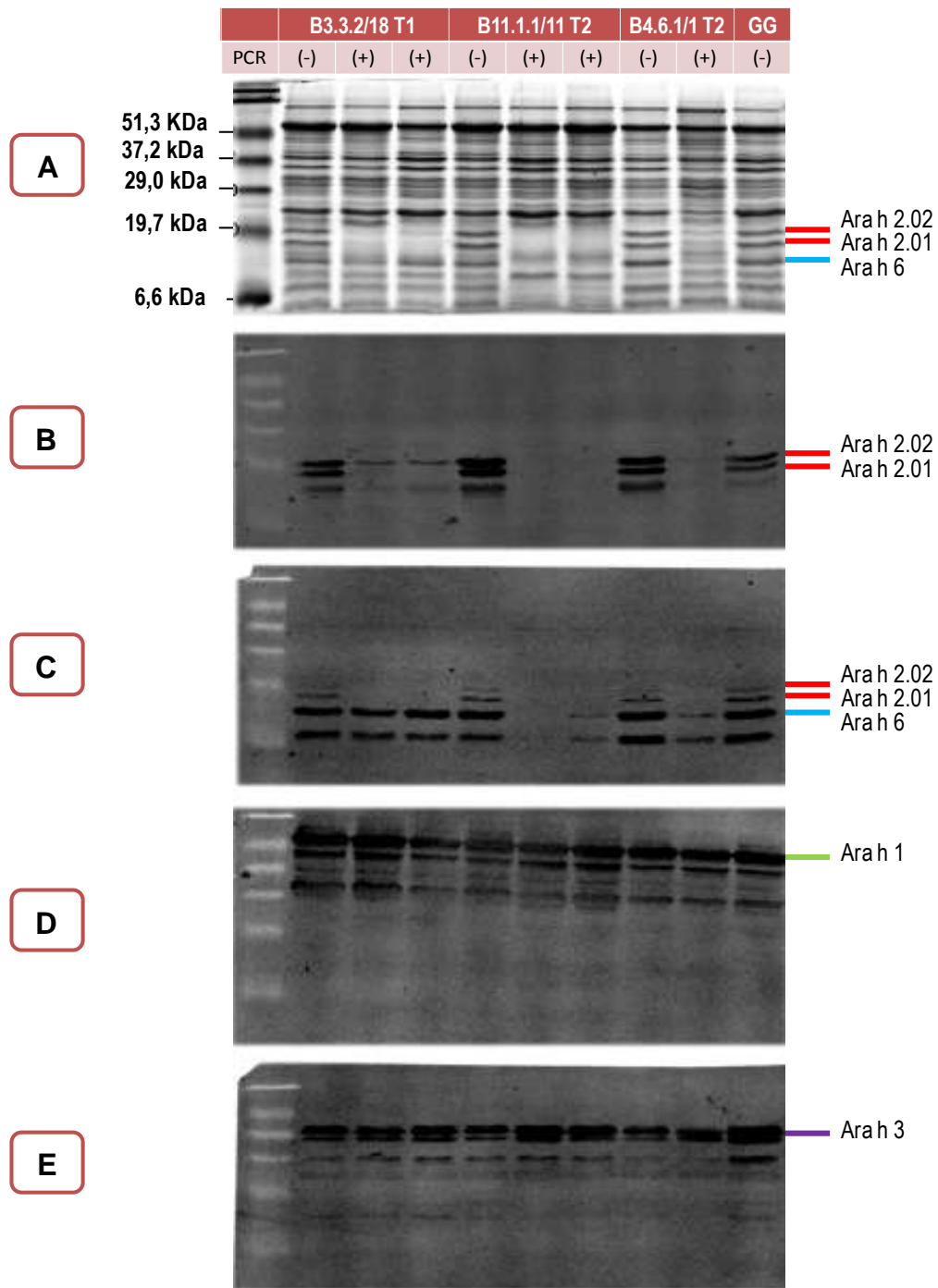
Para evaluar si el silenciamiento con la construcción Ara h 2 ARNi pudo afectar alguna otra proteína, se realizaron Western blot con anticuerpos anti Ara h 6, Ara h 1 y Ara h 3 (Fig. 3.7). Se analizaron tres progenies T1 de la línea B3.3.2, tres de la progenie T2 de la línea B11.1.1 y dos de la progenie T2 de la línea B4.6.1, en forma comparativa con el control no transgénico. Los polipéptidos separados en el gel SDS-PAGE mostraron un perfil global de proteínas sin alteraciones como consecuencia del evento de transformación realizado (Fig. 3.7 A). La doble banda de la proteína Ara h 2 de alrededor de 19.7 kDa estuvo ausente o fue casi imperceptible en las semillas transgénicas comparado con las no transgénicas empleadas como control.

El Western blot realizado con el anticuerpo primario anti-Ara h 2 mostró que tanto Ara h 2.01 como Ara h 2.02 presentaban bandas muy tenues pero aún detectables en las líneas B3.3.2 y B4.6.1. Sin embargo, la expresión de ambas bandas de Ara h 2 no fue visualizada en la línea B11.1.1 (Fig. 3.7 B). Las bandas que se observan por reacción inmunológica con un menor peso molecular, seguramente se deben al proceso proteolítico dentro de la formación de la proteína Ara h 2.

Las membranas bloqueadas con el anticuerpo anti-Ara h 6 permitió detectar cuatro bandas en los extractos de proteínas de semillas no transgénicas (Fig. 3.7 C). Las dos primeras bandas ubicadas alrededor de los 19.7 kDa fueron identificadas como Ara h 2.01 y Ara h 2.02 debido a que las mismas señales están reducidas en todas las muestras transgénicas.

En la línea B3.3.2, la proteína Ara h 6 no fue sustancialmente diferente a las semillas controles, indicando que la proteína Ara h 2 fue la principalmente silenciada. Sin embargo, en las líneas B11.1.1 y B4.6.1, fue notablemente reducida, permitiendo deducir que tanto la proteína Ara h 2 como la Ara h 6 fueron objeto de transformación en estas dos líneas transgénicas.

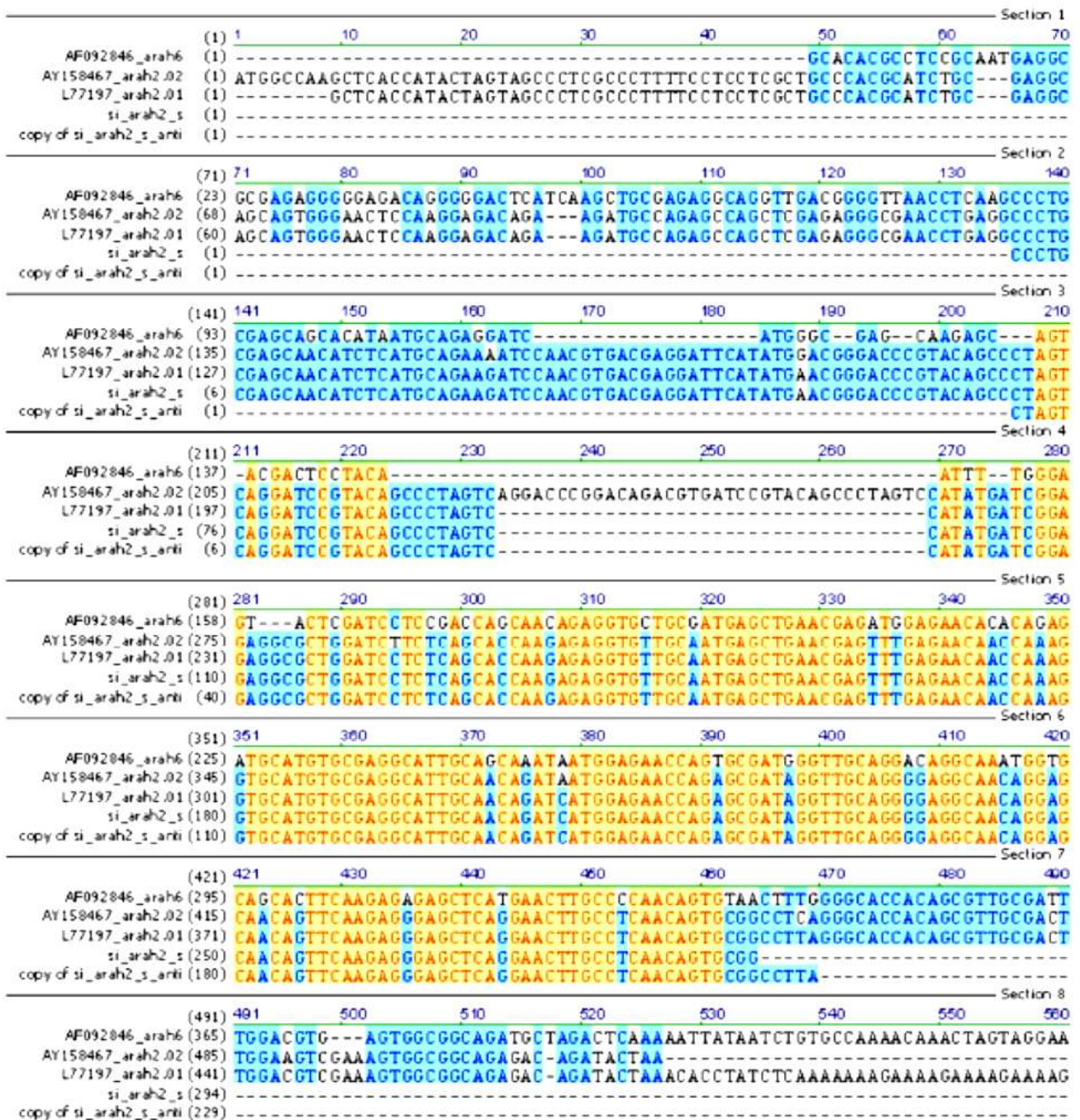
Las proteínas Ara h 1 y Ara h 3 no muestran alteraciones debidas al evento de transformación ya que las bandas presentes en todas las líneas transgénicas guardan concordancia con los controles no transgénicos (Fig 3.7 D y E).



**Figura 3.7: SDS-page y Western blot de las líneas transgénicas obtenidas.** Fueron analizadas 3 progenies T1 de la línea B3.3.2, 3 de la progenie T2 de la línea B11.1.1 y 2 de la progenie T2 de la línea B4.6.1, en forma comparativa con el control no transgénico Georgia Green (GG). Todas las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 15% y teñidas (A) con el pigmento Biosafe Coomassie blue. Las muestras fueron transferidas y bloqueadas en membranas de PVDF e incubadas con (B) anti-Ara h 2, (C) anti-Ara h 6, (D) anti-Ara h 1, y (E) anti-Ara h 3. Posteriormente, se aplicó el anticuerpo secundario anti-chicken y se detectó la señal usando el kit ECL-Plus (Chu Ye - Faustinelli *et al.*, 2008).

Un análisis de la secuencia de nucleótidos utilizando el programa Vector NTI (InVivoGen) nos permitió comparar las frecuencias de *ara h 2.01* (GenBank ID L77197), *ara h 2.02* (GenBank ID AY158467), *ara h 6* (GenBank ID AF092846), y del fragmento insertado de *ara h 2* en sentido y antisentido dentro de la construcción ARNi. En base a este análisis se demostró que los fragmentos invertidos de *ara h 2* comparten un 81% de homología con la secuencia de la región codificante de *ara h 6* desde la posición 278 a la 461 (184 pb de longitud). Esta alta homología podría ser la causa en las líneas B11.1.1 y B4.6.1 del silenciamiento conjunto de ambas proteínas, Ara h 2 y Ara h 6, abriendo la posibilidad de un contenido aún menor de proteínas alergénicas (Fig. 3.8).





**Figura 3.8: Secuencia de nucleótidos alineadas.** Comparación de la secuencia de nucleótidos de *ara h 2.01* (GenBank ID L77197), *ara h 2.02* (GenBank ID AY158467), *ara h 6* (GenBank ID AF092846), y del fragmento insertado de *ara h 2* en sentido y antisentido dentro de la construcción ARNi (Chu Ye - Faustinelli *et al.*, 2008).

Las líneas transgénicas con una copia simple del transgen mostraron una reducción de la concentración de la proteína Ara h 2, mientras que las progenies de la línea B11.1.1 con múltiples inserciones confirmaron mediante Western blot, una reducción total no solo

de Ara h 2 sino también de Ara h 6. Kumpatla and Hall (1998) pudieron observar en arroz que aquellas plantas transgénicas conteniendo múltiples copias del transgen *pUbi-bar* (resistencia a herbicida), en algunos casos, son inactivadas de alguna forma por el sistema, siendo silenciados, con un tipo de segregación no Mendeliana, sin embargo, Qu *et al.* (1996) pudo, mediante un análisis exhaustivo de más de 500 plantas de arroz transformadas con el gen de resistencia a higromicina mediante biobalística, observar que estas copias múltiples se ligaban y comportaban como locus simples, implicando una recombinación o una duplicación del transgen antes de su integración. Wei *et al.* (2007) analizaron la expresión del T-ADN conteniendo la proteína GFP en plantas de pino con un número diferente de copias insertadas. Ellos lograron un silenciamiento post transcripcional en aquellas líneas que contenían más de 3 copias del transgen pero no así en las que se habían insertado solo una copia. Hibridaciones cromosómicas *in situ* demostraron que estas líneas contenían las inserciones del T-ADN en el mismo cromosoma. Estos resultados sugieren que dos o más inserciones del T-ADN en el mismo cromosoma facilitan un silenciamiento génico eficiente. En este escenario, y teniendo en cuenta que la región seleccionada para la construcción posee alta homología con *ara h 2* y *ara h 6*, las líneas con múltiples inserciones generan más fragmentos ARN interferente que se hibridan con los ARN mensajeros de estos mismos genes, para marcarlos y destruirlos. Dada esta situación, es posible deducir que el silenciamiento fue más eficiente y a la vez, de mayor espectro, en el caso de la línea B11 debido a que se insertó en su genoma más de una copia del transgen.

## **EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: INMUNODETECCIÓN.**

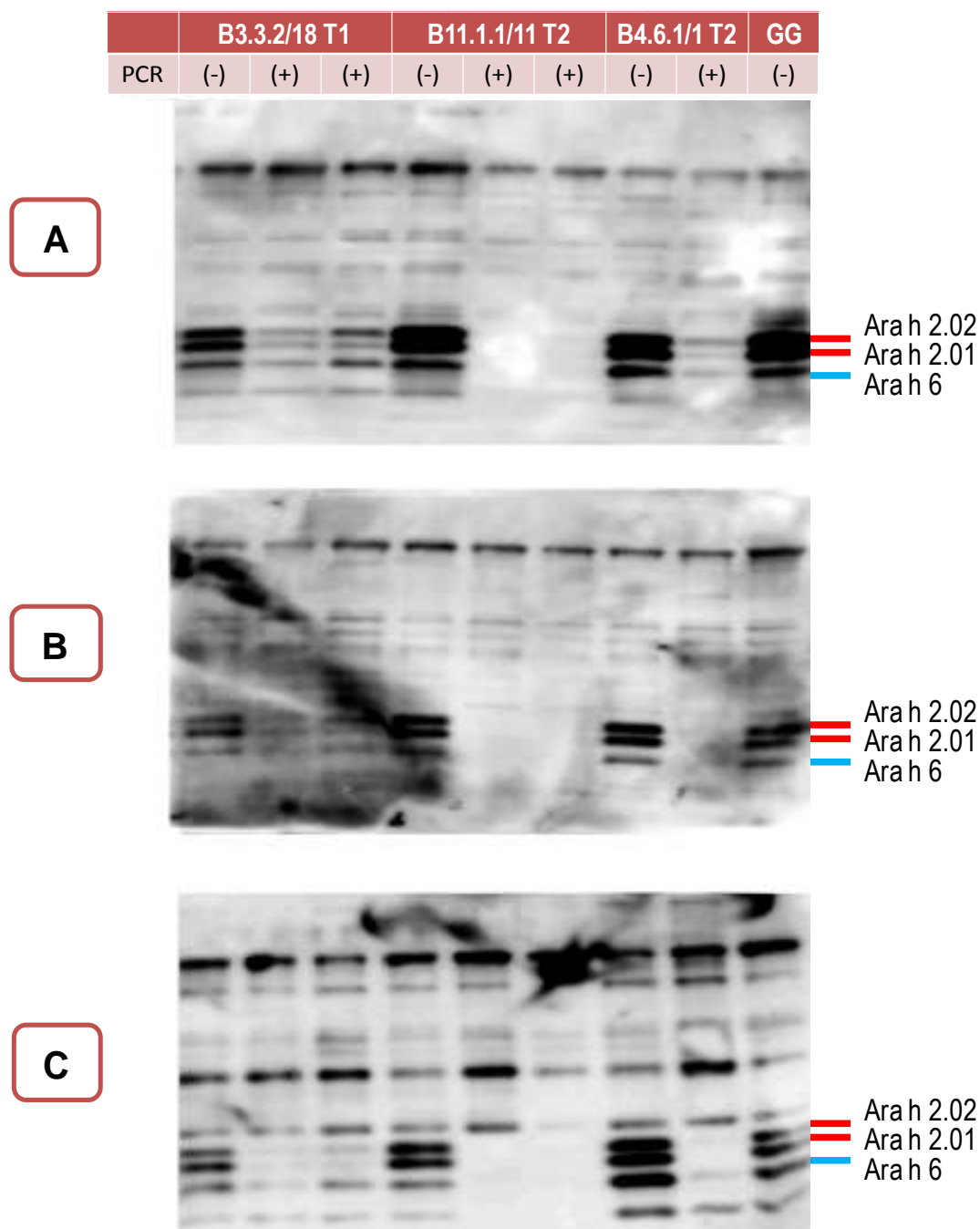
Estos mismos extractos de proteínas de las tres líneas transgénicas analizadas fueron evaluados por inmunodetección usando el suero de pacientes alérgicos a maní (Fig. 3.9). Los tres pacientes declarados alérgicos a maní donaron suero que contenía múltiples anticuerpos IgE incluidos los de Ara h 2 y Ara h 6.

En la sublínea transgénica B3.3.2 se pudieron detectar reacciones inmunológicas para las proteínas Ara h 2.01 y Ara h 2.02 mediante el suero de estos tres pacientes, pero en niveles mucho más reducidos si se los compara con el control no transgénico. En la

línea B11.1.1, las proteínas Ara h 2 y Ara h 6 no fueron detectadas por la reacción antígeno anticuerpo, mientras que en la línea B4.6.1 esta reacción fue muy débil.

Estos resultados inmunológicos coincidieron con los obtenidos por Western blot cuando se utilizaron los antígenos específicos para cada una de estas proteínas, pudiendo confirmar en todos los casos, la reducción o el silenciamiento tanto de Ara h 2 como de Ara h 6.

Si bien una de las mayores preocupaciones expresadas en torno de la biotecnología vegetal es con respecto a la potencialidad de introducir nuevos alérgenos, estos estudios inmunológicos comparando líneas transgénicas silenciadas con otra línea control mediante el uso de suero de pacientes sensibles, permitieron demostrar que no hubo reacciones cruzadas con otras proteínas de la semilla de maní transgénicas. Autores como Herman *et al.* (2003) en soja, y Lien Quynh Le *et al.* (2006) en tomate, también obtuvieron resultados inmunológicos semejantes cuando compararon líneas transgénicas y controles en ensayos con suero de pacientes sensibilizados permitiendo aseverar la viabilidad en la creación de alimentos con proteínas alérgicas silenciadas por medio de la inhibición *dsARNi*.



**Figura 3.9: Inmunodetección (“IgE binding”) de las proteínas Ara h 2 y Ara h 6 en las tres líneas transgénicas obtenidas.** Fueron analizadas 3 progenies T1 de la línea B3.3.2, 3 de la progenie T2 de la línea B11.1.1 y 2 de la progenie T2 de la línea B4.6.1, en forma comparativa con el control no transgénico Georgia Green (GG). Las muestras de proteínas separadas electroforéticamente fueron bloqueadas, y los fragmentos inmunológicamente reactivos fueron detectados con el suero de pacientes alérgicos a maní: **(A)** CM: femenina, nacida en 1978, con alergia a otro tipo de nueces; **(B)** SM: masculino, nacido en 1965, alérgico a otras nueces; y **(C)** DAM: femenina, nacida en 1972, con alergia a nueces, soja y porotos (Laboratorio Dra. S. J. Maleki, USDA-ARS-SRRC, New Orleans, Estados Unidos) (Chu Ye - Faustinelli *et al.*, 2008).

Estos resultados son relevantes por demostrar, que el silenciamiento de una proteína conglutina en semillas de maní transgénicas no altera su función como fuente de nutrientes indispensables para la germinación; y porque el silenciamiento conjunto de Ara h 2 y Ara h 6 por homología en algunas líneas, permitió obtener semillas con una reducción aún mayor en el contenido de proteínas alergénicas.

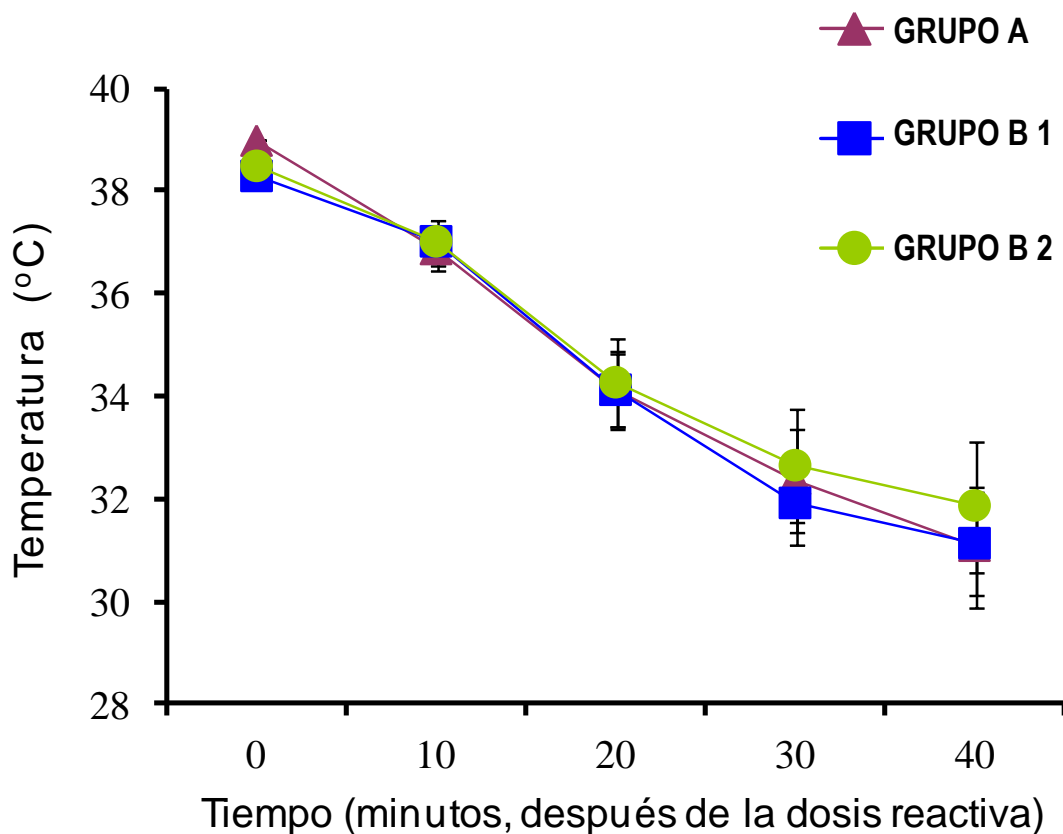
## **EVALUACIÓN PLANTAS TRANSGÉNICAS: BIOENSAYOS.**

El ensayo para la evaluación *in vivo* del potencial alergénico de las semillas transgénicas con ratones sensibilizados a maní se planteó para verificar la hipótesis que un menor contenido de Ara h 2, por ende, un menor contenido de alérgenos totales, evitaban o reducían la respuesta alergénica esperada, en este caso, descenso de la temperatura corporal.

El primer grupo ratones (Grupo A) sensibilizados con proteínas totales de maní e inyectados con el extracto crudo de semillas de maní control presentó un descenso gradual de la temperatura corporal, a medida que transcurrían los 40 minutos previstos en el protocolo de la prueba. Esta sintomatología se asocia a una reacción alergénica provocada por las proteínas totales de maní, inmediatamente después de colocada la dosis (Fig. 3.10).

El segundo grupo (Grupo B 1), sensibilizado con semillas con un contenido reducido de proteínas totales y luego inyectados con el extracto crudo de semillas control exhibió un descenso de temperatura corporal semejante al primer grupo, respuesta que coincidente con lo esperado.

El último Grupo B 2, constituido por ratones sensibilizados e inmunizados con proteínas extraídas de las semillas transgénicas sufrió una disminución de la temperatura corporal menos brusca aunque no significativamente diferente al descrito por los otros dos grupos tratados. Esta respuesta resultó imprevista para este grupo ya que se esperaba una respuesta inmunológica atenuada.



**Figura 3.10: Bio-ensayo con ratones. Inducción de anafilaxia sistémica en ratones sensibilizados oralmente con proteínas de maní. Grupo A:** constituido por 10 ratones sensibilizados con proteínas de maní obtenidas del Polvo de Maní de semillas control como fuente de proteínas totales de maní. **Grupo B:** 15 ratones tratados con proteínas de maní obtenidas de Polvo de semillas transgénicas con la proteína Ara h 2 silenciada como fuente de proteínas reducidas de maní. Los animales se alimentaron forzosamente con los preparados correspondientes una vez por semana durante 4 semanas. Los ratones del primer grupo fueron inyectados con 5 mg de un extracto crudo de semillas de maní control en la cavidad peritoneal, dos semanas después de la última sensibilización. Al segundo grupo se lo dividió en dos subgrupos: **Grupo B 1** de siete ratones inyectados con el extracto crudo de semillas de maní control y **Grupo B 2** inyectados con el extracto crudo obtenido de las semillas transgénicas en estudio. Los animales observados durante 40 minutos inmediatamente después de inyectados, fueron evaluados chequeando su temperatura corporal para determinar la respuesta anafiláctica desarrollada. Las lecturas de la temperatura rectal se realizaron cada 10 minutos con un Termómetro rectal digital (VWR). Los datos se expresaron como medias (SEM) y fueron analizados estadísticamente con el software SigmaStat (SPSS). Un valor de  $p > 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo (Laboratorio Dr. Jordana, Departamento de Medicina Patológica y Molecular, División Enfermedades Respiratorias y Alergias, Universidad de McMaster, Ontario, Canadá).

Para evaluar el desarrollo de anafilaxia sistémica, Sun *et al.* (2007) controlaron exhaustivamente las respuestas clínicas y biológicas en ratones sensibilizados e inmunizados con proteínas crudas de maní. Los síntomas clínicos observados durante los cinco minutos posteriores a la inmunización comenzaban con una picazón muscular continua y el escarbado del conducto auditivo con las patas traseras. Estos síntomas progresaban rápidamente llegando a producir edema y enrojecimiento alrededor de los ojos o de la boca y un autoaislamiento. La mayoría de estos ratones experimentaban períodos prolongados de inmovilidad que empeoraban gradualmente exhibiendo una falta de respuesta a estímulos de los bigotes y sólo una leve reacción a pinchazos. Las reacciones más graves provocaron pérdida de conocimiento, temblor y muerte.

La cinética y la gravedad de las reacciones anafilácticas fueron consistentes y se correlacionaban inversamente con las lecturas de temperatura interna corporal. Los ratones sensibilizados al maní experimentaban una marcada disminución (hasta 9 C) de la temperatura corporal durante el período de observación de 40 minutos tras la inyección intraperitoneal mientras que los ratones sensibilizados pero inyectados con solución salina en estos experimentos, no manifestaron ninguna reacción anafiláctica. Estos resultados muestran al descenso de la temperatura corporal en ratones inmunizados como síntoma del desarrollo progresivo de reacciones anafilácticas.

Las reacciones de hipersensibilidad registradas en los ratones no fueron significativamente diferentes en ninguno de los tratamientos. Nuestras conclusiones basadas en los resultados obtenidos fueron: (1) el umbral mínimo necesario para no provocar una respuesta alérgica no fue alcanzado con la línea transgénica evaluada, ó (2) los niveles de las proteínas Ara h 1, Ara h 6 y quizás Ara h 3 podrían estar enmascarando los efectos de un Ara h 2 reducido en estos modelos con ratones (Ozias-Akins *et al.*, 2009). Es importante destacar que si bien no se encontraron reacciones cruzadas asociadas entre el maní y otras nueces (Maloney *et al.*, 2008) se sabe que una dosis de tan solo 100 µg de proteínas de maní son necesarias para provocar reacciones inmunológicas en individuos sensibilizados (Hourihae *et al.*, 1997).

La relevancia en la biología humana de estos modelos murinos para evaluar alergenicidad es debatible, por lo que, otros análisis deben llevarse a cabo antes de llegar a una conclusión definitiva. Este biomodelo es objetado por autores como Riascos *et al.* (2010), que opinan que son insuficientes para evaluar todo el mecanismo alergénico involucrado y la sensibilización causada por las proteínas cuya expresión ha sido alterada.

Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Lien Quynh Le *et al.* (2006) quienes silenciaron vía ARN de interferencia, dos genes LTPG1 y LTPG2 que comparten un 76,5% de los nucleótidos y se los involucra con la producción del alergénico *Lyc e 3* en tomate. Este silenciamiento permitió una fuerte disminución en la acumulación de esta proteína y por lo tanto, la obtención de frutos de tomate transgénicos con un contenido de alérgenos reducido. Ellos también pudieron detectar que la producción de histaminas de basófilos humanos fue diferente según se trate de frutos transgénicos o no, pero en ninguno de los casos fue nula, lo que les permitió aseverar que una característica importante de las respuestas inmunológicas a ciertos alimentos se debe a que estos contienen múltiples proteínas alergénicas, como a pacientes sensibilizados a más de una de ellas. En síntesis, este grupo de investigación demostró que el silenciamiento vía ARN de interferencia fue la herramienta que permitió crear un alimento potencialmente hipoalergénico.

Otro estudio preliminar realizado fue el de Northern blot que mostró una reducción de ARN en las líneas transgénicas B3.3.1 y B3.3.2 comparadas con el control Georgia Green, lo cual es coincidente con los resultados obtenidos por Western blot. Es decir, la reducción de Ara h 2 en estas líneas transgénicas se correlacionan positivamente con una reducción en los niveles de ARN total, lo cual permite deducir que el tipo de silenciamiento obtenido fue parcial del tipo postranscripcional.

Según Tang *et al.* (2003), estos resultados son producidos por una alta concentración de fragmentos transgénicos de ARN mensajeros por digestión endonucleótica, los cuales compiten y reclutan a la enzima ARN polimerasa ARN dependiente (RdRP, por sus siglas en inglés), lo que genera fragmentos 3' no funcionales del producto digerido. Por otro lado, la digestión de los *micro*ARN del sistema regulatorio



endógeno de la planta no podría continuar con la síntesis proteica, porque los ARNm objetivo no se encuentran presentes en concentraciones suficientes como para competir por dicha enzima. Este desbalance por competencia es lo que produce un silenciamiento parcial y la presencia de concentraciones proteicas mínimas, aunque suficientes para producir reacciones alérgicas tanto en pacientes como en ratones sensibilizados.

Estas líneas transgénicas nos permitieron comprobar la eficacia indiscutible que posee la metodología del silenciamiento génico vía ARN de interferencia, especialmente cuando se utiliza una construcción con fragmentos formando un “loop” o bucle, lo cual permitió interferir específicamente con el gen objetivo. En manzana, Gilissen *et al.* (2005a) mediante una construcción semejante pudieron silenciar exitosamente el gen *Mal d 1*, responsable de reacciones alérgicas en pacientes sensibilizados. Al igual que Ara h 2 en maní, esta proteína está relacionada con la defensa de la planta a patógenos, pero su silenciamiento no alteró el fenotipo de las plantas obtenidas *in vitro* ni su sanidad comparadas con las no transgénicas.

Lo mismo se observó en soja, cuando Herman (2005) obtuvo plantas transgénicas que produjeron semillas con la proteína P34/*Gly n Bd 30k* totalmente silenciada. Estas plantas tampoco mostraron diferencias fenotípicas con su control. Este trabajo también ofreció la oportunidad de reducir alergias provocadas por alimentos con contenido de soja en humanos y animales, y produjo a su vez, un sistema modelo para estudiar reacciones alérgicas utilizando herramientas biotecnológicas.

Por otro lado, en Japón (Nakamura, 1996), pudieron reprimir la síntesis de alérgenos en semillas maduras de arroz por la metodología de ARNi aún sabiendo que estas proteínas eran producto de una familia multigenética. Estos resultados concuerdan en gran medida con los obtenidos en el presente trabajo, lo que confirma la eficiencia que se le otorga a esta metodología como herramienta para inducir silenciamiento génico.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES

El silenciamiento génico vía ARN de interferencia fue exitoso obteniéndose líneas de maní con un contenido reducido y en algunos casos, nulo de proteínas alergénicas del tipo Ara h 2 y Ara h 6.

Cuatro líneas transgénicas fueron obtenidas por transformación vía biobalística y se confirmaron tres transformaciones independientes demostrándose también, que las líneas **B3.3.1** y **B3.3.2** son sublíneas del mismo evento de transformación, con una reducción de la proteína Ara h 2 de un ~90% aún suficiente para activar reacciones alergénicas en ratones.

En la línea transgénica **B4.6.1** se logró una reducción notable no solo en el contenido de la proteína Ara h 2 sino también de la proteína Ara h 6, probablemente porque el fragmento *ara h 2* utilizado en la construcción compartía una homología del 81% con la secuencia de la región codificante del gen *ara h 6*, lo cual favoreció el silenciamiento doble de ambas proteínas. En la línea **B11.1.1**, a pesar de contener múltiples inserciones del transgen, no se pudieron detectar ninguna de las dos bandas correspondientes a estas proteínas por inmunodetección. Si bien esto no implicó la obtención de un maní hipoalergénico, es posible que signifique un producto que induzca reacciones menos agudas. Se podría inclusive pensar, que el consumo de un alimento con un menor contenido de este tipo de proteínas, podría evitar hipersensibilizaciones ó lograr reacciones inmunológicas más tardías, permitiendo quizás disminuir el porcentaje de niños afectados.

La Ingeniería Genética en plantas nos permitió remover proteínas alergénicas que plantean dificultades para una población importante de personas sensibles, que aún no cuentan con alternativas de control más que la de evitar su consumo. Inclusive, aunque aún se encuentre en estudio el uso de cultivos hipoalergénicos en inmunoterapia, es posible especular que plantas con proteínas silenciadas o reducidas podrían inducir una tolerancia significativa y durable en pacientes que sufren alergias alimenticias.

Es importante proyectar estos resultados, considerando fundamental continuar con la evaluación de estas líneas transgénicas realizando mediante estudios adicionales para confirmar y/o reevaluar en otros contextos los resultados obtenidos, en especial cuando se pruebe la estabilidad del transgen por homocigosis y por ende, sea posible la obtención de mayor cantidad de semillas. Se deberían evaluar las características de las plantas transgénicas y su segregación a través de las generaciones. Examinar más exhaustivamente con pruebas cutáneas (Astier *et al.*, 2006) los efectos que producirían en pacientes sensibilizados aquellas líneas como la B11, en la cual se logró silenciar dos proteínas, Ara h 2 y Ara h 6, y por ende, la concentración final de proteínas alergénicas totales se encuentra reducida. Desarrollar modelos animales donde se consideren distintos métodos de procesamiento usados comúnmente en maní como tostado, frito y hervido.

Objetivos como el silenciar en forma conjunta más de una proteína facilitaría la obtención de líneas con un contenido aún menor de alergénicos, siempre que se compruebe la no alteración de la fisiología de la planta y su capacidad para reproducirse exitosamente. Inclusive, el éxito de los resultados obtenidos en este proyecto debería impulsar el estudio e investigación de las posibilidades de silenciar la familia génica completa, como se ha logrado en trigo con el silenciamiento del grupo completo de las gliadinas, responsables de las reacciones autoinmunes al gluten en pacientes celíacos (Wieser *et al.*, 2006; Gil-Humanes *et al.*, 2008).

Estudios de esta magnitud ponen de relieve la idea de Pagliano (2004) quien afirmó que la nueva economía en naciones que pretenden crecer y generar riqueza, estará determinada en la aceptación del desafío que implica el aprender a utilizar los idiomas «digital y genético».

## BIBLIOGRAFÍA

- Astier, C., M. Morisset, O. Roitel, F. Codreanu, S. Jacquenet, P. Franck, V. Ogier, N. Petit, B. Proust, D. Moneret-Vautrin, W. Burks, B. Bihain, H. A. Sampson, and G. Kanny 2006. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* Vol. 118, N 1: 250 – 256.
- Baker, C. M., H. Y. Wetzstein 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut, *Arachis hypogaea*. *Plant Cell Reports* 11: 71-75.
- Baker, C. M., H. Y. Wetzstein 1995. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4-D. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 249-254.
- Basha S. M. 1988. Resolution of Peanut Seed Proteins by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1990. 36, 778-781.
- Bertioli, D. J., G. Seijo, F. O. Freitas, J. F. M. Valls, S. C. M. Leal-Bertioli and M. C. Moretzsohn 2011. An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 9 (1): 134–149.
- Bonetta, L. 2004. RNAi: Silencing never sounded better. *Nature methods*. Vol 1: 79-86.
- Bongiovanni, R.; M. Giletta y N. Barberis 2008. El cluster del maní en Córdoba. Pp. 45-49. En: Bongiovanni, R. [Ed.]. *Economía de los cultivos industriales: algodón, caña de azúcar, maní, tabaco, té y yerba mate. Proyecto Específico Análisis económico y de Mercado, Oportunidad, Riesgo y Competitividad para los Sistemas Productivos y los Productos Agroindustriales (PIND3262)*. 1ª. ed. Manfredi, Córdoba (AR): INTA. ISBN 978-987-521-336-4.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Breiteneder H., C. Radauer 2004. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 114(1):127–130.
- Breiteneder, H., C. Ebner 2001. Atopic allergens of plant foods. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 1:261-267.
- Burks A. W., L. W. Williams, R. M. Helm, C. Connaughton, G. Cockrell, T. O'Brien 1991. Identification of a major peanut allergen, Ara-H-I, in patients with atopic-dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol* 88:172-179.
- Burks A. W., G. Cockrell, C. Connaughton, A. Karpas, R. M. Helm 1995. Epitope specificity of the major peanut allergen, Ara h II. *J Allergy Clin Immunol* **95**: 607-611.
- Burks, A. W., H. A. Sampson, G. A. Bannon 1998. Review Article Series II. Peanut allergens. *Allergy* 53: 725–730.
- Burks, W. 2003. Peanut allergy: a growing phenomenon. *J. Clin. Invest.* 111:950–952.

- Carr, W. W. 2005. Clinical pearls and pitfalls: Peanut allergy. *Allergy Asthma Proc.* 26, 145–147.
- Chatel J. M., H. Bernard, F. M. Orson 2003. Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. *Allergy Immunol* 131:14–18.
- Chen S., M. Dickman 2004. *Bcl-2* family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *J. Exp. Botany* 55 (408): 2617-23.
- Cheng, M., D. C. H. Hsi and G. C. Phillips 1992. *In vitro* regeneration of Valencia-type Peanut (*Arachis hypogaea* L.) from Cultured Petiolules, Epicotyl Sections and Other Seedling Explants. *Peanut Science* 19: 82-87.
- Chu, Y., P. Faustinelli, M. L. Ramos, M. Hajduch, S. Stevenson, J. J. Thelen, S. J. Maleki, P. Ozias-Akins 2008. Reduction of IgE binding and non-promotion of *Aspergillus flavus* fungal growth by simultaneously silencing Ara h 2 and Ara h 6 in peanut. *J Agric Food Chem* 56 (23): 11225-33.
- Derka, C. A.; A. N. Sánchez 2006. Recopilación bibliográfica: Cultivo del Maní (*Arachis hypogaea*) PROFEDER – Proyecto MINIFUNDIO – INTA AER Sáenz Peña.
- Dodo, H., K. Konan, and O. Vizquez 2005. A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Food Allergy* 67-73.
- Echenique, V., G. Spangenberg 1999. Métodos de obtención y análisis de plantas transgénicas. Ed. Universidad Nacional del Sur, p.21-32.
- Faustinelli, P. F., R. W. Racca, D. J. Collino, A. de L. Avila, P. Ozias-Akins. 2009. "Effect of Growth Regulators on Peanut "Florman INTA" Regeneration". *Peanut Science*, Vol. 36, Issue 2: 138-143.
- Fernández E. M., O. Giayetto (compiladores) 2006. El Cultivo de maní en Córdoba. 1<sup>a</sup> ed. Río Cuarto: Univ. Nacional de Río Cuarto. 280 p.
- Gil-Humanes, J.; F. Pistón; A. Hernando; J. B. Alvarez; P. R. Shewry; F. Barro 2008. Silencing of  $\gamma$ -gliadins by RNA interference (RNAi) in bread wheat. *Journal of Cereal Science* 48 (3): 565-568.
- Gilissen, L. J. W. J., S. T. H. P. Bolhaar, C. I. Matos, G. J. A. Rouwendal, M. J. Boone, F. A. Krens, L. Zuidmeer, A. van Leeuwen, J. Akkerdaas, K. Hoffmann-Sommergruber, A. C. Knulst, D. Bosch, W. E. van de Weg, and R. van Ree 2005a. Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (2): 364-369.
- Gilissen, L. J. W. J., G. Van Heteren, I. M. Van Der Meer and R. D. Hall 2005b. Towards prevention of allergy through an integrated multidisciplinary approach. *Wageningen Journal of Life Sciences NJAS* 53-1.
- Grennan, A. K. 2005. *Plant Physiology* 139, 563-565.
- Hajduch M., A. Ganapathy, J. W. Stein, J. J. Thelen 2005. A Systematic Proteomic Study of Seed-Filling in Soybean: Establishment of High-Resolution Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. *Plant Physiol.* 137:1397-1419.

- Hazra, S., S. S. Sathaye and A. F. Mascarenhas 1989. Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea*). *Bio/Technology* 7: 949-951.
- Herman, E. M., R. M. Helm, R. Jung, A. J. Kinney 2003. Genetic Modification Removes an Immunodominant Allergen from Soybean. *Plant Physiology* Vol. 132, 36-43.
- Herman, E. M. 2005. Soybean Allergenicity and Suppression of the Immunodominant Allergen. *Crop Sci.* 45: 462-467.
- Hourihane J. O., S. A. Kilburn, J. A. Nordlee, S. L. Hefle, S. L. Taylor, J. O. Warner 1997. An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, doubleblind, placebo-controlled food challenge study. *J Allergy Clin Immunol* 100:596-600.
- <http://www.pca.com.au/> About Allergens. Peanut Company of Australia Limited
- <http://www.peanut-institute.org> The Peanut Institute
- Kang, Il-Ho, P. Srivastava, P. Ozias-Akins, M. Gallo. 2007. Temporal and Spatial Expression of the Major Allergens in Developing and Germinating Peanut Seed. *Plant Physiology*, Vol. 144, pp. 836-845.
- Kleber-Janke T., R. Cramer, U. Appenzeller, M. Schlaak, W. M. Becker 1999. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int Arch Allergy Immunol* 119:265-274
- Koppelman S. J, M. Wensing, M. Ertmann, A. C. Knulst, E. F. Knol 2004. Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clin Exp Allergy* 34: 583-590.
- Kumapatla, S. P.; T. C. Hall 1998. Recurrent onset of epigenetic silencing in rice harboring a multi-copy transgene. *The Plant Journal* 14 (1): 129-135.
- Lien Quynh Le, Y. Lorenz, S. Scheurer, K. Fötisch, E. Enrique, J. Bartra, S. Biemelt, S. Vieths, U. Sonnewald 2006. Design of tomato fruits with reduced allergenicity by *dsRNAi*-mediated inhibition of ns-LTP (*Lyc e 3*) expression. *Plant Biotechnology Journal* 4: 231-242.
- Litz, R. E., R. L. Jarret 1993. Regeneración de plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. En *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Capítulo 7. Pág.143-172.
- López, G. M. 2011. Serie de estudios sectoriales: Caso del maní y derivados del maní. IN: Fundación INAI (Coord.). Programa de Inserción Agrícola. Apoyo a los procesos de apertura e integración al comercio internacional ATN/ME-9565-RG BID/FOMIN. 128 pp.
- Mackey, M. A. y C. R. Santerre 2000. La biotecnología y nuestra provisión de alimentos. *Nutrition Today* vol. 35, 4: 120-128
- Maleki, S. J., O. Viquez, T. Jacks, H. Dodo, E. T. Champagne, Si-Yin Chung, S. J. Landry 2003. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J. Allergy Clin Immunol* 112, 190-195.

- Maloney, J. M., M. Rudengren, S. Ahlstedt, S. A. Bock, H. A. Sampson 2008. The use of serum-specific IgE measurements for the diagnosis of peanut, tree nut, and seed allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122: 145-151.
- McKently, A. H. 1991a. Direct somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *In vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 197-200.
- McKently, A. H., G. A. Moore, and F. P. Gardner 1991b. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue. *Crop Sci.* 31:833-837.
- Murashige, T., F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Murty, U. R.; N. G. P. Rao; P. B. Kirti y M. Bharati 1980. Fertilization in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) *Oléagineux* 36 (2): 73-76.
- Nakamura R., T. Matsuda 1996. Rice allergenic protein and molecular-genetic approach for hypoallergenic rice. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (8): 1215-1221.
- Ozias-Akins P. 1989. Plant regeneration from immature embryos of peanut. *Plant Cell Reports* 8: 217-218.
- Ozias-Akins, P., W. F. Anderson and C. C. Holbrook 1992. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L.: genotype comparison. *Plant Science* 83: 103-111.
- Ozias-Akins, P., J. A. Schnell, W. F. Anderson, C. Singsit, T. E. Clemente, M. J. Adang, and A. K. Weissinger 1993. Regeneration of transgenic peanut plants from stably transformed embryogenic callus. *Plant Science* 93, 185-94.
- Ozias-Akins, P., R. Gill 2001. Progress in the development of tissue culture and transformation methods applicable to the production of transgenic peanut. *Peanut Science* 28: 123-131.
- Ozias-Akins P, M. L. Ramos, P. Faustinelli, Y. Chu, S. Maleki, J. J. Thelen, J. Huntley, K. Arias, M. Jordana 2009. Spontaneous and induced variability of allergens in commodity crops: *Ara h 2* in peanut as a case study. *Regulatory Toxicology & Pharmacology*: Vol. 54 Issue 3, pS37-S40.
- Pagliano, D. 2004. El papel de las nuevas biotecnologías en la producción agropecuaria. Capítulo 2. En *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. ISBN 987-521-138-9
- Palmer, G. W., D. A. Dibbern, S. W. Burks, G. A. Bannon, S. A. Bock, H. S. Porterfield, R. A. McDermott, S. C. Dreskin 2005. Comparative potency of *Ara h 1* and *Ara h 2* in immunochemical and functional assays of allergenicity. *Clin. Immunol.* 115 (3): 302-312.
- Parrish, S., J. Fleenor, S. Xu, C. Mello and A. Fire 2000. Functional anatomy of a *dsRNA* trigger. Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell* 6: 1077-1087.
- Pham, T. S., E. J. Rudner 2000. Peanut Allergy. *Cutis*: 285-289.
- Qu, R., A. de Kochko, L. Zhang, P. Marmey, L. Li, W. Tian, S. Zhang, C. M. Fauquet, R. N. Beachy 1996. Analysis of a large number of independent transgenic rice plants produced by the biolistic method. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 32: 233-240.

- Ramos M. L., G. Fleming, Y. Chu, Y. Akiyama, M. Gallo, P. Ozias-Akins 2006. Chromosomal and phylogenetic context for conglutin genes in *Arachis* based on genomic sequence. *Mol Genet Genomics* 275: 578-592.
- Riascos, J. J., A. K. Weissinger, S. M. Weissinger and A. W. Burks 2010. Hypoallergenic legume crops and food allergy: Factors affecting feasibility and risk. *J. Agric. Food Chem.* 58: 20-27.
- Roca, W. M., L. A. Mroginski 1993. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.* Cali, Colombia, CIAT.
- Roy, K., M. Hai-Quan, S. Huang and K. W. Leong 1999. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine* 5 (4) 387-381.
- Seijo J. G., G. I. Lavia, A. Fernandez, A. Krapovickas, D. Ducasse, E. A. Moscone 2004. Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (*Leguminosae*). *Am J Bot* 91(9):1294–1303.
- Sen M., R. Kopper, L. Pons, E. C. Abraham, A. W. Burks, G. A. Bannon 2002. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *J Immunol* 169:882–887.
- Sharma A. D., P. K. Gill, P. Singh 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 415a-415f.
- Shewry, P. R., J. A. Napier, A. S. Tatham 1995. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*, Vol. 7, 945-956.
- Sicherer, S. H., A. Munoz-Furlong, H. A. Sampson 2003. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digital dial by means of a random digital dial telephone survey: A 5-year follow-up study. *J. Allergy Clin. Immunol.* Vol. 112, N.6, 1203-1207.
- Singh, M. B., P. L. Bhalla 2008. Genetic engineering for removing food allergens from plants. *Trends in Plant Science* Vol.13 No.6, 257-260.
- Singsit, Ch., M. J. Adang, R. E. Lynch, W. F. Anderson, A. Wang, G. Cardineau, P. Ozias-Akins 1997. Expression of a *Bacillus thuringiensis cryIA(c)* gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk borer. *Transgenic Research* 6, 169–176
- Small, I. 2007. RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Current opinion in Biotechnology* 18: 148-153.
- Smartt J., W. C. Gregory, M. P. Gregory 1978. The genomes of *Arachis hypogaea*. 1. Cytogenetics studies of putative genome donors. *Euphytica* 27:665–675
- Sun, J., K. Arias, D. Alvarez, R. Fattouh, T. Walker, S. Goncharova, B. Kim, S. Wasserman, J. Reed, A. J. Coyle, M. Jordana 2007. Impact of CD40 Ligand,  $\beta$  Cells, and Mast Cells in Peanut-Induced Anaphylactic Responses. *The Journal of Immunology*, 179: 6696–6703.



- Sunilkumar, G., L. M. Campbell, L. Puckhabert, R. D. Stipanovict and K. S. Rathore 2006. From the Cover: engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18054-18059.
- Tang, G., B. J. Reinhart, D. P. Bartel, P. D. Zamore 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development* 17: 49-63.
- Taylor, S. L., W. W. Busse, M. I. Sachs, J. L. Parker, J. W. Yunginger 1981. Peanut oil is not allergenic to peanut sensitive individuals. *J. Allergy Clin Immunol* 68:372-375.
- Taylor, S. L., S. L. Hefle 2001. Will genetically modified foods be allergenic? *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 (5) 765-771.
- Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspects. International review of cytology, Supplement 11A. Academic Press, Nueva York. p.71-111.
- Tijsterman, M., R. F. Retting, K. L. Okihara, T. Sijen, R. H. Plasterk 2002. RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. Elegans* by short antisense RNAs. *Science* 295: 694-697.
- Wei Tang, R. J. Newton, D. A. Weidner 2007. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine *J. Exp. Bot.* 58(3): 545-554.
- Wieser, H., P. Koehler, A. Folck, D. Becker 2006. Characterization of wheat with strongly reduced alpha-gliadin content. AACC International San Francisco.
- Xiang P., T. A. Beardslee, M. G. Zeece, M. G., J. Markwell, G. Sarath 2002. Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 and Ara h 4. *J. Agric Food Chem* 52 (5): 1404-09.