

# Resum

La immunització passiva de les mucoses es defineix com la transferència d'anticossos actius d'un organisme a les superfícies de les mucoses d'un altre organisme per a la prevenció o tractament de malalties infeccioses. La immunització passiva de les mucoses té un gran potencial en la prevenció i tractament d'infeccions gatrointestinals com les causades per rotavirus, amb més de 114 milions d'episodis de diarrea y més de 450.000 morts a l'any. Tanmateix, la producció dels anticossos recombinants suposa una forta despesa doncs el sistema de producció actual està basat en cèl·lules de mamífers, fet pel qual relenteix la producció de grans quantitats d'anticossos per a estratègies de immunització passiva.

Les plantes, com plataforma d'expressió alternativa, podrien facilitar l'escalada i la reducció de les despeses. A més a més, la utilització com a plataformes d'expressió dels òrgans comestibles de les plantes, solen estar catalogades com *Generalment-Reconeguts-Com-Segurs* (GRAS), podrien suposar una reducció addicional de les despeses al disminuir els requeriments de purificació dels anticossos. En aquest treball s'analitza la viabilitat de la utilització dels fruits com biofàctories econòmiques d'anticossos humans, aquests anticossos poden ser administrats oralment com extractes crus o bé com formulacions parcialment purificades en estratègies de immunització passiva de mucoses.

En la primera secció d'aquesta tesi es descriu la generació de plantes de tomaca que produeixen en els seus fruits una immunoglobulina A (IgA) model front a rotavirus. El resultat d'aquest treball és l'obtenció d'una línia elit homocigota, de la qual els seus fruits produeixen una promedi de 41µg d'IgA per gram fresc, equivalent a 0.69 mg de IgA per gram de pols de tomaca. Certes formulacions, parcialment purificades, derivades de tomaques amb IgA, foren capaces d'inhibir fortament la infecció viral en un assaig in vitro. A més, amb el propòsit de poder diferenciar les tomaques transgèniques amb IgA de les tomaques silvestres, les tomaques transgèniques amb IgA es creuaren amb una línia de tomaca transgènica que expressava els gens d'*Antirrhinum majus* que codifiquen per als factors de transcripció Rosea1 i Delila. Aquests factors de transcripció donen al fruit un intens color morat. El resultat d'aquest encreuament és l'obtenció d'una tomaca morada que presenta elevats nivells de IgA humana amb, també, alts nivells d'antocians.

En la segona secció d'aquesta tesi, la composició de les tomaques amb IgA sigué analitzada en la busca de possibles efectes no intencionats que pogueren comprometre l'estatus GRAS del producte final. Les tomaques transgèniques amb IgA foren comparades amb

tomaques silvestres i també amb varietats comercials utilitzant tècniques de proteòmica i metabolòmica. Mitjançant gels 2D-DIGE i LC-MSMS per a la identificació de proteïnes es demostrà que totes les proteïnes diferencials que augmentaven els seus nivells en les línies transgèniques corresponien únicament a cadenes o fragments de immunoglobulines. A més, un anàlisi no dirigit a través de UPLC-MS permeté identificar variacions entre línies transgèniques i no transgèniques. No obstant això, aquestes variacions no es pogueren associar a la presència de nivells anormals de cap metabolit secundari dels fruits amb IgA. Així que, d'aquest anàlisi no es pot concloure que les formulacions a partir de tomaques amb IgA foren menys segures que les seues corresponents formulacions amb tomaques silvestres.

La tercera secció d'aquesta tesi es centrà en l'optimització de la forma secretora de la IgA (sIgA), llavors és l'isòtip d'anticòs més rellevant en la imunització passiva de les mucoses. La producció de sIgA requereix de la co-expressió de quatre unitats transcripcionals que codifiquen per a la cadena lleugera (LC), la cadena pesada (HC), la cadena J (JC) i el component secretor (SC). Per optimitzar aquesta producció, es construïren setze versions de una sIgA humana front a rotavirus utilitzant el sistema d'ensamblatge multigènic GoldenBraid. Aquestes setze versions consisteixen en diferents combinacions de cadenes d'anticòs, incorporant alguna d'elles una senyal de retenció al reticle endoplasmàtic. Mitjançant expressió transitòria en *Nicotiana benthamiana* de totes les versions de sIgA s'obtingueren nivells màxims d'expressió amb la versió de sIgA que tenia la cadena pesada de tipus alfa1, la cadena lleugera de tipus lambda i una senyal KDEL unida al component secretor. La forma secretora representa un 33% del total de IgA acumulada.