

RAQUEL DE OLIVEIRA FARIA

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HSP60 HUMANA (HSPD1) EM ALFACE  
(*Lactuca sativa* L.) NA PREVENÇÃO DA COLITE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F224e  
2017 Faria, Raquel de Oliveira, 1987-  
Expressão da proteína HSP60 humana (HSPD1) em alface  
(*Lactuca sativa* L.) na prevenção da colite experimental / Raquel de  
Oliveira Faria. - Viçosa, MG, 2017.  
85f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.77-85.

1. Proteínas recombinantes. 2. *Lactuca sativa*. 3. Plantas  
transgênicas. 4. Imunorregulação. 5. Mucosa intestinal. I.  
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal.  
Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 572.6

RAQUEL DE OLIVEIRA FARIA

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HSP60 HUMANA (HSPD1) EM ALFACE  
(*Lactuca sativa* L.) NA PREVENÇÃO DA COLITE EXPERIMENTAL**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 04 de agosto de 2017.

  
Luciano Gomes Fietto

  
Agustin Zsögön

  
Ana Maria Caetano de Faria  
(Coorientadora)

  
Glaucia Barbosa Cabral

  
Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

“Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a Ele seja a glória na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém!”

Efésios 3: 20, 21

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Pai cuidadoso que sempre esteve no controle de todas as coisas e possibilitou que conseguisse alcançar meus objetivos.

Agradeço aos meus queridos pais, Ronaldo e Marilene, pelo apoio em tudo, pela torcida, pelas orações e, acima de tudo, pelo exemplo de pessoas honestas e verdadeiras.

Agradeço ao meu querido irmão, Rafael, por todo carinho e amizade.

Agradeço ao meu amado marido, Rodrigo, que conheci durante minha caminhada pelo doutorado, e me ajudou, com amor, a ter ânimo nos dias difíceis e continuar até o fim.

Agradeço ao meu orientador, prof. Wagner Otoni, pela amizade, pelo respeito, pela compreensão, por acreditar que conseguiria vencer esse desafio e por confiar na minha capacidade.

Agradeço ao prof. Francisco Aragão, pela coorientação, por receber-me no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG) e pela oportunidade de conhecer mais sobre transformação genética de plantas.

Agradeço à profa Ana Maria pela coorientação e por receber-me no Laboratório de Imunobiologia (LIB). Por vibrar com os bons resultados e assegurar que conseguiria executar os experimentos, mesmo em tempos de recursos escassos.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTII), por todo apoio, amizade e cuidar das minhas plantas enquanto estive fora.

Agradeço ao pessoal do LEG, pela amizade, apoio e por me ensinarem a trabalhar com transformação genética de plantas. Renato, obrigada por sempre cuidar das minhas plantas quando estive ausente.

Agradeço ao pessoal do LIB, pela amizade e por me ajudarem a aprender um pouco sobre imunologia. Juliana e Priscilla, sem vocês não teria conseguido.

Agradeço à profa. Denise Caro, pela ajuda com as análises histológicas do cólon.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, à Embrapa-Cenargen e à Universidade Federal de Minas Gerais pela infraestrutura e valiosa oportunidade de crescimento profissional.

Ao povo brasileiro, que por meio da CAPES e do CNPq, me permitiram ter bolsa durante o doutorado, e por meio da FAPEMIG financiaram este projeto.

E agradeço enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram nesta caminhada.

## **BIOGRAFIA**

RAQUEL DE OLIVEIRA FARIA, filha de Marilene de Oliveira Faria e Ronaldo Moreira de Faria, nasceu em 22 de março de 1987, na cidade de Vitória da Conquista, Estado da Bahia.

Graduou-se em Ciências Biológicas - Licenciatura em dezembro de 2010, pela Universidade Federal de Minas Gerais. Iniciou o mestrado em Biologia Vegetal, com ênfase em Fisiologia Vegetal, em março de 2011 na mesma Universidade, tendo defendido dissertação em fevereiro de 2013. Iniciou o doutorado em Fisiologia Vegetal em julho de 2013, na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em agosto de 2017.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão geral do complexo com formato de “bola de futebol americano” HSP60-HSP10 de mamíferos.....	23
<b>Figura 2.</b> Sequência otimizada do gene da proteína HSP60 humana com sequências específicas adicionadas para expressão em plantas. ....	33
<b>Figura 3.</b> Sequência otimizada da proteína após a tradução do gene HSP60 com sequências específicas adicionadas.....	34
<b>Figura 4.</b> Cultivo das gerações T1 e T2 de alface geneticamente modificado em sistema de hidroponia em casa de vegetação. ....	39
<b>Figura 5.</b> Esquema do desenho experimental da avaliação do efeito da administração oral da folha de alface transgênica a camundongos com colite experimental.....	45
<b>Figura 6.</b> Mapa do vetor pC3300HSP60NUC Slvp1 .....	48
<b>Figura 7.</b> Mapa do vetor pC3300HSP60NUC.....	49
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do padrão de bandas esperado após digestão do vetor pC3300HSP60NUC com as enzimas de restrição EcoRV e NcoI+SacI. ....	50
<b>Figura 9.</b> Padrão de bandas encontrado após digestão do vetor pC3300HSP60NUC com as enzimas de restrição EcoRV e NcoI+SacI.....	50
<b>Figura 10.</b> Gel de agarose com padrão de bandas encontrado após PCR das colônias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas com o vetor pC3300HSP60NUC. ....	51
<b>Figura 11.</b> Etapas de transformação genética e regeneração in vitro de <i>Lactuca sativa</i> .....	53
<b>Figura 12.</b> Aclimatização e etapas do desenvolvimento em casa de vegetação de plantas de <i>Lactuca sativa</i> inoculadas com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	54
<b>Figura 13.</b> Gel de agarose 1% mostrando resultado de PCR para confirmação de transgenia das plantas de alface T0.....	55
<b>Figura 14.</b> Gel de agarose a 1% para confirmação via PCR, da transgenia das plantas de alface T1 e T2 cultivadas em hidroponia. ....	56
<b>Figura 15.</b> Gel de agarose a 1% para confirmação via PCR, da transgenia das plantas de alface T1 e T2 cultivadas em hidroponia. ....	57
<b>Figura 16.</b> Autorradiografia obtida pela técnica de Southern blot para determinação do número de cópias de T-DNA em plantas T0 transgênicas de <i>Lactuca sativa</i> . ....	58
<b>Figura 17.</b> Autorradiografia obtida pela técnica de Southern blot para determinação do número de cópias de T-DNA em plantas T0 transgênicas de <i>Lactuca sativa</i> . ....	59
<b>Figura 18.</b> Autorradiografia obtida pela técnica de Southern blot para determinação do número de cópias de T-DNA em plantas T1 transgênicas de <i>Lactuca sativa</i> . ....	60
<b>Figura 19.</b> Detecção da proteína HSP60 humana em linhagens de plantas T0 transgênicas de alface, pela técnica de Western blot. ....	61
<b>Figura 20.</b> Detecção da proteína HSP60 humana em linhagens de plantas T0 transgênicas de alface, pela técnica de Western blot.....	61
<b>Figura 21.</b> Detecção da proteína HSP60 humana em linhagens de plantas T0 transgênicas de alface, pela técnica de Western blot. ....	62
<b>Figura 22.</b> Detecção da proteína HSP60 humana em linhagens de plantas T2 transgênicas de alface, pela técnica de Western blot. ....	62
<b>Figura 23.</b> Porcentagem de variação do peso corporal dos camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana por via oral misturada à dieta.....	64

<b>Figura 24.</b> Escore inflamatório macroscópico da colite ulcerativa aguda em camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana por via oral misturada à dieta.....	65
<b>Figura 25.</b> Escore histológico da colite ulcerativa aguda em camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana por via oral misturada à dieta.....	66
<b>Figura 26.</b> Representação da avaliação histológica da mucosa do cólon em camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana por via oral misturada à dieta.....	67
<b>Figura 27.</b> A sequência da proteína HSP60 de <i>A. thaliana</i> .....	71
<b>Figura 28.</b> Alinhamento entre sequência de aminoácidos da proteína HSP60 humana otimizada para plantas e da sequência da HSP60 de <i>A. thaliana</i> .....	71
<b>Figura 29.</b> Alinhamento entre sequência de aminoácidos da proteína HSP60 humana otimizada para plantas, da sequência da HSP60 de <i>A. thaliana</i> , e da sequência imunogênica reconhecida pelo anticorpo.....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação de diferentes plataformas de expressão para produção de farmacêuticos. ....	16
<b>Tabela 2.</b> Composição nutricional por 100 gramas de alface.....	28
<b>Tabela 3.</b> Codon Usage utilizado para otimização da sequência do gene HSP60 humano para expressão em plantas.....	32
<b>Tabela 4.</b> Composição da solução nutritiva para cultivo hidropônico de alface em casa de vegetação	38
<b>Tabela 5.</b> Índice macroscópico da colite aguda induzida por DSS.....	46
<b>Tabela 6.</b> Índice microscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos.....	47
<b>Tabela 7.</b> Eficiência de transformação genética de alface usando diferentes vetores. ....	52
<b>Tabela 8.</b> Resultado da verificação de transgenia por PCR, com primers específicos para o gene HSP60 humano.....	57

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

RESUMO

ABSTRACT

1 - INTRODUÇÃO .....	15
Plantas como plataformas para produção de proteínas recombinantes .....	15
Tolerância oral.....	19
Proteínas de Choque Térmico (HSPs).....	22
HSP60.....	22
HSP60 em plantas .....	25
A alface como modelo para aplicações biotecnológicas .....	27
Proposta do trabalho.....	28
2 - HIPÓTESES .....	30
3 - OBJETIVO GERAL .....	30
3.1. Objetivos específicos.....	30
4 - MATERIAL E MÉTODOS .....	31
4.1. Otimização da sequência do gene HSP60 humano e construção do vetor .....	31
4.2. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	34
4.3. Transformação de Escherichia coli e digestão com endonucleases .....	34
4.4. Transformação de Agrobacterium tumefaciens e confirmação por PCR .....	35
4.5. Transformação genética de alface mediada por A. tumefaciens .....	36
4.6. Aclimatização e cultivo em hidroponia das plantas de alface .....	37
4.7. Caracterização molecular dos transformantes .....	39
4.7.1. Extração de DNA genômico e reação da polimerase em cadeia (PCR) .....	39
4.7.2. Extração de DNA genômico e Southern blot .....	40

4.7.3. Extração de proteínas e Western blot .....	42
4.8. Avaliação do efeito da administração oral da folha de alface transgênica a camundongos com colite experimental .....	44
4.8.1. Modelo de colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) .....	44
4.8.2. Administração oral da folha de alface transgênica a camundongos .....	44
4.8.3. Desenho experimental .....	45
4.8.4. Avaliação do peso corporal dos animais .....	45
4.8.5. Avaliação da gravidade da colite induzida por DSS .....	46
4.8.6. Análise histológica da colite.....	46
4.9. Análises estatísticas.....	47
5 - RESULTADOS.....	47
5.1. Construção dos vetores.....	47
5.2. Transformação e cultivo de Escherichia coli e Agrobacterium tumefaciens .....	49
5.3. Transformação genética de alface mediada por A. tumefaciens .....	51
5.4. Aclimatização e cultivo em hidroponia das plantas de alface .....	53
5.5. Confirmação da presença do transgene por PCR .....	54
5.6. Southern blot .....	58
5.7. Western blot.....	60
5.8. Avaliação do peso corporal dos animais .....	63
5.9. Avaliação da gravidade da colite induzida por DSS .....	64
5.10. Análise histológica da colite.....	65
6 - DISCUSSÃO .....	68
7 - CONCLUSÕES GERAIS .....	76
REFERÊNCIAS .....	77

## LISTA DE ABREVIações

ADP - Adenosina difosfato

AIA - Ácido indolil-3-acético

ANA - Ácido  $\alpha$ -naftaleno acético

ANOVA - Análise de variância

BAP - 6-benzilaminopurina

BAR - Gene que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase, que confere resistência ao herbicida glifosinato de amônia

BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BSA - Albumina do soro bovino

CaMV35S - Promotor do vírus do mosaico-dourado da couve flor

CEBIO - Centro de Bioterismo

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CQB - Certificado de Qualidade em Biossegurança

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DSS - Sulfato de Sódio Dextrano

DTT - Ditioneitol

EAE - Encefalomielite autoimune experimental

ELISA - Ensaio Imunoenzimático Indireto

EMBRAPA CENARGEN - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, unidade Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ex-4 - Exendina-4

Foxp3 - Forkhead box P3

GA - Glifosinato de amônia

GALT - Tecido linfoide associado à mucosa intestinal

GS - Glutamina sintetase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HBsAg - Antígeno de superfície da hepatite B

HCl - Ácido clorídrico

HSP60 - Proteína de choque térmico de 60 kD

HSPs - Proteínas de choque térmico

IBA - Ácido indolbutírico

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

kD - Kilodaltons

KDEL - Sequência formada por quatro aminoácidos: Lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina (Lys-Asp-Glu-Leu)

LAP+ - Células que expressam LAP (latency-associated peptide)

LB - Meio Luria-Bertani

MALT - Tecido linfoide associado à mucosa

MS - Meio Murashige & Skoog

NaCl - Cloreto de sódio

NBT - Nitroblue tetrazolium

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NPTI - Neomicina fosfotransferase, gene que confere resistência à canamicina.

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Pb- Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

PPM - Partes por milhão

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

rhPDGF-BB - Proteína recombinante de plaquetas humanas derivada do fator de crescimento

BB

RE - Retículo endoplasmático

RNA - Ácido ribonucleico

RNAse - Ribonuclease

SAR - Resistência sistêmica adquirida

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Slvp1 - Gene da bomba de prótons vacuolar H<sup>+</sup>-pirofosfatase 1 de *Solanum lycopersicum*

TBS - Tampão tris salino

Tf - Transferrina humana

TGF- $\beta$  - Transforming Growth Factor- $\beta$

Treg - Células T reguladoras

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

## RESUMO

FARIA, Raquel de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Expressão da proteína HSP60 humana (HSPD1) em alface (*Lactuca sativa* L.) na prevenção da colite experimental.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Ana Maria Caetano de Faria e Francisco José Lima Aragão.

As plantas são plataformas atrativas para produção de proteínas recombinantes, por possuírem maquinaria capaz de reproduzir muitas das modificações pós-traducionais de mamíferos e não carrear viroses, patógenos ou oncogenes humanos. Ainda, a produção de proteínas-alvo recombinantes pode ocorrer em partes comestíveis das plantas, o que possibilita a administração oral de proteínas terapêuticas por meio de produtos vegetais frescos ou parcialmente processados. Uma das possibilidades de uso dessas proteínas recombinantes é para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. Nesses casos, induz-se a tolerância oral, que é um tipo de tolerância imunológica em que o organismo animal é capaz de reconhecer determinados antígenos, mas não desencadear resposta imunológica, sendo esta tolerância induzida pela exposição prévia a este antígeno. Os eventos imunológicos desencadeados nas superfícies mucosas têm repercussões sistêmicas de natureza fisiológica ou patológica. Portanto, se a tolerância oral induzir mecanismos de imunorregulação eficientes, ocorrerá também o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. Para isso, na presente proposta elegeu-se a proteína HSP60, já conhecida pelo seu potencial em modular doenças autoimunes e inflamações, com o objetivo de gerar plantas transgênicas de alface (*Lactuca sativa* L.) expressando a proteína HSP60 humana (HSPD1). Com essa finalidade, sintetizou-se o vetor para expressão em plantas contendo o gene HSP60 humano otimizado e transformou-se cotilédones de alface via *Agrobacterium tumefaciens*. A transgenia das plantas foi avaliada por PCR e Southern blot das linhagens T0, T1 e T2 e foram confirmados 4 eventos independentes. Folhas liofilizadas de plantas transgênicas com 45 dias de idade foram administradas a camundongos da linhagem C57BL/6 para verificar sua eficácia no tratamento de colite ulcerativa experimental induzida por DSS. Os bioensaios sugerem a presença e efetividade da proteína humana recombinante. A média de perda de peso do grupo DSS foi de 7,87%; do grupo Dieta alface + DSS foi de 4,90%; e do grupo Dieta alface HSP60 + DSS foi de 1,69%. Essa é uma evidência que houve melhora do quadro clínico de colite pela ingestão apenas de alface e uma melhora ainda mais significativa pela ingestão de alface produtora de HSP60 humana recombinante. Também houve melhora na avaliação histológica dos tecidos do cólon dos camundongos tratados com alface transgênica produtora de HSP60 humana e com DSS, em relação aos controles, que se alimentaram de

alface não transgênica e DSS ou apenas de DSS. Esses resultados indicam o potencial uso clínico da alface geneticamente modificada expressando HSP60 humana para a prevenção e o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, mediante a ativação da tolerância oral.

## ABSTRACT

FARIA, Raquel de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Expression of human protein HSP60 (HSPD1) in lettuce (*Lactuca sativa* L.) in the prevention of experimental colitis.** Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-advisors: Ana Maria Caetano de Faria and Francisco José Lima Aragão.

Plants are attractive platforms for the production of recombinant proteins because they have machinery capable of reproducing many of the post-translational modifications of mammals and do not carry human viruses, pathogens or oncogenes. Furthermore, the production of recombinant target proteins can occur in edible parts of plants and enables oral administration of therapeutic proteins by means of fresh or partially processed plant products. Among the possibilities for using recombinant proteins, there is the treatment of autoimmune and chronic inflammatory diseases. In this case, oral tolerance is induced, which is a type of immune tolerance in which the animal body is able to recognize certain antigens but does not trigger immune response, can be induced by previous exposure to this antigen. The immunological events triggered on the mucosal surfaces have systemic outcomes that are physiological or pathological in nature. Therefore, if oral tolerance induces efficient immunoregulation mechanisms, the treatment of autoimmune and chronic inflammatory diseases will also occur. Herein, HSP60 protein was chosen as a proof of concept due to its widely known potential to modulate autoimmune diseases and inflammations. The objective was to generate transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants with heterologous expression of human HSP60 protein. For this, we synthesized the expression vector for plants containing the optimized human HSP60 gene and transformed lettuce cotyledons via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant transgenesis was evaluated by PCR and Southern blot of the T0, T1 and T2 lines and 4 events were confirmed. Freeze-dried leaves were administered to the C57BL/6 mice lineage to verify their efficacy in the treatment of experimental ulcerative colitis induced by DSS. The confirmation of the existence and effectiveness of the recombinant protein was given by the bioassays. The mean of weight loss of the DSS group was 7.87%; of the group Diet lettuce + DSS was 4.90%; and the group Diet lettuce HSP60 + DSS was 1.69%. This is evidence that there was an improvement in the clinical condition of colitis due to ingestion of lettuce alone and an even more significant improvement by the ingestion of lettuce producing recombinant human HSP60. Recombinant human HSP60 lettuce- and DSS-treated mice showed improved histological indexes evaluation of the colon tissues, as compared to the controls, which were fed with non-transgenic lettuce and DSS or DSS solely. These results indicate the potential

clinical use of the recombinant lettuce for preventing and treating autoimmune and chronic inflammatory diseases via activation of oral tolerance.

## 1 - INTRODUÇÃO

### **Plantas como plataformas para produção de proteínas recombinantes**

Os biofármacos proteicos são de grande valia para o tratamento de doenças, porém seus sistemas de produção tradicionais são muito caros e inacessíveis para a maioria da população mundial. O custo para produção e comercialização desses fármacos supera o produto interno bruto (PIB) de mais de 75% dos países do mundo, o que os torna inacessíveis nesses locais. Esse alto preço é devido à produção em fermentadores caros, purificação, necessidade de armazenamento e transporte refrigerados, vida útil curta e necessidade de entrega estéril. Um método de entrega mais simples seria por via oral, porém proteínas desprotegidas são degradadas pela digestão no intestino ou são muito grandes para atravessar o epitélio intestinal (Kwon e Daniell, 2015).

São crescentes o interesse e as possibilidades do uso das plantas como plataformas para produção de proteínas recombinantes com potencial de uso farmacológico, que já são comumente produzidas em bactérias, leveduras ou células animais (Desai et al., 2010; Chen e Lai, 2015). Comparadas a outros organismos, as plantas oferecem diversas vantagens para essa finalidade (Tabela 1). Elas possuem células com maquinaria capaz de reproduzir muitas das modificações pós-traducionais, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e dobramento e processamento das proteínas, necessárias para a função biológica de muitas proteínas de mamíferos; possuem baixo custo de produção, armazenamento e transporte; além de não carregarem viroses, patógenos ou oncogenes humanos, sendo consideradas plataformas seguras para a produção de produtos biofarmacêuticos (Blais e Altosaar, 2006; Egelkrout et al., 2012; Shanmugaraj e Ramalingam, 2014; Yao et al., 2015).

Para viabilizar a estratégia de produção de proteínas recombinantes em plantas, várias metodologias para transformação genética de plantas foram desenvolvidas (Ma et al., 2003; Gunn et al., 2012). O método a ser escolhido para a introdução de transgenes em plantas é dependente do vetor de expressão e da espécie de planta escolhida, e pode ser de modo direto, via biobalística, ou indireto, como por exemplo, via *Agrobacterium*. O sistema biobalístico ou bombardeamento utiliza micropartículas de ouro ou tungstênio (0,2 a 4  $\mu\text{M}$  de diâmetro) cobertas com sequências de ácidos nucleicos e aceleradas a velocidades superiores a 1.500  $\text{km.h}^{-1}$ . As micropartículas, então, penetram na parede e membrana celular alojando-se nas organelas celulares de forma aleatória, podendo alcançar o núcleo ou plastídeos das células vegetais. A vantagem deste método reside na versatilidade e na ampla quantidade de espécies

de plantas suscetíveis a esse tipo de transformação genética. Em teoria, qualquer espécie poderia ser transformada usando-se este método (Brasileiro e Carneiro, 2015).

**Tabela 1.** Comparação de diferentes plataformas de expressão para produção de farmacêuticos. Adaptado de Yao et al. (2015).

<b>Parâmetros</b>	<b>Planta transgênica</b>	<b>Cultura de células de planta</b>	<b>Bactéria</b>	<b>Levedura</b>	<b>Cultura de células de mamíferos</b>	<b>Animais transgênicos</b>
<b>Custos gerais</b>	Muito baixo	Médio	Baixo	Médio	Alto	Alto
<b>Capacidade de expansão</b>	Muito alta	Média	Alta	Alta	Muito baixa	Baixa
<b>Escala de produção</b>	Mundial	Limitada	Limitada	Limitada	Limitada	Limitada
<b>Rendimento protéico</b>	Alta	Alta	Média	Alta	Média-alta	Alta
<b>Precisão de dobramento de proteínas</b>	Alta	Alta	Baixa	Média	Alta	Alta
<b>Glicosilação</b>	Diferenças pequenas	Diferenças pequenas	Nenhuma	Incorreta	Correta	Correta
<b>Qualidade do produto</b>	Alta	Alta	Baixa	Média	Alta	Alta
<b>Risco de contaminação</b>	Baixo	Baixo	Endotoxinas	Baixo	Vírus, Prions, DNA oncogênico	Vírus, Prions, DNA oncogênico
<b>Segurança</b>	Alta	Não específica	Baixa	Desconhecida	Média	Alta
<b>Custo de armazenamento</b>	Barato	Moderado	Moderado	Moderado	Caro	Caro

O sistema indireto de transformação genética explora a habilidade de vírus de plantas e de certas espécies de bactérias do gênero *Agrobacterium*, que naturalmente conseguem transferir seu genoma (vírus de plantas) ou parte do DNA do seu plasmídeo indutor de tumor (Ti) (*Agrobacterium*) para as células de plantas.

Na natureza, o DNA transferido (T-DNA) traz um conjunto de oncogenes e genes do catabolismo de opinas, cuja expressão nas células da planta leva ao crescimento neoplásico do tecido transformado (formação de tumores) e à produção de opinas, utilizadas quase exclusivamente pela bactéria como fonte de nitrogênio (Tzfira e Citovsky, 2006). Em linhagens recombinantes de *Agrobacterium*, o plasmídeo Ti foi modificado, pela substituição dos genes patogênicos por genes de interesse, para possibilitar que ocorra a infecção e a transferência do DNA (T-DNA) por meio da interação natural da bactéria com seu hospedeiro, porém não ocorra desenvolvimento dos tumores patogênicos (Chen e Lai, 2015). Estes sistemas de transformação genética indiretos são mais eficientes em plantas suscetíveis

como hospedeiros desses vírus ou bactérias, apesar de existir vários relatos sobre transformação de plantas que não são hospedeiros naturais, como as monocotiledôneas. A transformação de monocotiledôneas é possível, porém exige maior esforço para que ocorra a infecção. Por exemplo, podem ser necessários alguns pré-tratamentos, como alta osmolaridade, utilização de meio com açúcares e outros agentes que aumentam a competência celular, depleção de cálcio dos meios de cultivos, uso de acetoseringona e baixo pH nos meios (Sood et al., 2011).

O sistema de transformação genética via *Agrobacterium* geralmente oferece maior eficiência e herdabilidade ao longo das gerações comparativamente à biobalística. As inserções do transgene geralmente ocorrem em baixo número de cópias e em regiões transcricionalmente ativas, devido aos mecanismos de co-evolução da *Agrobacterium* e seu hospedeiro (Chen e Lai, 2015). Por isso, a transformação nuclear mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem dominado o cenário dessas abordagens do conhecimento desde seu início; porém a transformação plastidial via biobalística tem ganhado espaço e apresentado bons resultados (Zhang et al., 2017).

A produção em massa de proteínas de interesse em vegetais tem se apresentado comercialmente viável. As células vegetais que expressam proteínas terapêuticas podem ser processadas de forma econômica por liofilização e armazenadas à temperatura ambiente durante vários meses ou anos, sem afetar sua eficácia terapêutica (Kwon et al., 2013). As plantas também podem ser cultivadas no campo com a contenção biológica apropriada de transgenes, como a herança materna, no caso de transformação plastidial; esterilidade masculina ou a colheita de tecidos vegetativos antes da floração (Arlen et al., 2007).

Essas vantagens têm permitido a expressão de ampla diversidade de proteínas para prevenção, diagnóstico e terapias (Streatfield, 2006), e ampliam as possibilidades de produção em maior escala de importantes proteínas recombinantes em plantas (Schillberg et al., 2003; Zhang et al., 2017). Outra significativa vantagem é que a produção das proteínas recombinantes de interesse pode ocorrer em partes comestíveis das plantas, o que permite a possibilidade de administração oral de proteínas terapêuticas em produtos alimentares vegetais parcialmente processados. Isso reduz o custo de produção e, portanto, diminui o custo do tratamento do paciente (Tremblay et al., 2010; Choi et al., 2014). A administração oral é possível, pois a parede celular da planta protege a proteína de interesse farmacológico da degradação pelos ácidos e enzimas do estômago via bioencapsulação. Os componentes das paredes celulares quando chegam ao intestino são digeridos pela microbiota comensal, e as proteínas são liberadas para serem absorvidas. Pode-se utilizar adjuvantes ou proteínas de

ligação a receptores de membrana fundidas às drogas proteicas para auxiliar a passagem da droga pelo epitélio intestinal e, dessa forma, entregá-las ao sistema circulatório ou imune (Jin e Daniell, 2015).

Essa temática de importância estratégica tem sido abordada e revisada por vários grupos de pesquisa (Daniell et al., 2001; Yu e Langridge, 2001; Ma et al., 2003; Gunn et al., 2012; Zhang et al., 2017). A primeira proteína de interesse farmacêutico produzida em plantas foi o hormônio do crescimento humano, expresso em tabaco transgênico e em calos de girassol (Barta et al., 1986); seguida pela expressão da albumina do soro humana em folhas e suspensão de células de tabaco e batata (Sijmons et al., 1990), e pela expressão do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em tabaco (Mason et al., 1992). Como o HBsAg produzido em plantas transgênicas é antigenicamente e fisicamente semelhante ao HBsAg derivado de soro humano e de levedura recombinante, que são usados como vacinas, pode-se concluir que as plantas transgênicas são promissoras como sistemas de produção de vacinas contra hepatite B de baixo custo. Desde então, proteínas de interesse farmacológico foram produzidas em uma variedade de plantas, o que demonstra as vantagens do uso das diferentes espécies de plantas, de células e tecidos, e diferentes estratégias de expressão gênica (Twyman et al., 2005; De Muynck et al., 2010; Rybicki, 2010; Yao et al., 2015).

Estudos recentes também demonstram a utilização de plantas na produção de proteínas humanas estáveis e funcionais. Deepa e colaboradores (2013) expressaram uma proteína recombinante de plaquetas humanas derivada do fator de crescimento BB (rhPDGF-BB) em plantas de tabaco. Testes *in vitro* mostraram que a proteína produzida aumentou a proliferação de fibroblastos em 4,5 vezes, e também induziu a quimiotaxia dos fibroblastos tratados e promoveu a cicatrização de feridas *in vitro*. Assim, a produção de proteínas rhPDGF-BB funcionalmente ativas em plantas abre possibilidades de tratamento para melhorar a cicatrização das feridas em pacientes diabéticos.

A Exendina-4 (Ex-4) é um peptídeo sintético que mimetiza o peptídeo do hormônio glucagon e já é utilizado como medicamento para o tratamento do diabetes tipo-II. Choi e colaboradores (2014) geraram uma construção gênica derivada da fusão do gene para produção da Ex-4 com outro que produz transferrina humana (Tf), resultando em uma proteína que conservou as duas funções (Ex-4-Tf). Eles expressaram o gene de fusão Ex-4-Tf em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* e em folhas de *N. benthamiana* transientemente transformadas; e observaram que a nova proteína de fusão estimulou a liberação de insulina pelas células- $\beta$  pancreáticas, bem como a proliferação dessas células e a diferenciação das células precursoras do pâncreas em células produtoras de insulina. Além

disso, reteve a habilidade de internalizar nas células intestinais humanas e resistir às enzimas proteolíticas e à acidez estomacal. A administração oral da nova proteína de fusão parcialmente purificada aumentou a tolerância à glicose, o que não foi observado com a administração do medicamento comercial à base de Ex-4.

### **Tolerância oral**

Como constatado, a expressão de proteínas recombinantes em plantas pode oferecer um método conveniente e a baixo custo efetivo para produção de agentes para tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como o diabetes. Uma forma de tratar essas doenças inflamatórias é mediante a indução da tolerância oral, que é um tipo de tolerância imunológica. Entende-se por tolerância imunológica o fenômeno pelo qual o organismo animal é capaz de reconhecer determinados antígenos, mas não desencadear resposta imunológica, sendo essa tolerância induzida pela exposição prévia a esse antígeno. De modo geral, indivíduos que não desenvolveram bem esse mecanismo de tolerância, apresentam certas patologias designadas, em conjunto, como doenças autoimunes ou doenças inflamatórias crônicas. Para prevenir essas doenças o organismo humano conta com mecanismos naturais de imunorregulação (Kyewski e Klein, 2006).

Para manter as condições fisiológicas normais de proteção dos tecidos e manutenção da homeostase é necessário que o sistema imune consiga distinguir entre microrganismos patogênicos e antígenos inofensivos. Essa distinção, produzida pelo sistema imune inato e adaptativo, é realizada pelo MALT (do inglês Mucosa Associated Lymphoid Tissue). MALT é formado pelas coleções de células B, células T, células plasmáticas, dendríticas, macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos encontradas nos revestimentos mucosos de órgãos, incluindo o trato gastrointestinal, pulmões, glândulas salivares e conjuntivas (Turner, 2009).

As superfícies mucosas do corpo são os principais locais primários de exposição das células imunes com os antígenos externos, e também onde elas circulam e residem. A mucosa do trato gastrointestinal sozinha abriga mais linfócitos do que todos os órgãos linfóides combinados (Faria et al., 2017). Nessa mucosa situa-se o GALT (do inglês Gut Associated Lymphoid Tissue), que é o maior tecido linfóide do corpo. O GALT pode ser dividido em sítios efetores, que consistem em linfócitos espalhados por todo o epitélio e lâmina própria da mucosa, e tecidos organizados, que são responsáveis pela fase de indução da resposta imune. Estes são compostos pelas placas de Peyer, pelos folículos linfóides isolados e pelos linfonodos mesentéricos e cecais (Mowat et al., 2003).

A mucosa intestinal de mamíferos é a maior área de contato com antígenos devido à presença de vasta microbiota comensal e variedade de alimentos ingeridos. Por isso, essa mucosa também aloja o maior tecido linfóide do corpo. Os eventos imunológicos desencadeados nas superfícies mucosas têm repercussões sistêmicas, sejam eles de natureza fisiológica ou patológica. A mucosa gastrointestinal é uma via tolerogênica cujo microambiente dispõe de mecanismos robustos de imunorregulação. Vários tipos de células medeiam a atividade reguladora na mucosa intestinal, como células dendríticas, linfócitos B e T reguladores (Faria et al., 2017). Como exemplos desses mecanismos podemos citar subconjuntos de células T reguladoras (Treg), como células  $T_H3$ , que produzem transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), células  $T_R1$  que produzem interleucina-10 (IL-10) e células  $CD4^+CD25^+$  Treg, que são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição forkhead box P3 (Foxp3) (Gomes-Santos et al., 2017). Essas células Treg têm papel ativo no estabelecimento e manutenção da tolerância imunológica a tecidos próprios e no controle negativo de várias respostas imunes a antígenos exógenos. Assim, a consequência mais comum do contato do GALT com antígenos naturais, como as proteínas da dieta e da microbiota, é a supressão da reatividade inflamatória sistêmica a esses antígenos, fenômeno conhecido como tolerância oral (Pabst e Mowat, 2012).

Apesar de originada no trato gastrointestinal, a tolerância oral apresenta efeitos sistêmicos, como a inibição da produção de anticorpos séricos específicos, proliferação celular e produção de citocinas em outros tecidos (Faria e Weiner, 2005). Múltiplos mecanismos de tolerância são induzidos por antígenos orais. Doses baixas favorecem a supressão ativa pela indução de células Treg, enquanto as elevadas favorecem anergia clonal/deleção no timo. A administração oral de antígenos pode suprimir doenças autoimunes experimentais, como encefalites, uveítes, tireoidites, artrites e diabetes não obesa, além de outras doenças não autoimunes, como asma, aterosclerose, alergia, colite, rejeição de enxerto, acidente vascular cerebral e doença de Alzheimer (Faria, 2005).

A tolerância oral é uma abordagem atraente para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias devido a não toxicidade, a facilidade de administração ao longo do tempo e a mecanismos de ação antígenos-específicos. A aplicação bem sucedida da tolerância oral para o tratamento de doenças humanas é dependente da dose, do desenvolvimento de marcadores para avaliar os efeitos imunológicos, da rota (nasal ou oral), da formulação, da presença de adjuvantes da mucosa e do tipo de terapia utilizada (Faria e Weiner, 2005). Apesar de ser uma abordagem promissora para intervenções imunorregulatórias, que tem impedido com êxito certo número de doenças inflamatórias e autoimunes em modelos animais, a tolerância oral

não foi, até o momento, eficazmente implantada para um ambiente clínico (Weiner et al., 2011).

A estratégia de utilizar agentes para a indução de tolerância oral, uma forma eficaz e duradoura de tolerância periférica comprovadamente capaz de atuar em vários modelos de doenças inflamatórias de forma satisfatória, é promissora (Weiner et al., 2011) e seletiva; sem levar à imunossupressão generalizada que se observa com o uso dos corticosteroides (Flammer e Rogatsky, 2011). Por exemplo, a produção de anticorpos antifármacos que diminuem o tempo de coagulação em pacientes hemofílicos complica muito o tratamento, pois torna o fármaco, como o fator IX, ineficiente. Utilizar medicamentos para supressão imune geral é problemático, pois leva à exposição do paciente a patógenos. Para atender a essa necessidade médica, Su e colaboradores (2015) produziram uma proteína de fusão CTB-FIX, que corresponde ao fator IX juntamente com o carreador para transporte pela mucosa CTB, em plantas de alface, na concentração aproximada de  $1 \text{ mg.g}^{-1}$ . As folhas de alface transgênicas foram liofilizadas, transformadas em pó e administradas a camundongos com hemofilia B, que desenvolveram tolerância oral e apresentaram indução das células Treg LAP<sup>+</sup> e inibiram a formação de imunoglobulina E (IgE) e anafilaxia contra o fator IX. Herzog e colaboradores (2017) testaram a administração via oral dessa mesma alface recombinante a cães com hemofilia B que, então, apresentaram robusta supressão da imunoglobulina G e E (IgG e IgE) contra o fator IX intravenoso, pela indução de tolerância oral. Mesmo após 30 meses de armazenamento à temperatura ambiente, a proteína CTB-FIX liofilizada nos tecidos vegetais se mostrou estável, com conformação adequada, ligações dissulfeto e estrutura quaternária correta. Este resultado demonstra a eficiência em gerar tolerância oral por meio da administração de proteínas produzidas em alface, em um modelo animal de grande porte e não roedor. Os dados suportam o desenvolvimento clínico da administração oral da alface recombinante como meio de prevenção da formação de anticorpos e anafilaxia em pacientes com hemofilia.

Embora a estratégia de utilizar agentes para a indução de tolerância oral já tenha sido muito explorada por outros estudos (Faria e Weiner, 2006), a escolha do antígeno-alvo a ser utilizado para a indução de tolerância oral tem limitado a sua utilização para doenças nas quais o agente desencadeador da inflamação não é único ou não foi ainda identificado. Assim, escolhemos como antígeno-alvo uma proteína ubiquamente expressa em sítios inflamatórios, a proteína de choque térmico de 60 kD (HSP60). Uma vez que os tecidos inflamados expressam altos níveis de proteínas de choque térmico (HSPs), essas moléculas antigênicas

são candidatas promissoras para uma terapia baseada em imunidade (Gomes-Santos et al., 2017).

### **Proteínas de Choque Térmico (HSPs)**

Proteínas de choque térmico, conhecidas também como HSPs (do inglês heat shock proteins), são altamente conservadas durante a evolução dos seres vivos. As HSPs são chamadas assim por terem sido descritas, primeiramente, a partir de genes que alteravam sua transcrição em resposta ao aumento da temperatura durante a incubação de larvas de *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1964). Apesar dos genes HSPs apresentarem maior transcrição durante condições de estresse, essas proteínas estão presentes de forma constitutiva e abundante em todos os seres vivos e estão envolvidas em várias funções homeostáticas intracelulares e sistêmicas em diferentes espécies (Karlin e Brocchieri, 2000). As proteínas HSPs são classificadas, de acordo com o peso molecular, nas principais famílias: HSP10, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100, além do grupo das pequenas HSPs (Van Eden et al., 2005).

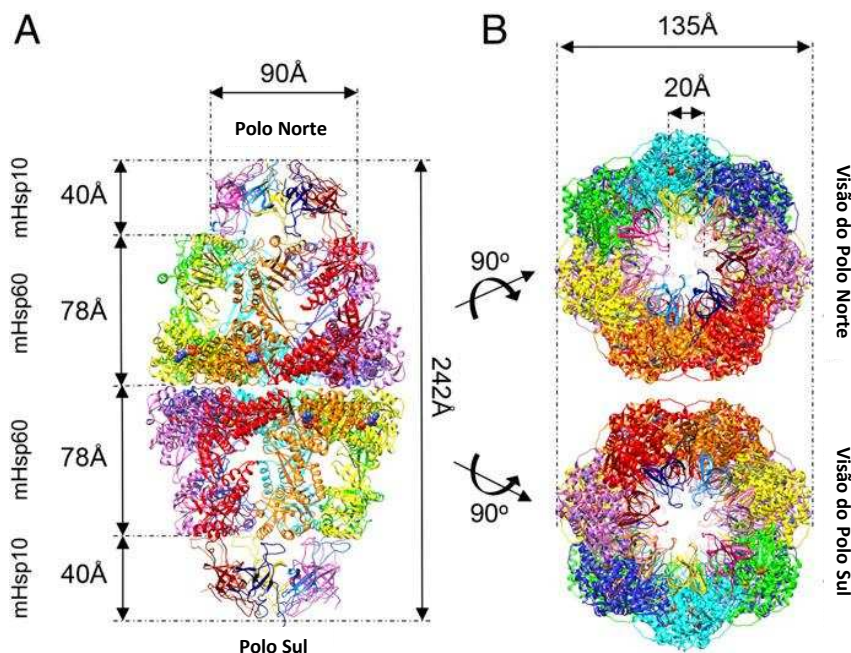
### **HSP60**

A proteína HSP60 atua como chaperonina mitocondrial que assiste e catalisa o dobramento de polipeptídeos em proteínas, para que não se agreguem de forma indesejada durante o dobramento e montagem das subunidades proteicas; ou durante o transporte transmembrana de proteínas (Bukau et al., 2006). Este sistema de chaperonina é crucial para a função mitocondrial e para a viabilidade celular, como demonstrado pela letalidade embrionária em ratos resultante da inativação do gene HSP60 (Christensen et al., 2010); bem como pela identificação de três distúrbios genéticos neurodegenerativos humanos associados à mutações nesta proteína: paraplegia hereditária (Hansen et al., 2007), hipomielinização e leucodistrofia (Magen et al., 2008).

Chaperoninas são uma classe de chaperonas moleculares que são evolutivamente homólogas à GroEL de *E. coli* (Boston et al., 1996). Dessa forma, são encontradas em procariotos, assim como em mitocôndrias e plastídios de eucariotos. Os exemplos mais estudados de chaperoninas são GroEL e GroES procarióticos e seus equivalentes eucarióticos HSP60 e HSP10, respectivamente (Ryabova et al., 2013). Em seres humanos a proteína HSP60 pode também ser chamada de HSPD1. As mitocôndrias humanas abrigam um sistema

de chaperoninas cujas proteínas, HSP60 e sua cochaperonina HSP10, exibem 51% e 33% de identidade com GroEL e GroES, respectivamente (Nisemlat et al., 2015).

O modelo aceito do ciclo de reação para dobramento de proteínas por HSP60 de mamíferos sugere que ela funciona através de um mecanismo distinto do mecanismo de GroEL / GroES (Nielsen e Cowan, 1998). A primeira estrutura cristalina da HSP60 humana complexada com sua cochaperonina HSP10 foi relatada por Nisemlat e colaboradores (2015). O complexo apresenta o formato de “bola de futebol americano” em sua visão perpendicular ao eixo longo, e é instável, pois é intermediário do ciclo de reação para dobramento de proteínas (Figura 1).



**Figura 1.** Visão geral do complexo com formato de “bola de futebol americano” HSP60-HSP10 de mamíferos. **A.** Visão perpendicular ao eixo longo do complexo; as sete subunidades em cada anel de HSP60 são coloridas em vermelho, laranja, amarelo, verde, ciano, azul e roxo. As subunidades de HSP10 em cada anel são coloridas em azul, azul claro, roxo, roxo escuro, amarelo, rosa e vermelho escuro. Os átomos das 14 moléculas ADP são representados como esferas. **B.** Visão dos pólos norte e sul do complexo HSP60-HSP10. O esquema de coloração é como em A. Adaptado de Nisemlat et al. (2015).

Apesar de ter sido encontrada inicialmente em mitocôndria de animais (McMullin e Hallberg, 1988) em mamíferos, a HSP60 também pode ser encontrada no citosol (Chandra et al., 2007), na superfície celular (Wand-Wurttenger et al., 1991), no espaço extracelular (Davies et al., 2006) e solúvel no sangue periférico (Cappello et al., 2008). Além de sua atividade essencial no dobramento de proteínas nas mitocôndrias, pesquisas têm associado as chaperoninas mitocondriais de mamíferos a várias outras atividades extra-mitocondriais e

extracelulares, incluindo modulação do apoptose (Samali et al., 1999), carcinogênese (Cappello et al., 2008) e inflamação (Gomes-Santos et al., 2017).

A expressão de HSPs pode ser regulada positivamente por todas as células sob condições de estresse, incluindo aumento da temperatura, exposição a mediadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo (Feng et al., 2002). Além disso, grandes quantidades de HSP60 na superfície celular podem servir como sinal de alerta para o sistema imune, levando à ativação e maturação de células dendríticas e à geração de resposta T antitumoral (Feng et al., 2002).

Quando expressa extracelularmente, HSP60 atua como agente imunorregulador e inflamatório. Ele é um antígeno dominante reconhecido durante infecções, juntamente com a HSP70 (Kaufmann, 1990). Essas propriedades colocam essas duas proteínas em uma categoria de antígenos especiais. De fato, há uma série de relatos sobre modelos animais que mostram que a administração de HSP60 pode modular doenças autoimunes, como inflamação crônica (Van Eden et al., 2005), esclerose múltipla (Quintana et al., 2008), diabetes (Quintana et al., 2004), artrite (Quintana et al., 2003), lúpus eritematoso (Dieudé et al., 2004), dentre outras. É também considerada uma das principais moléculas imunoreguladoras em tumores (Victoria et al., 2009) e transplantes (Granja et al., 2004).

No entanto, HSP60 tem propriedades tanto imunoreguladoras quanto inflamatórias, colocando-a como um antígeno necessariamente homeostático, mas com efeitos potencialmente nocivos também. HSP60 ativa a resposta imune inata e adaptativa e, por isso, é considerada como um sinal perigoso que amplifica a inflamação e influencia várias reações imunológicas (Habich e Burkat, 2007). Anticorpos anti-HSP e células T reativas a HSP60 fazem parte das respostas imunes a várias doenças infecciosas (Kaufmann, 1990). Aproximadamente, de 10 a 20% das células T específicas de ratos imunizados com *Mycobacterium tuberculosis* são contra a HSP65 bacteriana (Kaufmann et al., 1987). Anticorpos para HSP60 de *Chlamydia trachomatis* foram detectados em alto nível no sangue de pacientes infectados (Sanchez-Campillo et al., 1999), e respostas imunodominantes para HSP60 também estão presentes em outras infecções por fungos (Matthews et al., 1998). Essa forte resposta imune, direcionada à HSP60 durante infecções, pode ser explicada por seu papel crítico na homeostase celular e pela maior tradução da proteína em hospedeiros como resultado de estresse durante a infecção.

Contudo, HSP60 não é relevante apenas em condições patológicas. A autoreatividade a HSP60 foi encontrada em indivíduos saudáveis e uma alta frequência de clones de células B e T reativas à HSP60 próprias é encontrada em mamíferos em condições fisiológicas (Pockley

et al., 1999). Assim, acredita-se que os riscos potenciais de HSP60 como um agente terapêutico podem ser controlados pela abordagem de fatores importantes que determinam os seus efeitos. Estes fatores seriam a via de administração, os peptídeos adequados, o ponto de decurso da doença quando ocorre a administração, e a possível associação com outros agentes moduladores (Coelho e Faria, 2012).

Gomes-Santos e colaboradores (2017) tiveram sucesso ao prevenir a colite induzida por DSS em camundongos C57BL/6 pela administração oral de *Lactococcus lactis* geneticamente modificado que produz e libera HSP65 de *Mycobacterium*. A proteção foi causada devido à redução de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ; aumento da produção de IL-10 no cólon e expansão das células Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> no baço e no linfonodo mesentérico. De fato, a expressão de HSP é aumentada em cólon de pacientes com doenças inflamatórias intestinais e também anticorpos IgA anti-HSP60, bem como células T patológicas reativas à auto-HSP60, foram identificadas nesses indivíduos (Stevens et al., 1992).

As doenças inflamatórias intestinais, incluindo a doença de Crohn e a colite ulcerativa, são crônicas e afetam o trato gastrointestinal causando dano e inflamação da mucosa intestinal, o que causa diarreia, dor abdominal, perda de peso e náuseas. Nas sociedades ocidentais, 1 em cada 1.000 pessoas são afetadas por doenças inflamatórias intestinais, tornando-se um importante problema de saúde pública (Sobczak et al., 2014). Suas causas podem ser intrínsecas, como fatores genéticos, espécies reativas de oxigênio, disfunções do sistema imune; ou extrínsecas, como dieta, microbiota, estresse, uso de cigarro, quantidade e qualidade do sono. As estratégias terapêuticas atuais para esse tipo de doença dependem do uso de agentes anti-inflamatórios não específicos e drogas imunossupressoras, como por exemplo: aminosalicilatos e antibióticos, que causam efeitos colaterais graves e podem não ser efetivos em um número significativo de pacientes, pois trazem apenas alívio em curto prazo (Sobczak et al., 2014). Assim, Gomes-Santos e colaboradores (2017) abriram nova perspectiva para a prevenção e, possivelmente, o tratamento de doenças inflamatórias intestinais a partir da indução da tolerância oral utilizando HSPs.

### **HSP60 em plantas**

Em plantas, foram caracterizadas 5 diferentes famílias de HSPs que atuam como chaperonas, de acordo com o peso molecular que apresentam: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e pequenas HSPs (Gupta et al., 2010). A HSP60, em plantas, está principalmente

localizada no cloroplasto, mas também é encontrada em mitocôndrias, e também é chamada de Cpn60. O alinhamento entre sequência de nucleotídeos de HSP60 de *Homo sapiens* e de *Arabidopsis thaliana* mostrou 59% de identidade. A similaridade dos aminoácidos previstos varia de 43 a 60% entre plantas e seus homólogos procariontes e eucariontes, o que indica que essas proteínas apresentam funções similares conservadas evolutivamente em todos os organismos (Prasad e Stewart, 1992).

Em plantas, estresse térmico, assim como outros tipos de estresse, podem desencadear alguns mecanismos de defesa em nível molecular, especialmente mudanças na expressão gênica que resultam no aumento da síntese de grupos de proteínas, nessas estão incluídas as HSPs. Swindell e colaboradores (2007) observaram em *Arabidopsis*, que vários tipos de estresse como alta salinidade, altas e baixas temperaturas, dessecação, alta irradiância ultravioleta, estresse oxidativo, fermentos, infecção por patógenos e presença de metais pesados, causavam mudanças na expressão gênica de HSPs e de fatores de transcrição de HSPs. Assim, chegaram à conclusão que existe considerável interligação entre as redes regulatórias dos variados tipos de estresse.

Estudos indicaram que as chaperoninas plastidiais possuem propriedades estruturais e funcionais únicas que as distinguem das chaperoninas homólogas encontradas em bactérias (Levy-Rimler et al., 2002). Chaperoninas de cloroplastos de plantas são formadas por dois polipeptídeos distintos, Cpn60 $\alpha$  e Cpn60 $\beta$ , que apresentam 50% de identidade de aminoácidos (Boston et al., 1996).

A função de chaperonina reguladora do dobramento de proteínas recém-sintetizadas ou translocadas, que previne a agregação irreversível de outras proteínas e participa do remodelamento de proteínas durante condições de estresse, também está presente em plantas (Tripp et al., 2009). Cada família de HSPs possui particularidades nos seus mecanismos de ação. É conhecido que a família das HSP60 tem função de assistir proteínas do plastídeo, como a Rubisco (Wang et al., 2004).

Foi relatado que um mutante de *Arabidopsis* no gene *Cpn60 $\alpha$*  apresentou defeitos no desenvolvimento do cloroplasto e, conseqüentemente, no desenvolvimento adequado de embriões e plântulas (Apuya et al., 2001). Plantas de tabaco antisense *Cpn60 $\beta$*  apresentaram drásticas alterações fenotípicas, como crescimento lento, retardo no florescimento, nanismo e clorose foliar (Zabaleta et al., 1994). A deleção do gene *Len1*, que codifica Cpn60 $\beta$  no cloroplasto, induz à morte celular em *Arabidopsis*. Isso leva ao estabelecimento de resistência sistêmica adquirida (SAR), um mecanismo de resistência de plantas de amplo espectro, normalmente desencadeada por lesões necróticas resultantes de infecção patogênica (Ishikawa

et al., 2003). Assim, a partir desses resultados, podemos concluir que a proteína HSP60 está envolvida em diversos mecanismos relacionados ao crescimento e desenvolvimento normal das plantas, assim como à resistência a patógenos e tolerância a estresses.

### **A alface como modelo para aplicações biotecnológicas**

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma eudicotiledônea herbácea pertencente à maior família do reino vegetal, Asteraceae, gênero *Lactuca*. A alface cultivada é originária da região do sudoeste asiático e mediterrâneo, na região entre os rios Tigre e Eufrates. Em 4.500 a.C., já existem relatos de sua utilização como planta medicinal pelos egípcios (De Vries, 1997). Atualmente, é considerada a hortaliça folhosa de maior importância no Brasil, com cerca de 35.000 hectares plantados. Seu cultivo é realizado de maneira intensiva e, geralmente, praticado como agricultura familiar (Silva et al., 2008). É consumida principalmente in natura, em forma de saladas e em sanduiches fastfood, e seu mercado vêm aumentando nos últimos anos, acompanhando a diversificação de cultivares. No Brasil, o segmento de alface crespa vem liderando nos últimos 10 anos, devido ao melhoramento genético visando o pendoamento lento, que é característica fundamental para o cultivo de verão ou em áreas com temperaturas altas. As cultivares Vera e Verônica foram líderes de mercado por mais de uma década no Brasil (Sala e Costa, 2012).

As hortaliças folhosas são recomendadas na dieta alimentar de pessoas em tratamento da obesidade e de doenças crônico-degenerativas, por apresentarem baixo valor calórico. A importância da alface na alimentação e saúde humana se destaca por ser fonte de vitaminas e sais minerais (Ohse et al., 2001). Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2016) o consumo de 100 g de folhas verdes de alface in natura apresenta a seguinte composição média nutricional: baixo valor calórico (15 Kcal); baixo teor de gorduras totais (0,15 g); 94,98% de água; 1,36 g de proteínas totais; 2,87 g de carboidratos; 0,78 g de açúcares totais; 1,3 g de fibras totais; vitaminas e minerais (Tabela 2).

Uma técnica que tem se mostrado promissora para o cultivo de alface é a hidroponia, pois traz vantagens como: controle no uso de nutrientes, antecipação da colheita, homogeneidade da oferta e qualidade dos produtos durante o ano todo, redução do uso de agrotóxicos pela diminuição natural do número de pragas e a ausência de necessidade de rotação de cultura comum ao cultivo tradicional (Luz et al., 2006). A alface é uma planta anual e seu crescimento vegetativo da sementeira até o ponto da colheita comercial demora de 50 a 70 dias. Ao final da fase vegetativa, ocorre o acúmulo de látex que pode dar um gosto

amargo às folhas. A fase reprodutiva, caracterizada pela elevação da haste floral, e a produção de sementes demora cerca de 5 a 6 meses após a sementeira.

**Tabela 2.** Composição nutricional por 100 gramas de alface. Fonte: USDA, 2016.

<b>Nutrientes</b>	<b>Valores</b>	<b>Vitaminas</b>	<b>Valores</b>
Água	94,98 g	Vitamina C	9,2 mg
Energia	15 Kcal	Tiamina	0,070 mg
Proteína	1,36 g	Riboflavina	0,080 mg
Gordura Total	0,15 g	Niacina	0,375 mg
Carboidratos	2,87 g	Folato	38 µg
Fibra Total	1,3 g	Vitamina B-6	0,090 mg
Açúcares	0,78 g	Vitamina A, RAE	370 mg
<b>Minerais</b>	<b>Valores</b>	Vitamina A, IU	7450 UI
Cálcio	36 mg	Vitamina E	0,22 mg
Ferro	0,86 mg	Vitamina K	126,3 µg
Magnésio	13 mg		
Fósforo	29 mg		
Potássio	194 mg	mg – miligramas	
Sódio	28 mg	µg – microgramas	
Zinco	0,18 mg	UI - Unidades Internacionais	

Ademais, alface tem sido utilizada para produção de proteínas de interesse farmacológico (Rosales-Mendoza et al., 2010; Lai et al., 2012; Su et al., 2015). Dessa forma, foi eleita como espécie-alvo do presente trabalho, por ser uma cultura de crescimento e ciclo de vida rápidos, com protocolos de transformação bem estabelecidos na literatura e por apresentar possibilidade de consumo in natura por mamíferos, sendo inclusive um alimento bem presente na dieta dos brasileiros e de grande parte da população mundial.

### **Proposta do trabalho**

À luz de resultados positivos gerados por (i) Rezende e colaboradores (2013) no uso de *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 sobre a imunomodulação nos modelos experimentais de encefalomielite autoimune experimental (EAE); (ii) do potencial imunorregulador da proteína de choque térmico humana - HPS60 (Coelho e Faria, 2012); (iii) e do recente trabalho publicado por Gomes-Santos e colaboradores (2017) que mostra a eficiência de HSP65 para a prevenção de colite causada por DSS em camundongos, buscamos uma nova estratégia: obter plantas transgênicas de alface (*Lactuca sativa* L.), visando à expressão heteróloga da proteína HSP60 humana. Para isso, foi gerado o vetor de expressão

em plantas contendo o gene HSP60 humano, o qual foi introduzido em plantas de alface via transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens*, e avaliada sua eficácia na prevenção de colite experimental através da ativação da tolerância oral em sistema murino.

## **2 - HIPÓTESES**

A administração oral de folhas de alface transgênicas expressando a proteína HSP60 humana restaura a imunorregulação e leva à tolerância oral em camundongos que apresentam colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS).

## **3 - OBJETIVO GERAL**

Produzir plantas transgênicas de *Lactuca sativa* viáveis que expressam a proteína HSP60 humana em suas folhas, e investigar o desenvolvimento de tolerância imunológica em camundongos pela administração oral dessas folhas seguido da indução de colite experimental.

### **3.1 . Objetivos específicos**

- Construir um vetor para expressão em plantas do gene HSP60 humano;
- Transformar *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor de expressão contendo o gene HSP60 humano;
- Transformar geneticamente cotilédones de *Lactuca sativa* para obter linhagens transgênicas independentes expressando a proteína HSP60 humana;
- Confirmar a transgenia das plantas utilizando a técnica de PCR e a técnica de Southern blot;
- Identificar as proteínas HSP60 humanas produzidas pelas linhagens transformadas por Western Blot;
- Avaliar os efeitos clínicos e histológicos da ingestão das folhas de alface transgênicas na prevenção de colite experimental em camundongos.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Otimização da sequência do gene HSP60 humano e construção do vetor

Com o objetivo de expressar a proteína HSP60 humana em alface, foi feita a otimização da sequência do gene HSP60 humano considerando-se os códons preferenciais de plantas. Essa sequência foi previamente encontrada no NCBI (do inglês, National Center for Biotechnology Information), sob o número de referência NM\_002156.4 Homo sapiens heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) (HSPD1), transcript variant 1, mRNA.

Para a otimização da sequência do gene HSP60 humano para expressão em plantas, foi utilizado o codon usage para Arabidopsis thaliana disponível no endereço: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3702&aa=1&style=N>. Em resumo, cada aminoácido foi representado pelas respectivas trincas de nucleotídeos (Tabela 3).

Outros parâmetros também foram considerados na otimização, como o conteúdo de GC, que deve ser no mínimo de 50%; estrutura secundária do mRNA, que não deve formar hairpins; existência de regiões de splicing crípticos, que são regiões que apresentam mutações e criam novos sítios de splicing reconhecidos como autênticos; regiões de formação da cauda de poliA prematuras e regiões internas para ligação ribossomal, que causam diminuição da extensão do mRNA e possível encurtamento da proteína; sequências repetidas e sítios de enzimas de restrição, que poderiam interferir na clonagem. Caso algum desses parâmetros não seja atendido, a formação do mRNA ou a tradução da proteína podem não acontecer ou apresentarem problemas.

O vetor de expressão pC3300HSP60NUC contendo a sequência otimizada do gene HSP60 humano foi sintetizado pela empresa Epoch Life Science (<http://www.epochlifescience.com/>).

**Tabela 3.** Codon Usage utilizado para otimização da sequência do gene HSP60 humano para expressão em plantas.

<b>Aminoácido</b>	<b>Trinca</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>Trinca</b>
<b>F</b>	TTT	<b>H</b>	CAT
<b>L</b>	CTT	<b>Q</b>	CAA
<b>I</b>	ATT	<b>N</b>	AAT
<b>M</b>	ATG	<b>K</b>	AAG
<b>V</b>	GTT	<b>D</b>	GAT
<b>S</b>	TCT	<b>E</b>	GAA
<b>P</b>	CCT	<b>C</b>	TGT
<b>T</b>	ACT	<b>W</b>	TGG
<b>A</b>	GCT	<b>R</b>	AGA
<b>Y</b>	TAT	<b>G</b>	GGA
<b>STOP</b>	TGA		

Outras sequências específicas também foram adicionadas: (1) peptídeo sinal da proteína Bip At5g44620 (Lee et al., 2011), para o endereçamento da sequência para o retículo endoplasmático; (2) sequência otimizada do gene HSP60 humano; (3) sequência KDEL de retenção no retículo endoplasmático através do ancoramento à membrana, visando aumentar a expressão e estabilidade da proteína (Okamoto et al., 2003); (4) códon de terminação (Figura 2). Foram construídos dois vetores de expressão pC3300HSP60NUC e pC3300HSP60NUC Slvp1, porém ambos contendo sequência similar (Figura 2) e que dão origem à mesma sequência de aminoácidos (Figura 3).

As proteínas que residem permanentemente no lúmen do retículo endoplasmático (RE) devem de alguma forma ser diferenciadas das proteínas recém-sintetizadas que passam por esse compartimento antes de serem secretadas. Um dos mecanismos possíveis de retenção da proteína no retículo baseia-se no transporte retrógrado seletivo de proteínas solúveis residentes do RE do compartimento intermediário de cis-Golgi de volta ao RE. Isto é possível, pois os receptores nos compartimentos pós-RE reconhecem um motivo C-terminal que marca proteínas que devem ser mantidas no RE. Este motivo pode ser chamado KDEL e é composto por 4 aminoácidos, Lys-Asp-Glu-Leu (Alanen et al., 2011). As proteínas retidas no RE não participam de reações celulares citosólicas, nem causam desequilíbrio osmótico ou bioquímico à célula transgênica, além de ficarem protegidas contra a ação de diversas

proteases presentes no citosol. Elas podem ser compartimentalizadas em vesículas onde se mantêm armazenadas e estáveis.

```

GCCATGGCTACCGACATCAGTAGTTTGTTTAGAAACAGGTCTAGGAAAGACCAGCTTGACTA
TGGGTTGACTGTAATCGTGATCAGTACTTTGTGCTGGTGTCTCTGGCTTTACGCAAAGTGCA
AGAGGAGA GCTAAAGATGTGAAGTTCGGAGCAGATGCCAGAGCATTGATGTTGCAGGGAGTG
GACCTCTTGGCAGATGCAGTGGCAGTGACTATGGGTCCTAAAGGTAGAACAGTAATCATTGA
ACAATCATGGGGGAGTCCGAAGGTTACTAAAGACGGAGTGACAGTGGCTAAGTCTATTGATT
TGAAAGACAAGTACAAGAACATAGGTGCTAAACTTGTCCAAGATGTGGCAAACAATACGAAC
GAAGAGGCAGGTGATGGTACAACACTACAGCTACTGTCCTCGCTAGGTCAATCGCTAAAGAGGG
TTTCGAGAAGATTAGTAAAGGTGCAAATCCTGTGGAAATCAGACGTGGTGTGCATGCTTGCTG
TGGATGCTGTCATTGCTGAACTTAAGAAGCAGAGTAAACCTGTGACGACTCCTGAAGAAATC
GCTCAAGTAGCCACCATTTCTGCTAATGGAGATAAGGAAATCGGTAACATCATATCTGATGC
TATGAAGAAGGTGGGACGTAAAGGTGTGATAACAGTGAAAGATGGTAAGACGTTGAATGACG
AACTTGAGATCATAGAAGGAATGAAGTTTGATAGAGGTTACATTTACCATACTTCATCAAT
ACCTCTAAGGGACAGAAGTGTGAGTTCGAAGATGCTTATGTGTTGTTGTCTGAGAAGAAGAT
TTCATCTATTCAATCAATCGTGCCTGCTCTCGAAATCGCTAACGCTCATAGGAAACCTCTTG
TTATCATCGCAGAAGATGTCGATGGTGAGGCTCTTTCAACTTTGGTATTGAATAGGTTGAAA
GTCGGACTTCAAGTTGTGCGAGTCAAAGCTCCTGGTTTCGGAGATAACCGTAAGAACCAACT
TAAGGATATGGCAATAGCCACTGGAGGTGCTGTGTTTGGTGAAGAGGGTCTTACTTTGAACT
TGGAGGATGTGCAGCCACATGACCTCGGTAAAGTTGGAGAGGTCATCGTGACGAAAGACGAT
GCTATGTTGTTGAAAGGTAAGGAGATAAGGCTCAGATCGAGAAGAGGATAACAAGAAATCAT
TGAACAACCTTGATGTCACGACATCTGAATACGAGAAGGAGAAGTTGAACGAGAGACTTGCCA
AGTTGTCAGACGGTGTAGCTGTCTTGAAGGTTGGAGGAACCTCTGACGTGGAAGTGAATGAG
AAGAAGGATAGAGTGACGGATGCTCTTAACGCTACTCGTGCTGCAGTTGAGGAGGGTATAGT
CTTGGGAGGAGGATGTGCTCTTCTTCGTTGTATAACCAGCCTTGGATTCTTTGACTCCTGCCA
ATGAAGACCAGAAGATTGGAATTGAGATCATCAAACGTACCCTTAAGATTCCAGCAATGACC
ATTGCCAAGAACGCTGGTGTGGAGGGATCACTCATCGTGGAGAAGATCATGCAGTCATCATC
TGAAGTTGGATACGACGCTATGGCAGGTGACTTTGTGAACATGGTTGAGAAAGGTATCATCG
ATCCGACAAAGGTAGTCAGGACAGCACTTCTCGACGCTGCTGGAGTTGCCTCTTTGTTGACT
ACTGCTGAAGTCGTTGTAACCTGAGATAACAAAGGAGGAGAAGGACCCTGGTATGGGAGCAAT
GGGTGGAATGGGTGGTGGGATGGGAGGAGGAATGTTCAAGGATGAACTCTGAGAGCTC

```

**Figura 2.** Sequência otimizada do gene HSP60 humano com sequências específicas adicionadas para expressão em plantas. **Legenda:** Sítio de NcoI (C CATG G); Peptídeo sinal para endereçamento ao retículo endoplasmático BipAt5G44620 (Lee et al., 2011) ( ); peptídeo sinal para endereçamento à mitocôndria ( ); sequência do gene HSP60 otimizada para expressão nuclear em plantas ( ); sequência KDEL ( ); STOP CODON ( ), sítio de SacI (G AGCT C).

MATDISSLFRNRSRKDQLDYGLTVIVISTLCWCLWLYAKCKRRRLRLPTVFRQMRPVSRLVLA  
 HLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIEQSWGSPKVTKDGVTVAK  
 SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAGDGT TATVLRSLIAKEGFEEKISGANPVEIRRGV  
 MLAVDAVIAELKKQSKPVTTPPEEIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKT  
 LNDELEIEGKMFDRGYISPYFINTSKGQKCEFQDAYVLLSEKKISSIQSIVPALEIANHR  
 KPLVIAEDVDGEALSTLVNLRLKVGLQVVAVKAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEEGL  
 TLNLEDVQPHDLGKVGEVIVTKDDAMLLKGGKDKAQIEKRIQEIIEQLDVT TSEYEKEKLN  
 RLAKLSDGVAVLKVGGS DVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLGGGCALLRCIPALDSL  
 TPANEDQKIGIEIIKRTLKIPAMTI AKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEK  
 GIIDPTKVVRTALLDAAGVASLLTTAEVVVTEIPKEEKDPGMGAMGGMGGGMGGGMFKDEL

**Figura 3.** Sequência otimizada da proteína após a tradução do gene HSP60 com sequências específicas adicionadas. **Legenda:** Peptídeo sinal para endereçamento ao retículo endoplasmático BipAt5G44620 (Lee et al., 2011) ( ); peptídeo sinal para endereçamento à mitocôndria (presente apenas no vetor pC3300HSP60NUC) ( ); sequência de aminoácidos da proteína HSP60 madura ( ); sequência KDEL de ancoramento à membrana plasmática ( ).

#### 4.2. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

A partir da sequência do gene HSP60 humano otimizado para expressão em plantas, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos, complementares às posições 9272 – 9928 do vetor, gerando um amplicon de 656 pb. O fragmento amplificado corresponde a uma parte da região codificadora do gene. Os iniciadores foram: HSP60NUC F 5'→ 3' GACCTCTTGGCAGATGCAGT (Tm= 60,5 °C). HSP60NUC R 5'→ 3' TTTCGAGAGCAGGCACGATT (Tm= 58,4 °C). Também foram utilizados outros pares de primers para confirmação da transformação, que se anelam em regiões dos genes de seleção presentes no vetor, como o gene nptII, neomicina fosfotransferase, que confere resistência à canamicina; e o gene Bar, que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase, que confere resistência ao herbicida glifosinato de amônia. Os iniciadores são: NPTI F 5'→ 3' ACGCAGAAGGCAATGTCATACC (Tm= 59 °C), NPTI R 5'→ 3' AAGGACATGATGCTATGGCTGG (Tm= 58 °C), amplicon de 495 pb. BAR F 5'→ 3' GGTCTGCACCATCGTCAACC (Tm= 58 °C), BAR R 5'→ 3' CTGAAGTCCAGCTGCCAGAA Tm: 59 °C, amplicon de 447 pb.

#### 4.3. Transformação de *Escherichia coli* e digestão com endonucleases

Nessa etapa, células competentes de *E. coli* linhagem XL1-Blue foram transformadas por eletroporação, para introdução do vetor de expressão pC3300HSP60NUC ou pC3300HSP60NUC Slvp1. As células competentes foram eletroporadas em cuvetas de 1 mm a 1,5 kV durante 4 a 5 ms. Em seguida, foi adicionado meio Luria-Bertani (LB) líquido (Tripton 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, pH 7,0) e as células foram

incubadas, sob leve agitação, por 1 h a 37 °C, para recuperação. Posteriormente, a suspensão celular foi plaqueada em meio LB sólido, contendo o antibiótico canamicina 100 mg L<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C. Após esse período, as colônias crescidas foram inoculadas em meio LB líquido contendo canamicina 100 mg L<sup>-1</sup> e incubadas sob agitação de 250 rpm por 12-16 h a 37 °C, para realizar uma mini-preparação plasmidial (mini-prep) de *E. coli* e, posteriormente, fazer a confirmação da transformação das bactérias por digestão.

O vetor inserido em *E. coli* e extraído da colônia transformada foi digerido com a enzima de restrição EcoRV, que corta o vetor em vários sítios formando um padrão de bandas em gel de agarose 1% (p/v) facilmente identificado. Cada reação foi feita em volume final de 10 µL, utilizando 1.000 ng do vetor, 0,3 µL de enzima, tampão NEB3, a 37 °C, por 2 h.

Também foi selecionado o par de enzimas NcoI+SacI, pois seus sítios de restrição foram adicionados nas extremidades do gene HSP60 durante sua otimização, formando, então, um padrão com duas bandas no gel de agarose 1%, sendo a menor correspondente ao gene HSP60 na íntegra, e a maior correspondente ao restante do vetor de expressão. Cada reação foi feita em volume final de 10 µL, utilizando 1.000 ng do vetor, 0,3 µL de cada enzima, tampão NEB1, a 37 °C, por 2 h. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v).

#### **4.4. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e confirmação por PCR**

Após confirmação da integridade do vetor multiplicado em *E. coli*, foi realizada a transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem EHA105 por eletroporação, para introdução do vetor de expressão pC3300HSP60NUC ou pC3300HSP60NUC Slvp1. As células competentes foram eletroporadas em cuveta de 1 mm a 1,8 kV durante 4 a 5 ms. Em seguida, foi adicionado meio LB líquido e as células foram incubadas, sob agitação de 120 rpm, por 4 h a 28 °C, para recuperação. Elas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 2 min, descartado o sobrenadante, e o pellet ressuscitado em meio LB. A suspensão celular foi plaqueada em meio LB sólido, contendo o antibiótico canamicina 100 mg L<sup>-1</sup> e rifampicina 100 mg L<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas por 2 a 3 dias a 28 °C, as colônias isoladas foram estriadas em nova placa e utilizadas para realizar PCR de colônia para confirmação de transgenia.

Foram selecionadas 6 colônias resultantes da transformação de *A. tumefaciens* com os vetores de expressão para fazer o PCR de colônia. Para quebrar a parede celular e extravasar o DNA, pequenas alíquotas de bactérias foram raspadas da placa, com auxílio de um palito de dente, e ressuscitadas em 10 µL de água ultrapura em um tubo, que foi colocado em água

fervente por 5 min. Foi montada uma reação de PCR contendo 2 µL do sobrenadante gerado após a fervura e breve centrifugação. Foram utilizados dois pares de primers específicos: para o gene nptIe para o gene Bar. O programa da PCR consistiu de: desnaturação inicial a 94 °C (5 min), seguindo 35 ciclos de amplificação (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min) com um ciclo de extensão final a 72 °C durante 7 min. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v).

#### **4.5. Transformação genética de alface mediada por *A. tumefaciens***

As atividades de obtenção de plantas de alface transgênicas foram conduzidas seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e da CIBio-CENARGEN, e foram desenvolvidas no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG), da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). A EMBRAPA CENARGEN possui Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) vigente sob número 004/96. Plantas transgênicas de alface também foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTII), do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Pesquisa Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa. O LCTII possui CQB vigente, sob número 0024/97.

Para obtenção de explantes, sementes de alface cultivar Verônica foram desinfestadas mediante imersão em solução de NaClO a 2% por 15 min e enxágue em água destilada autoclavada por cinco vezes consecutivas. Este procedimento foi repetido duas vezes. Sob condições assépticas, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio para germinação in vitro, que consistiu de sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962) meia-força, sacarose 20 g L<sup>-1</sup>, ágar Sigma® 8 g L<sup>-1</sup> e pH ajustado para 5,7. As sementes foram mantidas em sala de crescimento no escuro e temperatura de 25 ± 2 °C, por 4 ou 5 dias.

Uma alíquota de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem EHA105 com o vetor pC3300HSP60NUC ou pC3300HSP60NUC Slvp1 foi plaqueada em meio AB sólido (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>Cl 1 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3 g L<sup>-1</sup>, KCl 0,15 g L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,5 mg L<sup>-1</sup>, glicose 5 g L<sup>-1</sup>, agar 15 g L<sup>-1</sup>) contendo canamicina 100 mg L<sup>-1</sup> e rifampicina 100 mg L<sup>-1</sup> e cultivada a 28 °C por 2 a 3 dias.

As placas contendo uma densa cultura de *Agrobacterium* crescida na superfície do meio AB, foram raspadas com auxílio de espátula e resuspendidas em 5 mL de meio de cocultura líquido, contendo: sais e vitaminas MS meia força, glicose 10 g L<sup>-1</sup>, acetoseringona

20 mg L<sup>-1</sup> e pH 5,2. A D.O.<sub>600</sub> foi ajustada para 0,5± 0,1, acrescentando-se meio de cocultura se necessário.

Plântulas com 4 ou 5 dias foram utilizadas como fontes de explantes, sendo seccionados segmentos de cotilédones de, aproximadamente, 3 mm imersos na suspensão de agrobactérias, onde permaneceram por cerca de 30-60 min, para cocultura líquida. Logo após, os explantes foram transferidos para 2-3 camadas de papel filtro autoclavado para retirar o excesso de suspensão bacteriana e a seguir, para placas de Petri contendo meio de cocultura sólido (LR1A) composto por sais e vitaminas MS força total, sacarose 30 g L<sup>-1</sup>, 6-benzilaminopurina (BAP) 0,2 mg L<sup>-1</sup>, ácido  $\alpha$ -naftaleno acético (ANA) 0,05 mg L<sup>-1</sup>, com pH ajustado para 5,2. Esse meio de cocultura foi previamente coberto com papel filtro estéril, que evita a retenção de líquido, evitando o crescimento bacteriano. A cocultura foi realizada por 48 h, no escuro, a 20 °C. As placas foram vedadas com fita hipoalergênica Micropore<sup>®</sup> Nexcare (3M do Brasil).

Após a etapa de cocultivo, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio de regeneração seletivo (LR1B) composto por sais e vitaminas MS força total, sacarose 30 g L<sup>-1</sup>, BAP 0,2 mg L<sup>-1</sup>, ANA 0,05 mg L<sup>-1</sup>, glifosinato de amônia (GA) 4 mg L<sup>-1</sup>, timentin 100 mg L<sup>-1</sup>, cefotaxima 200 mg L<sup>-1</sup>, benomil 0,5 mg L<sup>-1</sup> com pH ajustado para 5,7, para indução de organogênese. Os explantes foram subcultivados a cada 15 dias em meio LR1B seletivo recém-preparado.

No caso de ocorrência de brotações em meio seletivo, os explantes foram transferidos para meio LR2, composto de sais e vitaminas MS força total, sacarose 20 g L<sup>-1</sup>, ácido indolil-3-acético (AIA) 0,3 mg L<sup>-1</sup>, GA 2 mg L<sup>-1</sup>, timentin 100 mg L<sup>-1</sup>, cefotaxima 200 mg L<sup>-1</sup>, benomil 0,5 mg L<sup>-1</sup>, com pH ajustado para 5,7.

Na fase de enraizamento, os brotos alongados foram individualizados e cultivados em meio MS com vitaminas, sacarose 15 g L<sup>-1</sup>, ácido indolbutírico (AIB) 0,4 mg L<sup>-1</sup>, timentin 100 mg L<sup>-1</sup>, cefotaxima 200 mg L<sup>-1</sup>, benomil 0,5 mg L<sup>-1</sup>, com pH ajustado para 5,7, na ausência do agente seletivo.

#### **4.6. Aclimatização e cultivo em hidroponia das plantas de alface**

As plantas regeneradas e enraizadas foram aclimatizadas em casa de vegetação. Para tal, as plantas foram transferidas para copos plásticos contendo mistura de vermiculita e solo (1:1) e cobertas por sacos plásticos, proporcionando alta umidade. A diminuição da umidade para condições ambientais foi realizada gradativamente, através de orifícios nos sacos. Em

seguida, as plantas foram transferidas para vasos contendo mistura de solo e substrato comercial (1:1) em casa de vegetação.

As sementes das plantas T0 e T1 foram coletadas e germinadas em vermiculita, em casa de vegetação. Após 15 dias, as plântulas T1 e T2 foram transplantadas para um sistema de hidroponia (Figura 4), onde cresceram por cerca de 40 dias, até a coleta. O sistema de hidroponia utilizado consistiu de conjuntos de canos de PVC interligados e acoplados a uma caixa de 100 L, contendo solução nutritiva com composição própria para hidroponia de alface (Tabela 4). Imersa na solução, havia uma bomba elétrica, que fazia a oxigenação da solução nutritiva e a sua circulação pelos canos com orifícios na parte superior, onde se encontravam as plantas. O pH, a temperatura e a concentração de nutrientes em PPM da solução nutritiva foram monitorados diariamente. O pH foi mantido entre 5,5 e 6,5, adicionando-se hidróxido de potássio (KOH) à solução quando o pH ficava mais ácido que o recomendado. A concentração de nutrientes foi mantida acima de 100 ppm. Foram adicionados 10 mL de uma suspensão comercial de *Trichoderma sp.* para proteção das raízes das alfaces de infecções por fungos e bactérias patogênicas.

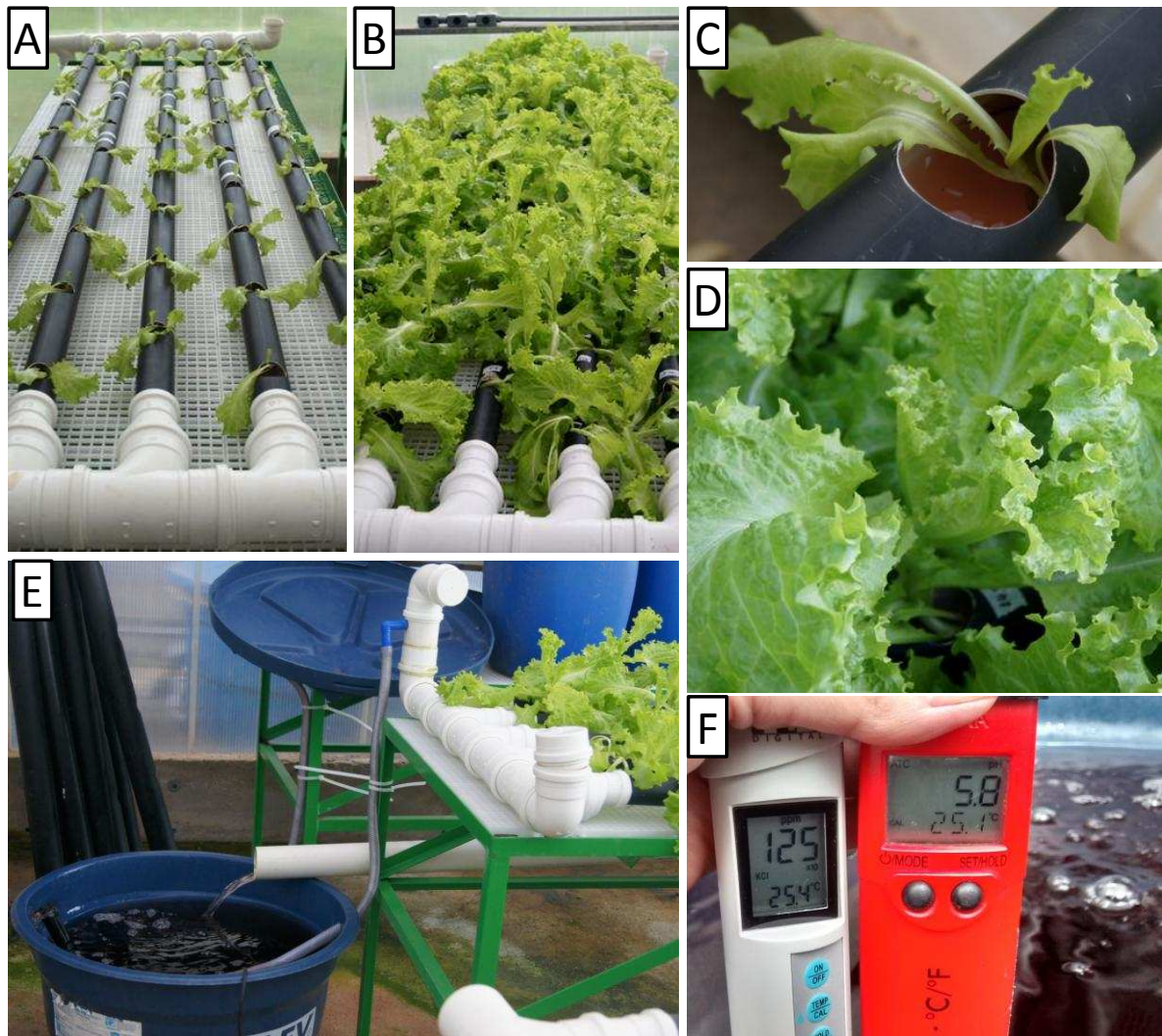
**Tabela 4.** Composição da solução nutritiva para cultivo hidropônico de alface em casa de vegetação.

<b>Substância</b>	<b>Massa para 1 L</b>	<b>Concentração final</b>
<b>Sulfato de magnésio hepta hidratado</b>	40 g L <sup>-1</sup>	40 mg L <sup>-1</sup>
<b>Nitrato de cálcio</b>	75 g L <sup>-1</sup>	75 mg L <sup>-1</sup>
<b>Fertilizante mineral misto</b>	66,2 g L <sup>-1</sup>	66,2 mg L <sup>-1</sup>
<b>MAP purificado – fosfato monoamônico</b>	15 g L <sup>-1</sup>	15 mg L <sup>-1</sup>
<b>Con micros light<sup>1</sup></b>	1 g L <sup>-1</sup>	1 mg L <sup>-1</sup>
<b>Fertilizante Fe 6% EDDHA<sup>2</sup></b>	3 g L <sup>-1</sup>	3 mg L <sup>-1</sup>
<b>Trichoderma sp.</b>	-	Diluído 10 <sup>6</sup> vezes

<sup>1</sup> p/p: Mo 0,916%; Bo, 10%; ZnEDTA 1,60%; CuEDTA 4,09%; MnEDTA 4,09%, Ni 0,814%. <sup>2</sup> Fe quelado por EDDHA solúvel em água 40% (p/p) de agente quelante EDDHA.

Foi feita extração de DNA de folhas e PCR para confirmação de transgenia de todas as plantas cultivadas em hidroponia. Aquelas cuja transgenia foi confirmada por PCR foram coletadas e imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido. Logo em seguida, foram acondicionadas em Liofilizador Liotop L101, por 48-72 h. Depois de serem liofilizadas, as

folhas foram trituradas em liquidificador para serem administradas aos camundongos C57BL/6.



**Figura 4.** Cultivo das gerações T1 e T2 de alface geneticamente modificado em sistema de hidroponia em casa de vegetação. **A.** Plântulas após 15 dias de germinação. **B.** Mesmas plantas após 30 dias no sistema de hidroponia. **C.** Detalhe de plântula no início do crescimento em hidroponia. **D.** Detalhe de planta após 30 dias de crescimento em hidroponia. Observar o rápido crescimento e acúmulo de biomassa foliar. **E.** Detalhe da caixa d'água com solução nutritiva sendo bombeada no sistema de hidroponia. **F.** Monitoramento do pH, temperatura e concentração de nutrientes da solução.

#### 4.7. Caracterização molecular dos transformantes

##### 4.7.1. Extração de DNA genômico e reação da polimerase em cadeia (PCR)

Plantas regeneradas foram submetidas ao processo de extração do DNA genômico utilizando-se o método minia extração para PCR, conforme descrito por Brasileiro e Carneiro (2015) com modificações. Cerca de 20 a 40 mg de tecido vegetal fresco, coletado pela manhã, de cada planta foram macerados em tubo de centrífuga tipo Eppendorf e logo em seguida adicionado 200  $\mu$ L de tampão de extração para PCR (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM,

tris-HCl 100 mM [pH 8]). As amostras foram homogeneizadas em agitador do tipo Vórtex por 5 s e incubadas a 60 °C, por 20 min. Após esse período, foram adicionados 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguindo-se agitação por 15 s e centrifugação a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi recuperado em novo tubo e a ele foram adicionados 200 µL de isopropanol gelado. As amostras foram homogeneizadas com suaves inversões por 1 min e incubadas a -20 °C, por no mínimo 30 min. Novamente foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min. Os precipitados recuperados foram lavados com 300 µL de etanol 70% (v/v) gelado e centrifugados a 12.000 g por 5 min. Após descartar o etanol e esperar o pellet secar, o precipitado foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura e armazenado a -20 °C.

A reação de PCR foi realizada em volume de 25 µL contendo KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8,4 100 mM, Triton X-100 1%, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, 128 µM de cada dNTP; 6 pmol de cada iniciador e 1,5 U de Taq DNA polimerase. O programa da PCR consistiu de: desnaturação inicial a 94 °C (5 min), seguindo 35 ciclos de amplificação (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min) com um ciclo de extensão final a 72 °C durante 7 min. Foram utilizados os primers específicos para o gene HSP60 otimizado para plantas. Os produtos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) e corados com brometo de etídio.

#### **4.7.2. Extração de DNA genômico e Southern blot**

Folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação foram usadas para extração de DNA genômico utilizando-se o método descrito por Doyle e Doyle (1987), modificado. Foram coletadas amostras de 1,5-3,0 g de folhas jovens, completamente expandidas que foram maceradas em nitrogênio líquido, utilizando gral e pistilo autoclavados, até formarem um pó fino. Este foi rapidamente transferido para tubo de polipropileno contendo 15 mL de tampão CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, tris-HCl 100 mM (pH 8) e β-mercaptoetanol 0,2%, pré-aquecido a 65 °C em banho-maria. As amostras foram incubadas a 65 °C por 30-40 min, sendo agitadas a cada 10 min. Após a incubação, foram adicionados 15 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguindo-se agitação leve por 10 min para emulsificar as fases, evitando a quebra do DNA. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4 °C por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e novamente adicionados 15 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguindo-se agitação leve por 10 min e centrifugação a 10.000 rpm, a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1/3 do volume de acetato de amônia 7,5 M. Os tubos foram agitados gentilmente por inversão e incubados em gelo por 5 min. Foi adicionado 1 volume de isopropanol gelado e novamente as amostras foram homogeneizadas

com suaves inversões por 5 min e incubadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por no mínimo 30 min. Depois foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e os precipitados recuperados foram lavados com 5 mL de etanol 70% (v/v) gelado e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min. Após descartar o etanol e esperar o pellet secar, o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de RNase A  $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  em água ultrapura. Os tubos foram incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 h. O DNA foi novamente precipitado com 1 volume de isopropanol gelado e lavado com etanol 70% (v/v) gelado. O pellet, após secar, foi ressuspensionado em 300  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e as amostras foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O DNA foi quantificado em nanodrop e em gel de agarose 1% (p/v), utilizando marcador de peso molecular High Mass DNA Ladder (Invitrogen). A digestão de cerca de 100  $\mu\text{g}$  do DNA genômico foi feita com 10  $\mu\text{L}$  da enzima de restrição HindIII 10 u/ $\mu\text{L}$  (Promega), tampão E, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por cerca de 18-20 h, em um volume final de reação de 200  $\mu\text{L}$ . Após conferência da digestão em gel de agarose 1% com 10% do volume final de reação, as amostras foram precipitadas com isopropanol gelado. As amostras foram, então, homogeneizadas com suaves inversões por 5 min e incubadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por no mínimo 30 min. Logo após, foram centrifugadas a 13.400 rpm por 15 min, o sobrenadante foi descartado e os precipitados recuperados foram lavados com etanol 70% (v/v) gelado e novamente centrifugados a 13.400 rpm por 10 min. Após descartar o etanol e esperar o pellet secar, o precipitado foi ressuspensionado em 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, adicionado de 25  $\mu\text{L}$  de glicerol e 10  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida 6x. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% (p/v) que correu durante cerca de 14 h, a 20 V.

A transferência do DNA para a membrana foi feita conforme descrito por Brasileiro e Carneiro (2015). O gel de agarose foi transferido para um reservatório de vidro e incubado em HCl 0,25 N por 10 min, sob agitação suave, para ocorrer a hidrólise das bases purinas. Logo após, o gel foi lavado com água destilada e incubado em solução de desnaturação (NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M) por 30 min, sob agitação suave, para que as ligações de hidrogênio entre a dupla fita do DNA se rompam. Novamente, o gel foi lavado com água destilada e incubado em solução de neutralização (tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M) por 30 min, sob leve agitação. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e o sistema de transferência foi montado. Esse sistema consiste de um recipiente com uma plataforma do tamanho do gel no centro, onde foram empilhados papéis toalha secos, papéis embebidos em tampão SSC 20X, a membrana de náilon exatamente do tamanho do gel, o gel de agarose, e mais papéis toalha embebidos em tampão SSC 20X, nessa ordem de baixo para cima. Em torno da plataforma foi colocado tampão SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sódio bi-hidratado 300 mM, pH 7,0) e em cima da

ilha, foi colocada a ponte, que liga o seu topo com a solução de tampão ao redor. Após cerca de 12-14 h de transferência, o sistema foi desmontado, as canaletas do gel foram marcadas com lápis, a membrana foi removida com cuidado e o DNA foi fixado à membrana por exposição direta à luz ultravioleta por 12 s.

Após secar por pelo menos 1 h à temperatura ambiente, a membrana foi colocada em recipiente próprio para hibridização, onde foi adicionada um pequeno volume de solução de pré-hibridização (SSC 5X, solução Denhardt 5X, SDS 0,5%, DNA de esperma de salmão 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) aquecida a 65 °C. A membrana foi incubada por 2 h, em forno de hibridização a 65 °C e 80 rpm.

A sonda utilizada foi o amplicon resultante da amplificação do fragmento de 656 pb do gene HSP60 humano otimizado para plantas. A sonda foi marcada com radioisótopo [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP, usando o kit de marcação de DNA DecaLabel da Thermo Scientific, seguindo as instruções do fornecedor; foi desnaturada por fervura por 5 min, e imediatamente colocada em gelo. Logo em seguida, a sonda foi adicionada à solução de pré-hibridização e o sistema foi incubado por 16 h, a 80 rpm, em forno de hibridização a 60°C. Após esse período, a membrana foi lavada duas vezes com solução de lavagem I [SSC 2X, SDS 0,1%] por 15 min à temperatura ambiente, e em seguida, foi lavada uma vez com solução de lavagem II [SSC 1X, SDS 0,1%] por 15 min, a 60°C e 80 rpm. A membrana foi seca em papel filtro e envolvida com filme plástico tipo PVC, sendo exposta a um intensificador do tipo IP num cassete, que foi mantido a temperatura ambiente. Após 1-2 dias de exposição, o IP foi revelado em aparelho FLA 3000 Phosphoimager para detecção do sinal radioativo.

#### **4.7.3. Extração de proteínas e Western blot**

Para extração de proteínas, 4-6 g de folhas de alface foram maceradas em nitrogênio líquido e colocados em tubos de 50 mL. Foi adicionado 0,5 mL de tampão de extração (Tris-HCL 50 mM pH 6,8,  $\beta$  - mercaptoetanol 1%, polivinilpirrolidona 0,2%) para cada 150 mg de tecido vegetal; incubou-se por 1 h no gelo sob forte agitação e, em seguida, centrifugou-se por 30 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e armazenado a -20 °C. A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada pelo método de ligação ao coomassie blue (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

A precipitação de proteínas foi realizada segundo Faurobert e colaboradores (2007), com modificações. Foram adicionados 4 volumes de tampão de precipitação gelado (acetato de amônio 100 mM em metanol) ao sobrenadante coletado na extração de proteínas. As

amostras foram misturadas por inversão e incubadas overnight a -20 °C. No dia seguinte, as proteínas foram precipitadas por centrifugação a 9.500 rpm, por 15 min, a 4 °C. Após centrifugação, o pellet foi lavado 2 vezes com tampão de precipitação gelado e 1 vez com acetona 70%, gelada. Entre cada lavagem, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 9.500 rpm e 4 °C. Não se esperou o pellet secar completamente à temperatura ambiente, para que as proteínas não se degradassem. Assim, tão logo o excesso de acetona evaporou, elas foram ressuscitadas em tampão de solubilização (ureia 7 M, tiourea 1 M, DTT 40 mM, chaps 4% [m/v]) e armazenadas em freezer a -20 °C.

Foram utilizadas 200 µg das proteínas extraídas e precipitadas de cada amostra para a corrida em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS). As proteínas foram desnaturadas em temperatura de 95 °C sob condição de redução em tampão de corrida (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,04%) e separadas em gel SDS/PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida) 12%. A transferência das proteínas do gel para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) foi feita utilizando o equipamento Bio-rad Trans-blot SD, 25 V por 1 h. Após a transferência, a membrana foi bloqueada overnight em solução tris-salina TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM), contendo leite desnatado em pó desnatado Molico 5%, sob agitação, a 4 °C.

A análise de imunodeteção foi realizada com anticorpos policlonais anti-HSPD1 (Sigma-Aldrich) produzidos em coelhos contra a proteína HSP60 humana, na proporção de 1:550 em solução tris-salina TBS contendo leite em pó desnatado 5%, durante 4 h, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Após a incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com a solução Tris-Salina TBS (contendo Tween-20 1%), e incubada durante 2 h, a 37 °C, sob leve agitação com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, IgG anti-coelho, produzido em cabra (Sigma-Aldrich), na diluição 1:30.000. Após esse período, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com a solução Tris-Salina TBS (contendo Tween-20 1%) e revelada usando o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e nitroblue tetrazolium (NBT), sob leve agitação, no escuro, até o aparecimento da cor azul. Em seguida, a reação foi parada pelo abundante enxague com água destilada.

## **4.8. Avaliação do efeito da administração oral da folha de alface transgênica a camundongos com colite experimental**

### **4.8.1. Modelo de colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS)**

Alguns modelos experimentais murinos têm sido desenvolvidos para se estudar a patogênese e a regulação de doenças inflamatórias intestinais. Um modelo de colite quimicamente induzida é feito por administração de sulfato de sódio dextrano (DSS), originalmente descrito por Okayasu e colaboradores (1990). Este modelo vem sendo amplamente utilizado devido à facilidade na indução da colite, rapidez e reprodutibilidade. Os camundongos que recebem a solução por via oral desenvolvem colite aguda com características semelhantes à retocolite ulcerativa humana, apresentando perda de peso, diarreia, sangramento retal, encurtamento do cólon, e alto escore histológico da doença (Okayasu et al., 1990).

Neste trabalho, camundongos C57BL/6 receberam uma solução de DSS a 2% diluído na água de beber, como única fonte líquida, durante 7 dias consecutivos. Esses animais foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos em gaiolas coletivas no Biotério Experimental do Laboratório de Imunobiologia durante o período dos experimentos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob Protocolo nº. 85 / 2014.

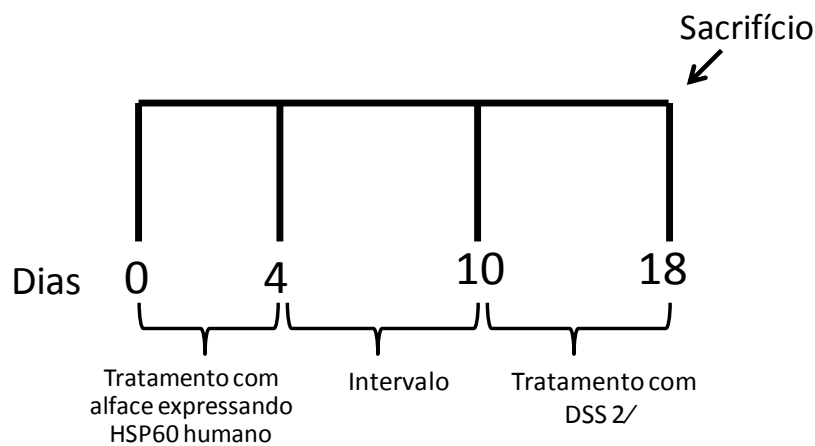
### **4.8.2. Administração oral da folha de alface transgênica a camundongos**

Folhas de alfaces transgênicas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Logo em seguida, foram colocadas em Liofilizador Liotop L101 por pelo menos 48 h, para completa desidratação. Após a liofilização, as folhas das plantas T2 provenientes da linhagem 14 foram trituradas em liquidificador e adicionadas à dieta AIN93 para camundongos (Reeves et al., 1993), na concentração de aproximadamente 6% (m/m).

Esse tratamento ocorreu antes da indução da colite experimental. Para cada gaiola, foi adicionada quantidade de ração considerando o cálculo de, pelo menos, 5 g de ração para cada animal por dia. Todos os dias foram avaliados o consumo da ração. Assim, cada camundongo ingeriu cerca de 300 mg de alface transgênica por dia pela dieta (Oliveira et al., 2015).

### 4.8.3. Desenho experimental

Em cada experimento, e para cada tratamento, foram utilizados de 3 a 6 camundongos C57BL/6, com 9-10 semanas. Eles foram submetidos ao tratamento pelo consumo de dieta contendo a proteína HSP60 proveniente de alface transgênica por 4 dias. Em seguida, houve 6 dias de intervalo, quando foram alimentados apenas com ração comercial e água, e nos 7 dias seguintes foram submetidos ao tratamento com DSS 2%, para indução de colite aguda ulcerativa. As garrafas contendo solução de DSS eram renovadas e o consumo dos animais foi mensurado diariamente durante o período de indução da colite. No 18º dia do experimento, houve o sacrifício dos animais (Figura 5). Cada experimento consistiu de quatro gaiolas, sendo uma com camundongos não tratados com alface ou DSS (grupo Naive), uma com camundongos não tratados com alface, mas que ingeriram DSS 2% (grupo DSS), uma com camundongos tratados com alface não transgênica e DSS 2% (grupo Dieta alface + DSS), e a última com camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana recombinante e DSS 2% (grupo Dieta HSP60 + DSS).



**Figura 5.** Esquema do desenho experimental da avaliação do efeito da administração oral da folha de alface transgênica a camundongos com colite experimental. Durante os primeiros 4 dias houve o tratamento dos camundongos com alface produtora de HSP60 humana na dieta. Houve um intervalo de 6 dias, seguido da indução de colite por ingestão de DSS 2% , por 7 dias consecutivos.

### 4.8.4. Avaliação do peso corporal dos animais

Diariamente, durante o período experimental, os camundongos foram pesados em balança de precisão (0,25-2.000 g) sempre no mesmo horário. A partir desses dados, foi calculado o percentual de variação de peso, que também foi utilizado para obtenção do escore macroscópico da doença.

#### 4.8.5. Avaliação da gravidade da colite induzida por DSS

Os parâmetros macroscópicos para avaliação da gravidade da colite induzida por DSS foram listados na Tabela 5. O índice macroscópico representa a soma de cada parâmetro ranqueado (% de perda de peso, diarreia e sangramento). Foi dado um escore de 0 a 4 para cada parâmetro analisado. O índice máximo possível é igual a 12 (Kang et al., 2006).

**Tabela 5.** Índice macroscópico da colite aguda induzida por DSS.

Índice	% perda de peso	Diarreia	Sangramento
0	Nenhuma	Nenhuma	Ausente
1	1 a 5		
2	5 a 10	Moderada	Moderado
3	11 a 15		
4	>15	Grave	Grave

#### 4.8.6. Análise histológica da colite

Amostras do cólon de camundongos C57BL/6 com colite induzida por DSS foram fixadas em formaldeído 10% em tampão PBS e processadas para análise histológica. Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina foram ranqueados às cegas, baseado no sistema de índice previamente descrito (McCafferty et al., 2000) que classifica as seguintes características: extensão da destruição da arquitetura da mucosa, presença e grau de infiltração celular na mucosa e submucosa, presença ou ausência de abscessos e úlceras das criptas e a presença e grau de depleção das células caliciformes (Tabela 6). Os índices para cada característica foram somados com o índice máximo possível de 13.

**Tabela 6.** Índice microscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos.

<b>Parâmetro</b>	<b>Classificação</b>
Extensão da destruição da arquitetura da mucosa (erosão)	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 dano extensivo
Presença e grau de infiltração celular da mucosa	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 infiltração transmural
Presença e grau de infiltração celular da submucosa	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 infiltração transmural
Presença ou ausência de abscessos e úlceras das criptas	0 ausente e 1 presente
Presença ou ausência de depleção das células caliciformes	0 ausente, 1 leve, 2 moderada e 3 muito reduzido

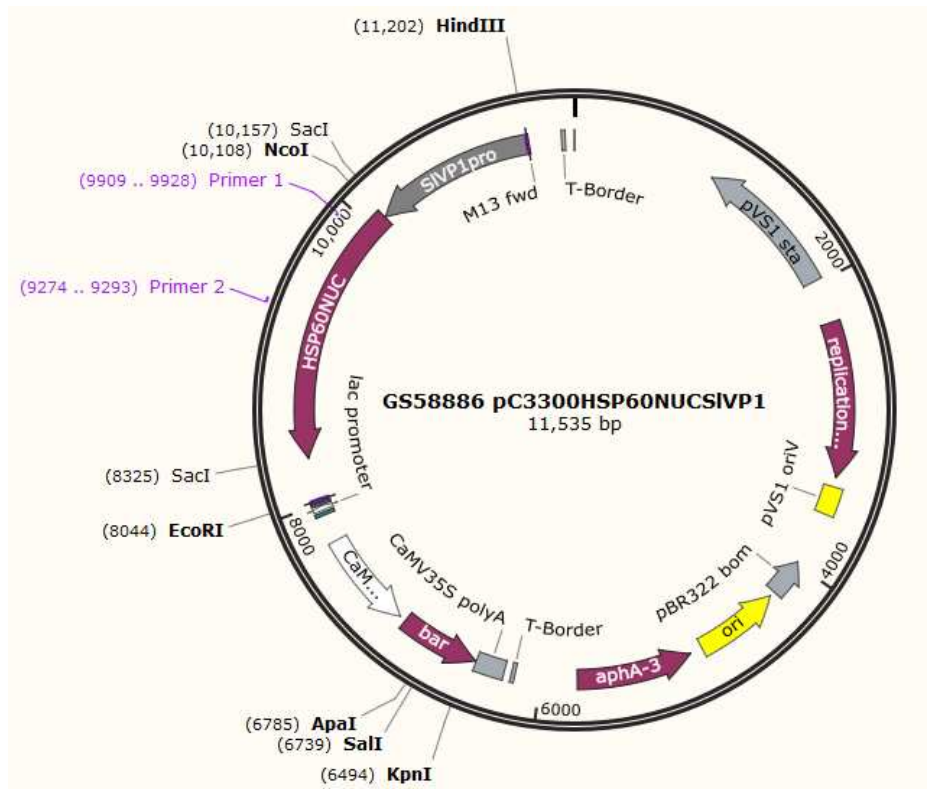
#### **4.9. Análises estatísticas**

As medidas realizadas foram comparadas estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey para calcular a significância entre os grupos. O valor P considerado com diferença significativa foi  $> 0,05$ .

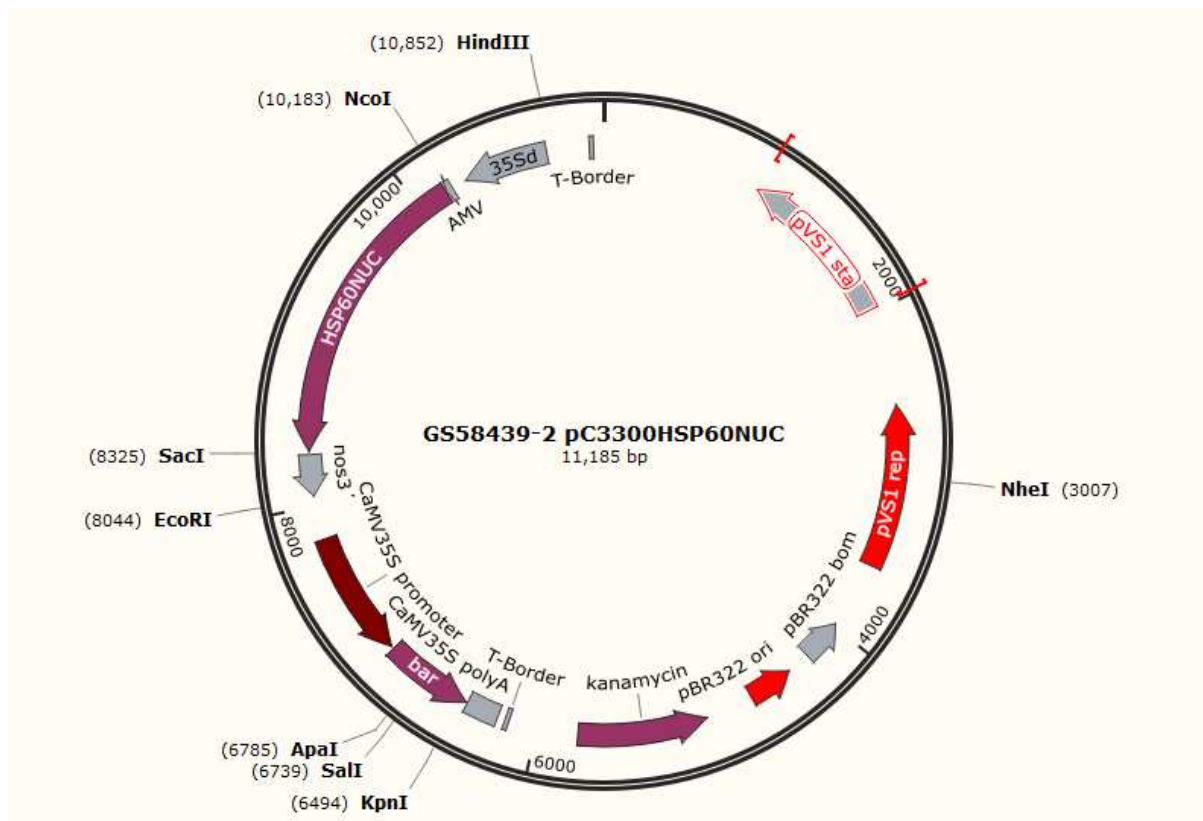
### **5 - RESULTADOS**

#### **5.1. Construção dos vetores**

Foram construídos dois vetores, sendo que do pC3300HSP60NUC Slvp1, foi retirada a sequência de endereçamento para a mitocôndria, presente nos 75 primeiros pares de bases nitrogenadas do gene humano; e possui a expressão do gene HSP60 regulada pelo promotor do gene da bomba de prótons vacuolar H<sup>+</sup>-profosfatase 1 (Slvp1) de *Solanum lycopersicum* (Figura 6). Enquanto que o vetor pC3300HSP60NUC apresenta a sequência de endereçamento para a mitocôndria, e possui a expressão do gene HSP60 regulada pelo promotor CaMV35S do vírus do mosaico-dourado da couve flor (Figura 7). Ambos os promotores são constitutivos.



**Figura 6.** Mapa do vetor pC3300HSP60NUC Slvp1 sem a sequência de endereçamento à mitocôndria no gene HSP60, regido pelo promotor do gene Slvp1 de *Solanum lycopersicum*. Em lilás, está representada a posição de anelamento dos primers específicos para o gene HSP60 humano otimizado para plantas.

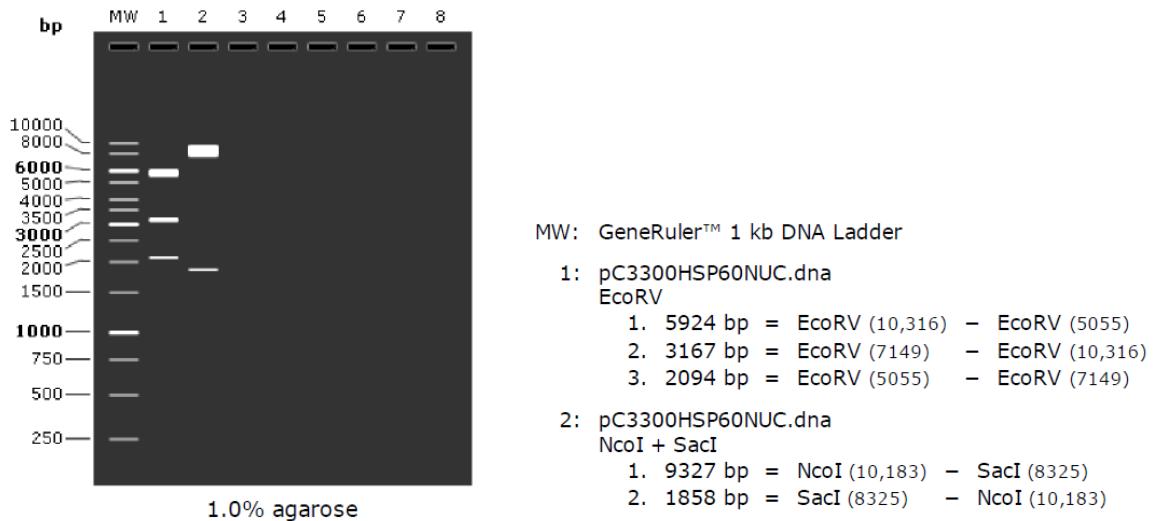


**Figura 7.** Mapa do vetor pC3300HSP60NUC contendo a sequência de endereçamento à mitocôndria no gene HSP60, regido pelo promotor CaMV35S do vírus do mosaico-dourado da couve flor.

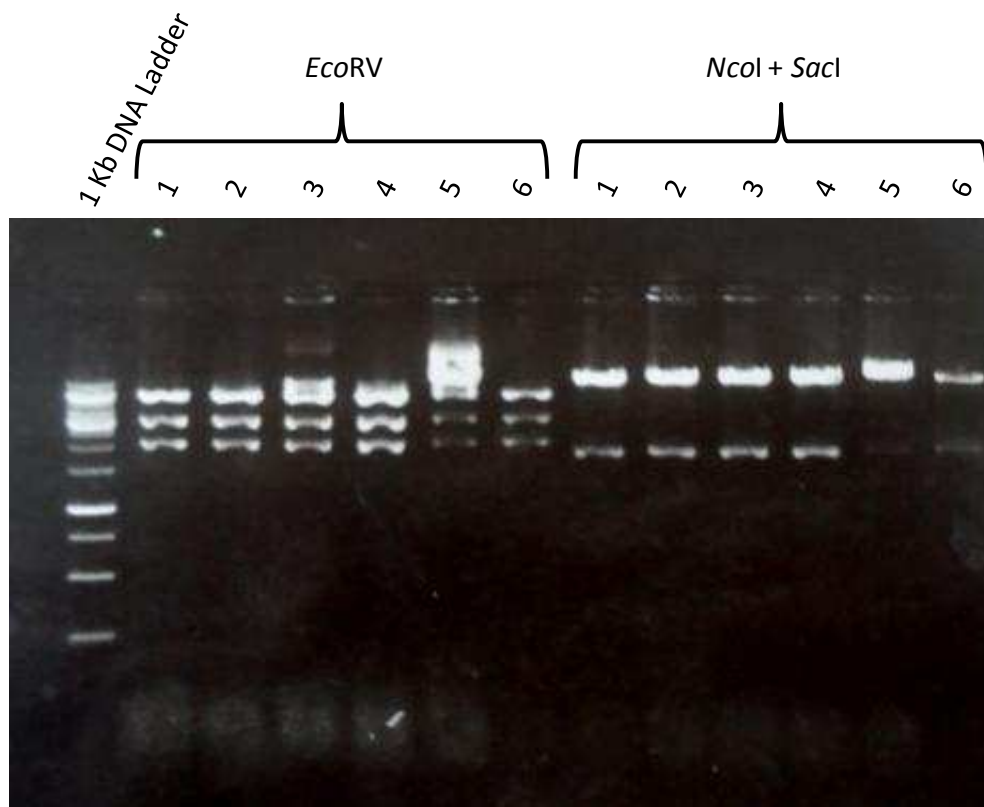
Ambos os vetores possuem o gene Bar, que codifica para a enzima fosfinotricina acetiltransferase e confere resistência ao herbicida glifosinato de amônia (GA) para seleção em plantas. O mecanismo de ação deste herbicida é a inibição da enzima glutamina sintetase (GS) que pertence à rota de assimilação do nitrogênio. Com a inibição da GS, ocorre acúmulo de amônia e conseqüente morte celular. O promotor que regula a expressão do gene Bar é o CaMV35S. O operon nptII é o promotor que regula a expressão do gene de resistência ao antibiótico canamicina para seleção em bactérias.

## 5.2. Transformação e cultivo de *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens*

Os produtos da digestão do vetor pC3300HSP60NUC com as enzimas de restrição EcoRV e NcoI+SacI apresentaram o padrão esperado de três bandas para a EcoRV e duas bandas para NcoI+SacI, sendo que a banda menor, de 1.858 pb, corresponde exatamente ao gene HSP60 completo (Figura 8).



**Figura 8.** Representação esquemática do padrão de bandas esperado após digestão do vetor pC3300HSP60NUC com as enzimas de restrição EcoRV e NcoI+SacI.

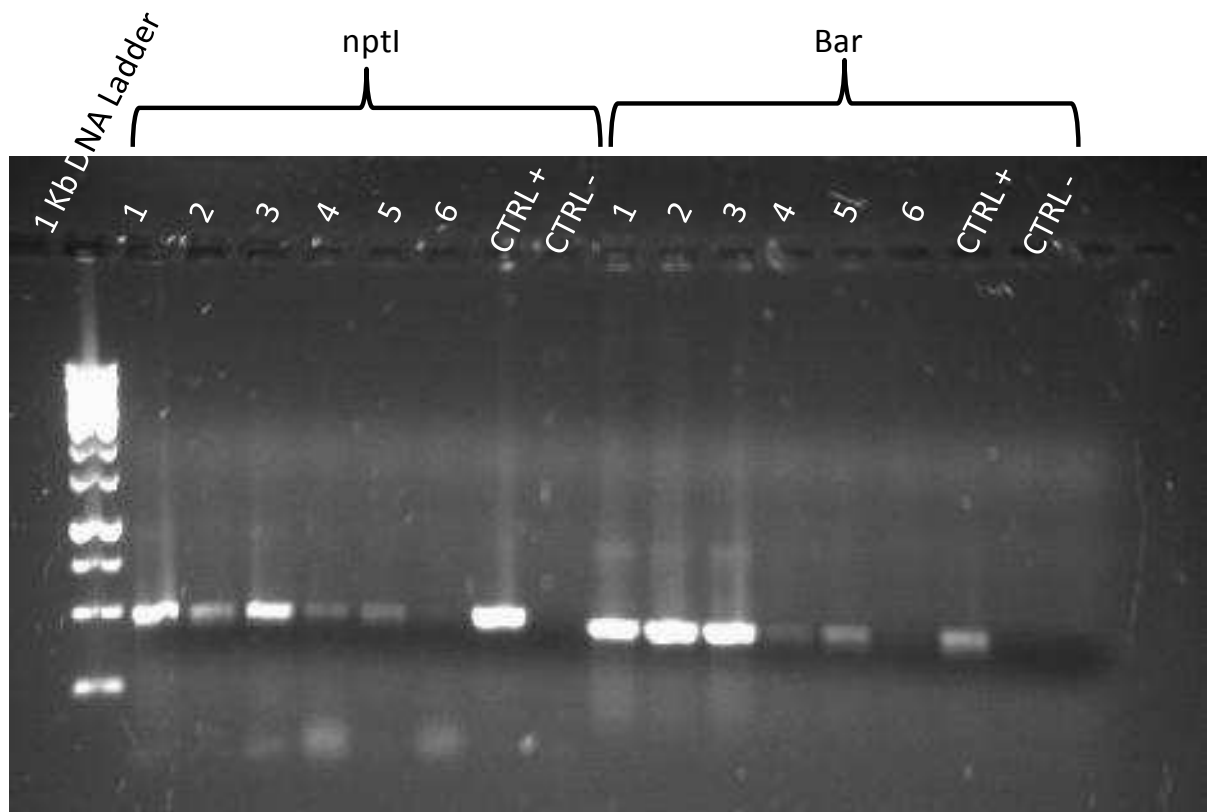


**Figura 9.** Padrão de bandas encontrado após digestão do vetor pC3300HSP60NUC com as enzimas de restrição EcoRV e NcoI+SacI. Números de 1 a 6 representam a digestão das diferentes colônias de *E. coli* crescidas após a transformação por eletroporação.

O padrão de bandas resultantes da digestão dos plasmídeos das colônias de *E. coli* 3 e 5 apresentou-se alterado após digestão com EcoRV, por isso, os vetores resultantes dessas colônias foram descartados. O padrão de bandas resultante da digestão dos plasmídeos das

colônias 1, 2, 4 e 6 apresentou-se conforme o esperado, por isso foram mantidas em estoque (Figura 9).

O DNA plasmidial proveniente da colônia 1 de *E. coli* foi utilizado para transformação de células competentes de *A. tumefaciens* linhagem EHA105. Após o crescimento das bactérias transformadas em placas contendo meio LB sólido, foram selecionadas 6 colônias individualizadas e feito um PCR de colônia, para verificar a transformação (Figura 10).



**Figura 10.** Gel de agarose com padrão de bandas encontrado após PCR das colônias de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor pC3300HSP60NUC. Números de 1 a 6 representam as diferentes colônias de *A. tumefaciens*; nptI = PCR utilizando primer específico para o gene nptI. Bar = PCR utilizando primer específico para o gene Bar. CTRL + = PCR realizado com vetor pC3300HSP60NUC purificado. CTRL - = PCR realizado sem presença de vetor.

Os controles positivos apresentaram bandas do tamanho esperado, assim como todas as colônias, exceto a número 6. As colônias 1, 2 e 3 foram armazenadas em estoque de glicerol 25% em freezer -80 °C.

### 5.3. Transformação genética de alface mediada por *A. tumefaciens*

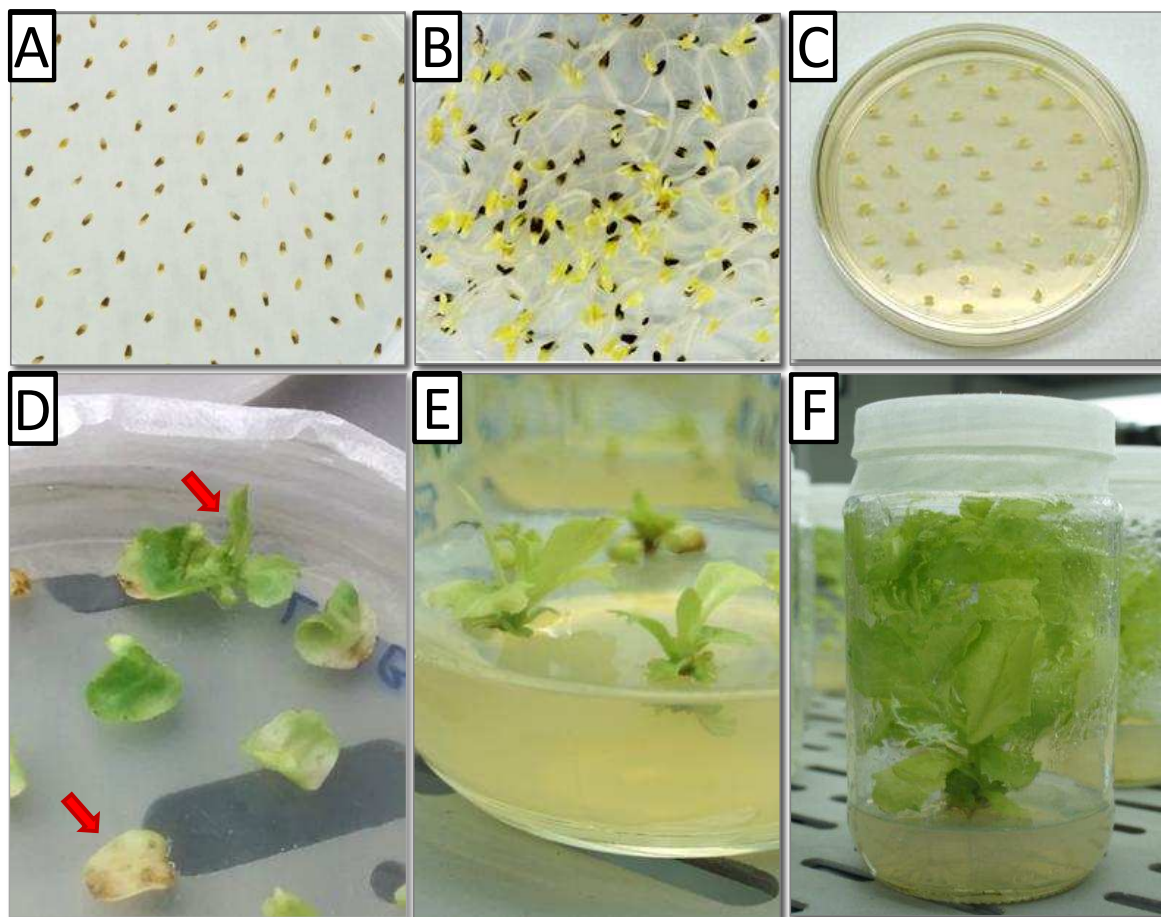
Foram realizados, pelo menos, 4 experimentos de transformação (cocultura) independentes para cada vetor, seguindo-se a sequência de metodologias ilustrada na Figura 11. O número de explantes transformados e regenerados que apresentaram brotações (como

ilustrado na Figura 11D) após 15-20 dias em meio de regeneração seletivo (LR1B) está mostrado na Tabela 7. Nota-se que os experimentos utilizando o vetor pC3300HSP60NUC (promotor 35S) apresentaram porcentagem média de brotação de 24% que é muito superior à porcentagem de brotação média das transformações utilizando o vetor pC3300HSP60NUC Slvp1 (promotor Slvp1), que foi de 5,3%. Essa diferença na eficiência de transformação foi compensada pelo maior número de experimentos de cocultura e de explantes por evento, sendo que, ao final, foi obtido número semelhante de explantes regenerados que apresentaram brotações de parte aérea.

**Tabela 7.** Eficiência de transformação genética de alface usando diferentes vetores.

Experimentos independentes	pC3300HSP60NUC (35S)			pC3300HSP60NUC Slvp1 (Slvp1)		
	Nº total de explantes	Explantes com gemas	% de brotação	Nº total de explantes	Explantes com gemas	% de brotação
<b>1</b>	245	88	35,9%	778	182	23,3%
<b>2</b>	325	81	24,9%	750	19	2,5%
<b>3</b>	647	124	19,1%	911	8	0,8%
<b>4</b>	265	64	24,1%	1.129	23	2,0%
<b>5</b>	-	-	-	1.373	41	2,9%
<b>6</b>	-	-	-	1.238	56	4,5%
<b>Total</b>	1.482	357	24,0%*	6.179	329	5,3%*

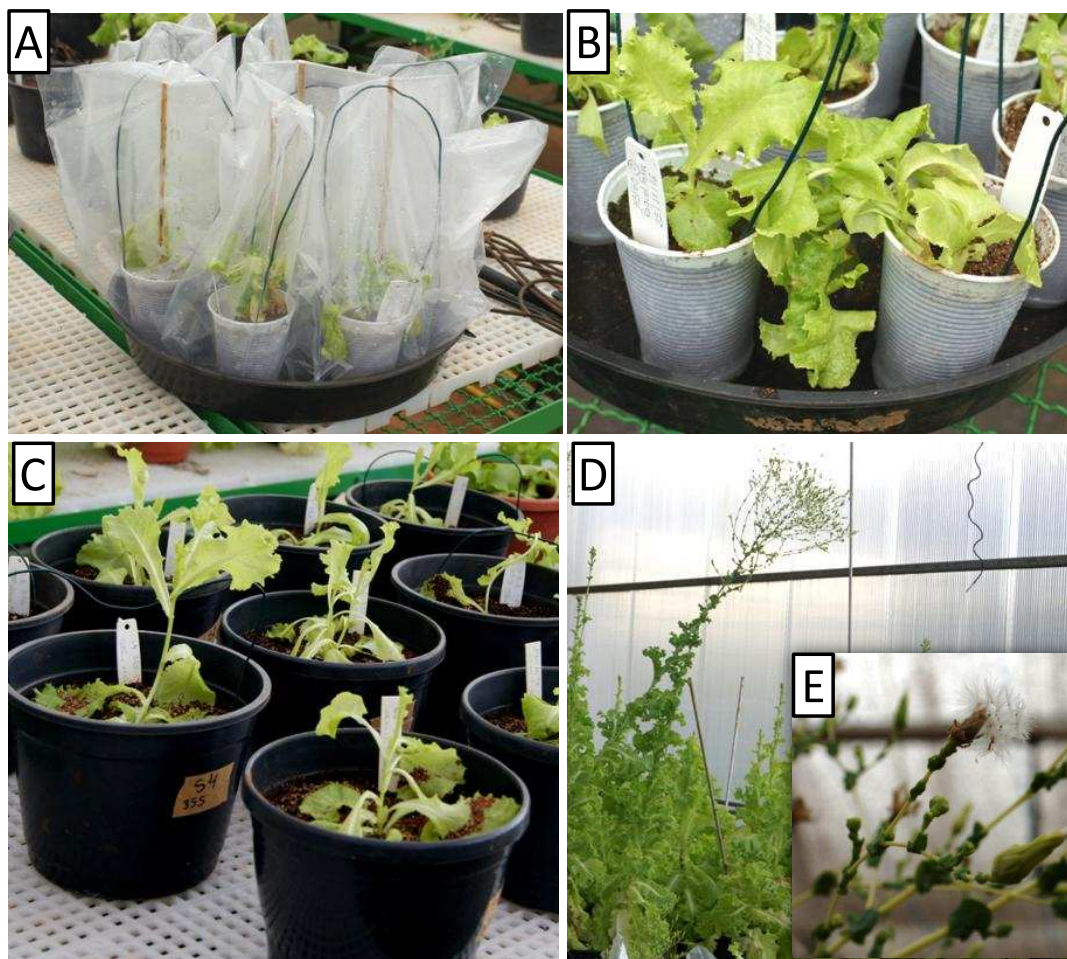
\* Média da porcentagem de brotação.



**Figura 11.** Etapas de transformação genética e regeneração in vitro de *Lactuca sativa*: **A.** Sementes desinfestadas para germinação. **B.** Sementes de *Lactuca sativa* com 4-5 dias de germinação no escuro, prontas para serem inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens*. **C.** Explantes cotiledonares inoculados em meio de regeneração (LR1B). **D.** Explantes após 20-30 dias em meio de regeneração (LR1B). Observa-se o início da organogênese com formação de brotos em alguns explantes, enquanto outros apresentam morte celular (setas). **E.** Brotos regenerados em meio de desenvolvimento (LR2) com seleção. **F.** Planta de alface regenerada a partir de organogênese em meio de enraizamento (LR3) e pronta para aclimatização.

#### 5.4. Aclimatização e cultivo em hidroponia das plantas de alface

Foram aclimatizadas, seguindo-se a sequência de eventos ilustrada na figura 12, 46 plantas transformadas com o vetor pC3300HSP60NUC, que receberam identificação com números, e 28 plantas transformadas com o vetor pC3300HSP60NUC Slvp1, que receberam identificação com letras. Dessas foram coletadas sementes de 21 plantas possivelmente transformadas com o vetor pC3300HSP60NUC (5, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 29, 32, 34, 35, 37) e de 21 plantas potencialmente transformadas com o vetor pC3300HSP60NUC Slvp1 (A, B, C, D, E, G, I, J, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y).



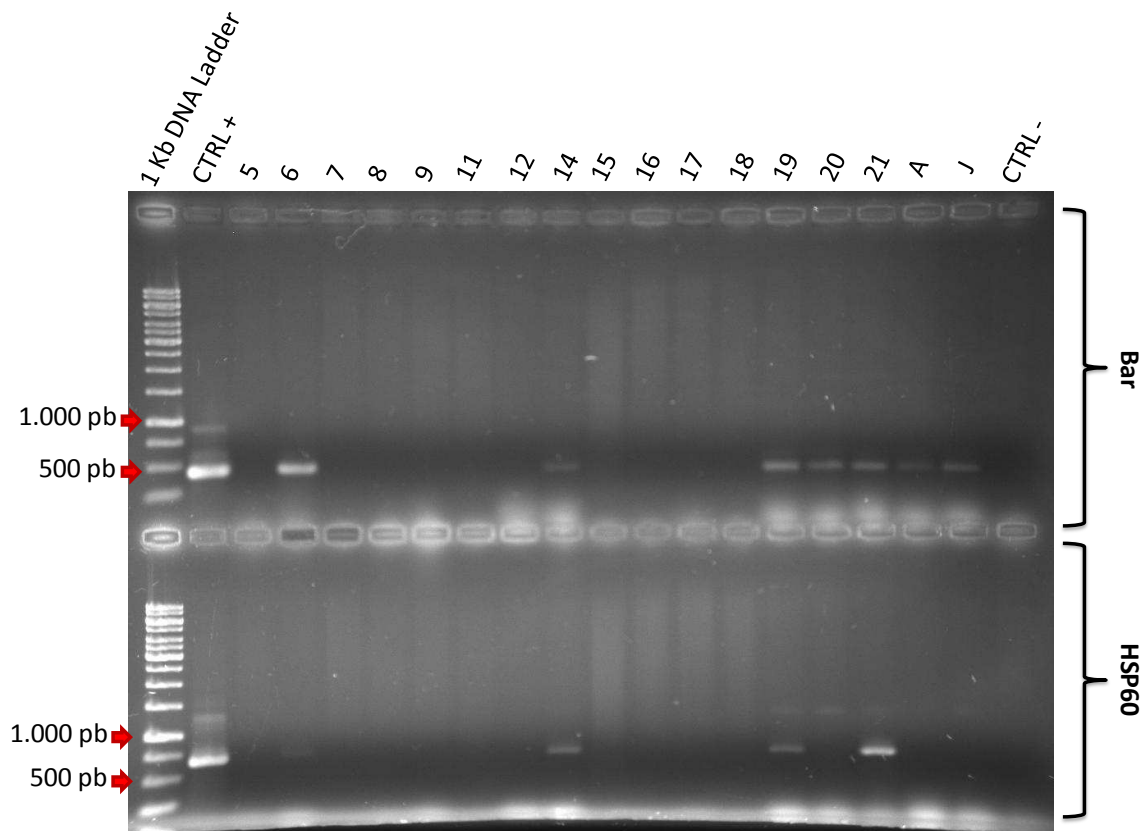
**Figura 12.** Aclimatização e etapas do desenvolvimento em casa de vegetação de plantas de *Lactuca sativa* inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens*. **A.** Plantas no estágio inicial de aclimatização, cobertas por sacos plásticos para manutenção de alta umidade. **B.** Plantas aclimatizadas e adaptadas à umidade do ambiente. **C.** Plantas aclimatizadas transplantadas para vasos com solo e substrato (1:1). **D.** Planta após cerca de 2-3 meses após aclimatização, mostrando haste floral com inflorescências em capítulo. **E.** Detalhe de inflorescência em capítulo madura.

Foram cultivadas 57 plantas possivelmente transformadas em hidroponia, sendo 8 plantas T1 da linhagem X (promotor Slvp1), 5 plantas T1 da linhagem 19, 6 plantas T1 da linhagem 21, 8 plantas T1 da linhagem 25. Da linhagem 14 foram 30 plantas T2 provenientes de diferentes T1 comprovadamente transgênicas por Southern blot.

### 5.5. Confirmação da presença do transgene por PCR

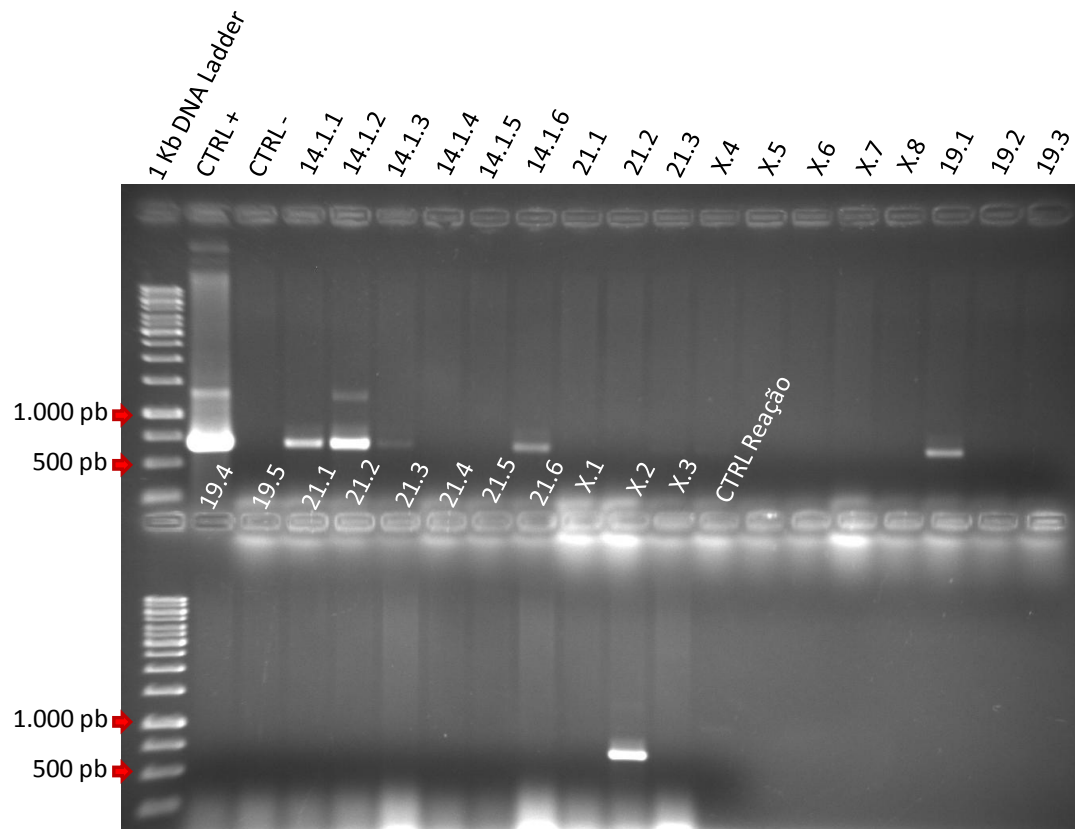
Várias tentativas de confirmar a transgenia das plantas T0 por PCR foram feitas. Abaixo está um exemplo de resultado obtido utilizando dois pares de primers diferentes – específico para o gene HSP60 humano otimizado para plantas, e específico para o gene Bar (Figura 13). Algumas amostras apresentaram bandas amplificadas utilizando os primers específicos para o gene Bar, porém não apresentaram bandas para o gene HSP60. Dessa

forma, foram consideradas transgênicas, apenas as plantas que apresentaram bandas amplificadas com os dois pares de primers, que são os eventos 6, 14, 19, 21.

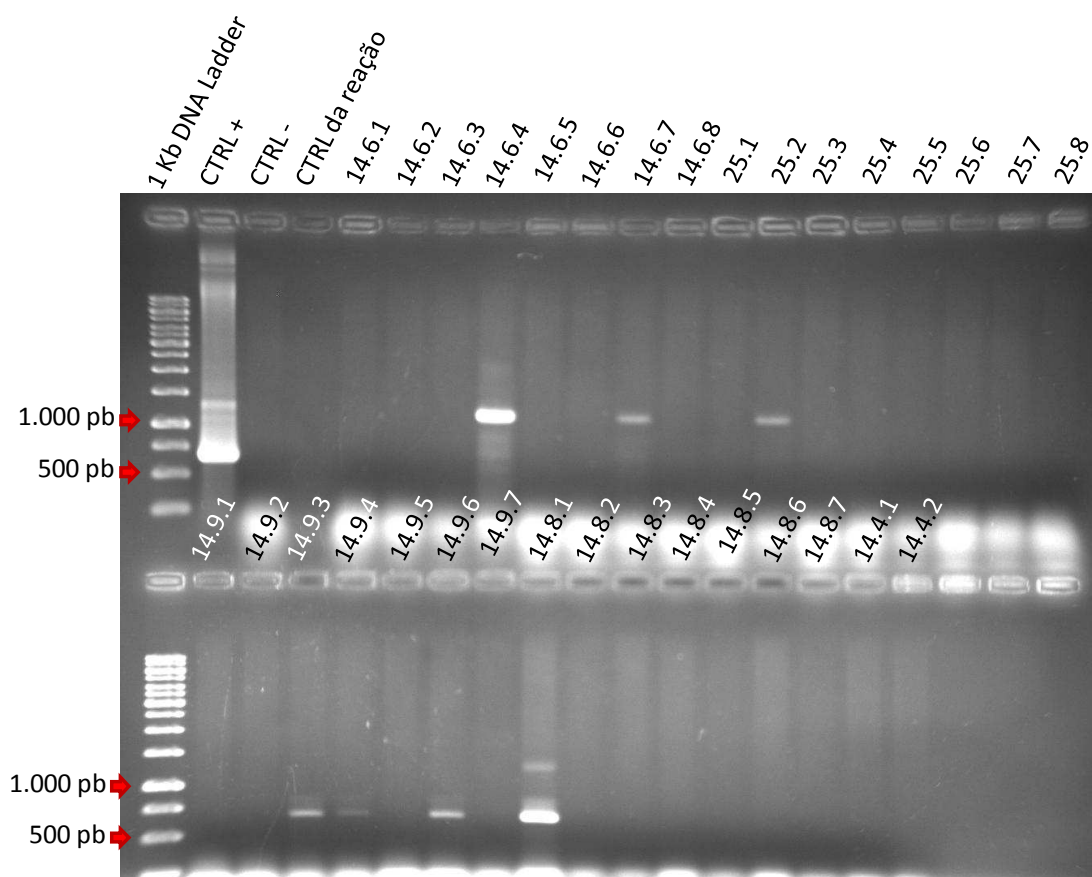


**Figura 13.** Gel de agarose 1% mostrando resultado de PCR para confirmação de transgenia das plantas de alface T0. Amostras consideradas positivas por amplificação com os dois pares de primers: 6, 14, 19, 21. Bar = PCR utilizando primers específicos para o gene Bar. HSP60= PCR utilizando primers específicos para o gene HSP60 humano otimizado para plantas. CTRL + = PCR realizado com vetor pC3300HSP60NUC. CTRL - = PCR realizado com DNA de planta não transgênica de alface.

Para selecionar as plantas T1 e T2 cultivadas em hidroponia para serem liofilizadas e administradas aos camundongos, foi feita reação de PCR com par de primers específicos para o gene HSP60 humano otimizado para plantas (Figuras 14 e 15), visto que esse par de primers se mostrou mais confiável que o par de primers específicos para o gene Bar. Das 57 plantas, 15 foram confirmadas como transgênicas e foram, então, liofilizadas.



**Figura 14.** Gel de agarose a 1% para confirmação via PCR, da transgenia das plantas de alface T1 e T2 cultivadas em hidroponia. Foram utilizados primers específicos para o gene HSP60 humano otimizado para plantas. CTRL + = PCR realizado com vetor pC3300HSP60NUC. CTRL - = PCR realizado com DNA de planta não transgênica de alface. CTRL Reação = PCR realizado sem presença de DNA.



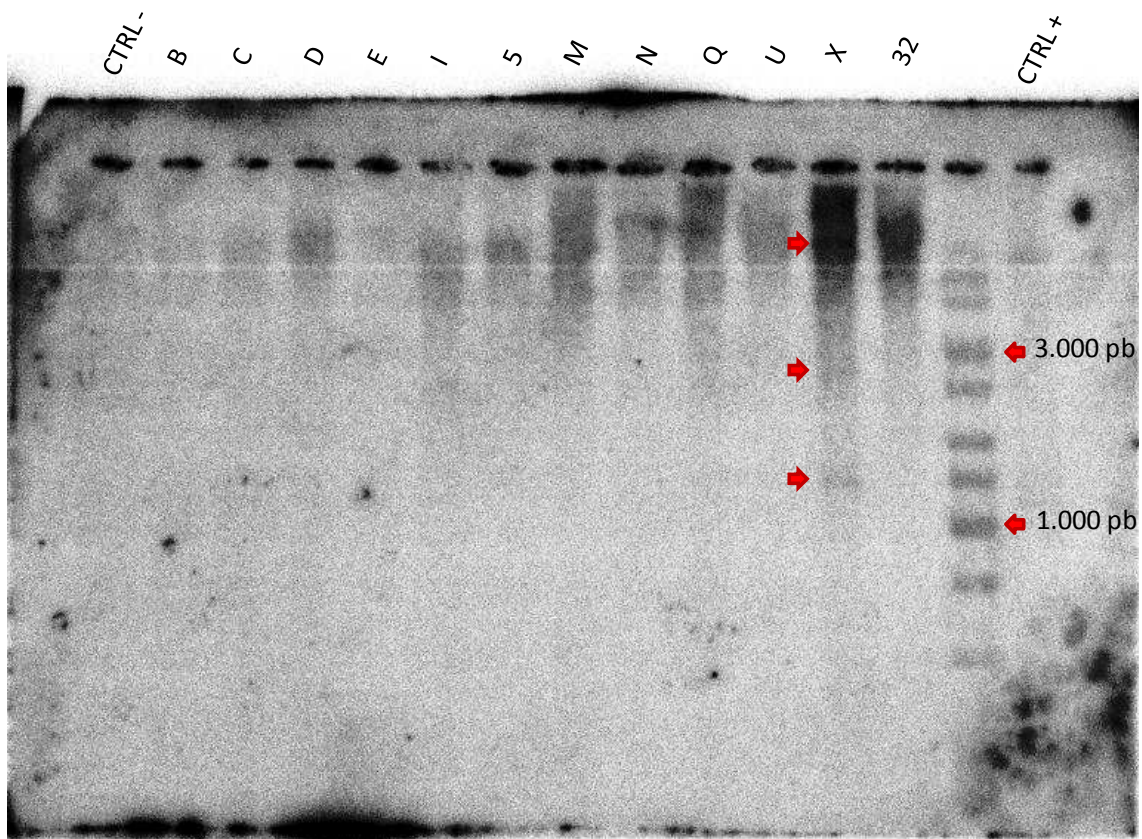
**Figura 15.** Gel de agarose a 1% para confirmação via PCR, da transgenia das plantas de alface T1 e T2 cultivadas em hidroponia. Foi utilizado primers específicos para o gene HSP60 humano otimizado para plantas. CTRL + = PCR realizado com vetor pC3300HSP60NUC. CTRL - = PCR realizado com DNA de planta não transgênica de alface. CTRL Reação = PCR realizado sem presença de DNA.

**Tabela 8.** Resultado da verificação de transgenia por PCR, com primers específicos para o gene HSP60 humano, das plantas T1 e T2 cultivadas em hidroponia. Apenas as encontradas positivas para o transgene foram coletadas e utilizadas para o bioensaio com camundongos.

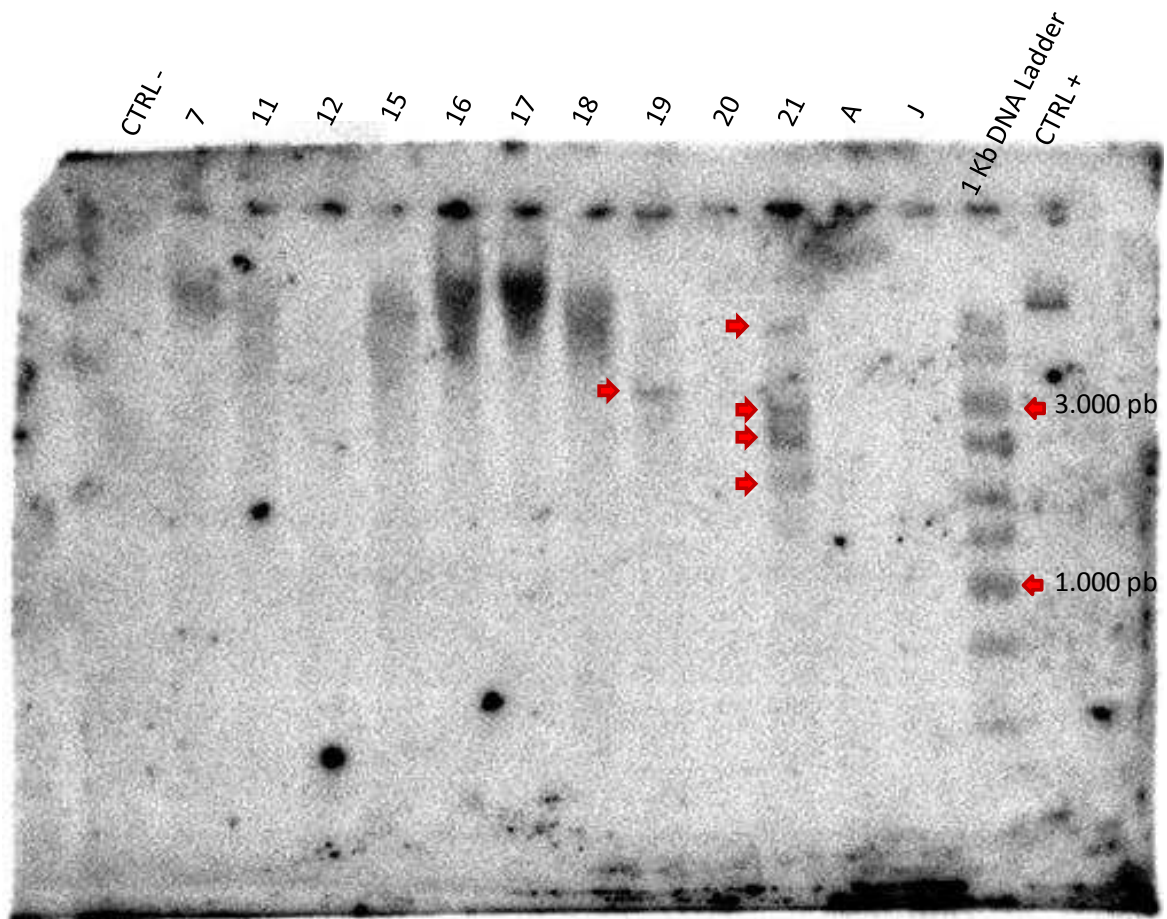
Promotor	Linhagem	Positivas	Negativas
<b>Slvp1</b>	X	X.2; X.4	X.1; X.3; X.5; X.6; X.7; X.8
<b>35S</b>	14.1	14.1.1; 14.1.2; 14.1.3; 14.1.6	14.1.4; 14.1.5
<b>35S</b>	14.6	14.6.4; 14.6.7	14.6.1; 14.6.2; 14.6.3; 14.6.5; 14.6.6; 14.6.8
<b>35S</b>	14.8	14.8.1	14.8.2; 14.8.3; 14.8.4; 14.8.5; 14.8.6; 14.8.7
<b>35S</b>	14.9	14.9.3; 14.9.4; 14.9.6	14.9.1; 14.9.2; 14.9.5; 14.9.7
<b>35S</b>	19	19.1	19.2; 19.3; 19.4; 19.5
<b>35S</b>	21	21.3	21.1; 21.2; 21.4; 21.5; 21.6
<b>35S</b>	25	25.2	25.1; 25.3; 25.4; 25.5; 25.6; 25.7; 25.8

## 5.6. Southern blot

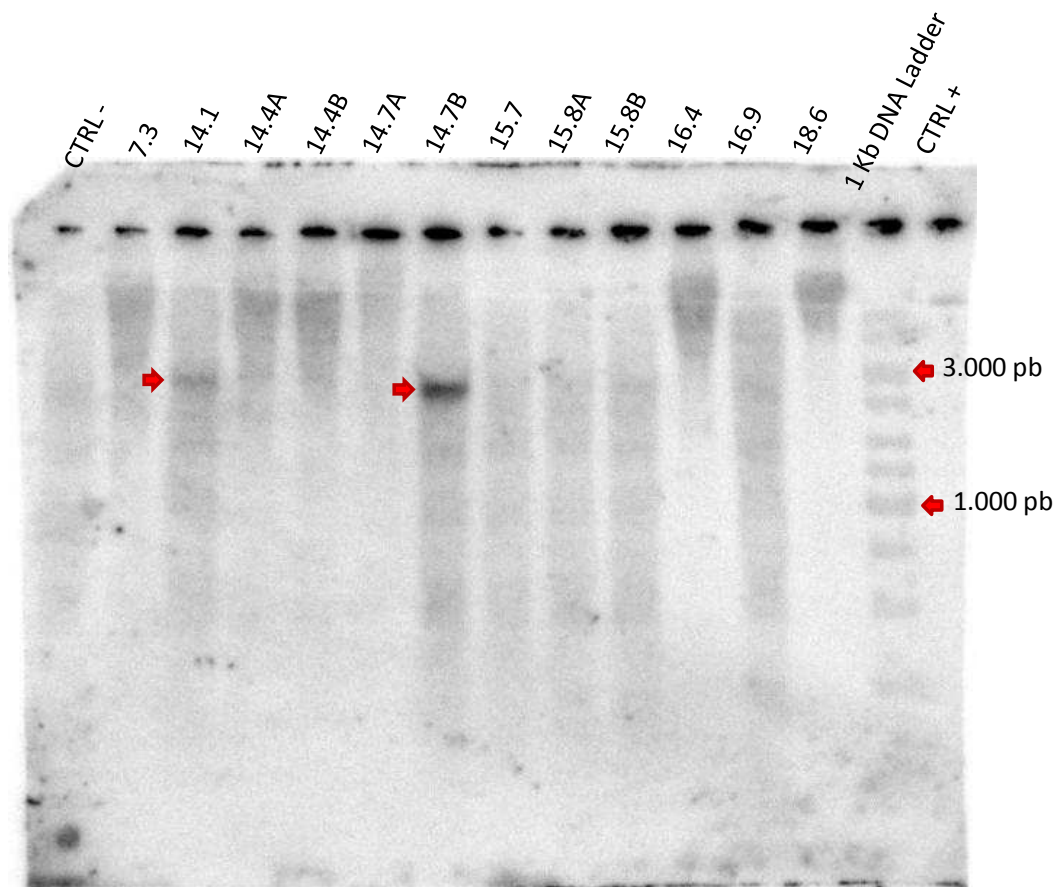
A enzima escolhida para digestão do DNA genômico das plantas de alface foi a HindIII, que corta ambos os vetores apenas uma vez. Dessa forma, é possível saber não apenas se a planta é transgênica, mas também o número de cópias do gene inseridas no seu genoma. Foi confirmada a integração do HSP60 no genoma das plantas 14 (14.1 e 14.7B), 19, 21 e X, por Southern blot. Foram encontradas 3 bandas na amostra X, o que indica existir 3 cópias do gene integradas no genoma dessa planta (Figura 16). As amostras 19 e 21, por sua vez, apresentam 1 e 4 cópias do gene integradas ao genoma, respectivamente (Figura 17). Ambas as plantas T1 procedentes da T0 14 (14.1 e 14.7B) apresentaram apenas 1 cópia do gene integrada ao genoma (Figura 18).



**Figura 16.** Autorradiografia obtida pela técnica de Southern blot para determinação do número de cópias de T-DNA em plantas T0 transgênicas de *Lactuca sativa*. DNA total das plantas foi digerido com HindIII, e a sonda foi preparada com um fragmento de 656 pb do gene HSP60 humano otimizado para plantas. CTRL + = digestão do vetor pC3300HSP60NUC. CTRL - = digestão de DNA de planta não transgênica de alface.



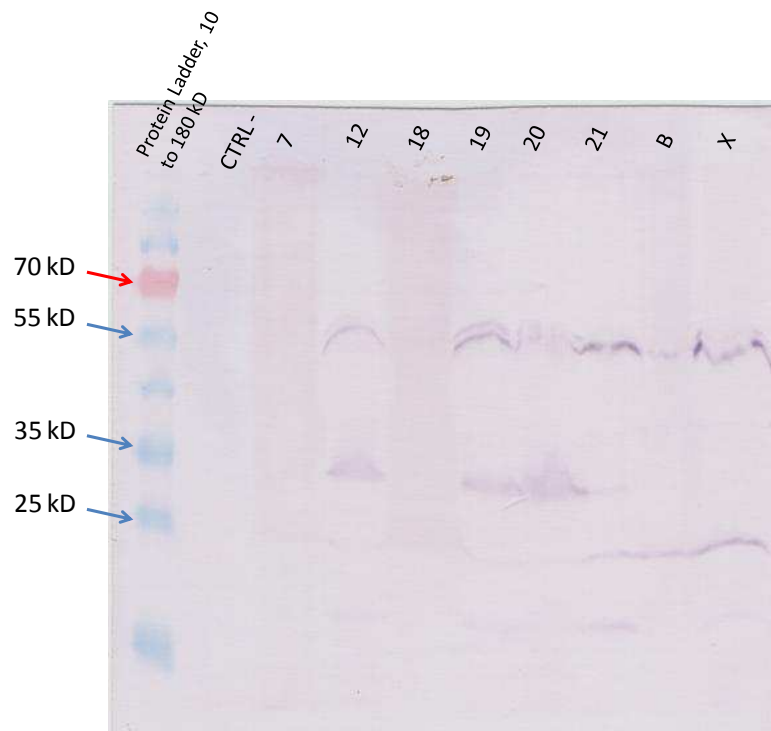
**Figura 17.** Autorradiografia obtida pela técnica de Southern blot para determinação do número de cópias de T-DNA em plantas T0 transgênicas de *Lactuca sativa*. DNA total das plantas foi digerido com HindIII, e a sonda foi preparada com um fragmento de 656 pb do gene HSP60 humano otimizado para plantas. CTRL + = digestão do vetor pC3300HSP60NUC. CTRL - = digestão de DNA de planta não transgênica de alface.



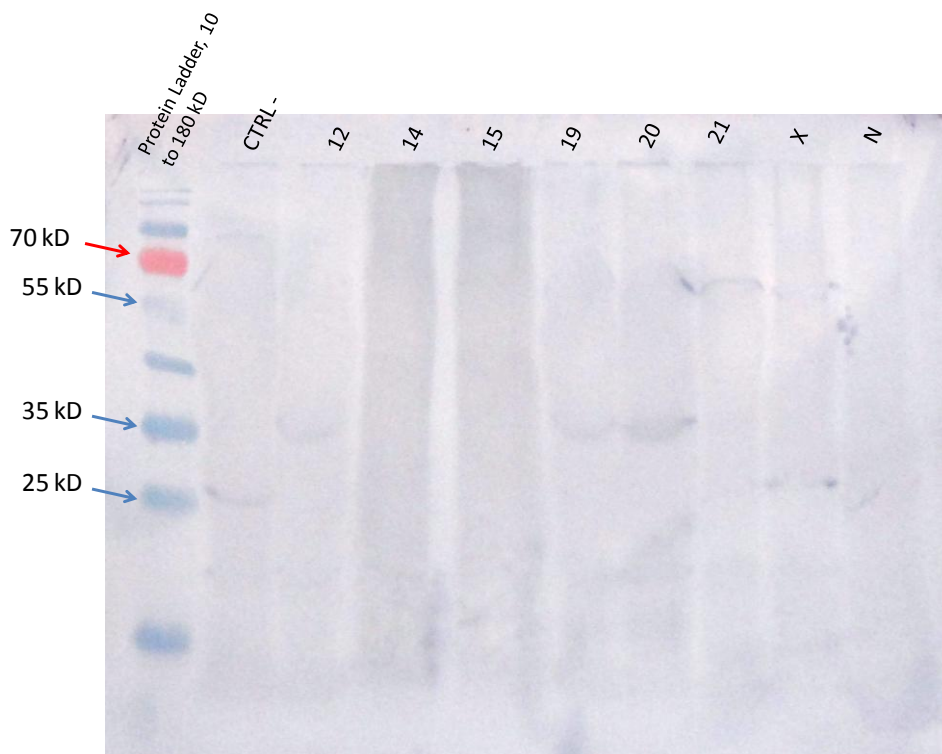
**Figura 18.** Autorradiografia obtida pela técnica de Southern blot para determinação do número de cópias de T-DNA em plantas T1 transgênicas de *Lactuca sativa*. DNA total das plantas foi digerido com HindIII, e a sonda foi preparada com um fragmento de 656 pb do gene HSP60 humano otimizado para plantas. CTRL + = digestão do vetor pC3300HSP60NUC. CTRL - = digestão de DNA de planta não transgênica de alface.

### 5.7. Western blot

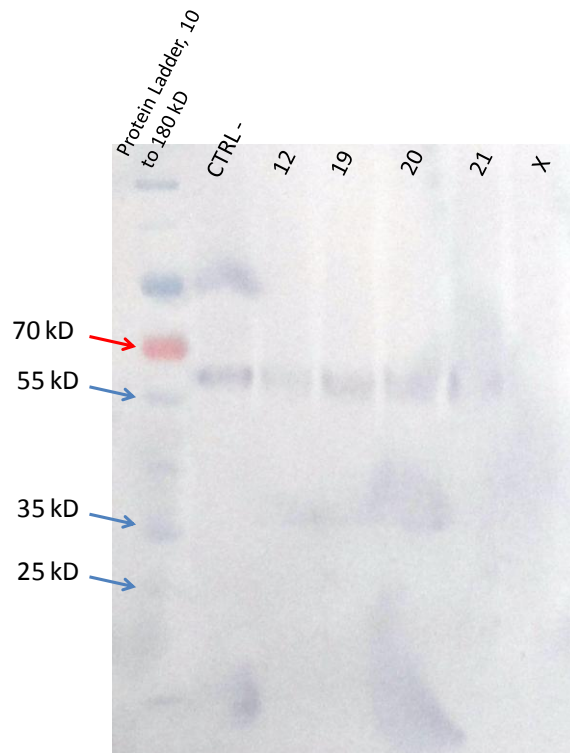
As amostras de proteínas em membranas de Western blot após revelação apresentaram bandas aproximadamente na região esperada, correspondente a 60 kD. Também são observadas bandas de aproximadamente 35, 25 e 20 kD, que podem corresponder a fragmentos da proteína HSP60 degradada durante a extração e precipitação (Figuras 19 e 22). O controle negativo também apresentou bandas em algumas membranas (Figuras 20, 21 e 22), o que indica que o anticorpo não conseguiu distinguir a proteína HSP60 humana da HSP60 vegetal. Entretanto, o controle negativo (plantas não transformadas) geralmente apresentou marcação mais fraca que as amostras que haviam sido confirmadas como transgênicas por Southern blot, o que indica um provável acúmulo de proteínas com cerca de 60 kD nas amostras transformadas (Figura 19).



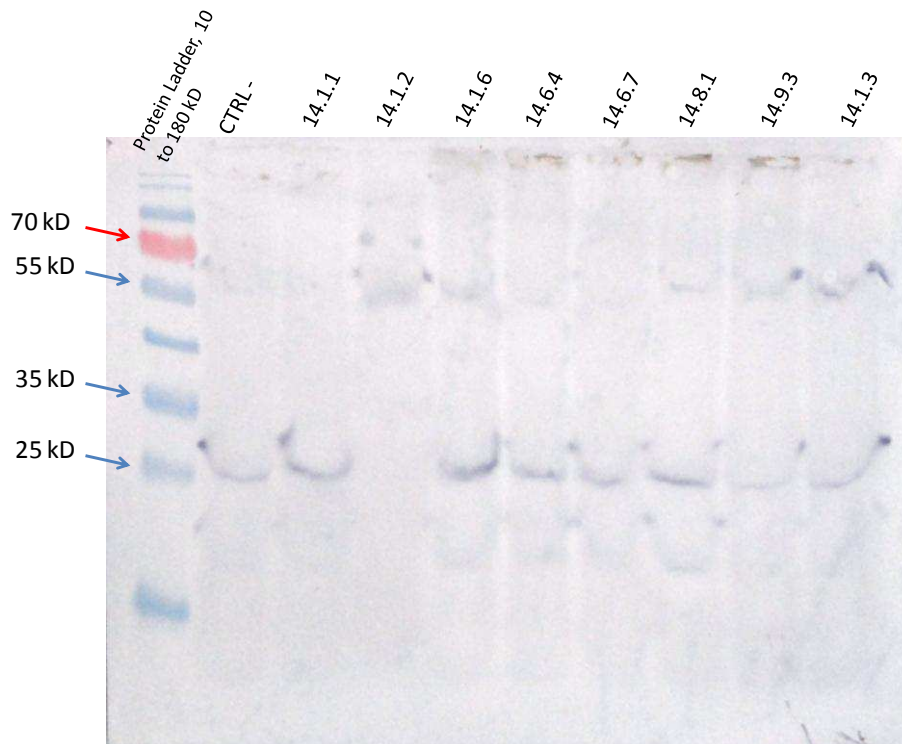
**Figura 19.** Detecção da proteína HSP60 humana em linhagens de plantas transgênicas de alface, pela técnica de Western blot. Membrana de PVDF com as amostras T0 (7, 12, 18, 19, 20, 21, B, X) após revelação com NBT/BCIP.



**Figura 20.** Detecção da proteína HSP60 humana em linhagens de plantas transgênicas de alface, pela técnica de Western blot. Membrana de PVDF com as amostras T0 (12, 14, 15, 19, 20, 21, X, N) após revelação com NBT/BCIP.



**Figura 21.** Detecção da proteína HSP60 humana em linhagens de plantas transgênicas de alface, pela técnica de Western blot. Membrana de PVDF com as amostras T0 (12, 19, 20, 21, X) após revelação com NBT/BCIP.

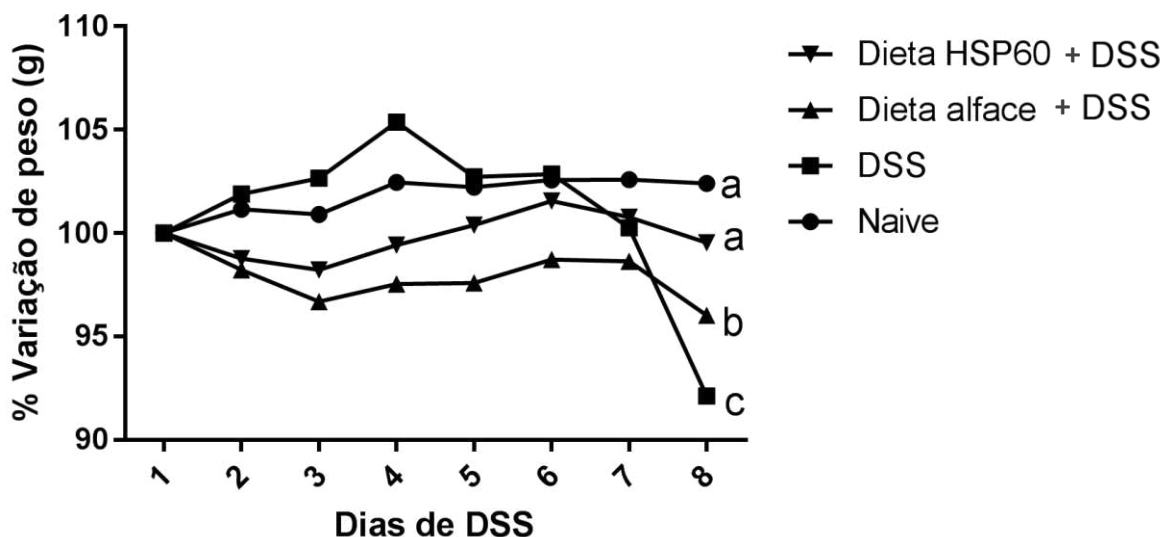


**Figura 22.** Detecção da proteína HSP60 humana em linhagens de plantas transgênicas de alface, pela técnica de Western blot. Membrana de PVDF com as amostras T2 (14.1.1, 14.1.2, 14.1.3, 14.1.6, 14.6.4, 14.6.7, 14.8.1, 14.9.3) após revelação com NBT/BCIP.

## 5.8. Avaliação do peso corporal dos animais

Foram feitos dois bioensaios independentes com camundongos de 9 a 11 semanas, sendo que cada bioensaio demorou 17 dias completos e o sacrifício ocorreu no 18º dia. O peso dos camundongos foi avaliado todos os dias no mesmo horário. Era esperado que os camundongos mantivessem ou ganhassem peso durante os 10 primeiros dias de experimento e perdessem peso, por causa da colite ulcerativa aguda, após o 4º dia de ingestão de DSS, devido a diarreia, perda de sangue e prostração dos animais. O resultado obtido se assemelha ao esperado, porém a perda de peso dos animais aconteceu mais acentuadamente apenas no 7º dia de administração de DSS e último dia do experimento (Figura 23), apesar de apresentarem diarreia e sangue nas fezes a partir do 5º dia.

Ao final dos experimentos, houve diferença significativa entre o grupo Naive (controle negativo) e o grupo DSS (controle positivo), indicando que o tratamento com DSS 2% foi suficiente para gerar inflamação nos animais durante os 7 dias de administração. Não houve diferença entre o grupo Naive e o grupo Dieta HSP60. Porém, este último grupo apresentou diferença quando comparado ao grupo DSS, sugerindo que o tratamento com administração na dieta de alface produtora de HSP60 humana recombinante levou à melhora da colite ulcerativa experimental (Figura 23). Houve diferença entre o grupo DSS e o grupo Dieta alface, que não ingeriu HSP60 recombinante, indicando que a ingestão de alface causa melhora significativa da perda de peso causada pela colite. Também houve diferença entre o grupo Dieta alface e o grupo Dieta HSP60, denunciando que mesmo que exista um efeito causado pela alface sobre a melhora da colite, há também o efeito da proteína recombinante HSP60 humana.

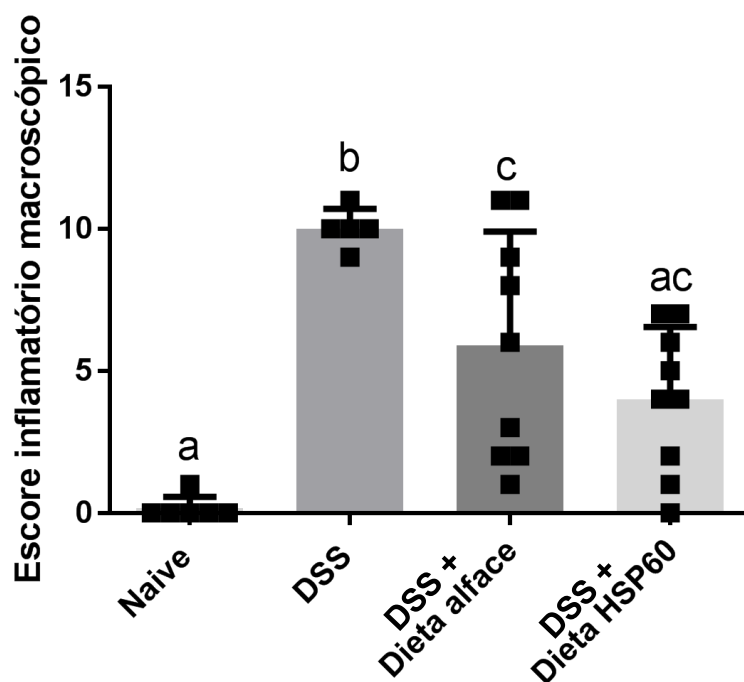


**Figura 23.** Porcentagem de variação do peso corporal dos camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana por via oral misturada à dieta, durante os 7 dias de indução de colite por DSS 2%. Camundongos C57BL/6 foram tratados por 4 dias com alface produtora de HSP60 humana, seguidos de intervalo de 6 dias e indução de colite por DSS 2% por 7 dias. O peso dos animais foi aferido diariamente. O grupo Naive consistiu de animais que não receberam nenhum tratamento. Para análise estatística, os grupos foram comparados entre si em cada tempo experimental.  $n=5$  (Naive e DSS) ou  $9$  (Dieta alface e HSP60). Realizou-se o teste two way ANOVA e a diferença estatística foi representada por letras e apontada com valor  $p < 0,05$ . Valores representam a média  $\pm$  dp (desvio padrão).

### 5.9. Avaliação da gravidade da colite induzida por DSS

O índice macroscópico ou escore clínico inflamatório foi feito considerando os resultados de 3 parâmetros ranqueados (% de perda de peso, diarreia e sangramento). O sangramento e a diarreia foram avaliados após a retirada do cólon no dia do sacrifício. O percentual da perda de peso foi obtido comparando-se os valores do peso do primeiro dia de administração de DSS e do último dia.

Avaliando-se juntamente os dois experimentos, o grupo Naive apresentou escore igual a zero, e o grupo DSS apresentou o maior escore. Observa-se que houve melhora no quadro clínico inflamatório com a ingestão de dieta contendo alface expressando HSP60 humana (Dieta HSP60), pois não houve diferença estatística entre este grupo e o grupo Naive, o controle que não ingeriu DSS e não apresentou colite ulcerativa, mas houve diferença estatística se comparado ao grupo DSS, que não ingeriu alface e apresenta quadro severo de colite. Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo Dieta HSP60 e o grupo Dieta alface, que ingeriu alface não transgênica. Os grupos que ingeriram alface apresentaram-se muito heterogêneos e geraram dados com grande desvio padrão (Figura 24).



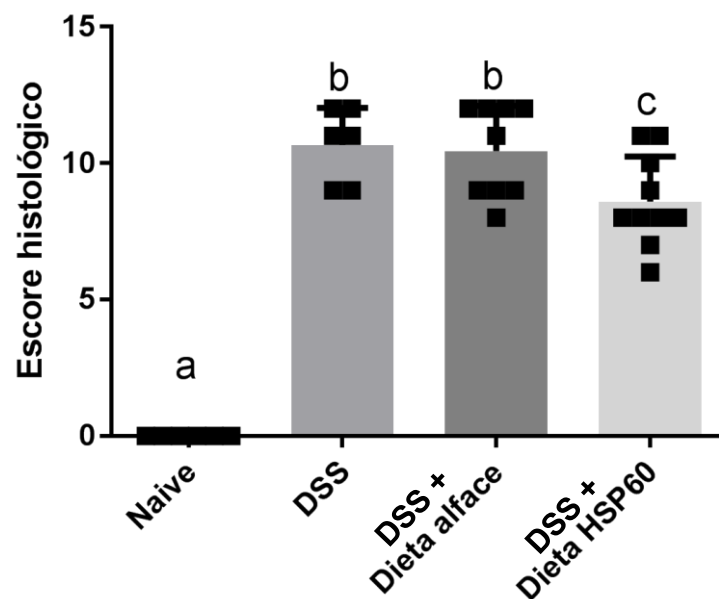
**Figura 24.** Escore inflamatório macroscópico da colite ulcerativa aguda em camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana por via oral misturada à dieta, seguidos de intervalo de 6 dias e indução de colite por DSS 2% por 7 dias. Camundongos C57BL/6 foram sacrificados e submetidos à classificação sintomatológica da doença. O escore total foi obtido a partir da soma dos três parâmetros. O gráfico representa valores de média  $\pm$  desvio padrão  $n=5$  (DSS),  $n=6$  (Naive) ou  $n=9$  (DSS + Dieta alface e DSS + Dieta HSP60). Quadrados pequenos pretos representam os indivíduos. Foi realizado o teste de Tukey e as letras diferentes representam diferenças significativas ( $p<0.05$ ).

### 5.10. Análise histológica da colite

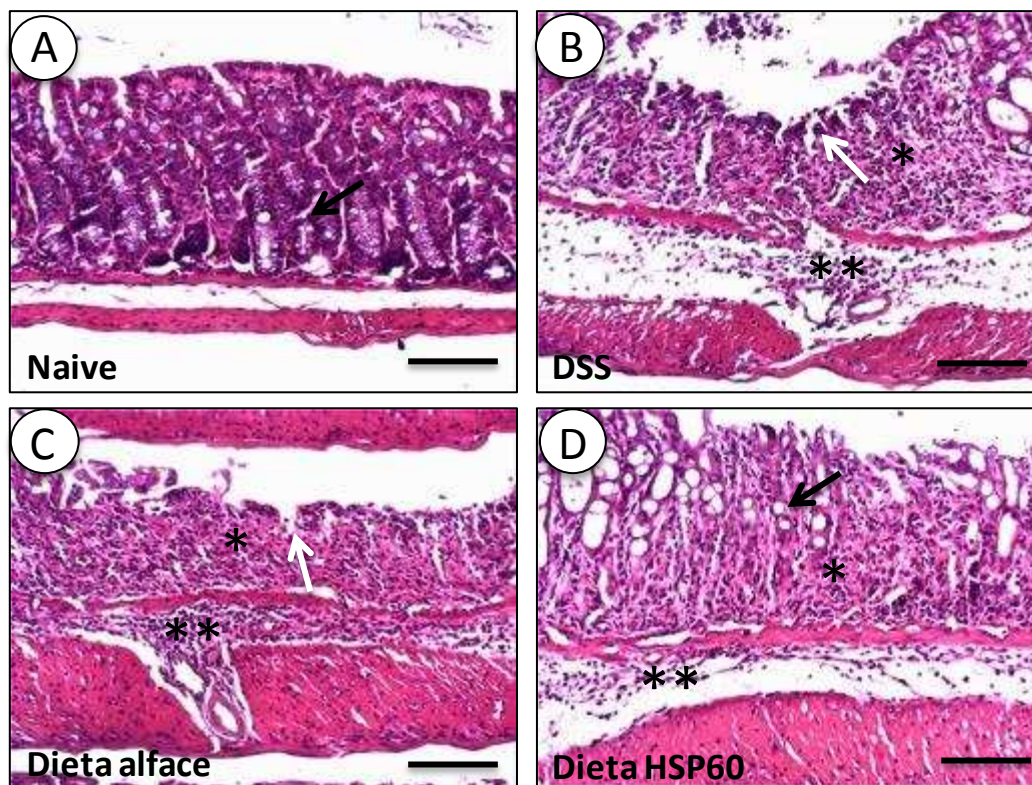
A análise das lâminas permitiu verificar que animais do grupo Naive (controle que não ingeriu alface nem DSS), apresentaram mucosa, submucosa, muscular e serosa dentro dos padrões de normalidade. A ausência de colite pode ser comprovada pelo escore histológico igual a zero, em todos os animais analisados (Figura 25). A mucosa apresenta-se preservada com células caliciformes e ausência de erosão ou ulceração. Não há infiltrado de células inflamatórias que prejudique a arquitetura da mucosa. A submucosa apresenta-se delgada e com ausência de infiltrado inflamatório (Figura 26A).

Já os animais do grupo tratado apenas com DSS apresentaram mucosa e submucosa com intenso infiltrado inflamatório que causou destruição das criptas, tiveram bastante edema principalmente na camada muscular e quase completa perda da estrutura epitelial na mucosa. A mucosa apresenta erosão e ausência grave de células caliciformes. Estas foram substituídas por um intenso infiltrado inflamatório (Figura 26B). Essa análise se comprova no gráfico de escore histológico, no qual os grupos menos inflamados apresentaram menores valores (Figura 25).

Os camundongos tratados com alface não transgênica apresentaram cólon com mucosa e submucosa comprometidas, no mesmo grau que a do grupo DSS (Figura 26C). Esses dois grupos também apresentaram escore histológico semelhante estatisticamente (Figura 25). Já os camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana recombinante apresentaram cólon com mucosa e submucosa comprometidas, entretanto o comprometimento mostra-se menor. São notadas áreas de preservação da parte superior da mucosa, onde aparecem células caliciformes. O infiltrado na região da submucosa também mostrou-se drasticamente reduzido (Figura 26D).



**Figura 25.** Escore histológico da colite ulcerativa aguda em camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana por via oral misturada à dieta, seguidos de intervalo de 6 dias e indução de colite por DSS 2% por 7 dias. Ao final do sétimo dia, os animais foram sacrificados e o cólon foi coletado para preparo das lâminas de histologia. As lâminas foram coradas com HE e a morfologia da mucosa foi avaliada. O escore histológico foi obtido a partir da avaliação qualitativa global da histologia. A análise do escore leva em consideração a depleção de células caliciformes, grau de erosão/ulceração, presença de infiltrado inflamatório da mucosa e da submucosa, presença de abscesso e úlcera. Foi dado um escore de 0 a 3 para cada parâmetro analisado. O escore total foi obtido a partir da soma dos três parâmetros. Valores representam a média ± dp, n= 6 (Naive e DSS) ou n= 9 (DSS + Dieta alface e DSS + Dieta HSP60). A significância estatística foi medida por teste de Tukey e apontada por letras diferentes com valor  $p < 0,05$ .



**Figura 26.** Representação da avaliação histológica da mucosa do cólon em camundongos tratados com alface produtora de HSP60 humana por via oral misturada à dieta, seguidos de intervalo de 6 dias e indução de colite por DSS 2% por 7 dias. Ao final do sétimo dia, os animais foram sacrificados e o cólon foi coletado para preparo das lâminas de histologia. As lâminas foram coradas com HE e a morfologia da mucosa foi avaliada. **A.** Cólon de camundongo não submetido à ingestão de DSS e que apresenta aparência fisiológica normal e não patológica. **B.** Cólon de camundongo que ingeriu DSS e apresenta sinais histológicos de colite. **C.** Cólon de camundongo de ingeriu alface e DSS, apresentando colite. **D.** Cólon de camundongo que ingeriu alface produtora de HSP60 humana, que apresenta menor comprometimento pela colite, com diminuição do infiltrado inflamatório e aumento do número de células caliciformes. Setas pretas apontam para as células caliciformes. Setas brancas apontam para áreas de erosão e os asteriscos marcam o infiltrado de células inflamatórias na mucosa (um asterisco) e submucosa (dois asteriscos). Barra = 100  $\mu$ m.

## 6 - DISCUSSÃO

Inicialmente, construímos o vetor de expressão para transformação nuclear de alface (pC3300HSP60NUC), contendo a sequência otimizada do gene para expressão da proteína HSP60 humana em plantas, regido pelo promotor constitutivo CaMV35S, do vírus do mosaico-dourado da couve flor. Este promotor é amplamente utilizado como ferramenta para expressão de proteínas em várias espécies de plantas, porém apresenta diferentes níveis de expressão dependendo da espécie (Saidi et al., 2009). Logo após, foi publicado um artigo que mostrou o silenciamento do promotor CaMV35S em plantas de alface T0, pela metilação de uma sequência específica. Os sítios CpG e CpWpG (onde W é A ou T) do promotor CaMV35S foram hipermetilados em 9 de 10 linhagens transgênicas. A frequência de citosinas metiladas variou de 54,2 a 92,3% em alface, exceto por uma linhagem (#23), que mostrou baixa frequência 2,1% (Okumura et al., 2016).

Por causa disso, o vetor de expressão foi sintetizado novamente, dessa vez contendo o promotor do gene da bomba de prótons vacuolar  $H^+$ -pirofosfatase 1 de *Solanum lycopersicum* (Slvp1). O gene VP1 faz parte da família de genes de bombas de prótons  $H^+$ -pirofosfatase, chamada de V-PPase. Juntamente com a família V-ATPase, são as duas maiores famílias de bombas de prótons eletrogênicas da membrana vacuolar de plantas. Essas bombas acidificam os vacúolos e geram um gradiente eletroquímico na célula vegetal, que permite o transporte secundário ativo de íons inorgânicos, açúcares e ácidos orgânicos. As proteínas V-PPase consistem em um único polipeptídeo e estão presente na maioria das plantas terrestres, algumas algas, protozoários, bactérias e archeobactérias (Mohammed et al., 2012). O gene Slvp1 possui expressão constitutiva, exceto em frutos maduros (Mohammed et al., 2012), e resultados obtidos no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG), mostraram que o promotor Slvp1 é funcional em todas as células, durante o desenvolvimento de plantas de alface transformadas com esse promotor (dados não publicados).

Possivelmente, mais de 25% das proteínas codificadas pelo genoma nuclear de eucariotos multicelulares são direcionadas a organelas com membranas por uma sequência sinal de direcionamento. Quase todas as proteínas solúveis e muitas proteínas da membrana são direcionadas para a via de secreção pelo retículo endoplasmático, as mitocôndrias ou os cloroplastos através de sequências N-terminais (pré-sequências), que geralmente são clivadas após a entrada na organela. Como a transferência destas pré-sequências para outros polipeptídeos não relacionados geralmente leva ao direcionamento da proteína produzida para

a organela correta, essa sequência deve conter todas as informações de direcionamento necessárias e, portanto, deve ser identificável (Small et al., 2004). Assim, outro problema que supostamente poderia acontecer, seria que a existência de dois peptídeos sinais na proteína (o de direcionamento à mitocôndria, já presente no gene HSP60 humano, e o de direcionamento ao retículo endoplasmático, que foi adicionado) poderia gerar confusão à maquinaria celular no momento da tradução e, assim, originar uma proteína truncada ou impedir a formação da proteína. Dessa forma, no novo vetor de expressão também foi adicionada sequência otimizada do gene para expressão da proteína HSP60 humana em plantas, sem a sequência de endereçamento à mitocôndria, presente nos 75 primeiros pares de bases nitrogenadas do gene humano. Este novo vetor chamamos de pC3300HSP60NUC Slvp1.

No entanto, observando os resultados deste trabalho, a presença de duas sequências de direcionamento não interferiu na viabilidade da tradução da proteína nas plantas transformadas com o vetor de expressão pC3300HSP60NUC. De fato, já foi relatado em diversas espécies de plantas, como *A. thaliana*, *Glycine max* e *Pisum sativum*, a existência de duas sequências de direcionamento para duas organelas diferentes na mesma proteína, no caso das enzimas envolvidas no ciclo da ascorbato-glutationa (ascorbato peroxidase, monodehidroascorbato redutase e glutatona redutase). Essas enzimas possuem sequências de direcionamento ao cloroplasto e à mitocôndria, para possibilitar que exerçam a função de desintoxicação de  $H_2O_2$  da célula vegetal de forma eficiente. Os níveis de transcrição mostraram que esses genes são induzidos por estresses químicos oxidativos em cloroplastos e/ou mitocôndrias e são elevados durante a fotossíntese realizada em presença de luz (Chew et al., 2003). Pensamos que possivelmente, a maquinaria da célula reconheceu apenas a primeira sequência, que direcionava a proteína ao retículo endoplasmático, e procedeu a tradução normalmente, sem prejuízo para a proteína recém-sintetizada. Dessa forma, esta proteína teria ficado ancorada na membrana plasmática do retículo, devido à presença da sequência KDEL de retenção por ancoramento à membrana do retículo (Napier et al., 1992; Okamoto et al., 2003).

Inesperadamente, a transformação de alface com o vetor de expressão pC3300HSP60NUC Slvp1 foi mais demorada e difícil, como se pode observar pela menor porcentagem de brotação (Tabela 7), e conseqüentemente, organogênese em todos os eventos independentes, exceto o primeiro. Apesar do esforço em aumentar o número de eventos de transformação e de explantes por evento, e assim, obter número semelhante de explantes regenerados que apresentaram brotações de parte aérea, não foram aclimatadas a mesma proporção de plantas, nem foi confirmada a transgenia de muitas plantas transformadas com

esse vetor (apenas a linhagem X). Apesar de a expressão gênica ser regulada pelo promotor CaMV35S e a proteína conter duas sequências de direcionamento, as transformações com o vetor de expressão pC3300HSP60NUC foram bem sucedidas.

A confirmação da presença do gene no genoma nuclear das plantas de alface foi feita utilizando duas técnicas diferentes. Uma delas foi a PCR, com um par de iniciadores específicos para a sequência do gene HSP60, além de utilizar mais dois pares de iniciadores específicos para genes de resistência (nptI e Bar) existentes no T-DNA inserido no genoma. Também foi utilizada a técnica de Southern blot, que permite detectar fragmentos de DNA específicos em amostras de DNA genômicos. Esta técnica é considerada uma prova molecular da integração de genes exógenos no genoma vegetal. Ela pode ser utilizada não somente para detectar a presença ou ausência do gene, mas também o número de cópias que foi inserido no genoma vegetal. A técnica da PCR tem alta sensibilidade, o que pode levar a falsos positivos, por possibilitar a amplificação de quantidades mínimas de DNA contaminante contendo o gene analisado e, dessa forma, é menos confiável que o Southern blot (Brasileiro e Carneiro, 2015). Apesar da PCR não ser tão confiável quanto o Southern blot, as reações feitas utilizando os iniciadores desenhados especificamente para o gene HSP60 mostraram-se condizentes com os dados encontrados nas membranas de Southern blot, e os dois resultados foram complementares. Assim, temos certeza da transgenia das plantas T0 (14, 19, 21 e X), e de alguns exemplares de T1 (14.1 e 14.7B). Concluimos, então, que o gene inserido pode ser herdado com eficiência, e que a técnica de PCR é uma boa ferramenta para ser utilizada na triagem de plantas transgênicas para serem utilizadas nos bioensaios.

Em análise de alinhamento entre a sequência de aminoácidos da proteína HSP60 humana otimizada para plantas (Figura 2) e a sequência da proteína HSP60 vegetal (Figura 27), foi encontrado 325/551(59%) de identidade, 429/551(77%) de positivos e 5/551(0%) de gaps (Figura 28). Esses valores mostram alta similaridade entre as duas sequências e elevada probabilidade de reconhecimento indiscriminado das duas proteínas pelo anticorpo policlonal para HSP60 humana.

MYRFASNLASKARIAQNARQVSSRMSWSRNYAAKEIKFGEVEARALMLKGVEDLADAVKVTMG  
 PKGRNVVIEQSWGAPKVTKDGVTVAKSIEFKDKIKNVGASLVKQVANATNDVAGDGTTCATV  
 LTRAIFAEGCKSVAAGMNMAMD LRRGISMAVDVAVTNLKS KARMISTSEEIAQVGTISANGER  
 EIGELIAKAMEKVGKEGVITIQDGKTLFNELEVVEGMKLD RGYTSPYFITNQKTQKCELD DP  
 LILIHKKISSINSIVKVLLELALKRQRPLLVSE DVESDALATLILNKL RAGIKVCAIKAPG  
 FGENRKANLQDLAALTGGEVITDELGMNLEKVDLSMLGTCKKVTVSKDDTVILDGAGDKKGI  
 EERCEQIRSAIELSTSDYDKEKLQERLAKLSSGGVAVLKI GGASEAEVGEKKDRVTDALNATK  
 AAVEEGILPGGGVALLYAARELEKLP TANFDQKIGVQIIQNALKTPVYTIASNAGVEGAVIV  
 GKLEQDNPDLYDAAKGEYVDMVKAGIIDPLK VIRTUALVDAASVSSLLTTTEAVVVDLPKD  
 ESESGAAGAGMGMGMDY

**Figura 27.** A sequência da proteína HSP60 de *A. thaliana* encontrada no NCBI, sob o número de referência NP\_189041.1 heat shock protein 60 [*Arabidopsis thaliana*].

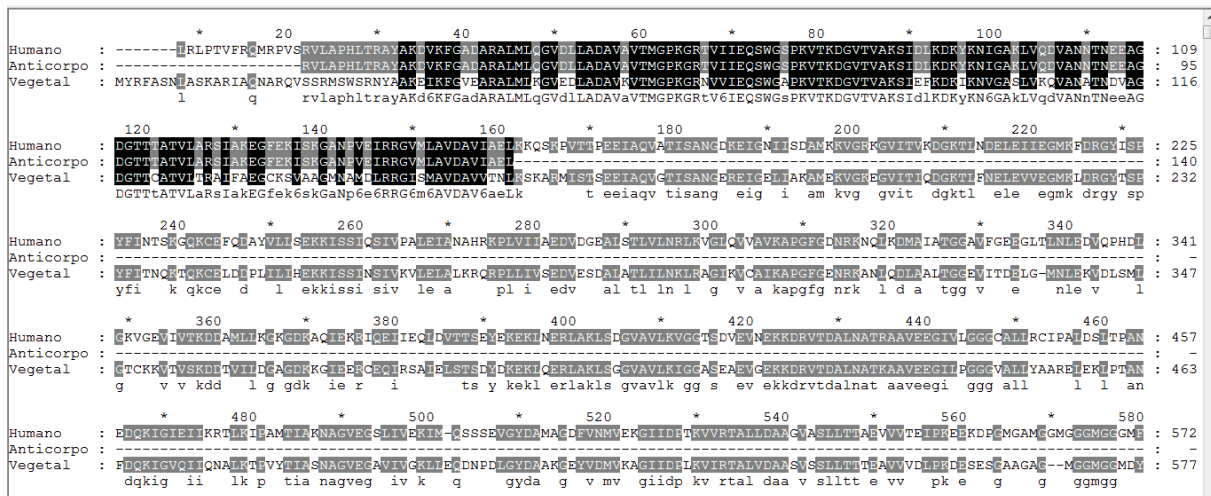


**Figura 28.** Alinhamento entre sequência de aminoácidos da proteína HSP60 humana otimizada para plantas e da sequência da HSP60 de *A. thaliana*, mostrando 325/551(59%) de identidade, 429/551(77%) de positivos e 5/551(0%) de gaps. Regiões em preto marcam os aminoácidos idênticos que existem em ambas as proteínas.

À luz disso, tentou-se fazer um protocolo mais restrigente para que apenas a HSP60 humana fosse reconhecida pelo anticorpo. A concentração do anticorpo primário anti-HSP60 humano utilizada (1:550) foi cerca de metade da recomendada pelo fabricante para Western blot (1:250). A membrana foi bloqueada por longo período, overnight por pelo menos 16 h, com alta concentração de leite em pó desnatado 5%. Essa concentração de leite em pó foi mantida em todas as etapas do blotting, ao invés de diminuir para 1%, como é o protocolo mais usado (Brasileiro e Carneiro, 2015).

O reconhecimento da proteína HSP60 humana pelo anticorpo policlonal acontece pelo reconhecimento de sequência específica de aminoácidos. Essa sequência imunogênica foi especificada pelo fabricante do anticorpo (Sigma) como: RVLAPHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIIIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAGDGTTTATVLARSIAKE

GFEEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAEL. Tal sequência possui alta similaridade com ambas as proteínas (Figura 29).



**Figura 29.** Alinhamento entre sequência de aminoácidos da proteína HSP60 humana otimizada para plantas, da sequência da HSP60 de *A. thaliana*, e da sequência imunogênica reconhecida pelo anticorpo. Regiões em preto marcam os aminoácidos idênticos que existem nas três sequências.

A partir das análises dos alinhamentos entre essas sequências proteicas, concluímos que a confirmação precisa da tradução da proteína HSP60 humana nos tecidos vegetais não foi possível de ser realizada com eficiência pela técnica de Western blot, pois a sequência de aminoácidos da proteína humana e da vegetal são muito semelhantes. Dessa forma, o anticorpo policlonal anti HSP60 humano, interage semelhantemente com as duas proteínas.

Uma forma simples e eficiente de resolver este problema seria ter adicionado uma sequência de aminoácidos à extremidade C ou N-terminal para diferenciar as duas proteínas. Uma boa opção seria adicionar seis resíduos de histidina à extremidade C-terminal da proteína (cauda His<sup>6</sup> tag ou de polihistidina). A cadeia de resíduos de histidina tem a capacidade de ligar-se a vários tipos de íons imóveis, como níquel, cobalto e cobre, e por isso, pode ser usada para detecção e purificação de proteínas marcadas com a cauda de polihistidina (Terpe, 2003). Devido ao seu tamanho relativamente pequeno, baixa imunogenicidade, natureza hidrofílica, e a existência de anticorpos comerciais específicos para detecção da cauda de polihistidina, atualmente esta é uma técnica muito utilizada para identificação de proteínas por Western blot (Debeljak et al., 2006). Se tivesse sido adicionada uma cauda de polihistidina, poderíamos não apenas distinguir a proteína HSP60 animal da proteína homóloga vegetal por Western blot, mas também purificar a proteína recombinante e realizar uma quantificação precisa da produção da HSP60 humana pela alface.

No entanto, a confirmação da existência da proteína recombinante nos tecidos vegetais pode ser dada pela melhora nos índices clínicos e histológicos da colite em camundongos que se alimentaram com alface recombinante expressando HSP60 humana e DSS, em relação aos controles, que se alimentaram de alface não transgênica e DSS ou apenas de DSS. Confirmando, assim, que a linhagem 14, transformada com o vetor de expressão pC3300HSP60NUC com o promotor CaMV35S e utilizada nos bioensaios, não apresentou silenciamento do transgene inserido.

Doenças inflamatórias intestinais, que incluem a doença de Crohn e a colite ulcerativa, são desordens crônicas que afetam milhares de pessoas no mundo todo. Elas são caracterizadas por inflamação intestinal descontrolada, que leva à má da qualidade de vida das pessoas afetadas, causando, por exemplo, dores abdominais, diarreia e perda de peso. Apesar da causa exata dessas doenças ainda ser desconhecida, as evidências sugerem que as interações entre a desregulação imune, fatores ambientais e polimorfismos genéticos contribuem para a natureza multifatorial da doença (Basso et al., 2014).

O modelo de colite ulcerativa induzida por DSS é caracterizado por alterações clínicas, como diarreia, sangramento retal forte, perda de peso; e alterações morfológicas e celulares, como erosões, displasia, encurtamento do intestino grosso, formação de folículos linfoides, aumento da permeabilidade intestinal, produção de linfócitos e de citocinas inflamatórias (Okayasu et al., 1990). A mucosa afetada pela colite ulcerativa é o cólon do intestino grosso, especialmente a região do cólon distal, que é mais próxima ao reto. Dentre os modelos murinos de colite quimicamente induzida, o modelo de indução por DSS é amplamente utilizado pela sua simplicidade, rapidez, alta reprodutibilidade e sua alta similaridade com a colite ulcerativa humana. Inclusive por induzir mudanças histológicas, como aumento do infiltrado celular, erosão epitelial, ulceração, edema e depleção de células caliciformes. Um dos parâmetros clínicos relevantes na colite é a perda de peso, que ocorre a partir do 3º ou 4º dia de administração de DSS (Chassaing et al., 2014). O DSS é um polissacarídeo sulfatado negativamente carregado e solúvel em água. Seu peso molecular é variável de 5 a 1.400 kDa. A colite murina mais severa, que mais se aproxima da colite ulcerativa humana, resulta da administração de DSS entre 40 e 50 kDa em água de beber (Okayasu et al., 1990).

Os resultados encontrados nos experimentos deste trabalho mostram que os camundongos tratados com DSS 2% apresentaram os sintomas característicos de colite ulcerativa induzida por DSS, como esperado. Houve retardo no tempo para haver redução do peso dos camundongos, que ocorreu apenas no 7º dia de consumo de DSS. Essa demora em

perder peso, pode ser devido à composição do DSS administrado, pois cada lote é diferente, mesmo que seja produzido pela mesma empresa química (Chassaing et al., 2014). Apesar de ter demorado um pouco mais, houve perda de peso em todos os grupos que ingeriram DSS e não houve perda de peso nos camundongos do grupo Naive. A média de perda de peso do grupo DSS foi de 7,87%; do grupo DSS + Dieta alface foi de 4,90%; e do grupo DSS + Dieta HSP60 foi de 1,69%. Essa é uma evidência que houve melhora do quadro clínico de colite pela ingestão apenas de alface e uma melhora ainda mais significativa pela ingestão de alface produtora de HSP60 humana recombinante. O grupo Dieta HSP60, inclusive, apresentou perda de peso tão baixa, que foi semelhante estatisticamente ao grupo Naive, que não ingeriu DSS.

Quando se analisou a integridade da mucosa do cólon através de escore histológico da doença, percebemos que animais que receberam administração da alface produtora de HSP60 humana recombinante apresentaram arquitetura da mucosa menos afetada pelo DSS, com menor erosão epitelial, redução do infiltrado inflamatório celular e menor edema, além de apresentarem manutenção parcial das células caliciformes, e não a depleção, como encontrado nos outros grupos que ingeriram DSS. Rezende e colaboradores (2012) também encontraram resultado semelhante no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE). Os camundongos que foram pré-tratados com HSP65 de *Mycobacterium*, produzido e secretado por *Lactococcus lactis*, e após 10 dias, submetidos à indução de EAE, apresentaram melhora no escore clínico e histológico. A inibição da EAE foi associada à presença de citocinas anti-inflamatórias nos gânglios linfáticos e no baço, e um aumento das células Treg nos órgãos linfoides periféricos, bem como na medula espinhal. Os resultados encontrados por Gomes-Santos e colaboradores (2017), também auxiliam no entendimento da atuação do HSP65 na prevenção de doenças inflamatórias. Eles observaram melhora significativa no escore clínico e histológico dos animais previamente tratados com HSP65 de *Mycobacterium*, produzido e secretado por *L. lactis*, no trato gastrointestinal de camundongos, e posteriormente, tratados com DSS 1,5%. O HSP65-LL preveniu completamente a colite induzida por DSS em camundongos. O mecanismo imunomodulatório por meio do qual o HSP65-LL atuou está associado com a indução de células Tregs  $CD4^{+}Foxp3^{+}$  e  $CD4^{+}LAP^{+}$ , via IL-10 e receptor tipo TLR2 (toll-like receptor 2).

As HSPs tem chamado atenção dos imunologistas desde que foi observado que o sistema imune desenvolve respostas rápidas ao aumento de HSPs, sob várias condições de alteração da homeostase, como aumento do estresse oxidativo, aumento de temperatura ou infecção por patógenos. Por causa de sua conservação evolutiva, seu papel na manutenção da

integridade das proteínas celulares e sua indutibilidade sob estresse, as HSPs são estudadas como antígenos imunogênicos com potencial de controlar inflamações (Van Eden et al., 2007). De fato, ocorre aumento na expressão de HSP60 em cólon de pacientes com doenças inflamatórias intestinais, bem como células T reativas à auto-HSP60, foram identificadas nesses indivíduos (Puga Yung et al., 2009). Uma vez que ocorre regulação positiva como parte da resposta inflamatória em doenças intestinais, a indução de células T reativas pela administração oral da HSP60 torna-se uma explicação atraente para o desenvolvimento de Tregs na mucosa, o que levaria à melhora no quadro clínico e histológico observado neste trabalho. Isso implica que a proteína HSP60 humana pode ser um alvo terapêutico para a indução de tolerância imunológica via oral nos casos de doenças em que o auto-antígeno é desconhecido (Gomes-Santos et al., 2017). Para avaliar os mecanismos imonoreguladores induzidos pela proteína HSP60 humana produzida por *Lactuca sativa*, outros testes imunológicos ainda serão feitos, como avaliação de IgA secretória, quantificação de citocinas produzidas em cultura de células extraídas de baço, linfonodos cecal e mesentérico, como IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-6.

Uma vantagem da utilização de um vegetal recombinante para expressão do HSP60 humano seria que este modelo produziria extratos livres de endotoxinas bacterianas, que mesmo em concentrações muito baixas podem influenciar a produção de citocinas e atividade funcional de células imunitárias (Coelho e Faria, 2012). Assim, a possibilidade de utilização de plantas, como a alface, para produção de HSP60 recombinante e sua administração via oral da proteína nativa é uma excelente alternativa para a prevenção de doenças inflamatórias intestinais, e possivelmente, de outras doenças inflamatórias crônicas e autoimunes.

## 7 - CONCLUSÕES GERAIS

Construiu-se e sintetizou-se dois vetores de expressão em plantas contendo o gene HSP60 humano. Ambos os vetores foram utilizados para transformar cotilédones de *Lactuca sativa* a fim de obter linhagens transgênicas independentes expressando a proteína HSP60 humana. A transgenia das plantas positivas foi confirmada por PCR e por Southern blot. Tentamos identificar as proteínas HSP60 produzidas pelas linhagens transformadas por Western Blot. Porém não é possível distinguir a proteína HSP60 humana recombinante da proteína HSP60 produzida pelos próprios tecidos vegetais utilizando esta técnica. Isso ocorreu, pois, a sequência de aminoácidos idênticos entre as duas proteínas na região reconhecida pelo anticorpo é alta e o anticorpo reconhece as duas proteínas igualmente. Entretanto, quando as folhas liofilizadas das plantas T2 da linhagem 14 foram administradas aos camundongos por via oral, misturada à dieta, pudemos observar a prevenção da colite, pela melhora no escore clínico e histológico dos camundongos, quando comparado com os controles, que também ingeriram DSS. Assim, comprovamos a existência da proteína HSP60 humana recombinante nas folhas dessa linhagem.

Em conclusão, foram produzidas linhagens de *Lactuca sativa* transgênicas com expressão heteróloga da proteína HSP60 humana em suas folhas, que não apresentaram alterações morfológicas macroscópicas e são viáveis para cultivo. Elas podem ser utilizadas, in natura ou liofilizadas, e administradas via oral para a prevenção de colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos, e possivelmente, também para prevenção e tratamento de outros tipos de doenças inflamatórias ou autoimunes.

## REFERÊNCIAS

- Alanen HI, Raykhel IB, Luukas MJ, Salo KEH, Ruddock LW. 2011. Beyond KDEL: The role of positions 5 and 6 in determining ER localization. *Journal of Molecular Biology* 409: 291-297.
- Apuya NR, Yadegari R, Fischer RL, Harada JJ, Zimmerman JL, Goldberg RB. 2001. The *Arabidopsis* embryo mutant schlepperless has a defect in the chaperonin-60 $\alpha$  gene. *Plant Physiology* 126: 717-730.
- Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole AM, Oishi KK, et al. 2007. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- $\alpha$ 2b. *Plant Biotechnology Journal* 5: 511-525.
- Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM. 1986. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology* 6: 347-357.
- Basso PJ, Fonseca MT, Bonfá G, Alves VB, Sales-Campos H, Nardini V, Cardoso CR. 2014. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 47(9): 727-737.
- Blais DR, Altosaar I. 2006. Human CD14 Expressed in seeds of transgenic tobacco displays similar proteolytic resistance and bioactivity with its mammalian-produced counterpart. *Transgenic Research* 15: 151-64.
- Boston RS, Viitanen PVE. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology* 32: 191-222.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brasileiro ACM, Carneiro VTC (2<sup>a</sup> eds). 2015. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN. 453 p.
- Bukau BJ, Weissman J, Horwich A. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125(3): 443-451.
- Cappello F, Conway de Macario E, Marasà L, Zummo G, Macario AJ. 2008. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biology & Therapy* 7(6): 801-809.
- Chandra D, Choy G, Tang DG. 2007. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *The Journal of Biological Chemistry* 282(43): 31289-31301.
- Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology* 4(104): 15-25.

Chen Q, Lai H. 2015. Gene delivery into plant cells for recombinant protein production. *BioMed Research International Article ID 932161*, 10 pages.

Chew O, Whelan J, Millar AH. 2003. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 278(47): 46869-46877.

Choi J, Diao H, Feng Z-C, Lau A, Wang R, Jevnikar AM, Ma S. 2014. A fusion protein derived from plants holds promising potential as a new oral therapy for type 2 diabetes. *Plant Biotechnology Journal* 12: 425-435.

Christensen JH, Nielsen MN, Hansen J, Füchtbauer A, Füchtbauer E-M, West M, Corydon TJ, Gregersen N, Bross P. 2010. Inactivation of the hereditary spastic paraplegia-associated Hspd1 gene encoding the Hsp60 chaperone results in early embryonic lethality in mice. *Cell Stress and Chaperones* 15: 851-863.

Coelho V, Faria AMC. 2012. HSP60: issues and insights on its therapeutic use as an immunoregulatory agent. *Frontiers in Immunology* 2:1-6.

Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* 6: 219-226.

Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Johnson E, Wardle TD, Andrew SM, Williams JH. 2006. Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. *Clinical and Experimental Immunology* 145(1): 183-189.

De Muynck B, Navarre C, Boutry M. 2010. Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnology Journal* 8: 529-563.

De Vries IM. 1997. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 165-174.

Debeljak N, Feldman L, Davis KL, Komel R, Sytkowski AJ. 2006. Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. *Analytical Biochemistry* 359(2): 216-223.

Deepa K, Rodionov RN, Weiss N, Parani M. 2013. Transgenic expression and functional characterization of human platelet derived growth factor BB (hPDGF-BB) in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171: 1390-1404.

Desai P, Shrivastava N, Padh H. 2010. Production of heterologous protein in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances* 28: 427-435.

Dieudé M, Sénécal JL, Raymond Y. 2004. Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis & Rheumatism* 50(10): 3221-3231.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.

Egelkrout E, Rajan V, Howard JA. 2012. Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Science* 184: 83-101.

- Faria AM, Weiner HL. 2006. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical and Developmental Immunology* 13(2-4): 143-157.
- Faria AMC, Weiner HL. 2005. Oral Tolerance. *Immunological Reviews* 206: 232-259.
- Faria AMC, Reis BS, Mucida D. 2017. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. *The Journal of Experimental Medicine* 214(5): 1211-1226.
- Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J. 2007. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology* 355: 9-14.
- Feng H, Zeng Y, Graner MW, Katsanis E. 2002. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* 100(12): 4108-4115.
- Flammer JR, Rogatsky I. 2011. Minireview: glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Molecular Endocrinology* 25(7): 1075-1086.
- Gomes-Santos AC, de Oliveira RP, Moreira TG, Castro-Junior AB, Horta BC, Lemos L, de Almeida LA4, Rezende RM, Cara DC, Oliveira SC, Azevedo VA, Miyoshi A, Faria AM. 2017. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents inflammatory intestinal disease in mice by IL-10- and TLR2-dependent pathways. *Frontiers in Immunology* 8: 30.
- Granja C, Moliterno RA, Ferreira MS, Fonseca JA, Kalil J, Coelho V. 2004. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. *Human Immunology* 65: 124-134.
- Gunn KS, Singh N, Giambrone J, Wu H. 2012. Using transgenic plants as bioreactors to produce edible vaccines. *Journal of Biotechnology Research* 4: 92-99.
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra R, Chowdhuri DK. 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences* 86: 377-384.
- Habich C, Burkat V. 2007. Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(6): 742-751.
- Hansen J, Svenstrup K, Ang D, Nielsen MN, Christensen JH, Gregersen N, Nielsen JE, Georgopoulos C, Bross P. 2007. A novel mutation in the HSPD1 gene in a patient with hereditary spastic paraplegia. *Journal of Neurology* 254(7): 897-900.
- Herzog RW, Nichols TC, Su J, Zhang B, Sherman A, Merricks EP, Raymer R, Perrin GQ, Häger M, Wiinberg B, Daniell H. 2017. Oral tolerance induction in hemophilia B dogs fed with transplastomic lettuce. *Molecular Therapy* 25(2): 512-522.
- Ishikawa A, Tanaka H, Nakai M, Asahi T. 2003. Deletion of a chaperonin 60 $\beta$  gene leads to cell death in the *Arabidopsis* lesion initiation 1 mutant. *Plant & Cell Physiology* 44(3): 255-261.
- Jin S, Daniell H. 2015. Engineered chloroplast genome just got smarter. *Trends Plant Science* 20(10): 622-640.
- Kang OW, Kim DK, Choi YA, Park HJ, Tae J, Kang CS, Choi SC, Nah YH, Lee HK, Lee YM. 2006. Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. *International Journal of Molecular Medicine* 18(5): 893-899.

- Karlin S, Brocchieri L. 2000. Heat shock protein 60 sequence comparisons: duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11348-11353.
- Kaufmann SH, V  th U, Thole JE, Van Embden JD, Emmrich F. 1987. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *European Journal of Immunology* 17(3): 351-357.
- Kaufmann SH. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today* 11(4): 129-136.
- Kwon K-C, Daniell H. 2015. Low-cost oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells. *Plant Biotechnology Journal* 13: 1017-1022.
- Kwon KC, Verma D, Singh ND, Herzog R, Daniell H. 2013. Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 782-799.
- Kyewski B, Klein L. 2006. A central role for central tolerance. *Annual Review of Immunology* 24: 571-606.
- Lai H, He J, Engle M, Diamond MS, Chen Q. 2012. Robust production of virus-like particles and monoclonal antibodies with geminiviral replicon vectors in lettuce. *Plant Biotechnology Journal* 10(1): 95-104.
- Lee J, Lee H, Kim J, Lee S, Kim DH, Kim S, Hwang I. 2011. Both the hydrophobicity and a positively charged region flanking the C-terminal region of the transmembrane domain of signal-anchored proteins play critical roles in determining their targeting specificity to the endoplasmic reticulum or endosymbiotic organelles in *Arabidopsis* cells. *The Plant Cell* 23: 1588-1607.
- Levy-Rimler G, Bell RE, Ben-Tal N, Azem A. 2002. Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Letters* 529(1): 1-5.
- Luz JMQ, Guimar  es STMR, Kornd  rfer GH. 2006. Produ  o hidrop  nica de alface em solu  o nutritiva com e sem sil  cio. *Horticultura Brasileira* 24: 295-300.
- Ma J K-C, Drake PMW, Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Review Genetics* 4: 794-805.
- Magen D, Georgopoulos C, Bross P, Ang D, Segev Y, Goldsher D, Nemirovski A, Shahar E, Ravid S, Luder A, Heno B, Gershoni-Baruch R, Skorecki K, Mandel H. 2008. Mitochondrial Hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy. *The American Journal of Human Genetics* 83(1): 30-42.
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 11745-11749.
- Matthews RC, Maresca B, Burnie JP, Cardona A, Carratu L, Conti S, Deepe GS, Florez AM, Franceschelli S, Garcia E, Gargano LS, Kobayashi GS, McEwen JG, Ortiz BL, Oviedo AM, Polonelli L, Ponton J, Restrepo A, Storlazzi A. 1998. Stress proteins in fungal diseases. *Medical Mycology* 36(1): 45-51.

- McCafferty DM, Sihota E, Muscara M, Wallace JL, Sharkey KA, Kubes P. 2000. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 279(1): 90-99.
- McMullin TW and Hallberg RL. 1988. A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli* groEL gene. *Molecular and Cellular Biology* 8(1): 371-380.
- Mohammed SA, Nishio S, Takahashi H, Shiratake K, Ikeda H, Kanahama K, Kanayama Y. 2012. Role of Vacuolar H<sup>+</sup>-inorganic pyrophosphatase in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* 63(15): 5613-5621.
- Mowat AM. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology* 3(4): 331-41.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Napier RM, Fowke LC, Hawes C, Lewis M, Pelham HR. 1992. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 102: 261-271.
- Nielsen K, Cowan NJ. 1998. A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding in vivo. *Molecular Cell* 2(1): 93-99.
- Nisemblat S, Yaniv O, Parnas A, Frolov F, Azem A. 2015. Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(19): 6044-6049.
- Ohse S, Dourado-Neto D, Manfron PA, Santos OS. 2001. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. *Scientia Agricola* 58(1): 181-185.
- Okamoto T, Shimada T, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Minamikawa T. 2003. C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiology* 132(4): 1892-1900.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3): 694-702.
- Okumura A, Shimada A, Yamasaki S, Horino T, Iwata Y, Koizumi N, Nishihara M, Mishiba K. 2016. CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce. *Plant Cell Reports* 35(1): 43-51.
- Oliveira RP, Santiago AF, Ficker SM, Gomes-Santos AC, Faria AM. 2015. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. *Journal of Immunological Methods* 421: 36-43.
- Pabst O, Mowat AM. 2012. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology* 5: 232-239.
- Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. 1999. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones* 4(1): 29-35.

- Prasad TK, Stewart CR. 1992. cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Molecular Biology* 18: 873-885.
- Puga Yung GL, Fidler M, Albani E, Spermon N, Teklenburg G, Newbury R, Schechter N, van den Broek T, Prakken B, Billetta R, Dohil R, Albani S. 2009. Heat shock protein-derived T-cell epitopes contribute to autoimmune inflammation in pediatric Crohn's disease. *PLoS One* 4(11): e7714.
- Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR. 2003. DNA Fragments of the Human 60-kDa Heat Shock Protein (HSP60) Vaccinate Against Adjuvant Arthritis: Identification of a Regulatory HSP60 Peptide. *The Journal of Immunology* 171(7): 3533-3541.
- Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, Iglesias AH, Merbl Y, Izquierdo G, Lucas M, Basso AS, Khoury SJ, Lucchinetti CF, Cohen IR, Weiner HL. 2008. Antigen microarrays identify unique serum auto antibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 18889-18894.
- Quintana FJ, Hagedorn PH, Elizur G, Merbl Y, Domany E, Cohen IR. 2004. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(2): 14615-14621.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. 1993. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76a rodent diet. *The Journal of Nutrition* 123: 1939-1951.
- Rezende RM, Oliveira RP, Medeiros S R, Gomes-Santos AC, Alves AC, Loli FC, Guimarães MAF, Amaral SS, Cunha AP, Weiner HL, Azevedo V, Miyoshi A, Faria AMC. 2012. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Autoimmunity* 40: 45-57.
- Ritossa FM. 1964. Behavior of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of *Drosophila*. *Experimental Cell Research* 36(3): 515-523.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solis AG, Martinez-Gonzalez L, Korban SS. 2010. Expression of an immunogenic T1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague. *Planta* 232: 409-416.
- Ryabova NA, Marchenkov VV, Marchenkova SY, Kotova NV, Semisotnov GV. 2013. Molecular chaperone GroEL/ES: unfolding and refolding processes. *Biochemistry (Moscow)* 78(13): 1405-1414.
- Rybicki EP. 2010. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnology Journal* 8: 620-637.
- Saidi Y, Schaefer DG, Goloubinoff P, Zrýd J-P, Finka A. 2009. The CaMV 35S promoter has a weak expression activity in dark grown tissues of moss *Physcomitrella patens*. *Plant Signaling & Behavior* 4(5): 457-459.
- Sala FC, Costa CP. 2012. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. *Horticultura Brasileira* 30: 187-194.

- Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. 1999. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *The EMBO Journal* 18(8): 2040-2048.
- Sanchez-Campillo M, Bini L, Comanducci M, Raggiaschi R, Marzocchi B, Pallini V, Ratti G. 1999. Identification of immune reactive proteins of *Chlamydia trachomatis* by Western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera. *Electrophoresis* 20(11): 2269-2279.
- Schillberg S, Fischer R, Emans N. 2003. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Science* 60: 433-445.
- Shanmugaraj BM, Ramalingam S. 2014. Plant Expression Platform for the Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering* 1(6): 1-4.
- Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, Van Den Elzen PJM, Hoekema A. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *BioTechnology* 8: 217-221.
- Silva GS, Rezende BLA, Filho ABC, Júnior APB, Martins MIEG, Porto DRQ. 2008. Viabilidade econômica do cultivo da alface crespa em monocultura e em consórcio com pepino. *Ciência Agrotecnica* 32(5): 1516-1523.
- Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C. 2004. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4: 1581-1590.
- Sobczak M, Fabisiak A, Murawska N, Wesołowska E, Wierzbicka P, Wlazłowski M, Wójcikowska M, Zatorski H, Zwolińska M, Fichna J. 2014. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacological Reports* 66(5): 766-775.
- Sood P, Bhattacharya A, Sood A. 2011. Problems and possibilities of monocot transformation. *Biologia Plantarum* 55(1): 1-15.
- Stevens TR, Winrow VR, Blake DR, Rampton DS. 1992. Circulating antibodies to heat-shock protein 60 in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clinical & Experimental Immunology* 90: 271-274.
- Streatfield SJ. 2006. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods* 38: 150-157.
- Su J, Zhu L, Sherman A, Wang X, Lin S, Kamesh A, Norikane JH, Streatfield SJ, Herzog RW, Daniell H. 2015. Low cost industrial production of coagulation factor IX bioencapsulated in lettuce cells for oral tolerance induction in hemophilia B. *Biomaterials* 70: 84-93.
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP. 2007. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* 8: 125.
- Terpe K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 523-533.

- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S. 2010. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances* 28: 214-221.
- Tripp J, Mishra SK. 2009. Functional dissection of the cytosolic chaperone network in tomato mesophyll protoplasts. *Plant, Cell and Environment* 32(2): 123-133.
- Turner JR. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9(11): 799-809.
- Twyman RM, Schillberg S, Fischer R. 2005. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 10: 185-218.
- Tzfira T, Citovsky V. 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 147-154.
- United States Department of Agriculture, USDA. Agricultural research service. national nutrient database for standard reference. Revised may, 2016. Release 28. (Agricultural, Ed.), Kansas City.
- Van Eden W, Van Der Zee R, Prakken B. 2005. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology* 5(4): 318-330.
- Van Eden W, Wick G, Albani S, Cohen I. 2007. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 1113: 217-237.
- Victoria GD, Socorro-Silva A, Volsi EC, Abdallah K, Lima FD, Smith RB, Moyses RA, Zárata-Bladés CR, Michaluart P, Silva CL, Kalil J, Coelho V. 2009. Immune response to vaccination with DNA-hsp65 in a phase I clinical trial with head and neck cancer patient. *Cancer Gene Therapy* 16: 598-608.
- Wand-Wurttenberger A, Schoel B, Ivanyi J, Kaufmann SHE. 1991. Surface expression by mononuclear phagocytes of an epitope shared with mycobacterial heat shock protein 60. *European Journal of Immunology* 21(4): 1089-1092.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9(5): 244-252.
- Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. 2011. Oral tolerance. *Immunological Reviews* 241(1): 241-259.
- Yao J, Weng Y, Dickey A, Wang KY. 2015. Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 28549-28565.
- Yu J, Langridge WH. 2001. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnology* 19: 548-552.
- Zabaleta E, Oropeza A, Assad N, Mandel A, Salermo G, Herrera-Estrella L. 1994. Antisense expression of chaperonin 60b in transgenic tobacco plants leads to abnormal phenotypes and altered distribution of photoassimilates. *The Plant Journal* 6(3): 425-432.

Zhang B, Shanmugaraj B, Daniell H. 2017. Expression and functional evaluation of biopharmaceuticals made in plant chloroplasts. *Current Opinion in Chemical Biology* 38: 17-23.