



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLOGICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

**“EXPRESIÓN DE LA PROTEINA HSP65 DE *Mycobacterium
leprae* EN TABACO Y SU EFECTIVIDAD COMO
TRATAMIENTO ORAL EN RATAS ARTRÍTICAS”**

Tesis que presenta:

M.C. César Rodríguez Narciso

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en la opción de Biología Experimental

Director de tesis:

D.C Rodolfo López Gómez

Co-asesora D.C. Iris Estrada García

Morelia Michoacán.

Agosto 2010

ÍNDICE	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. ATRACT	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
3.1 Las plantas como biorreactores	5
3.2 Cultivo de tejidos vegetales y la ingeniería genética	7
3.3 Sistemas de transformación genética vegetal para expresión de moléculas foráneas	7
3.3.1 Sistemas de transferencia directa de ADN exógeno	7
3.3.2. Sistema de transformación por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	7
3.4. Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	9
3.4.1. Expresión de antígenos en tabaco	9
3.5 Artritis reumatoide	10
3.5.1 Papel de las proteínas HSP en el desarrollo de enfermedades infecciosas.	11
3.5.1.1 Papel de la proteína HSP65 micobacteriana en la artritis reumatoide	13
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVO GENERAL	16
5.1. Objetivos específicos	16
CAPITULO I ARTICULO PUBLICADO	
CAPITULO II RESULTADOS NO PUBLICADOS	
I. INTRODUCCION	17
1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	17
1.2 PCR cuantitativa	17

1.3	RT-PCR en tiempo real	18
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1	Sacrificio y toma de muestras	21
2.2	Extracción de RNA de ganglio poplíteo	21
2.3	Amplificación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por RT-PCR en tiempo real	22
2.3.1	Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR	25
2.3.2	Preparación de los estándares de cDNA	26
2.3.3	Determinación de la concentración inicial de cDNA	26
2.4	Cuantificación relativa (Método Pfaffl)	28
2.5	Análisis estadístico	29
III.	RESULTADOS	30
3.1	Cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real	30
3.1.1	Eficiencia de la amplificación en la PCR cuantitativa	30
3.1.2	Sensibilidad y especificidad de RT-PCR tiempo real	31
3.2	Análisis del nivel de expresión de las citocinas IL-1 β , IL10, TNF- α y β -actina en ganglio de ratas artríticas	34
3.2.1	Análisis de expresión de IL-1 β	35
3.2.2	Análisis de expresión de TNF- α	38
3.2.3	Análisis de expresión de IL-10	38
IV.	DISCUSIÓN	42

V.	CONCLUSIONES	50
VI.	BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE CUADROS	PÁGINAS
Cuadro 1 Expresión de proteínas farmacéuticas en cloroplastos	6
Cuadro 2 Proteína de importancia médica expresada en <i>N. tabacum</i>	10
Cuadro 3 Respuesta inmunológica inducida por proteínas de choque térmico (HSPs)	12
Cuadro 4 Características de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión génica (Invitrogen Custom Primers)	25
Cuadro 5 Condiciones de amplificación la técnica de RT-PCR tiempo real	27
Cuadro 6 Cálculo de las eficiencias de amplificación en la técnica de RT-PCR tiempo real	31
Cuadro 7 Niveles de expresión génica de IL-1β, TNF-α e IL-10 en tejido de ganglios poplíteos de ratas artríticas antes (A) y después (D) del tratamiento	37

ÍNDICE DE FIGURAS		PÁGINAS
Figura 1	Esquema del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
Figura 2	Articulación artrítica.	11
Figura 3	Estructura tridimensional de la proteína HSP65 de <i>M. leprae</i>	13
Figura 4	Toma de muestras de ratas artríticas	21
Figura 5	Seguimiento de la PCR en tiempo real	23
Figura 6	Emisión de fluorescencia del SYBR Green I durante la PCR	24
Figura 7	Curva y línea recta de calibración de estándares	28
Figura 8	Determinación de la sensibilidad de RT-PCR tiempo real	32
Figura 9	Curvas (A) y pico (B) de desnaturalización para el IL-1β	33
Figura 10	Amplificados de las citocinas IL-1β, TNF-α e IL-10	34
Figura 11	Niveles de expresión de β-actina en los distintos grupos de ratas artríticas.	35
Figura 12	Niveles de expresión génica de mRNA de IL-1β en ganglios poplíteos de ratas artríticas tratadas	36
Figura 13	Niveles de expresión génica de mRNA de TNF-α en ganglios poplíteos de ratas artríticas tratadas	40
Figura 14	Niveles de expresión génica de mRNA de IL-10 en ganglios poplíteos de ratas artríticas tratadas	41

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La dirección estuvo a cargo del Dr. Rodolfo López Gómez y asesorado por los doctores Iris Estrada García, Rafael Salgado Garciglia, Carlos Cervantes Vega, Joel Meza y Mariana Meckes Fisher.

La parte del trabajo correspondiente a la inducción de artritis y la administración oral de la proteína HSP65 micobacteriana expresada en tabaco a ratas Lewis, se realizó en el Laboratorio de Farmacología de Productos Naturales del Centro Médico Nacional siglo XXI México, D.F. y la parte correspondiente al análisis citocínico fue llevado a cabo en el Laboratorio de Inmunología Molecular de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional México, D.F. bajo la dirección de la Dra Iris Estrada García.

***«Cualesquiera que hayan sido nuestros logros,
alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos.»***

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca Otorgada (No. de registro 159787), al Proyecto de Factor de Transferencia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por la beca complementaria para poder finalizar este trabajo.

Esta tesis esta dedicada especialmente a mis padres Rubén Rodríguez Botello y Margarita Narciso Rosales que con su apoyo, paciencia y sobre todo con su amor incondicional me enseñaron que hay que levantarse en cada caída no importa cuantas y que tan difíciles sean estas.

A mis hermanos Luis, Gloria, Lety, Álvaro, Armando, Salvador, Laura[†] y sobre todo a ese ser tan especial que cada día me demuestra que la felicidad es una consecuencias de la vida misma, GRACIAS hermanita, Silvia.

A mis abuelitos que me dejaron su ejemplo de lucha y me apoyaron cuando más lo necesitaba Isaac[†], María[†], Juan[†] y Guadalupe[†]. A mi tía Margarita.

Te agradezco a ti especialmente por haberme brindado tu amistad incondicional y toda tu ayuda, la cual, fue fundamental para realizar este trabajo.

Agradezco al Dr Rodolfo López Gómez por la dirección de este trabajo, así como el apoyo para terminarlo y haber soportado todos los desmanes en el laboratorio. A los doctores Rafael Salgado Garciglia, Carlos Cervantes Vega y al DC. Joel Meza por su asesoría y las observaciones hechas para mejorar este trabajo.

A la DC Iris Estrada García por sus acertadas sugerencias y apoyo moral y económico para la realización de este proyecto, gracias por ser mas que una asesora una gran amiga y a cada uno de los miembros de su laboratorio: DC Mayra Tapia, DC. Yaneth Serafin, Axín, Araceli, Toño, Carlos entre otros.

Agradezco así mismo, a la DC Mariana Meckes Fisher por permitirme cubrir parte del trabajo en su laboratorio de Farmacología de Productos Naturales y orientarme en la realización de la fase farmacológica. También agradezco el apoyo brindado por la MC Martha de la misma institución que sin su ayuda no hubiera sido posible cubrir parte importante de este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas: Martha, Marco, Luis, Yadira, Omar, Yunuen, Yuri, Cinthia, Miguel Coria, Ricardo, Jovany, Marco Fierro.

Al resto de personal facultativo y administrativo del Instituto de Químico-Biológicas y en general a todo el personal por su apoyo y estímulos continuados. En especial a la señora Isabel, Blanca, Martha, Claudia y Chela por aguantarme tantos desmanes y sobre todo por su granito de arena en la realización de este gran sueño.

«Escuchad el consejo de quien mucho sabe, pero sobre todo, escuchad el consejo de quien mucho te ama.»

I. RESUMEN

Los sistemas de expresión basados en plantas brindan un medio adecuado para producir moléculas inmunogénicas que podrían ser utilizadas como vacunas orales. El tabaco (*Nicotiana tabacum*), en particular ha sido uno de los mejores sistemas modelo en este campo, ya que diversas investigaciones han demostrado que una amplia variedad de proteínas foráneas pueden ser expresadas eficientemente en esta planta, debido al sistema de transformación bien establecido con que se cuenta. El objetivo de este trabajo fue obtener plantas transgénicas de tabaco que expresaran la proteína HSP65 bajo el control del promotor doble 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y evaluar su eficacia por vía oral en el tratamiento de ratas con artritis inducida por adyuvante.

Se transformaron discos de hojas de tabaco con el plásmido pChsp65 vía *Agrobacterium tumefaciens*. Las plántulas obtenidas se seleccionaron por resistencia al antibiótico kanamicina, y por la prueba histoquímica de la expresión de la enzima β -glucuronidasa. Se obtuvieron plantas completas de tabaco, a las cuales se les verificó la incorporación del gen de la proteína HSP65 por análisis tipo PCR, RT-PCR y Western Blot. Se seleccionaron seis líneas regeneradas (7, 9, 20, 31, 33, 34) y éstas líneas se realizó extracción de ADN y ARN total para las pruebas de PCR y RT-PCR en las que se verificó la amplificación de una banda de 1644 pb correspondiente al tamaño esperado. Así mismo, en la prueba de western blot, se observó la presencia de una proteína de 65 KDa correspondiente al peso molecular del péptido HSP65. Los niveles de expresión fueron determinados por densitometría. Para comprobar la eficacia del antígeno producido en tabaco, se trataron vía oral a ratas Lewis artríticas con hoja de tabaco transgénico de la línea 34. Se administró una dosis diaria de 1.5 gramos de tejido durante 5 días a cada rata de los grupos: tabaco-hsp65, tabaco-pCAMBIA2301 y tabaco silvestre, así mismo, otro grupo de ratas fue administrado diariamente con 30 μ g de la proteína HSP65 durante 5 días. Como grupo control se utilizaron ratas artríticas y ratas sanas alimentadas con dieta convencional. El registro clínico del peso corporal e inflamación articular fue monitoreado diariamente, logrando encontrar diferencias significativas entre los distintos grupos. Dentro de estas diferencias, el grupo de ratas alimentadas con tabaco-HSP65 mostró un efecto significativo con respecto a los demás grupos. Así mismo, es importante señalar que el grupo de ratas tratadas con tabaco silvestre manifestó un efecto importante aunque no significativo en la desinflamación articular. Estos resultados sugieren un efecto

sinérgico entre la proteínas HSP65 recombinante y la presencia de algún metabolito secundario producido por la planta per se.

Para corroborar el efecto anti-inflamatorio de la proteína HSP65 expresada en tabaco transgénico, a los distintos grupos tratados se extrajo el RNA total de ganglios poplíteos para determinar por RT-PCR tiempo real el nivel de citocinas inflamatorias (IL-1 β y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10). De dicha prueba se observó que el grupo de ratas tratadas con tabaco-hsp65 mostró niveles importantes de IL-10 antes (151.36 ± 27.20) y después (308.06 ± 10.13) del tratamiento y una reducción en los niveles de IL-1 β (955.215 ± 32.81 y 289.98 ± 58.44) comparado con otros grupos. Así mismo, es importante mencionar que los niveles de TNF- α antes y después del tratamiento no fue posible determinarlos, ya que su expresión es transitoria. Con ello, nuestros resultados sugieren que la proteína HSP65 micobacteriana expresada en tejido vegetal y suministrada por vía oral a ratas artríticas tiene un efecto antiartrítico.

II. ABSTRACT

Based expression systems in plants provide an adequate means to produce immunogenic molecules that could be used as oral vaccines. The tobacco (*Nicotiana tabacum*), in particular, has been one of the best model systems in this field, since research has shown that a wide variety of foreign proteins can be expressed efficiently in this plant, due to the processing system well established that account. The aim of this study was to obtain transgenic tobacco plants that express the protein HSP65 promoter under the control of double 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) and assess its effectiveness in the oral treatment of rats with adjuvant induced arthritis.

Agrobacterium tumefaciens bearing the pChsp65 plasmid was used to transform tobacco plants. The plantules obtained were selected for resistance to the antibiotic kanamycin, and histochemical evidence for the expression of the enzyme β -glucuronidase. Complete tobacco plants were obtained, to which they verified the incorporation of the *hsp65* gene was confirmed by PCR, RT-PCR, histochemistry and western blot analyzes. Six regenerated lines were selected (7, 9, 20, 31, 33, 34) and these lines was extracted total DNA and RNA for PCR and RT-PCR in which amplification was verified by a band of 1644 bp corresponding to the expected size. Likewise, in the Western blot, we observed the presence of a protein of 65 kDa molecular weight. The expression levels were determined by densitometry. To test the efficiency of antigen produced in tobacco, were treated orally to Lewis rats with tobacco leaf arthritic transgenic line 34. We administered a daily dose of 1.5 grams of tissue for 5 days each rat of groups: tobacco-hsp65, tobacco-pCAMBIA2301 and tobacco wild type, likewise, another group of rats was administered daily with 30 μ g of protein HSP65 during May days. The control group rats were used arthritic and healthy rats fed conventional diet. The record of body weight and joint swelling was monitored daily, failed to find significant differences between groups. Within these differences, the group of rats fed tobacco-hsp65 showed a significant effect compared to other groups. It is also important to note that the group of rats treated with tobacco wild type showed a significant effect but not significant decrease in inflammation in the joints. These results suggest a synergistic effect between the HSP65 recombinant protein and metabolite presents in tobacco plant.

To corroborate the anti-inflammatory effect of HSP65 protein expressed in transgenic tobacco, the different groups treated total RNA was extracted from popliteal lymph nodes to determine real-time RT-PCR the level of inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10). From this test it was observed that the group of rats treated with tobacco-hsp65 showed significant levels of IL-10 before (151.36 + 27.20) and after (308.06 + 10.13) treatment and a reduction in the levels of IL-1 β (955 215 + 289.98 + 32.81 and 58.44) compared with other groups. It is also important to note that the levels of TNF- α before and after treatment was not possible to determine them, since their expression is transient. Thus, ours results suggest that mycobacterial HSP65 protein expressed in plant tissue and delivered orally to arthritic rats has anti-arthritic effect.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas han demostrado ser un sistema ideal para aplicar y desarrollar las distintas técnicas de ingeniería genética ya que ofrecen grandes posibilidades para introducir material genético foráneo, con lo cual adquieren ventajas competitivas, como poder defenderse mejor de una plaga, de enfermedades, incorporar algún nuevo nutrimento, madurar lentamente, incrementar la calidad del producto mediante la mejora de su aspecto nutricional o la expresión a gran escala de proteínas recombinantes con características antigénicas, que podrían ser utilizadas en el desarrollo de un efecto profiláctico o en el tratamiento de algunas enfermedades (Herrera-Estrella et al., 1983; Schillberg et al., 2005).

3.1. Las plantas como biorreactores

Gracias a que las plantas se han convertido en una adecuada plataforma para expresar moléculas foráneas es que muchos sectores han hecho uso de éstas para la solución de algunos de sus problemas. Tal es el caso del sector farmacéutico. Debido a la gran demanda de sus productos, a los elevados costos de producción y al poco abastecimiento a la sociedad es que se ha visto la necesidad de buscar un sistema distinto al tradicional donde se pueda expresar moléculas antigénicas y de diagnóstico para dar apoyo a programas de control de enfermedades como el cáncer, hepatitis, malaria, lepra, cólera, entre otras, padecimientos que han sido difícil de erradicar y que año con año afectan a la población mundial (Argüello y Herrera-Estrella 1993; Arakawa et al., 1998).

En el año 1990, Sijmons y colaboradores lograron por primera vez la expresión de una proteína de origen animal en plantas, en particular en el tabaco. A partir de entonces, numerosos grupos se enfocaron en expresar diferentes moléculas proteicas en plantas, existiendo en la actualidad una gran número de éxitos al respecto. La producción de este tipo de moléculas en plantas presenta ciertas ventajas respecto a los métodos de producción alternativos como son:

- Bajos costos de producción asociados a la existencia de una infraestructura ya adaptada para la cosecha y procesado agrícola.

- Facilidad de escalamiento para cubrir la demanda.
- Ausencia en plantas de patógenos humanos y animales, así como de endotoxinas de origen bacteriano.
- Expresión de moléculas en forma estable en órganos de almacenamiento, como semillas y tubérculos (Lam 1997).

En la actualidad se ha logrado expresar exitosamente en diferentes especies vegetales, varias proteínas con características farmacológicas; entre las que se encuentran ornamentales, frutales y de importancia agrícola, algunas han mostrado capacidad antigénica e inmunológica (Cuadro 1).

Cuadro 1. Expresión de proteínas farmacológicas en plantas.

Proteína	Sistema de expresión	Nivel de expresión (% Total de Proteína Soluble)	Ensayo funcional
Subunidad Enterotoxigénica β de <i>E. coli</i> (LTB)	Zanahorias	0.3	Inmunogenicidad y protección contra CT
	Soya	2.4	Protección inmunogénica contra LT en ratones
Subunidad β del cólera(CTB)	Tomate IGF-1	0.081	Inmunogenicidad por vía oral a ratones
Antígeno de la superficie de la Hepatitis B (HBsAg)	Papa	8.5 mg ^g -1 Peso fresco	Respuesta inmunogénica en humanos
Antígeno del rotavirus humano del grupo A (VP6)	Alfalfa	0.06- 0.28	Inmunogenicidad a ratones y transferencia de respuesta por anticuerpos generados
Antígeno del rotavirus (VP7)	Papa	0.3-0.4	Protección inmunogénica contra el virus en ratones
Proteína de la cápside del virus Norwalk (NVCP)	Fruto del tomate y papa	8 y 4	Inducción sistémica y mucosal de anticuerpos en ratones
Proteína del virus del sincio respiratorio (S1)	Tomate y hojas de tabaco	0.1	Respuesta inmunogénica a ratones por la administración oral
Antígeno F1-V de <i>Yersinia pestis</i> F1-V	Hojas de tabaco	1-2 mg ⁻¹	Protección inmunológica en puercos contra <i>Y. pestis</i>

Chebolu y Daniell, 2009.

3.2. Cultivo de tejidos vegetales y la ingeniería genética

El cultivo de tejidos vegetales consiste en una serie de técnicas que permiten el cultivo y manipulación bajo condiciones artificiales de células, tejidos y órganos de plantas. Una de las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales, en conjunto con la ingeniería genética es la obtención en poco tiempo y espacio en condiciones *in vitro* de un gran número de especies genéticamente modificadas (Chebolu y Daniell, 2009).

El cultivo de tejido vegetales *in vitro* se ha convertido en el eje en torno al cual giran las nuevas tecnologías de mejoramiento genético vegetal y que a través de la tecnología de ADN recombinante permite la inserción de secuencias génicas específicas en vectores (Ej. plásmidos bacterianos y virus) para incorporarse al genoma de la planta.

3.3. Sistemas de transformación genética vegetal para expresión de moléculas foráneas

En la actualidad, la ingeniería genética vegetal cuenta con varios sistemas para la introducción de genes al genoma de la planta, los cuales difieren en la eficiencia con la que se introducen las moléculas de ADN exógenas y el tipo de tejido en cuestión.

3.3.1. Sistemas de transferencia directa de ADN exógeno

Para la transferencia directa se han empleado técnicas como la utilización de microproyectiles de alta velocidad como transportadores de ADN hacia el interior de las células (Klein et al., 1988). Sin embargo, el empleo de esta técnica puede ser azarosa y producir quimeras, además existe la dificultad de la regeneración a plantas completas, entre otros (Kyojuka et al., 1991).

3.3.2. Sistema de transformación por *Agrobacterium tumefaciens*.

Una de las estrategias más utilizadas es la transformación indirecta del genoma nuclear de las plantas a través de *Agrobacterium tumefaciens*. Por ser un fitopatógeno natural, permite la

introducción de material genético foráneo a células vegetales de distintas especies principalmente dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas (Herrera-Estrella et al., 1983), debido a que presenta un plásmido inductor de tumores (Ti) el cual contiene una región llamada ADN-T (ADN de transferencia) con integración estable dentro de las células vegetales, además de una región de virulencia (*vir*) y una región para el catabolismo de opinas que pueden ser utilizadas por la bacteria como una fuente de carbono y/o nitrógeno (Hunter y Neill, 1990) (Figura 1).

Las plantas al sufrir una herida liberan compuestos fenólicos que activan los genes de virulencia (*vir*) del plásmido Ti de la bacteria (Stachel y Nester, 1986), los cuales inducen la colonización y unión entre la bacteria y la célula vegetal, procesando y transfiriendo un segmento de este plásmido (ADN-T) hasta el núcleo de la célula vegetal e integrándose al azar en un lugar del genoma vegetal (Herrera-Estrella *et al.*, 1997) (Figura 1).

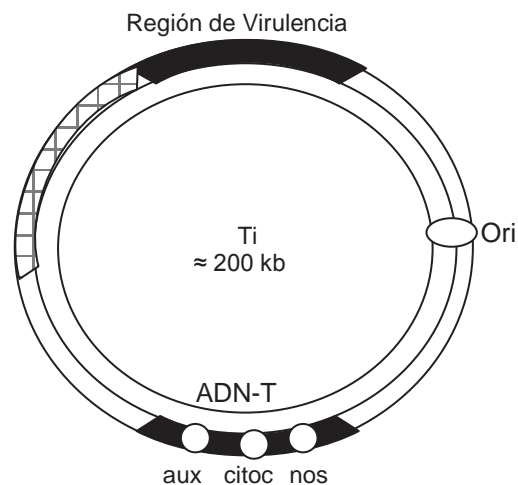


Figura 1 **Esquema del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.** ADN-T (ADN de transferencia: aux, auxina; citoc, citocininas y nos, terminador de nopalina sintasa), Ori (origen de replicación).

El ADN-T codifica enzimas que convierten metabolitos vegetales a dos clases de compuestos importantes; estos son reguladores de crecimiento vegetal (auxinas y citocininas) que estimulan el crecimiento de las células transformadas para formar el tumor (agalla de la

corona) y opinas que son la fuente de nitrógeno para la bacteria; estas opinas sólo pueden ser metabolizadas por *Agrobacterium* (Brown, 1986).

3.4. Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

En conjunto con las técnicas de ingeniería genética y el sistema de cultivo de tejidos vegetales es que se ha establecido el sistema de transformación de distintas especies vegetales. Uno de los primeros trabajos desarrollados en este campo fue el realizado por White en 1939, en donde logra la formación de células parenquimatosas (callo) a partir de explantes de tabaco utilizando el cultivo *in vitro*. Así mismo, y tomando como base los antecedentes anteriores Murashige y Skoog (1962) establecen las condiciones nutricionales que dan lugar a la morfogénesis de callos obtenidos de tejido meristemático de tabaco y de muchas especies vegetales. En 1965 Vasil y Hildebrandt demostraron de manera más precisa que a partir de una célula somática aislada de tejido meristemático de tallo de tabaco se puede lograr la regeneración a una planta completa. Estos hechos significativos constituyen en sí el despliegue de varias investigaciones en el campo de la transformación genética vegetal.

El tabaco en sí ha sido considerado uno de los sistemas pioneros en el campo de la transformación genética vegetal debido a la problemática agronómica que siempre se ha enfrentado con el virus del mosaico (VMT), patógeno que ha devastado grandes extensiones de cultivo en América Latina, por lo que ha sido necesaria la creación de individuos resistentes a la enfermedad. Y no fue hasta 1983 en que se lograron generar las primeras plantas transgénicas de tabaco capaces de expresar la proteína β -faseolina de una especie de *Phaseolus*, haciendo así posible el surgimiento de la Agrobiotecnología (Mason et al., 1992; Ma et al., 1997; Lamm et al., 1997).

3.4.1. Expresión de antígenos en tabaco

La transformación de tabaco ha sido uno de los logros biotecnológicos más sobresalientes de finales del siglo pasado, ya que hizo posible el surgimiento de la agrobiotecnología con las primeras plantas transgénicas que lograron expresar eficientemente moléculas foraneas. En 1990 Sijmons y colaboradores lograron por primera vez la expresión de una proteína de origen

animal (la seroalbúmina humana), en plantas de tabaco. A partir de allí, numerosos grupos se abocaron a la tarea de expresar diferentes moléculas proteicas en plantas de tabaco (Cuadro 2).

Cuadro 2. Proteínas de importancia médica expresada en *N. tabacum*.

PROTEINA EXPRESADA	PLANTA	LOCALIZACIÓN
Seroalbúmina humana	<i>Nicotiana tabacum</i>	Apoplasto
Virus del sincisio respiratorio	<i>N. tabacum</i>	Apoplasto y retículo endoplásmico
Eritropoyetina humana	<i>N. tabacum</i>	Apoplasto
HbsAg	<i>N. tabacum</i>	Intracelular
HGM-CSF	<i>N. tabacum</i>	Intracelular

Gómez-Lim 2001.

La expresión de antígenos en plantas ha sido de gran apoyo para el sector farmacéutico, ya que su aplicación en algunos padecimientos autoinmunes como la artritis reumatoide, requiere de grandes cantidades, por lo que el tabaco en particular, por presentar un gran follaje, por contar con el establecimiento del sistema de transformación y regeneración *in vitro*, y la estabilidad del material genómico foráneo, lo hace un sistema ideal para estos requerimientos.

3.5. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por una inflamación crónica de las articulaciones, afecta aproximadamente al 1.5 % de la población mundial (Se et al., 1999). Esta enfermedad se inicia con la inflamación de la membrana sinovial que induce a la formación de un tejido granular denominado pannus y que con frecuencia lleva a la destrucción erosiva del cartílago adyacente y hueso, lo que provoca la incapacidad física moderada del 80% de los pacientes y una temprana muerte (Figura 2) (Brbera et al., 2004).

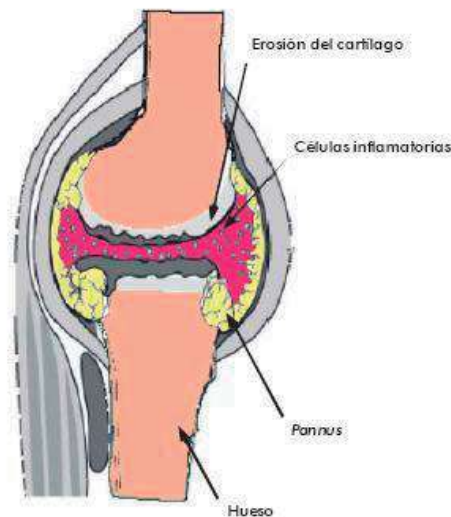


Figura 2 **Articulación artrítica.** Inflamación de la membrana sinovial, erosión de hueso y formación de pannus.

La AR es ocasionada por la acción concertada de diferentes tipos de células que sintetizan citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 y el interferón gamma), las cuales desencadenan la activación de los linfocitos T CD4+ para diferenciarse a células Th1 (del inglés, *T helper 1*). En el proceso de inflamación crónica las Th1 infiltran la membrana sinovial y con la síntesis de IL-2 y INF- γ estimulan macrófagos que producen cantidades elevadas de TNF α y de IL-1 β que ejercen funciones en el ámbito local y sistémico, tales como: reclutamiento celular, inhibición en la producción de citocinas como la IL-10 (Forre y Hassfeld, 2000), estimulación de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible y cicloxigenasa- 2 para la síntesis de óxido nítrico y de prostaglandinas que tienen un efecto en la activación de metaloproteasas, en la apoptosis y en la degradación de todos los componentes de la matriz extracelular del cartílago (Clancy et al., 1998).

3.5.1. Papel de las proteínas HSP en el desarrollo de enfermedades infecciosas.

Actualmente, la causa principal que desencadena el desarrollo de la AR es desconocida. Blass et al., (1999) determinaron que existen antígenos como las proteínas de estrés térmico (HSP) de origen micobacteriano causantes del desarrollo de la artritis. Las proteínas HSP

presentan características inmunogénicas con un excepcional grado de conservación evolutiva, lo que ocasiona que componentes inmunológicos reaccionen contra HSPs propias y extrañas. La respuesta inmune contra las HSPs extrañas es un mecanismo de defensa importante contra las infecciones bacterianas. Los anticuerpos contra estas proteínas son abundantes en los individuos sanos y en pacientes con enfermedades autoinmunes y pueden reaccionar en forma cruzada con los antígenos propios expresados en las propias articulaciones (Life et al., 1993; Matzinger, 1996; Chen et al., 1999). Su expresión aumenta bajo condiciones de estrés celular como ocurre durante la inflamación. Estas “chaperonas” moleculares tienen además la función de asistir en la síntesis, el plegamiento, el transporte y la degradación de las proteínas intracelulares.

Actualmente se han realizado varios estudios que demuestran que las proteínas de estrés térmico (HSPs) de algunos agentes patógenos causantes de enfermedades juegan un papel importante y en las cuales se han determinado dos factores que atribuyen a que éstas pueden ser consideradas como uno de los mejores antígenos en el evento de infección:

1. Son abundantes en el patógeno, especialmente bajo condiciones de estrés.
2. La memoria inmunológica para co-reaccionar con determinantes de las HSP es generado con microbios con diferente grado de virulencia.

Gracias a estos dos factores y a los grandes avances que demuestran que las HSP son antígenos inmunodominantes es que tienen uso potencial en distintas estrategias de vacunación y tratamiento en algunas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Zügel et al., 1995) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Respuesta inmunológica inducida por proteínas de choque térmico (HSPs).

PATOGENO	ENFERMEDAD	FAMILIA HSP	REFERENCIA
Helmito: <i>Brugia malayi</i>	Filiariasis	HSP70	Ragno et al., 1997.
Protozoarios: <i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria	HSP70, HSP70	Jendoubi y Bonnefoy 1988

Hongo: <i>Candida albicans</i>	Candidiasis	HSP90	Matthews et al., 1991
Bacteria: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	HSP60, HSP70	Shinnick et al., 1988
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lepra		García et al., 1999

Zügel et al., 1995.

3.5.1.1. Papel de la proteína HSP65 micobacteriana en la artritis reumatoide

La inmunización en ratas con micobacterias atenuadas conduce a una artritis autoinmune conocida como artritis inducida por adyuvante (Pearson et al., 1964). Un análisis de la respuesta inmune en ratas con artritis por adyuvante reveló la presencia de células T que reconoce como antígeno a una proteína de choque térmico de 65 KDa (HSP65) (Figura 4), la cual tiene capacidad de regular en el proceso inflamatorio (van Eden et al. 1988; Billingham et al., 1990). La proteína HSP65 es una proteína proveniente de un gen de 1626 pares de bases, es altamente conservada en el género *Mycobacterium*, por su peso molecular está considerada dentro de la familia de las HSP60 (GroEL-2) (Figura 3). La sobre expresión de esta proteína es un mecanismo que poseen las micobacterias para tolerar los *efectos* del estrés ambiental ya que tiene la capacidad de interactuar con otras proteínas con conformaciones no nativas a expensas de la hidrólisis de ATP (Frydman y Höhfeld, 1997).

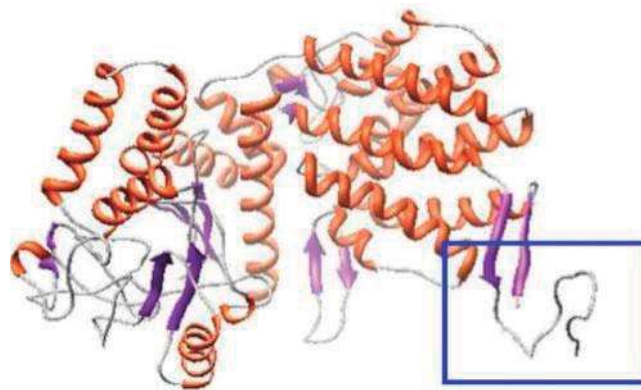


Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína HSP65 de *M. leprae* (Ram et al., 2009).

Estudios recientes han reportado la asociación de la proteína HSP65 micobacteriana con efectos moduladores en varias enfermedades, en forma de vacunas de ADN (ADNhsp65) en la inhibición de diferentes tipos de tumores (Lukacs et al., 1993; Michaluart et al., 2008), contra tuberculosis (Jones et al., 1993; Sauza et al., 2008; Zarate-Blades et al., 2009), en la infección

sistémica por hongos (Ribeiro et al., 2009) y potencialmente en la modulación de la artritis, diabetes y esclerosis múltiple (van Eden et al., 1985; Life et al., 1993; Matzinger, 1996; Chen et al., 1999, Quintana et al., 2003; Santos-Junior et al., 2007).

Se ha determinado que el tratamiento antiartrítico con la proteína HSP65 en animales de laboratorio inducidos por diferentes agentes artritogénicos, como la pared celular de *Streptococcus* (van Eden Broek et al., 1989), pristano (Thompson, et al., 1998) y colágeno (Kingston et al., 1996), promueve la inactivación de células auto reactivas y la desinflamación articular, a través de la activación de células T supresoras que reconocen péptidos contenidos en dicha proteína, cuando ésta es administrada vía mucosas (oral y nasal) (Haque et al., 1996; Ulmansky et al., 2002).

Estudios sobre el potencial que tiene la administración oral de la proteína HSP65 a bajas dosis (30 µg) y co-administrada con el inhibidor de tripsina de soya (ITS) en la artritis, mostraron una reducción significativa a la destrucción articular, la cual fue visualizada radiográficamente. En adición, el tratamiento con HSP65/ ITS produjo disminución del interfeón gama ($INF\gamma$) y un incremento de la interleucina 10 (IL-10), específicos a la proteína HSP65. En 2002, Wendling y col. demostraron también que la administración nasal péptidos (111-125aa) de la proteína HSP65 a ratas sensibles, estimuló la producción de IL10 específica a ésta, previniendo la posterior inducción de la artritis por adyuvante.

Por lo tanto, las pruebas recopiladas hasta la fecha son un fuerte indicativo de que el mecanismo de protección contra la artritis es una característica particular de la proteína HSP65 mycobacteriana, que no se da en otras proteínas inmunogénicas y conservadas en otros organismos (Prakken, et al., 2001; Wendling et al., 2002).

IV. HIPÓTESIS

La administración oral de la proteína HSP65 de *Mycobacterium leprae* expresada en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) inhibe el desarrollo de los síntomas de la artritis inducida por adyuvante en ratas.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración oral de la proteína HSP65 de *Mycobacterium leprae* expresada en plantas de tabaco en ratas con artritis inducida por adyuvante.

5.1. Objetivos Específicos

- Clonar el gen *hsp65* de *Mycobacterium leprae* en un vector de expresión en plantas.
- Transformar plantas de tabaco con el gen *hsp65* de *Mycobacterium leprae* por el método de *A. tumefaciens*.
- Verificar la transformación de plantas de tabaco-*hsp65* por métodos moleculares (PCR, RT-PCR, histoquímica de Gus y Western blot).
- Evaluar el efecto antiartrítico en ratas con artritis inducida por adyuvante alimentadas con plantas transgénicas de tabaco.
- Determinar el nivel de citocinas proinflamatorias (TNF α y IL-1 β) y anti-inflamatorias (IL-10) por RT-PCR en ratas artríticas tratadas con plantas transgénicas de tabaco.

CAPÍTULO I

ARTÍCULO PUBLICADO

Expression of *Mycobacterium leprae* HSP65 in tobacco and its effectiveness as an oral treatment in adjuvant-induced arthritis

César Rodríguez-Narciso · Mayra Pérez-Tapia · Rosa María Rangel-Cano · Celio L. Silva · Mariana Meckes-Fisher · Rafael Salgado-Garciglia · Sergio Estrada-Parra · Rodolfo López-Gómez · Iris Estrada-García

Received: 25 November 2009 / Accepted: 13 May 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Transgenic plants are able to express molecules with antigenic properties. In recent years, this has led the pharmaceutical industry to use plants as alternative systems for the production of recombinant proteins. Plant-produced recombinant proteins can have important applications in therapeutics, such as in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). In this study, the mycobacterial HSP65 protein expressed in tobacco plants was found to be effective as a treatment for adjuvant-induced arthritis (AIA). We cloned the *hsp65* gene from *Mycobacterium leprae* into plasmid pCAM-BIA 2301 under the control of the double 35S promoter from cauliflower mosaic virus. *Agrobacterium*

tumefaciens bearing the *pChsp65* plasmid was used to transform tobacco plants. Incorporation of the *hsp65* gene was confirmed by PCR, reverse transcription-PCR, histochemistry, and western blot analyses in several transgenic lines of tobacco plants. Oral treatment of AIA rats with the HSP65 protein allowed them to recover body weight and joint inflammation was reduced. Our results suggest a synergistic effect between the HSP65 expressed protein and metabolites presents in tobacco plants.

Keywords Transgenic plants · HSP65 protein · Tobacco · Adjuvant induced arthritis · Oral treatment · Rats

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11248-010-9404-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Rodríguez-Narciso · R. Salgado-Garciglia · R. López-Gómez (✉)
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
Edificio B1, Francisco J Mújica S/N Col. Felicitas del Rio,
CP 58060 Morelia, Michoacán, Mexico
e-mail: lgomez@umich.mx

M. Pérez-Tapia · S. Estrada-Parra · I. Estrada-García
Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas IPN, Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n,
Col. Santo Tomas., CP 11340 México, D.F., Mexico

R. M. Rangel-Cano
Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV
Campus Guanajuato IPN, Km 9,5 Libramiento Norte Carr.
Irapuato-León., Irapuato, Guanajuato, Mexico

C. L. Silva
Department of Biochemistry and Immunology, Medicine
School of Ribeirão Preto, The Centre for Tuberculosis
Research, University of São Paulo, São Paulo, SP CEP
14049-900, Brazil

M. Meckes-Fisher
Farmacología de Productos Naturales, Unidad Pediátrica,
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Av.
Cuauhtemoc 330, Col Doctores, CP 06725 México, D.F.,
Mexico

Abbreviations

AIA	Adjuvant-induced arthritis
RA	Rheumatoid arthritis

Introduction

The pharmaceutical industry is applying recombinant protein technology to satisfy the need to find a system to produce drugs on a large scale but at a low production cost. The use of transgenic plants as a system for the expression of relevant antigens has been widely assessed, and the general conclusion drawn is that the large-scale production of such antigens is associated with a relatively low cost and less complex production system (Daniell et al. 2009; Ramessar et al. 2009). In addition, results from studies on animals under experimental conditions and from clinical assays in humans indicate that certain antigens derived from transgenic plants act as prophylactic agents and can be used to treat certain diseases (Tacket et al. 2000; Walmsley and Arntzen 2000). Hence, these plant-produced recombinant proteins have been proposed as an alternative production system to support public health programs aimed at controlling diseases that cause devastating problems in the population (Tacket et al. 2000), such as rheumatoid arthritis (RA). In Mexico, RA is one of the most common chronic diseases, with important physical, social, economic and psychological consequences. Statistics from the health sector in 2005 reported that 1.5 million people suffer arthritic problems (<http://www.issste.gob.mx/website/comunicados/boletines/2005/mayo2005.html>).

In recent decades, extensive research efforts have been directed towards determining the primary etiological agent causing RA. However, the causes are still a mystery, since it is thought that multiple factors, such as heredity, hormonal changes, environment, and/or infection with another viral or bacterial pathogen, may be involved (Lunardi et al. 2000; Moctezuma 2002; Lopes-Silva et al. 2009). Molecular studies have reported the existence of certain molecules that may themselves be involved in the development and modulation of RA, such as the type II collagen molecule and the glycoprotein and human cartilage protein CH65, which are expressed in the cartilage of arthritic patients. However, there is

strong evidence indicating the minimal involvement of these proteins in the development of the disease (Rudolphi et al. 1997).

It has been reported that a number of autoimmune diseases occur after primary infection with a pathogen, with the pathogen producing a molecule that co-reacts immunologically with another molecule present in the tissues of the host, causing the destruction of these tissues (Life et al. 1993; Matzinger 1994; Chen et al. 1999; Kohm et al. 2003). This hypothesis has been strongly supported by results from studies on arthritis induced by *Mycobacterium tuberculosis* attenuated by heat which show the activation of T cells and antibodies that recognize an antigen of the 65-KDa mycobacterial protein, which subsequently increases its expression in the process of inflammation and heat stress (van Eden 1988; Blass et al. 1999; Sewell et al. 2002; Lopes-Silva et al. 2009).

Heat stress proteins (HSPs) show a high degree of evolutionary conservation in eukaryotes and prokaryotes (Brown and Doolittle 1997). These chaperones have the molecular function of assisting in the synthesis, folding, transport, and degradation of intracellular proteins (Srivastava 2002). High levels of expression of these proteins under conditions of cellular stress, as occurs during inflammation and immune responses against major foreign HSPs during bacterial infections, are currently being considered as a potent antigen in the development of dangerous diseases, such as autoimmune arthritis (Lopes-Silva et al. 2009). Mycobacterial HSP65 protein has been shown to provide protection against laboratory-induced arthritis stimulated by *Streptococcus* sp. cell-wall extracts (van Eden Broek 1989), Freund's complete adjuvant (Billingham et al. 1990), pristano (Thompson et al. 1998), and collagen (Kingston et al. 1996). This protective effect has been related to the presence of certain peptides in the protein, which activate T cells and suppress antibodies that inactivate self-reactive T lymphocytes (Thorns and Morris 1985; Shoenfeld et al. 1986; Prescott et al. 2000).

The gene for HSP65 of *Mycobacterium leprae* has been shown to have immunomodulatory effects in various diseases, including the inhibition of the development of different types of tumor cells (Lukas et al. 1993; Michaluart et al. 2008), the development of prophylactics against tuberculosis (Jones et al. 1993; Rosada et al. 2008; Souza et al. 2008; Zárate-Bladés et al. 2009) in systemic fungal infection (Ribeiro et al.

2009) and, potentially, the modulation of arthritis, diabetes and multiple sclerosis (van Eden et al. 1985; Life et al. 1993; Matzinger 1994; Chen et al. 1999; Quintana et al. 2003; Santos-Júnior et al. 2007). In arthritic rats, the purified HSP65 protein co-administered orally with soybean trypsin inhibitor at low doses (30 mg) has been shown to play an important role in the modulation of arthritis induced by adjuvant (AIA). This effect is related to the activation of regulatory T cells specific to the protein (Haque et al. 1996; Cobelens et al. 2000; Ulmansky 2002).

In the study reported here, we show the effectiveness of oral therapy using transgenic tobacco plants expressing the *M. leprae* HSP65 protein in the experimental model of AIA rats.

Materials and methods

Vector construction

The pcDNA3.hsp65 plasmid, which contains a 3.3-kb fragment that includes the *M. leprae* hsp65 gene, was kindly donated by Dr. Celio L. Silva. It was amplified by PCR using the oligonucleotides TUBCF (forward: 5'-GGAATTCATGGCCAAGACAATTGCC-3') and TUBCE (reverse: 5'-CGGGATCCCGTCAGAAGTC-CATACCACCC-3') under PCR conditions of 95°C for 10 min, followed by 35 cycles at 95°C for 1 min, 60°C for 50 s, and 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 7 min. The PCR product was cloned into the multiple cloning site of the pGEMT-easy vector (Promega, Madison, WI). Digestion of this plasmid with *Eco*RI and *Bam*HI released a 1,638-bp fragment which was then subcloned into the pUCpSS vector (Burlington, Canada). The pUCpSSHsp65 plasmid was then digested with *Hind*III to release the cassette of 3,582 bp that was subcloned into the pCAMBIA 2301 plasmid, which is a plant expression vector. This final plasmid was named *pChsp65*.

Transformation and regeneration of tobacco plants

The *pChsp65* plasmid was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electroporation (Hoeckema et al. 1983; Mattanovich et al. 1989) using a Gene Pulser electroporator (Bio-Rad, Hercules CA); transformation was confirmed by PCR amplification of

the *hsp6* gene. Transgenic plants were obtained by infecting *Nicotiana tabacum* TB1 leaf discs with recombinant *A. tumefaciens-hsp65*, following the protocol described by Baumann et al. (1987). The regeneration and selection of transgenic plants was carried out on solid MS medium (Murashige and Skoog 1962). *A. tumefaciens* cells were eliminated after transformation by culturing the transformed tissue for one round in medium containing kanamycin (100 mg/l) and claforan (500 mg/l). Regenerated transformed calli were subcultured in a medium containing claforan (500 mg/l) and kanamycin (200 mg/l), and regenerated shoots were subcultured in phytohormone-free MS medium. Rooted plants were transferred to a peat moss–agrolite (1:1) substrate and maintained under greenhouse conditions.

Histochemical analysis of tobacco plants

Fresh leaves from transgenic tobacco, wild-type (WT) tobacco, and tobacco-pCAMBIA 2301 (vector only) plants were submerged in β -glucuronidase (GUS) reaction buffer [0.1 M NaHPO₄, pH 7, 1 mM K₃Fe(CN)₆, 1 mM K₄Fe(CN)₆, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 *N*-laurylsarcosil, 0.5 mg/ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid cyclohexylammonium (Sigma, St. Louis, MO)] for 24 h at 37°C. Following incubation, the chlorophyll of the explants was removed with absolute ethanol by placing the samples in the organic solvent for 2 h (Jones and Sutton 1997). The characteristic blue staining indicating expression of the *gus* gene was determined by optical microscopy.

Nucleic acids extraction

For the extraction of DNA from transgenic plants, fresh leaves (100 mg) were frozen in liquid nitrogen and finely pulverized with a previously sterilized mortar. Genomic DNA was extracted following the protocol of Doyle and Doyle (1987). For RNA extraction, 1 g of fresh leaf tissue was finely pulverized in liquid nitrogen. RNA extraction was performed according to the protocol of López-Gómez and Gómez-Lim (1992).

Reverse transcription-PCR

A 3- μ g aliquot of total RNA was used for reverse transcription (RT) in a 20- μ g reaction volume using

SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, UK). A 5- μ l volume of this RT mixture was then used for the PCR analysis using primers TUBCF and TUBCE.

Western blot analysis and quantification of the *M. leprae* HSP65 protein in transgenic tobacco plants

Protein extracts were obtained from 100 mg of fresh pulverized leaves from both WT and transgenic plants. Samples were resuspended in 300 μ l extraction buffer [1 \times phosphate buffered saline (PBS), 0.5% Tween 20, 10 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 sucrose, 10 μ g/ml phenylmethylsulphonyl fluoride, 5 μ g/ml phosphoramidon], shaken for 1 min, and then centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 5 min. The total protein concentration was determined by the method of Bradford (1976), and HSP65 protein quantification was carried out by densitometric analysis using the program RFLPScan V2.1 (Scanalytics, Fairfax, VA). HSP65 immunodetection was performed by electrophoresing 30 μ g of protein extract from each of the plant lines, namely, WT (tobacco), tob-pCAM (transgenic tobacco vector only), and tob-HSP65 (transgenic tobacco expressing HSP65 protein), and 30 μ g of extract from *Escherichia coli* (MH98ES) as a positive control in a polyacrylamide gel (12%). The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules CA); the membrane was blocked with 5% nonfat milk in PBS at 37°C for 1 h and then incubated for 30 min with a 1: 2000 dilution of monoclonal antibody IIIE9 (epitope-specific, unique for *M. leprae* HSP65; Gillis and Buchanan 1982) in PBS–0.5% Tween (PBST) containing 1% nonfat milk at room temperature. The membrane was washed three times (5 min each time) with PBST. The rabbit anti-mouse immunoglobulin–peroxidase conjugate (Sigma) was diluted 1: 2000 in 1% nonfat milk–PBST. The membrane was incubated with the antibody at room temperature for 30 min, then washed four times with PBST. The washed membrane was incubated with AEC/DEF (3-amino-9-ethylcarbazole/*N,N* dimethylformamide) substrate to develop the protein bands. The molecular weights of the bands were estimated on the basis of a protein weight marker (Sigma).

Induction and clinical evaluation of AIA

Male Lewis rats, 6–8 weeks old and weighing 180–190 g (Harlan Mexico S. A. de CV, Mexico), were used. To induce arthritis, we injected the animals intradermally at the base of the tail with 200 μ l of complete Freund adjuvant (2 mg *M. tuberculosis* strain H37Ra/rat; Sigma). Development of AIA was recorded at the start of the study and on days 1, 10, and 30. The body weight of the animals was determined, and the inflammation at the joint level in the hind feed of each animal was measured with a Mitutoyo micrometer (Mitutoyo Corp, Kawasaki, Japan).

Oral administration of the HSP65 protein expressed in transgenic tobacco

After the tenth day of AIA, a time at which the rats showed weight loss and joint inflammation, the rats were subjected to a 16-h fasting period. In the study, six groups of five AIA rats each were used and fed with leaf tissue equivalent to 10 μ g of HSP65 protein. The same quantity of tobacco WT and tob-pCAMB leaf tissue were supplied to the control rats. Another group of animals was treated with 30 μ g of purified recombinant *M. leprae* HSP65 protein (*E. coli*, pUC8-hsp65; kindly provided by R. Butler, NIMR, London, UK) co-inoculated with a soybean trypsin inhibitor (rHSP65-STI). Control groups of arthritic rats and healthy rats without treatment were included.

Statistical analysis

Group differences in cumulative arthritis scores of weight and inflammation in disease incidence were analyzed using Student's *t* test. *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

pChsp65 vector construction

PCR amplification of HSP65 of *M. leprae* with primers designed to correspond to the complete gene yielded a 1,644-bp product; this fragment was subcloned, and the *pChsp65* plasmid was generated.

This plasmid has two reporter genes, the kanamycin resistance gene and the gene encoding the GUS enzyme. The *hsp65* gene was cloned in a cassette with a double cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and a CaMV 35S terminator region in the plasmid pCAMBIA 2301 [Electronic Supplementary Material (ESM) Fig. 1S].

Histochemical analysis of transgenic plants

Plasmid *pChsp65* was used to produce transformed tobacco plants; incorporation of the plasmid was confirmed by the survival of plants (>85%) for over 1 month in kanamycin medium. None of these plants showed apparent phenotypical changes. Published reports indicate that the success rate of obtaining transformed plants of a particular species lies in the degree of survival that species shows when exposed to an antibiotic, without the appearance of pleiotropic effects that would affect the normal development of the plant (Nölke et al. 2005). Transformation was further confirmed with GUS assay: of the 40 lines chosen to be assayed, 42.5% (lines 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 20, 23, 31, 32, 33, 34, 38, 40) presented different degrees of staining, a parameter indicative of enzymatic activity (ESM Fig. 2S A). The organs that depicted the highest degree of staining were the trichomes and veins (ESM Fig. 2S B, C, D). No staining was observed in any of the wild-type (ESM Fig. 2S A; lines 13, 14, 15, 16) and tobacco-pCAMBIA 2301 (vector only) plants analyzed (ESM Fig. 2S A, lines 3, 6, 10). These results confirm the integration and stable expression of the *gus* gene in the genomic DNA of the transformed tobacco plants. The activity of the GUS enzyme in roots and leaves of some plant species transformed with the plasmid pCAMBIA 2301 has been reported (McIntosh et al. 2004).

PCR confirmation of the presence of *hsp65* in transgenic tobacco plants

We chose transgenic tobacco lines 7, 9, 20, 31, and 34 as test material to confirm the incorporation of the *hsp65* gene into the genome of the tobacco plants. Using genomic DNA extracted from transgenic tobacco and control plants, we PCR-amplified the *M. leprae hsp65* gene using the oligonucleotides TUBCE and TUBCF. Negative controls included the amplification of genomic DNA of WT tobacco plants

and tobacco plants transformed with pCAMBIA 2301. The amplified products were analyzed electrophoretically, and a 1,644-bp fragment corresponding to the *hsp65* gene was found only in transgenic plants. No comparable fragment was amplified in the control plants (ESM Fig. 3S A). Amplification of the *hsp65* gene provided evidence of its incorporation into the genomic DNA of the different lines of transformed plants. Of the lines chosen for the GUS analysis, only lines 7, 9, 20, 31, and 34 showed the PCR product; those lines transformed with the plasmid pCAMBIA 2301 and the WT plants did not present this 1,644-bp product (ESM Fig. 3S A).

Confirmation of *hsp65* gene expression in transgenic tobacco plants was carried out by RT-PCR analysis. cDNA synthesis was performed using 3 µg of total RNA. Using this cDNA and the *hsp65* primers in a PCR reaction resulted in the amplification of a 1,644-bp fragment in the putative transgenic lines; this product was not obtained in the WT lines or in those transformed with the plasmid alone (ESM Fig. 3S B). These results demonstrated that it was indeed feasible to express the *hsp65* gene of mycobacterial origin in the plant genome.

Expression of the HSP65 protein

To determine which transgenic line produced the highest levels of HSP65 protein, we performed a western blot assay using monoclonal antibody IIIIE9 (which only recognizes *M. leprae* HSP65). The results showed that the different lines expressed different levels of protein, with line 34 showing the highest level of expression (0.19% of the total soluble protein) (Fig. 1A, B).

Oral administration of the HSP65 protein expressed in tobacco to arthritic rats

Throughout the 30 days of observation, the group of healthy rats (without treatment) showed significant weight gain ($t_{0d} = 187 \pm 6.9$, $t_{10d} = 223.6 \pm 4.7$, $t_{30d} = 263.66 \pm 1.52$ g), but not a gain in joint measurements ($t_{0d} = 6.02 \pm 0.05$, $t_{10d} = 6.24$, $t_{30d} = 6.2 \pm 0.19$ mm) (Fig. 2A, B). In contrast, rats treated with the adjuvant lost significant weight ($t_{0d} = 190 \pm 3.03$, $t_{10d} = 164.6 \pm 9.8$ g, $t_{30d} = 159 \pm 1.15$ g) (Fig. 2A), and the size of their joints increased ($t_{0d} = 5.78 \pm 0.05$, $t_{10d} = 7.28 \pm 0.05$, $t_{30d} = 10.41 \pm 0.10$ mm) (Fig. 2B).

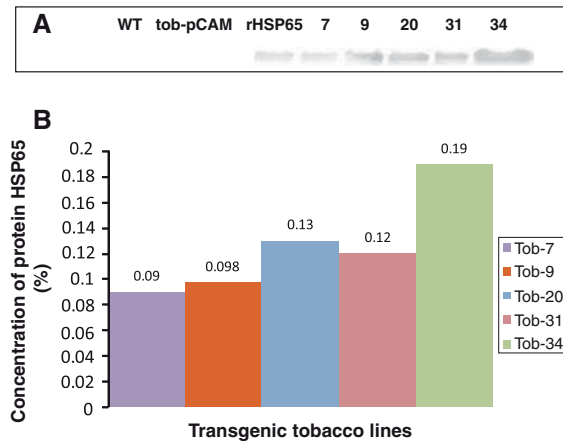


Fig. 1 Analysis of heat shock protein 65 (*HSP65*) in tobacco plants. **A** Western blot analysis of transformed tobacco using the first monoclonal antibody IIIIE9 and a second anti-rabbit antibody conjugated with the peroxidase enzyme. Presence of a 65-KDa band in transformed tobacco lines containing the *hsp65* gene (*tob-hsp65*; lines 7, 9, 20, 31, 34) and in those containing recombinant HSP65 (*rHSP65*; *E. coli* MH9ES), but not in wild-type tobacco (*WT*) plants and plants with tobacco-pCAMBIA 2301 (*tob-pCAM*). **B** Densitometric analysis of the expression of HSP65 protein in transgenic tobacco lines containing the *hsp65* gene (*tob-hsp65*): 7 (0.09%), 9 (0.098%), 20 (0.13%), 31 (0.12%), 34 (0.19%)

Animals fed with WT tobacco and tob-pCAMBIA 2301 plant tissue showed a recovery of weight and a reduction of joint inflammation at the end of treatment (WT tobacco: $t_{0d} = 189.2 \pm 3.6$, $t_{10d} = 161.8 \pm 2.70$, $t_{30d} = 190.66 \pm 2.50$ g; $t_{0d} = 5.84 \pm 0.1$, $t_{10d} = 7.2 \pm 0.18$, $t_{30d} = 8.2 \pm 0.05$ mm, respectively; tob-pCAMBIA 2301: $t_{0d} = 193 \pm 5.17$, $t_{10d} = 172.00 \pm 8.89$, $t_{30d} = 187.00 \pm 2.08$ g; $t_{0d} = 5.5 \pm 0.2$, $t_{10d} = 7.5 \pm 0.23$, $t_{30d} = 8.60 \pm 0.25$ mm, respectively) (Fig. 2A, B). Weight recovery and joint deinflammation were significantly higher than that of the non-treated arthritic rat group.

In contrast to the above-mentioned groups, the group of rats that received tobacco-hsp65 leaves as food markedly increased their body weight ($t_{0d} = 189.2 \pm 4$, $t_{10d} = 169.6 \pm 2.8$, $t_{30d} = 232.33 \pm 1.7$ g), and the size of their joints decreased significantly ($t_{0d} = 5.52 \pm 0.1$, $t_{10d} = 7.76 \pm 0.19$, $t_{30d} = 6.3 \pm 0.05$ mm) (Fig. 2A, B). Weight recovery and reduction in joint inflammation was significantly higher with this treatment than with the other treatments, with the animals almost reaching the joint values of the “healthy” individuals.

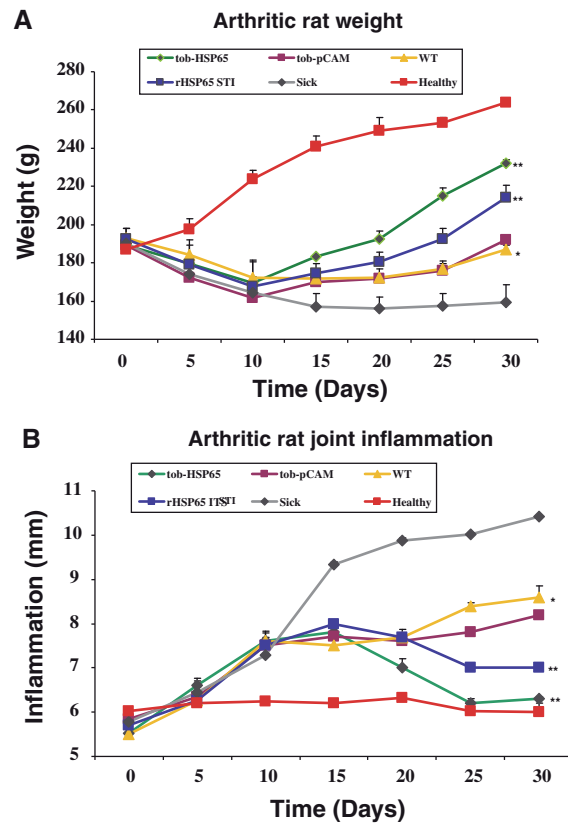


Fig. 2 Effect of oral administration of mycobacterial HSP65 protein expressed in tobacco plants after the development of adjuvant induction arthritis (AIA) on weight (**A**) and joint inflammation (**B**). On day 0, rats were immunized with 2 mg of *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37Ra)/rat in Freund’s complete to induce AIA. On day 10, treatment was started with oral administration of transgenic tobacco plants containing the *hsp65* gene (*tob-hsp65*), tobacco-pCAMBIA 2301 plants (*tob-pCAM*), wild-type tobacco plants (*WT*), and plants containing the recombinant Hsp65 protein (*rHSP65-STI*). Healthy and diseased control rats received no treatment, and on day 30, rats were killed by decapitation. The rats were examined daily. Student’s *t* test results are expressed as the mean \pm standard deviation. **P* < 0.05 was considered to be significant, ***P* < 0.01 when compared to the control groups

Animals treated with rHSP65-STI showed a similar behavior as those fed tobacco-hsp65 leaves, with a weight gain ($t_{0d} = 192.4 \pm 2.8$, $t_{10d} = 167.8 \pm 12.81$, $t_{30d} = 192.66 \pm 6.11$ g) and reduced inflammation ($t_{0d} = 5.7 \pm 0.4$, $t_{10d} = 7.5 \pm 0.05$, $t_{30d} = 7.0 \pm 0.06$ mm) (Fig. 2A, B). However, these values are significantly different from those in rats receiving tob-hsp65 leaves (see Fig. 2A, B) whose weight recovery and reduction in joint inflammation were relatively better.

Discussion

Our results demonstrate that tobacco plants infected with *A. tumefaciens* carrying the plant expression plasmid pChsp65 stained positive in the GUS histochemical assay. We detected the expression of the GUS protein in different tissues of the plants, principally in veins (vascular tissue) and trichomes. This expression is in agreement with that reported by Jefferson et al. (1987) using the GUS gene under control of the 35S promoter.

The mycobacterial *hsp65* gene and the recombinant protein have been used as a potential therapeutic agent (gene therapy) to treat animals with autoimmune diseases, such as AIA in rats and diabetes in non-obese mice (Elias et al. 1990; Cobelens et al. 2000; Nomaguchi et al. 2002; Santos-Júnior et al. 2007). Some studies report that the oral administration of the HSP65 protein to arthritic rats induces an important weight recovery and reduction of joint inflammation together with a reduction in the cartilage- and bone-destroying process (Billingham et al. 1990; Cobelens et al. 2000). Our results with respect to the oral administration of transgenic plant tissues that express the HSP65 protein are in agreement with those of Cobelens et al. (2000), who reported the oral administration of the recombinant protein (expressed in *E. coli*) in conjunction with a soybean trypsin protein to rats with AIA. We founded a significant effect on recovery weight (Fig. 2A) and, in the case of joint inflammation, the results were also similar but obtained higher values since changes were observed from the first administration (Fig. 2B). One important point is that we fed the rats plant tissue without trypsin inhibitor and in quantities of 10 µg. One explanation for these interesting results is the possibility of a synergistic effect between the HSP65 protein and some compounds present in tobacco plants. We also observed a deinflamatory effect in those rats fed with WT tobacco tissue or tobacco-pCAMBIA 2301 tissue; this could be due to the effect of nicotine and/or scopolin, both of which have been shown to have anti-inflammatory properties (Kalra et al. 2004; Kim et al. 2004). The oral administration of transgenic tobacco HSP65 in five doses to arthritic rats was enough to counteract the effects of the disease symptoms. This effect could ultimately be the consequence of a modulation of the immune system (van Eden Broek 1989; Cobelens

et al. 2000; Kalra et al. 2004; Kim et al. 2004; van Eden et al. 2005).

Our data suggest that *M. leprae* HSP65 protein produced by plant tissues was successful in mitigating the effects of AIA, perhaps with the assistance of synergistic effects with plant metabolites. These results confirm the heterologous expression of the mycobacterial HSP65 protein in tobacco plants and its potential effect when orally administered for the treatment of arthritis. To the best of our knowledge, this is the first report of a synergistic effect in transgenic plants.

Acknowledgments We would like to thank Dr. T.P. Gillis from The National Hansen's Disease Programs, Baton Rouge, Louisiana, USA for his kind donation of monoclonal antibody IIIE9 and Mr. Robert Butler from the National Institute for Medical Research, MRC, London, UK for his donation of recombinant *Mycobacterium leprae* HSP65 protein.

References

- Baumann G, Raschke E, Bevan M, Schöffl F (1987) Functional analysis of sequences required for transcriptional activation of a soybean heat shock gene in transgenic tobacco plants. *EMBO J* 6:1161–1166
- Billingham ME, Carney SL, Butler R, Colson MJ (1990) A mycobacterial 65-kD heat shock protein induces antigen-specific suppression of adjuvant arthritis, but is not itself arthritogenic. *J Exp Med* 171:339–344
- Blass S, Engel JM, Burmester GR (1999) The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42:2499–2506
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochem* 72:248–254
- Brown JR, Doolittle WF (1997) *Archaea* and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:456–502
- Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H (1999) Human 60 kDa heat shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162:3212–3219
- Cobelens PM, Heijnen CJ, Nieuwenhuis EES, Kramer PG, van der Zee R, van Eden W, Kavelaars A (2000) Treatment of adjuvant-induced arthritis by oral administration of mycobacterial HSP65 during disease. *Arthritis Rheum* 43:2694–2702
- Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ (2009) Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* 14(12):669–679
- Doyle JJ, Doyle JJ (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 9:11–15
- Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR (1990) Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1576–1580

- Gillis TP, Buchanan TM (1982) Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 37:172–178
- Haque MA, Yoshino S, Unada S, Nomaguchi H, Tokunaga O, Kohashi O (1996) Suppression of adjuvant arthritis in rats by induction of oral tolerance to Mycobacterial 65-kDa heat shock protein. *Eur J Immunol* 26:2650–2656
- Hoeckema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoot RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of Vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179–180
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6(13):3901–3907
- Jones PG, Sutton JM (1997) Plant molecular biology—essential techniques. Wiley, New York, pp 202–204
- Jones DB, Coulson AF, Duff GW (1993) Sequence homologies between Hsp60 and autoantigens. *Immunol Today* 14:115–118
- Kalra R, Singh SP, Pena-Philippides JC, Langley RJ, Razani-Boroujerdi S, Sopori ML (2004) Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of nicotine administered by patch in an animal model. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(3):563–568
- Kim HJ, Jang SII, Kim YJ, Chung HT, Yun YG, Kang TH, Jeong OS, Kim YC, Kim YC (2004) Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE₂ from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia* 75(3–4):261–266
- Kingston AE, Hicks AC, Colston MJ, Billingham MEJ (1996) A 71-kD heat shock protein (hsp) from *Mycobacterium tuberculosis* has modulatory effects on experimental rat arthritis. *Clin Exp Immunol* 103:77–82
- Kohm AP, Fuller KG, Miller SD (2003) Mimicking the way to autoimmunity: an evolving theory of sequence and structural homology. *Trends Microbiol* 11:101–105
- Life P, Hassell A, Williams K, Young S, Bacon P, Southwood T (1993) Responses to Gram negative enteric bacterial antigens by synovial T cells from patients juvenile chronic arthritis: recognition of heat shock protein hsp60. *J Rheumatol* 20:1388–1396
- Lopes-Silva C, Bonato V, dos Santos-Junior R, Zérate Bladés CR, Sartori A (2009) Recent advances in DNA vaccines for autoimmune diseases. *Expert Rev Vaccines* 8:239–252
- López-Gómez R, Gómez-Lim MA (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango masocarp. *Hortic Sci* 27:440–442
- Lukcas KV, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ (1993) Tumor cells transfected with a bacterial heat shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. *J Exp Med* 178:343–348
- Lunardi C, Bason C, Navone R (2000) Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med* 10:1183–1186
- Mattanovich D, Rüker F, Machado A, Laimer M, Regner F, Steinkeller H (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* sp. by electroporation. *Nucleic Acids Res* 17:6747
- Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991–1045
- McIntosh KB, Hulm JL, Young LW, Bonham-Smith PC (2004) A rapid *Agrobacterium*-mediated *Arabidopsis thaliana* transient assay system. *Plant Mol Biol Rep* 22:53–61
- Michaluart P, Abdallah KA, Lima FD et al (2008) Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Gene Ther* 15:676–684
- Moctezuma JF (2002) Manifestaciones articulares de la artritis reumatoide. *Revista Mexicana de Reumatología* 17:211–219
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nölke G, Schneider B, Fischer R, Schillberg S (2005) Immunomodulation of polyamine biosynthesis in tobacco plants has a significant impact on polyamine levels and generates a dwarf phenotype. *Plant Biotechnol J* 3:237–247
- Nomaguchi H, Yogi Y, Kawatsu K, Okamura H, Ozawa Y, Kasatani T (2002) Prevention of diabetes in non-obese diabetic mice by a single immunization with *Mycobacterium leprae*. *Jpn J Leprosy* 71:31–38
- Prescott S, Jackson AM, Hawkyard SJ, Alexandroff AB, James K (2000) Mechanisms of action of intravesical Bacille Calmette Guérin: local immune mechanisms. *Clin Infect Dis* 3:591–593
- Quintana FJ, Carmi P, Cohen IR (2003) DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. *J Immunol* 17:3533–3541
- Ramessar K, Rademacher T, Sack M, Stadlmann J, Platis D, Stiegler G, Labrou N, Altmann F, Stöger JME, Capell T, Christou P (2009) Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(10):3727–3732
- Ribeiro AM, Bocca AL, Amaral AC et al (2009) DNAhsp65 vaccination induces protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Vaccine* 27:606–613
- Rosada R, de la Torre LG, Frantz FG et al (2008) Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. *BMC Immunol* 9:1–13
- Rudolph U, Rzepka R, Batsford S et al (1997) The B cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. Increased frequencies of IgG + B cell specific for mycobacterial heat-shock protein 60 or human type II collagen in synovial fluid and tissue. *Arthritis Rheum* 40:1409–1419
- Santos-Junior RR, Sartori A, Bonato VL, Coelho Castelo AA, Vilella CA, Zollner RL, Silva CL (2007) Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression. *Clin Exp Immunol* 149:570–578
- Sewell DL, Reinke EK, Hogan LH, Sandor M, Fabry Z (2002) Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. *Immunol Lett* 82:101–110
- Shoenfeld Y, Vilner Y, Coates ARM, Ranch J, Shani D, Pinkhas J (1986) Monoclonal antibodies react with DNA, and monoclonal anti-DNA autoantibodies react with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 66:255–261
- Souza PRM, Zárate-Bladés CR, Hori JI et al (2008) Protective efficacy of different strategies employing *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 against tuberculosis. *Expert Opin Biol Ther* 8:1255–1264

- Srivastava P (2002) Roles of heat-heat proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2:185–194
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ (2000) Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 182:302–305
- Thompson SJ, James NF, Siew LK, Webb GR, Jenner PJ, Colston MJ, Elson CJ (1998) An immunodominant epitope from mycobacterial 65-kDa heat shock protein protects against pristane-induced arthritis. *J Immunol* 160:4628–4634
- Thoms CJ, Morris JA (1985) Common epitopes between mycobacteria and certain host tissue antigens. *Clin Exp Immunol* 61:323–328
- Ulmansky R (2002) Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion. *J Immunol* 168:6463–6469
- van Eden W (1988) Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331:171–173
- van Eden Broek W (1989) Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kDa mycobacterial heat shock protein. *J Exp Med* 170:449–466
- van Eden W, Haloshitz J, Nevo A, Frenkel A, Klajman A, Cohen JR (1985) Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5117–5120
- van Eden W, van der Zee R, Prakken B (2005) Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5:318–330
- Walmsley AM, Arntzen CJ (2000) Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 11:126–129
- Zárate-Bladés CR, Deperon-Bonato VL, Volve de Silveira EL et al (2009) Comprehensive gene expression profiling in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* following DNAhsp65 immunotherapy. *J Gene Med* 11:66–78

CAPÍTULO II

RESULTADOS NO PUBLICADOS

I. INTRODUCCION

1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. La PCR es un método que permite la amplificación exponencial de secuencias de interés de ADN a partir de una molécula de ADN molde (Andersen et al., 2004). Para llevar a cabo el proceso de amplificación son necesarios ciertos elementos y condiciones como es el uso de la enzima ADN polimerasa y de un par de oligonucleótidos, cada uno aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, los cuales son complementarios a una secuencia molde de las dos hebras del ADN (Akilesh et al., 2003).

En la actualidad, la técnica de PCR es considerada como el mejor método de análisis semi-cuantitativo, debido a su alta sensibilidad en la síntesis de secuencias específicas (Bas et al., 2004). Sin embargo, existen inconvenientes que hacen que este método sea considerado solo como una herramienta cualitativa y no cuantitativa, como es el obtener un alto nivel de falsos positivos por contaminación y a que la cantidad de producto no relacionado con la cantidad de ADN de entrada (Bustin et al., 1999). Para resolver este tipo de problemas se han generado variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, como la optimización de temperaturas más precisas de alineamiento y el diseño oligonucleótidos más precisos para unirse al ADN molde, lo que ha dado lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (Bustin y Nola, 2004).

1.2 PCR cuantitativa.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de secuencias de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que se desea amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula

fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR es proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando (Bustin, 2000).

Hoy en día, la técnica de PCR en tiempo real ha sido considerada como una de las mejores opciones para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales (Dorak, 2008). Sin embargo, una limitación de la PCR en tiempo real es que se debe utilizar ADN como secuencia molde, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar ARN de una manera similar. El uso de la enzima transcriptasa reversa adicionada a esta técnica ha dado solución a este problema, ya que su utilización permite la generación de cADN a partir de una plantilla de mRNA (Valasek y Repa, 2005). En muchos casos este método se ha utilizado para medir los niveles de ARNm de un particular en condiciones diferentes. Invertir el análisis de la transcriptasa-PCR del mRNA se refiere a menudo como "RT-PCR tiempo real" (Bustin y Nola, 2004).

1.3 RT-PCR en tiempo real.

La RT-PCR en tiempo real, es una de las herramientas de apoyo a la era genómica, ya que se ha convertido en el método de elección para la detección de mRNA (Bustin, 2000). Existen varios factores que han contribuido a que esta tecnología adquiriera mayor aceptación en la investigación debido a que permite: (i) establecer la homogeneidad de un ensayo y evitar la necesidad de un procesamiento post-PCR, (ii) un amplio rango dinámico en la comparación directa entre RNAs que difieren ampliamente en sus abundancia, y (iii) y ser un método cuantitativo y cuantitativo (Ginzinger, 2002).

Esta técnica tiene amplias aplicaciones en la investigación científica y como herramienta de diagnóstico. Vale la pena resaltar que se han hecho grandes logros en el estudio de virus que afectan al hombre y a los animales (Bustin, 2005), así como en la investigación de bacterias y hongos patógenos, pues esta prueba ofrece una gran sensibilidad y especificidad en menor

tiempo y a un menor costo. También es ampliamente utilizada en identificar mutaciones o polimorfismos genéticos y sus resultados en el análisis de los cambios de la curva de fusión (Valasek y Repa, 2005). Asimismo esta alternativa se utiliza para acceder a datos relevantes a la biodinámica de los organismos que producen enfermedades (Clementi et al., 1993). Sin embargo uno de los campos de mayor aplicación de esta técnica es la investigación de cambios en la expresión genética de células a través de la cuantificación de su mRNA, permitiendo asociar dichos cambios a estados fisiológicos celulares, presencia de fármacos, agentes infecciosos, etc (Bustin et al., 2005).

Una ventaja adicional de esta herramienta es utilización de pequeñas cantidades de muestra de tejidos complejos para lograr obtener grandes resultados. Esto la hace una alternativa ideal cuando se usa conjuntamente con microcirugía laser para hacer biopsias de tejidos o células específicas y estudiar, por ejemplo, el comportamiento de células cancerosas (Edwards et al., 2004; Johnson et al., 2005). Investigaciones importantes reportan que muestras celulares provenientes del mismo origen patológico pueden presentar patrones de expresión de mRNA altamente heterogéneo (Goidin et al., 2001), por lo que la aplicación de esta herramienta juega un papel crucial en la normalización de dicho comportamiento.

La técnica de la RT-PCR en tiempo real también es usada en otros campos como la investigación forense y la bioseguridad. En estos casos las investigaciones se basan en la identificación con una alta sensibilidad y especificidad de organismos patógenos o saprófitos difundidos en el medio ambiente. La caracterización de pequeñas cantidades de material genético procedente de tales organismos hace posible conocer su procedencia e identificar su dinámica (Johnson et al., 2005).

En enfermedades crónico-degenerativas, esta herramienta es considerada como una de las mejores opciones para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas (Dorak, 2008). En la artritis reumatoide, el análisis del perfil citocínico juega un papel central en la caracterización de vías inflamatorias relacionadas con la enfermedad y la identificación de propiedades funcionales de poblaciones celulares inmunológicas. La técnica de RT-PCR en tiempo real por sí misma es un método

cuantitativo que permite determinar niveles de expresión de transcritos específicos de citocinas en experimentos *in vivo* e *in vitro*, los cuales son difícil de obtener por métodos convencionales, debido al tamaño reducido de las muestras obtenidas en las biocias que dificulta la detección de proteínas citocinicas y el mRNA (Blaschke et al., 2000).

Otras investigaciones, ha reportado el empleo de la técnica de RT-PCR tiempo real para estudiar la expresión cutánea de varias citocinas inmunomoduladoras como la IL-10 durante la terapia experimental de la psoriasis, demostrando que esta técnica es adecuada en el monitoreo farmacogenómico (Baschke et al., 2000). En resumen, la técnica de RT-PCR en tiempo real es una herramienta sensible y rápida para cuantificar la expresión del ARNm, incluso con pequeñas cantidades de tejido.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 Sacrificio y toma de muestras

A los 15 días de inducción y de presentar el cuadro clínico de la fase crónica (pérdida de peso e inflamación de articulaciones) se realizó el primer sacrificio de dos animales de cada grupo antes de aplicar el tratamiento. Así mismo, de estos animales se realizó la toma de muestras (ganglio poplíteo, bazo y suero), para la extracción de RNA total (Figura 4). El sacrificio final de todos los grupos se realizó a los 45 días después de la inducción de la cual, se tomaron las mismas muestras y parámetros farmacológicos.

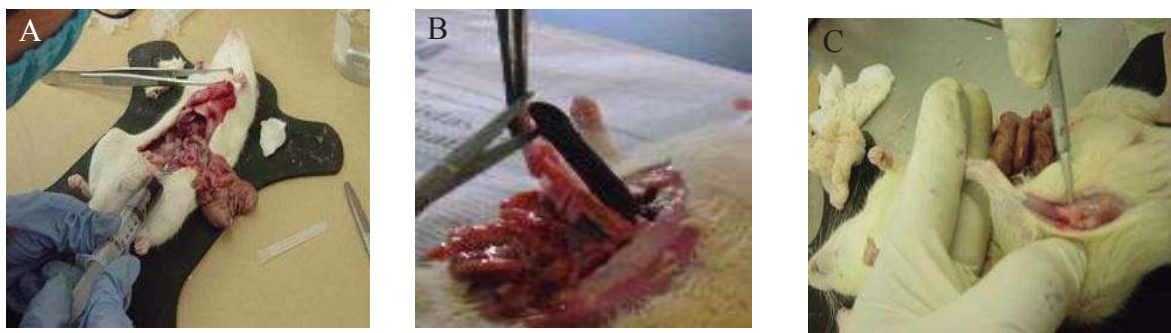


Figura 4. **Toma de muestras de ratas artríticas.** A) Toma de muestras sanguíneas, B) Disección de bazo y C) Extracción de ganglio poplíteo.

2.2 Extracción de ARN de ganglio Poplíteo

La extracción del ARN de ganglios poplíteos se realizó mediante Trizol[®] Reagent invitrogen. 0.1 gramos de tejido (5-10 millones de células) de cada muestra fue homogenizado con 500µl de Trizol al ser pasado través de una jeringa de insulina de 1 ml. El homogenizado fue transferido a un tubo de 1.5 ml para centrifugarse a 12 000 rpm por 10 minutos y rescatar la fase acuosa, la cual fue transferida a un nuevo tubo al que se le adicionaron 200 µl de cloroformo (CHCl₃) para incubarse durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 12 000 rpm por 5 minutos a 4 °C, de las cuales se recuperó la fase acuosa para transferirse a un nuevo tubo al que se le adicionaron 10 µl de glicógeno. Para la precipitación del material genético se adicionó 1 ml de

isopropanol a cada muestra, se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos en nitrógeno líquido, para finalmente centrifugarse a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Después de centrifugar las muestras y desechar el sobrenadante, se realizaron dos lavados con etanol al 70% por centrifugación a 7 500 rpm durante 1 minuto a 4 °C. Con la pastilla obtenida después del lavado esta fue secada al vacío y resuspendida con agua libre de RNasas.

2.3 Amplificación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por RT-PCR tiempo real

Para la síntesis de ADN complementario (cDNA) se utilizaron 3 µg de ARN mensajeros (ARNm) de cada una de las muestras de ganglio, 3 µM de oligonucleótido dT₁₄, 200 unidades de la enzima SuperscriptTM RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Gibco BRL), 1X de solución tampón para la RT (Gibco BRL), 10 mM DTT, 500 µM dNTPs (Promega), 60 unidades de un inhibidor de RNasas A, B y C (RNasin, Promega) y agua DEPC hasta un volumen final de 20 µl.

Para establecer la RT-PCR en tiempo real, es importante señalar primeramente que esta prueba, permite el seguimiento de la reacción en tiempo real mediante medidas de fluorescencia y, por lo tanto, se puede identificar fácilmente la fase exponencial de la síntesis del producto amplificado (Figura 5). Esto permite el análisis de los datos en esta fase, donde la eficiencia de la reacción es constante. Además, durante la fase exponencial, el incremento de la fluorescencia es proporcional al crecimiento exponencial del producto amplificado, por lo que la cantidad de material inicial en cada muestra se puede calcular con una gran precisión, mediante la determinación del punto de corte (C_p, crossing-point) de cada amplificación. Este punto de corte, es el ciclo en el cual la fluorescencia aumenta por encima del background y coincide con el máximo de la segunda deriva de la fluorescencia con respecto al ciclo de la reacción. El ciclo en el que la segunda derivada es máxima (C_p), se encuentra en la fase exponencial, puesto que la señal de fluorescencia aumenta durante esta fase y disminuye cuando la reacción comienza a entrar en la fase de saturación (plateau). Para monitorear cada una de estas fases el termociclador de tiempo real es acoplado a un software.

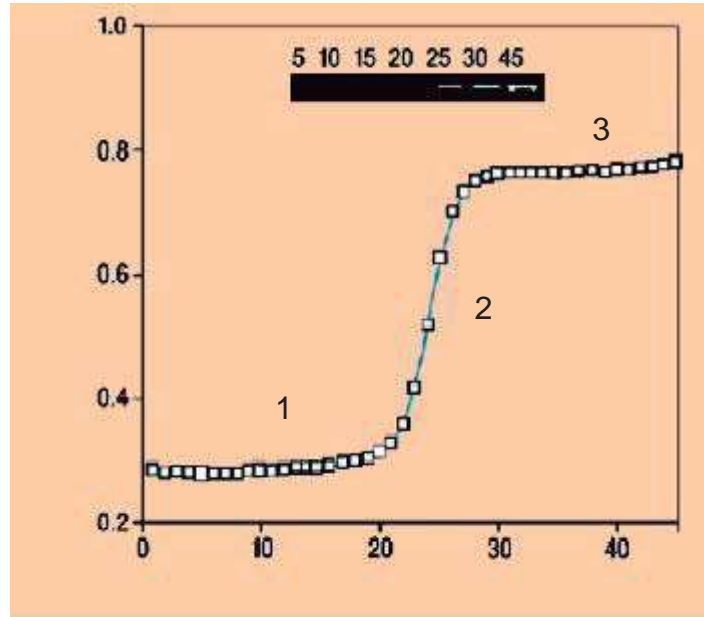


Figura 5. **Seguimiento de la PCR en tiempo real.** La reacción de PCR consta de tres fases: (1) Fase inicial, donde la cantidad de producto es indetectable. (2) Fase exponencial, en esta fase el aumento de fluorescencia es proporcional al logaritmo de la concentración de producto (3) Fase de saturación, en la cual el valor de fluorescencia no es representativo de la cantidad inicial de producto. Cp, corresponde al punto de corte.

Para el seguimiento y el análisis de la reacción se pueden utilizar agentes que, al intercalarse en la molécula de doble cadena DNA, puedan emitir fluorescencia, como pueden ser el bromuro de etidio, YO-PRO-1 y el SYBR Green I. En el presente trabajo se empleó el SYBR Green I como fluoróforo, el cual se une al surco menor del DNA de doble cadena de una manera independiente de la secuencia.

El SYBR Green I en disolución emite poca fluorescencia, pero al unirse al DNA de doble cadena su fluorescencia aumenta más de 100 veces. Así, la fluorescencia emitida por el fluoróforo es proporcional a la concentración de cDNA. La medida de la señal de fluorescencia al final de cada etapa de elongación permite la visualización del producto sintetizado de forma continua (Figura 5 y 6). La señal aparece claramente a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo de la concentración de partida.

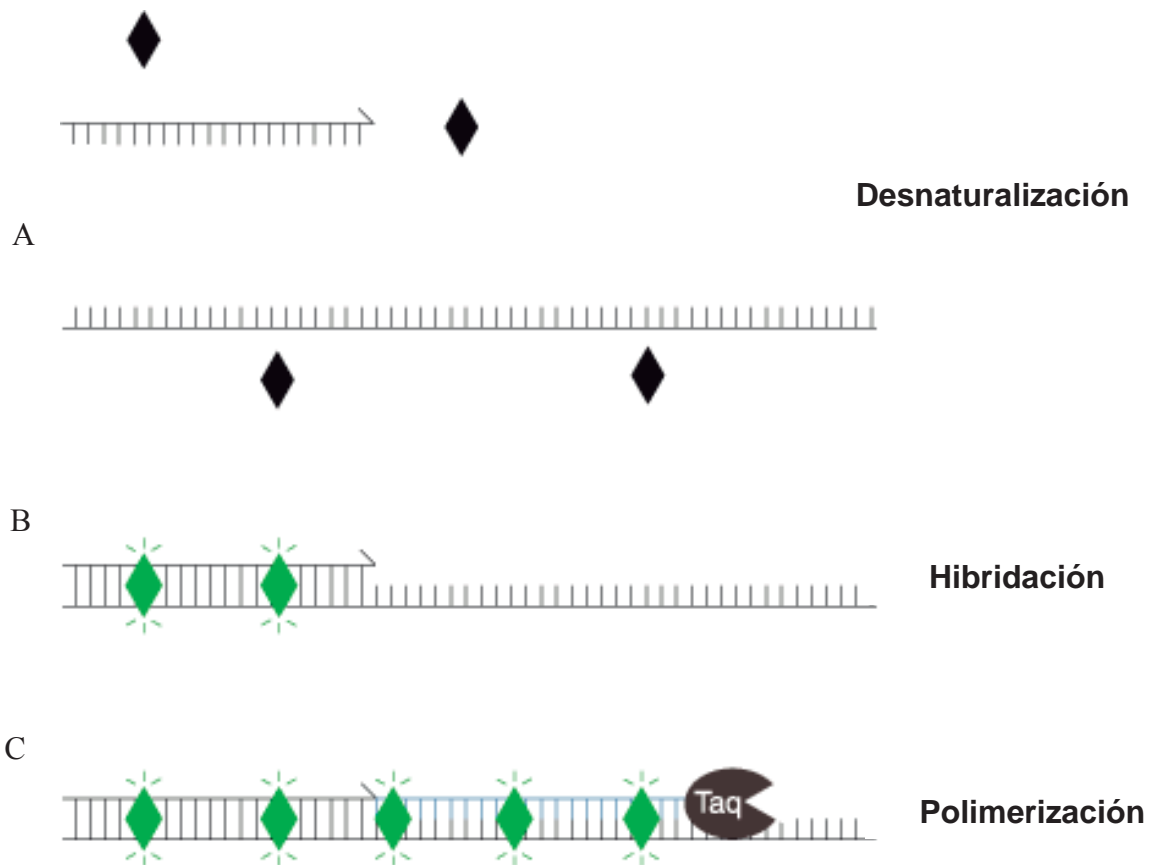


Figura 6. **Emisión de fluorescencia del SYBR Green I durante la PCR.** (A) Durante la desnaturalización, el SYBR Green I no unido, emite poca fluorescencia. (B) En la fase de hibridación de los oligonucleótidos, unas pocas moléculas del fluoróforo se unen a la doble cadena de cDNA-Oligonucleótido, dando lugar a un ligero aumento de la fluorescencia. (C) Durante la polimerización, un mayor número de moléculas de SYBR Green I se unen al cDNA recién sintetizado, y el incremento de la fluorescencia puede ser monitorizado en tiempo real. (D) La desnaturalización hace que las dos hebras de cDNA se separen, liberándose el fluoróforo y cayendo de nuevo la fluorescencia a la señal de inicio

En el presente trabajo, el termociclador en tiempo real utilizado fue el Lightcycler (Roche). La PCR se llevó a cabo en pequeños capilares de vidrio, que se introducen en un rotor tipo carrusel, y se calientan y enfrían por corrientes de aire. El carrusel rota haciendo pasar un haz de luz azul de 470 nm emitido por un diodo a través de los capilares, y la fluorescencia se lee por diodos de fotodetección. Esta señal se analiza por el software (versión 3.5), permitiendo seguir la reacción en tiempo real y la cuantificación del producto amplificado.

Para la cuantificación génica por tiempo real de β -actina, IL-1 β , IL-10 y TNF- α , se empleó el kit LC-Fast Start Reaction Mix (Roche). Este kit usa el SYBR Green I para la detección del DNA de doble cadena y una Taq polimerasa que se activa por calor, la cual minimiza la amplificación de productos no deseados. Además, este kit contiene dUTP en lugar de dTTP y la enzima termolábil uracil-N-glicosilasa. Estos dos elementos se introducen para eliminar cualquier contaminación de cDNA previamente amplificado, ya que la uracil-N-glicosilasa degrada selectivamente aquellas moléculas de cDNA que contienen dUTP, impidiendo su posterior amplificación, pero no actúa sobre el cDNA diana (que contiene dTTP).

2.3.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR

En la cuadro 4 se muestran las características de los oligonucleótidos utilizados y sintetizados por Gibco-BRL para el análisis de la expresión de interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 10 (IL10), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y β -actina. Los oligonucleótidos fueron sintetizados utilizando el programa Oligo 4.0. Para asegurarnos de que los oligonucleótidos escogidos eran específicos, sus secuencias se compararon mediante el programa FASTA que incluye las secuencias recogidas en las bases de datos EMBL (<http://www.embl-hiedelberg.de>).

Cuadro 4. **Características de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión génica (Invitrogen Custom Primers).**

Nombre	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Longitud	% GC	Tm
IL-1 β				
Forward	TGGGCCTCAGG GGA AGA A	19	58	65°C
Reverse	TGGGGAAGTGTGCAGACTCAAAC	24	50	66°C
Producto		176		
IL-10				
Forward	CATCCGGGGTGACAATAACTG	21	52	62°C
Reverse	CCTGGGGCATCACTTCTAC	19	58	58°C
Producto		226		
TNF- α				
Forward	ACTGGCGTGTTCATCCGTTCTCTA	24	50	66°C
Reverse	CCCGCAATCCAGGCCACTACTTC	23	61	70°C
Producto		216		

β -Act				
Forward	CTGGGACGATATGGAGAAGATTTG	24	46	63°C
Reverse	CATGGCTGGGGTGTGAAGG	20	60	66°C
Producto				

La especificidad de los oligonucleótidos se comprobó mediante la obtención por PCR de bandas únicas del tamaño esperado en un gel de agarosa. Los oligonucleótidos diseñados y los escogidos (excepto los de la β -actina), se situaron flanqueando intrones para evitar contaminaciones con DNA genómico, dificultando su amplificación debido al gran tamaño del fragmento, y en el caso de que amplificaran poder detectar su presencia por análisis de electroforesis.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, conteniendo 1 μ l de cDNA (diluido 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10 000), 0,5 μ M (0.25 μ l) de cada primer, 1 μ l de la mezcla de LC-Fast Start Reaction Mix SYBR Green I (que contiene Taq polimerasa, tampón de reacción y una mezcla de dATPs, dCTPs, dGTPs y dUTPs y 3 mM de $MgCl_2$). El volumen final fue completado con 7.5 μ l de agua bidestilada.

La mezcla de la reacción se introdujo en los capilares (LightCycler Capillaries, Roche) por centrifugación durante 10 s a 3000 rpm.

Los capilares con la mezcla de reacción se colocaron en el termociclador en tiempo real LightCycler de Roche, donde se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real. Los pasos seguidos fueron:

1. Desnaturalización y activación de la Taq polimerasa a 95°C durante 10 min.
2. Amplificación (40 ciclos). La señal de fluorescencia se detecta al final de cada paso de elongación. Las condiciones de la amplificación son: Generación de una curva de desnaturalización, mediante el calentamiento a 95°C e inmediato enfriamiento a 60°C, manteniéndose esta temperatura durante 15 s, tras lo cual se realiza un aumento paulatino de la temperatura desde los 60°C hasta los 95°C, a una velocidad de 0,1°C/s y midiéndose la fluorescencia de manera continua (Cuadro 5).

Cuadro 5. Condiciones de amplificación RT-PCR tiempo real.

Desnaturalización		Hibridación	Elongación
Temperatura (°C)	95	60 (62)	72
Tiempo (s)	10	10	10
Velocidad (°C/s)	20	20	20,0
Adquisición de la señal	No	No	single

2.3.2 Preparación de los estándares de cDNA

Para determinar la concentración de cDNA de IL-1 β , IL-10, TNF- α y β -actina se incluyó una curva estándar en cada una de las reacciones. La curva estándar de cada uno de estos genes se construyó a partir de cDNA de concentración conocida (cDNA estándar). Este cDNA se preparó, para cada uno de los genes analizados, mediante amplificación de cDNA obtenido de tejido de bazo estimulado con lipopolisacárido (como se describe en el apartado de la transcripción reversa).

2.3.3 Determinación de la concentración inicial de cDNA

A partir de diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000, 1: 10 000...) de cada uno de estos estándares de cDNAs se construyeron las curvas estándar que constaban de cuatro puntos por duplicado. Estas curvas se generaron en el Lightcycler mediante medidas de fluorescencia y teniendo en cuenta que existe una respuesta lineal en un amplio rango de ciclos. El valor del punto de corte (Cp) es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración inicial. Así pues, la curva de calibración se genera mediante la representación de los valores de Cp frente al logaritmo de la concentración inicial los estándares, obteniéndose de este modo una línea recta (Figura 7). La concentración de cDNA inicial presente en nuestras muestras se obtuvo interpolando el Cp de cada una de ellas en esta curva de calibración.

Los valores de cDNA de IL-1 β , IL-10 y TNF- α , se normalizaron expresándolos como el cociente entre el número de copias inicial de cDNA de dichos genes y el número de copias inicial de cDNA de la β -actina (Método Pfaffl). La β -actina, fue utilizada como gen de expresión constante, (gen “housekeeping”), el cual codifica para la α -tubulina, un componente

del citoesqueleto. La utilización de este nos permitió corregir las posibles diferencias cuantitativas y cualitativas ocasionadas por el manejo de las muestras (errores en el pipeteo, en las diluciones, etc...), la posible degradación del ARN, debido al almacenamiento, a su manipulación, a las variaciones en la eficiencia de la transcripción reversa, a las diferencias en la calidad de las muestras, y a variaciones en la cantidad inicial tanto de mARN, para la transcripción reversa, como en la de cDNA, y para la PCR.

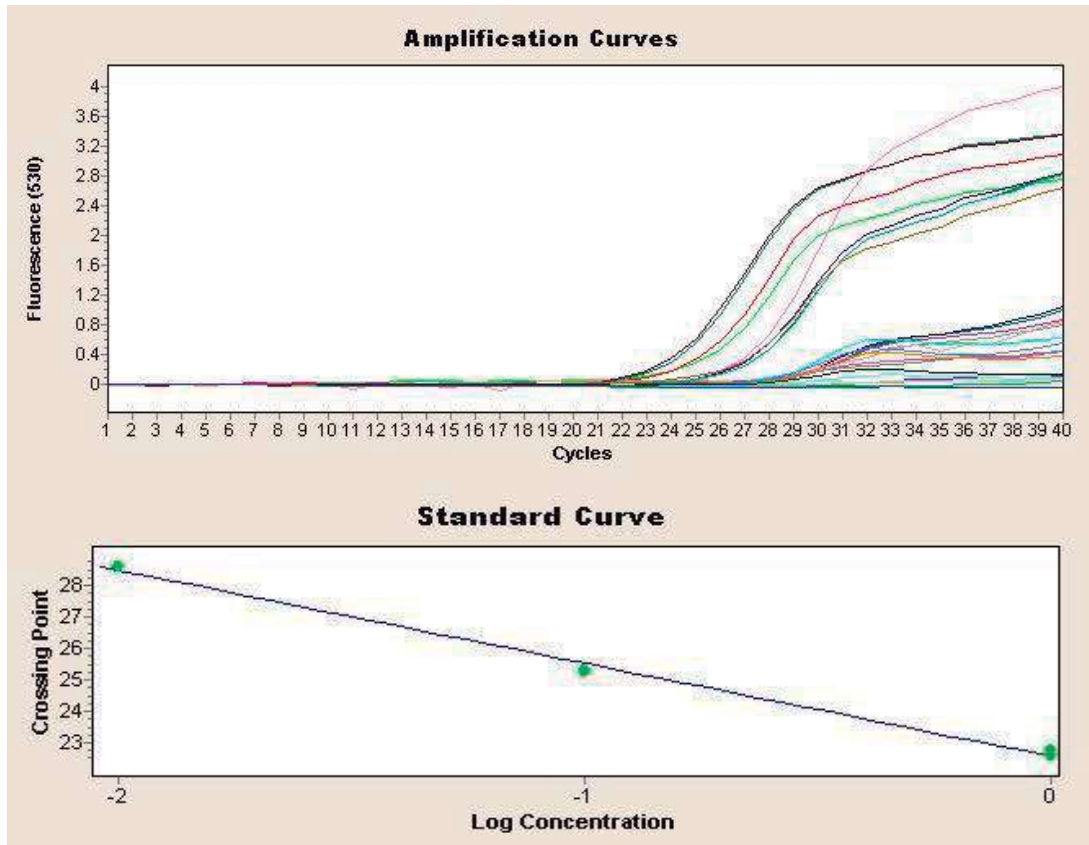


Figura 7. Curva y línea recta de calibración de estándares.

2.4 Cuantificación relativa (Método Pfaffl)

Es el método en el cual, la concentración del blanco es expresada como una relación del blanco con respecto al control, tomando en cuenta las diferencias de sus eficiencias de control como del gen problema. La eficiencia fue calculada acorde a la ecuación $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ con un valor ideal 2.

$$\text{Relación} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta C_t \text{ blanco (control-tratado)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t \text{ ref(Control-tratado)}}$$

2.5 Análisis estadístico

Para establecer el efecto de la proteína HSP65 en el peso corporal e inflamación articular, así como en los niveles citocínicos en los distintos tratamientos se estableció la prueba estadística de t-Student. $p < 0.05$ considerada estadísticamente significativa. Los valores son representados como la media \pm DS (n=5).

III. RESULTADOS

3.1. Cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real

La cuantificación de los niveles de mRNA es un aspecto importante en los estudios de expresión y actividad génica. Mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real se realizó la cuantificación de los niveles de mRNA de IL-1 β , IL-10 y TNF- α en las 30 muestras de tejidos (ganglio) de ratas artríticas tratadas oralmente con la proteína HSP65 expresada en tabaco. Con el propósito de estudiar el comportamiento y relación en la modulación del desarrollo de la artritis inducida por adyuvante, se determinaron los niveles de expresión de estos genes tras una previa optimización de las condiciones de PCR que incluyó el diseño de oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes, la temperatura media de éstos y tiempos de la PCR. Todo ello permitió llevar a cabo la cuantificación génica de estos componentes con una alta eficiencia, sensibilidad y especificidad.

3.1.1 Eficiencia de la amplificación en la PCR cuantitativa

La eficiencia de una reacción de PCR se define como el porcentaje de conversión de DNA molde a producto amplificado por ciclo. El máximo valor para la eficiencia es 2, donde todas las moléculas de DNA existentes tras el ciclo anterior son amplificadas en cada ciclo subsiguiente. Para una exacta cuantificación es necesario que la eficiencia de los estándares y de las muestras sea muy similar y de ser posible por encima del 90%, puesto que pequeñas variaciones en la eficiencia de la amplificación conlleva a considerables variaciones en los valores de concentración.

Se determinó la eficiencia de la reacción en una serie de estándares y de muestras. Para ello se realizó, por triplicado, una serie de diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) de cada uno de ellos y se representó el punto de corte (Cp) con respecto al logaritmo de su concentración. La eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la recta resultante de dicha representación. Se obtuvo una eficiencia similar para los estándares y para las muestras en todos los genes estudiados (método de Pfaffl).

$$\text{Eficiencia (E)} = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

Después de N ciclos: relación= $\frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta C_{t \text{ blanco}}(\text{Control-tratamiento})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta C_{t \text{ referencia}}(\text{Control-tratamiento})}}$

$$(E_{\text{referencia}})^{\Delta C_{t \text{ referencia}}(\text{Control-tratamiento})}$$

En este estudio, la eficiencia fue similar para los estándares y para las muestras en todos los genes estudiados (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cálculo de las eficiencias de amplificación en la RT-PCR tiempo real.

Gen	Eficiencia	
	Valor absoluto	Porcentaje
IL-1 β	1,90	95%
IL-10	1,87	93,5%
TNF- α	1,90	95%
β -actina	1,86	93%

3.1.2. Sensibilidad y especificidad de RT-PCR tiempo real

Para determinar la mínima cantidad de cDNA que puede ser cuantificada mediante RT-PCR tiempo real para cada uno de los genes estudiados, se construyó una curva patrón para cada uno de ellos a partir de diluciones seriadas de cDNA de concentración conocida, y la curva comprendía desde el ciclo 19 (Fig. 8). Todas las curvas estándar mostraron coeficientes de correlación superiores a 0,99, lo que indica la existencia de una precisa relación lineal. El límite de detección fue el mismo para todos los genes. Estos datos indican que se trata de una técnica de una gran sensibilidad.

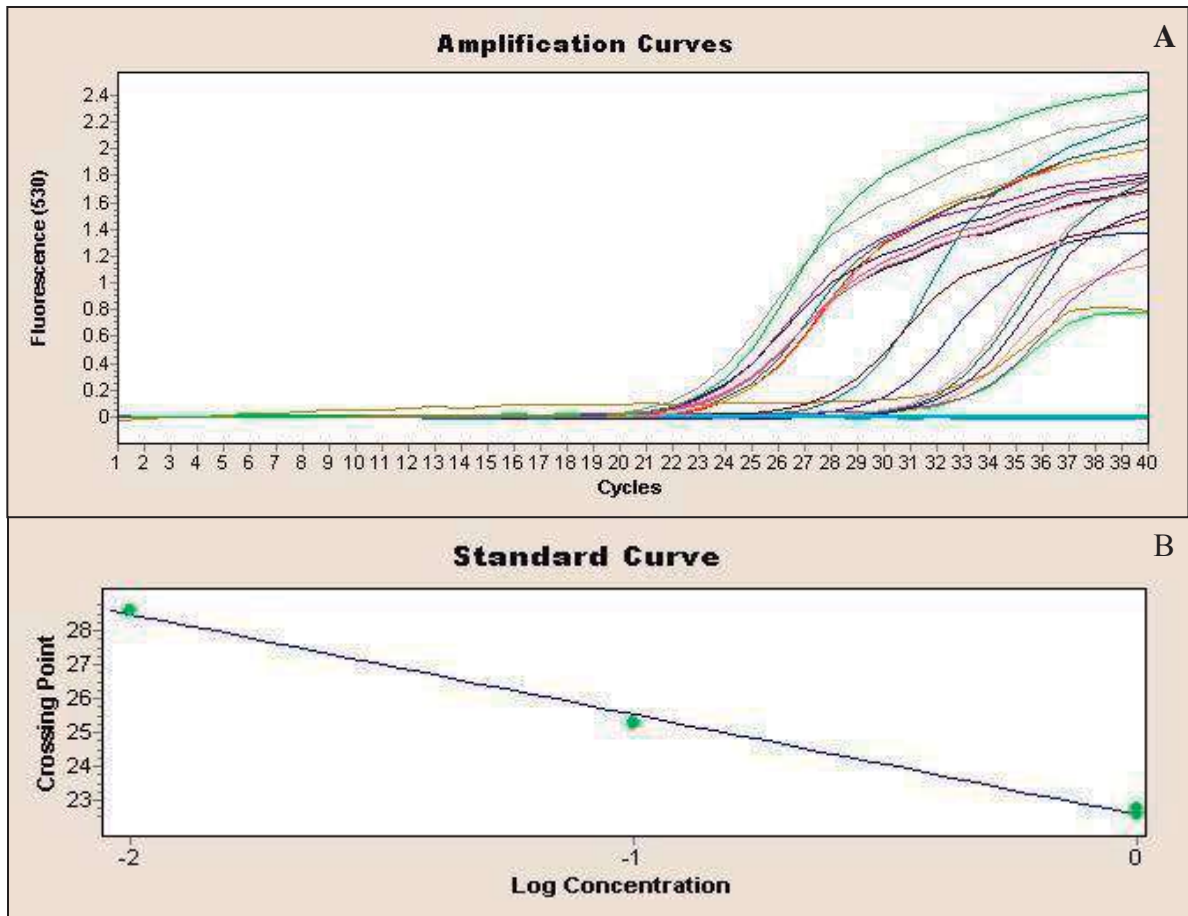


Figura 8. **Determinación de la sensibilidad de RT-PCR tiempo real.** **A)** Curvas de amplificación de las diferentes diluciones de IL-1 β desde 19 ciclos de cDNA. Las líneas que no se elevaron corresponden a los controles negativos de la reacción. **B)** Curva de calibración generada al representar el logaritmo del número de copias de los calibradores frente a su Cp. resultados similares se obtuvieron para IL-10 y TNF α .

Para determinar la especificidad de un producto amplificado, el software de SYBR Green I está acoplado al termociclador con el propósito de detectar tanto el producto deseado como productos no deseados y dímeros de los oligonucleótidos, esto mediante el incremento de la temperatura por encima de la temperatura de desnaturalización para que el fragmento sintetizado libere el fluoróforo y disminuya bruscamente la fluorescencia. En este estudio se

obtuvo un único pico característico para cada producto amplificado. En la figura 9 A y B se muestran los resultados para una PCR de la IL-1 β . Los resultados fueron similares para el resto de genes estudiados. Puesto que se han descrito diferencias entre los resultados obtenidos mediante el método de la curva de desnaturalización, fue necesario comprobar mediante una electroforesis en gel de agarosa que sólo se había amplificado realmente el producto deseado (fig. 10).

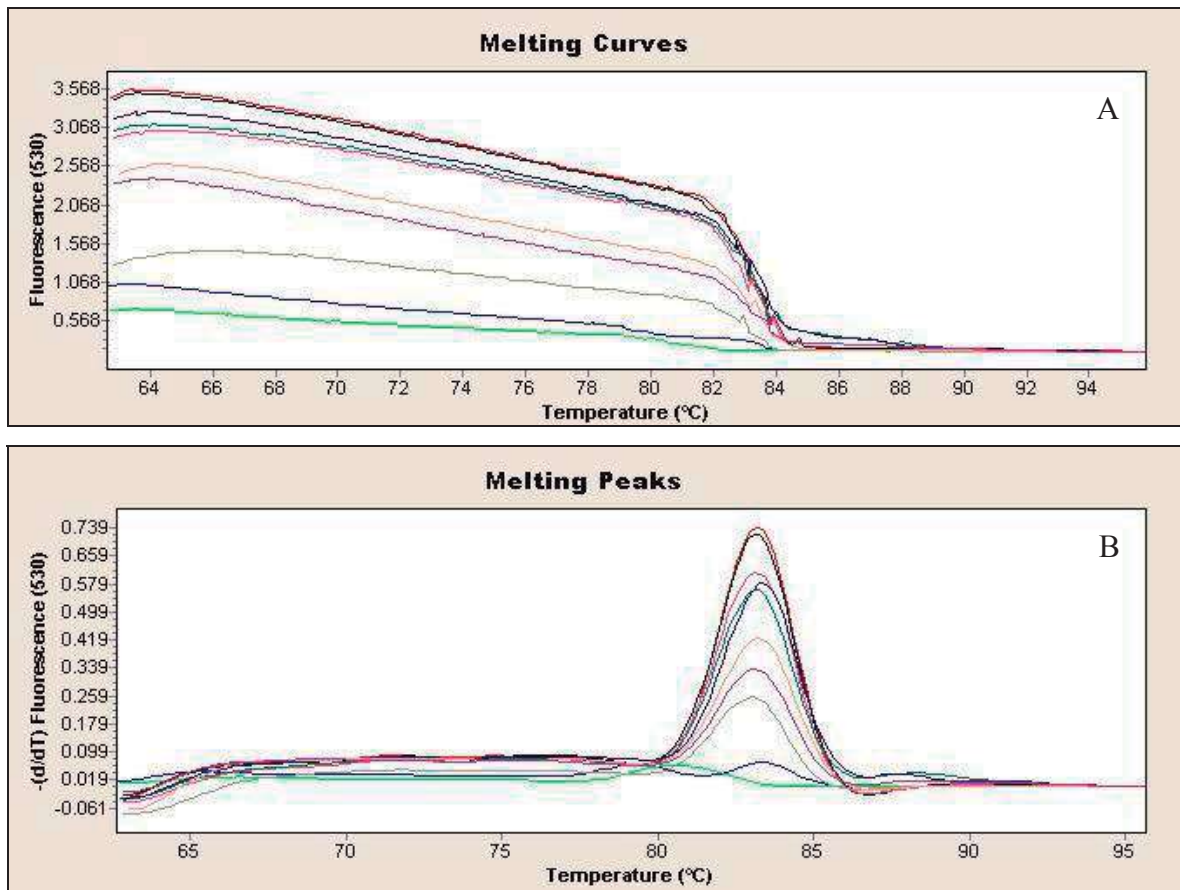


Figura 9. Curva (A) y pico (B) de desnaturalización para la IL-1 β . Amplificación de IL-1 β en las muestras de RNA obtenido de ganglios de ratas artríticas. Líneas verde y azul corresponden al control negativo, roja y negra al concentrado, y el resto a diferentes muestras. Tanto los productos de los estándares como los de las muestras se desnaturalizan a una misma temperatura, indicando la presencia de un único producto amplificado por PCR.

En la Fig. 10 se observan el amplificado de cada uno de los genes en cuestión. Se puede observar en cada uno de los genes que se obtiene una sola banda, lo cual indica que el producto amplificado es específico, y además, es el deseado puesto que el tamaño observado es el esperado.

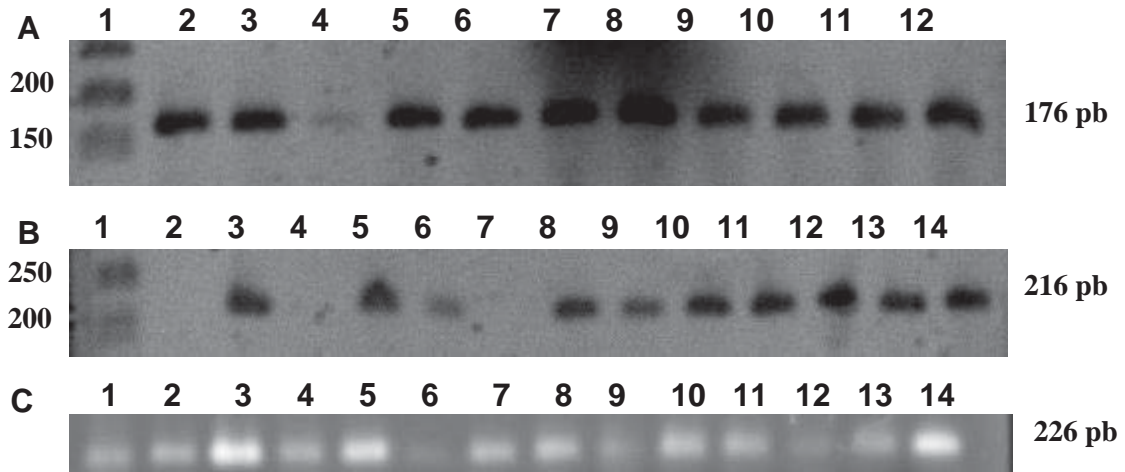


Figura 10. **Amplificados de IL-1 β , TNF- α e IL-10.** Carril 1A marcador de tamaño molecular (1 Kb) y Carriles 2A-12A corresponden a cada una de las bandas del producto de IL-1 β . Carriles 1B marcador de tamaño molecular (1 Kb) y carriles 2- 14B productos amplificado de TNF- α ; Carriles 1C – 14C bandas amplificadas del gen de la IL-10.

3.2. Análisis de expresión de las citocinas IL-1 β , IL-10, TNF- α y β -actina en ganglio de ratas artríticas

El estudio de la cuantificación génica de IL-1 β , IL-10, TNF- α y β -actina en ganglios de ratas artríticas se llevó a cabo utilizando la RT-PCR tiempo real. La β -actina ha sido considerada como un gen constitutivo que debería mantener su nivel de expresión constante en cualquier condición. Sin embargo, se ha descrito que diversos tratamientos y patologías pueden alterar su expresión. Por ello, en primer lugar, se comprobó que los niveles de expresión de la β -actina no presentaran variaciones en los diversos grupos clasificados (Figura 11). Así, una vez realizada esta comprobación, se eligió a β -actina como gen control, y los valores de mRNA de los genes analizados se representaron como el cociente entre las copias de mRNA del gen en estudio y las de la β -actina [copias mRNA (gen/ β -actina)].

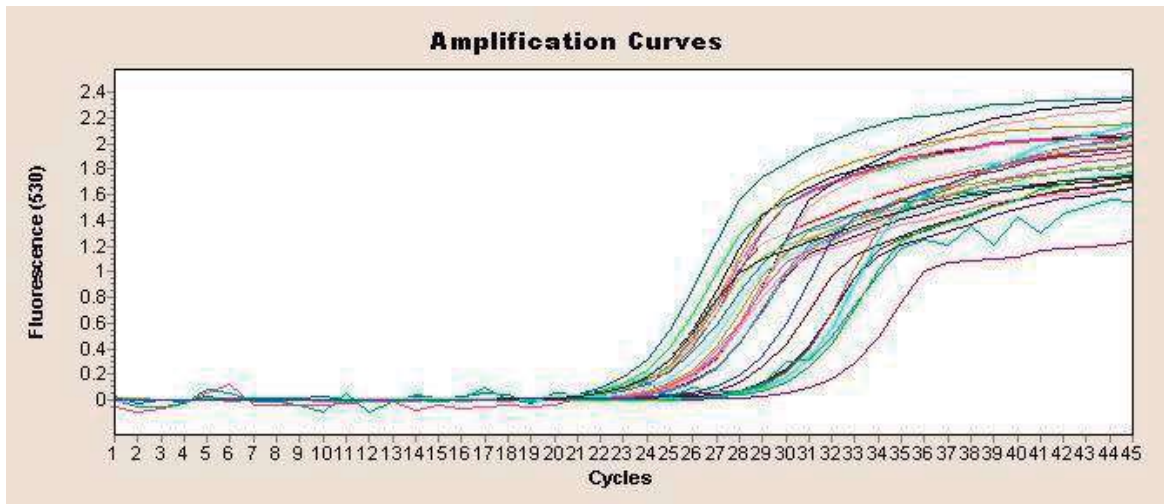


Figura 11. Niveles de expresión de β -actina en los distintos grupos de ratas artríticas. Amplificación por triplicado de β -actina de los distintos grupos.

En este trabajo se analizó la expresión de IL-1 β , IL-10 y TNF- α en el ganglio poplíteo tanto de ratas artríticas como no artríticas tratadas con tabaco-hsp65, tabaco-pCAMBIA2301 (tabaco-pCAM), tabaco silvestre (TW), proteína HSP65 recombinante (rHSP65) y como de controles ratas sanas y ratas enfermas sin tratamiento (R enf. s/t).

3.2.1 Análisis de expresión de IL-1 β .

El nivel de expresión génica de las distintas citocinas varió conforme a cada tratamiento y en cada una de sus etapas (antes de la inducción, a los 15 días de inducción y al final del tratamiento). Como se observa en la figura 9, el nivel de expresión de la IL-1 β varió en cada etapa de cada tratamiento. En el grupo de ratas tratadas con tabaco-hsp65 el nivel de IL-1 β disminuyó significativamente después del tratamiento con respecto a los 15 días de inducción (955.21 ± 32.81 a 289.98 ± 58.44 copias de mRNA IL-1 β , respectivamente). Así mismo, esta diferencia fue significativa con respecto a los demás grupos pero no con el grupo de ratas tratadas con rHSP65, donde la diferencia antes y después del tratamiento fue mínima. Sin embargo, la diferencia entre las etapas de este grupo antes y después del tratamiento fue

significativa de 1027.57 ± 120.99 a 397.89 ± 39.97 copias de RNAm de IL-1 β (fig. 12 y cuadro 7).

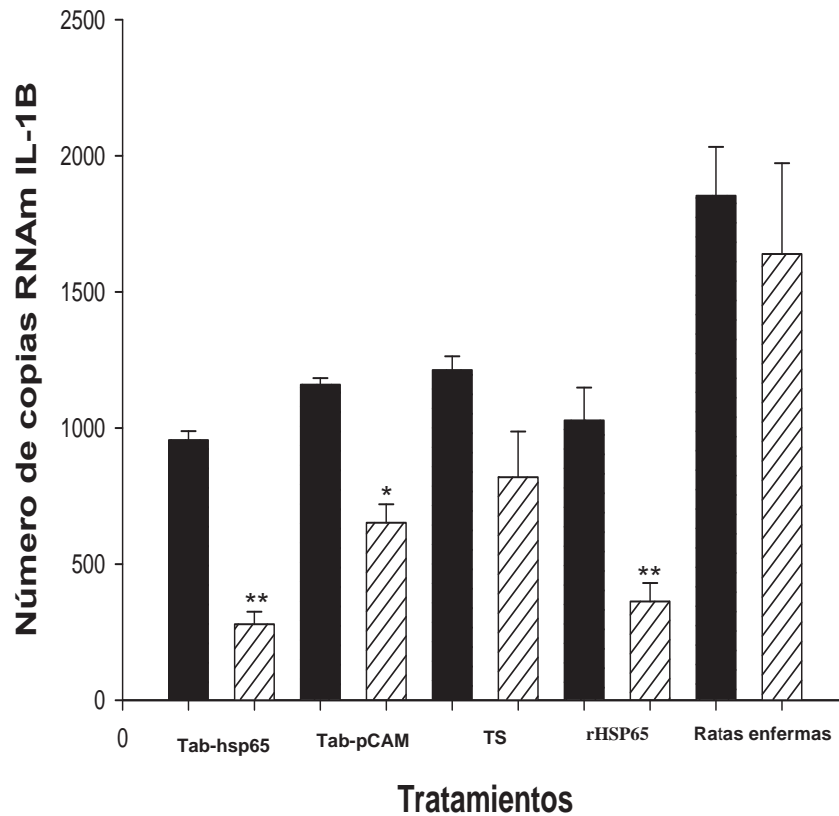


Figura 12. Niveles de expresión génica de mRNA de IL-1 β en ganglios poplíteos de ratas artríticas tratadas: tabaco-hsp65 (tab-hsp65), tabaco-CAMBIA2301 (tab-pCAM), tabaco silvestres (TS), proteína recombinante (rHSP65) y ratas enfermas sin tratamiento (R. enf s/t). Antes del tratamiento () y después del tratamiento (). Prueba de T- Student. Los valores de mRNA se expresan como media ($X \pm DE$ [copias mRNA (IL-1 β / β -actina)]). Significativa (*) y altamente significativa (**) ($P < 0.05$) $n=5$

Cuadro 7. Niveles de expresión génica de IL-1 β , TNF- α e IL-10 en tejido de ganglios poplíteos de ratas artríticas antes (A) y después (D) del tratamiento.

Citocina / Tratamiento	Tabaco- hsp65-A	Tabaco- hsp65-D	Tabaco- pCAM-A	Tabaco- pCAM-D	TW-A	TW-D	rHSP65-A	rHSP65-D	R. enf s/t-A	R enf. s/t - D
IL-1 β	955.21 \pm 32.81	289.98 \pm 58.44	1159.12 \pm 24.18	613.54 \pm 21.94	1212.17 \pm 50.84	740.52 \pm 139.28	1027.57 \pm 120.99	397.89 \pm 39.97	1853.24 \pm 179.44	1814.45 \pm 195.37
TNF α	1151.03 \pm 1161.66	1072.51 \pm 93.62	1135.5 \pm 36.37	1019.03 \pm 75.74	1180.625 \pm 77.46	877.87 \pm 60.13	1170.45 \pm 0.21	865.62 \pm 107.58	1296.56 \pm 55.77	1334.5 \pm 324.59
IL-10	151.36 \pm 27.20	308.06 \pm 10.13	130.5 \pm 0.14	125.53 \pm 3.07	115.45 \pm 6.71	119 \pm 9.0	149.67 \pm 7.53	205.8 \pm 2.3	46.45 \pm 4.3	56.22 \pm 3.2

Los valores de mRNA se expresan como media \pm desviación estándar (X \pm DE [copias mRNA (gen problema/ β -actina)]).

Otro de los grupos analizados fue el tratado con tabaco-pCAM, el cual mostró diferencias estadísticas en el nivel de expresión de IL-1 β a los 15 días después de la inducción (1159.12 ± 24.18 copias de RNAm de IL-1 β) y al final del tratamiento (613.54 ± 21.94 copias de RNAm de IL-1 β), pero no entre los grupos tratados con TW y rHSP65, donde el análisis estadístico no mostró diferencia significativa (fig. 12).

Dentro de los grupos tratados se encuentra el grupo de ratas alimentado con TW, el cual no mostró diferencias estadísticas antes y después del tratamiento (613.54 ± 21.94 a 740.52 ± 139.28 ciclos de RNAm de IL-1 β), ni siquiera entre grupos. La nula diferencia de este grupo se correlaciona con la patología y la poca recuperación de la articulación inflamada. Así mismo, a diferencia del resto de los grupos, el de ratas enfermas sin tratamiento y el de ratas sanas, no presentaron diferencias importantes al final del estudio (1853.24 ± 179.44 a 1814.45 ± 195.37 copias de RNAm de IL-1 β) (fig.12 y cuadro 7).

3.2.2 Análisis de expresión de TNF- α

Otro parámetro importante por analizar en el tratamiento de las ratas artríticas fue el comportamiento génico de la citocina proinflamatoria TNF- α , que de igual manera que la IL-1 β , se analizó su nivel de expresión durante el desarrollo del tratamiento en los distintos grupos. En el análisis se pudo corroborar que dentro de cada grupo, antes y después del tratamiento no hubo diferencias significativas excepto, el grupo tratado con tabaco silvestre TW, en el cual se observó una diferencia importante después del tratamiento (1212.17 ± 50.84 a 740.52 ± 139.28 copias mRNA de TNF α) (Cuadro 7). También es importante mencionar que la diferencia entre grupos fue irrelevante (fig. 13).

3.2.3 Análisis de expresión de IL-10

Aún cuando en los distintos los niveles de mRNA de citocinas proinflamatorias (IL-1 β) disminuyeron significativamente después del tratamiento, se observó que el efecto de desinflamación fue muy lento, lo que se sugiere que el desarrollo de la artritis no ésta

relacionado simplemente por las fluctuaciones de citocinas inflamatorias sino también por los niveles de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10.

Se determinó que la diferencia en el nivel de expresión de IL-10 en los distintos grupos fue significativa, cuando éstos fueron tratados con la proteína HSP65, ya sea expresada en planta de tabaco o *E. coli*. Sin embargo, es importante mencionar que esta diferencia antes y después (151.36 ± 27.20 a 308.06 ± 10.13 copias de mRNA de IL-10) del tratamiento fue significativamente más importante en el grupo tratado con la proteína expresada en tabaco que en el grupo tratado con la proteína expresada en bacteria (149.67 ± 7.53 a 205.8 ± 2.3 copias de mRNA de IL-10) (fig. 14).

Así mismo, el análisis estadístico mostró que la diferencia entre las etapas de los demás grupos no fue significativa (tabaco-pCAM 130.5 ± 0.14 a 125.53 ± 3.07 , TW 115.45 ± 6.71 a 119 ± 9.0 , r enf. s/t 46.45 ± 4.3 a 56.22 ± 3.2 copias de mRNA de IL-10), la cual está correlacionada con la poca recuperación de la articulación inflamada en estos grupos (fig. 14).

En resumen, con los resultados anteriores se determinó la importancia de la proteína HSP65 administrada vía oral en la recuperación de la desinflamación de las articulaciones de las ratas artríticas tratadas, a través del balance entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

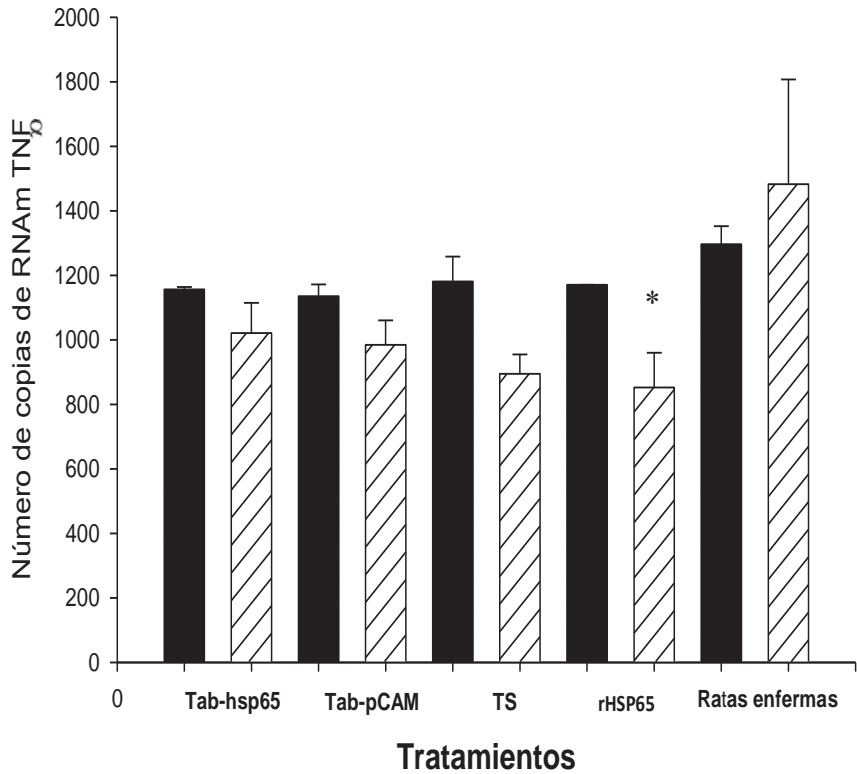


Figura 13. Niveles de expresión génica de mRNA de $TNF\alpha$ en ganglios poplíteos de ratas artríticas tratadas: tabaco-hsp65 (tab-hsp65), tabaco-pCAMBIA2301 (tab-pCAM), tabaco silvestres (TS), proteína recombinante (rHSP65) y ratas enfermas sin tratamiento (R. enf s/t). Antes del tratamiento (▨) y después del tratamiento (■). Prueba de T-Student. Los valores de mRNA se expresan como media ($X \pm DE$ [copias mRNA ($TNF\alpha/\beta$ -actina)]). Significativa (*) y altamente significativa (**) ($P < 0.05$) $n = 5$

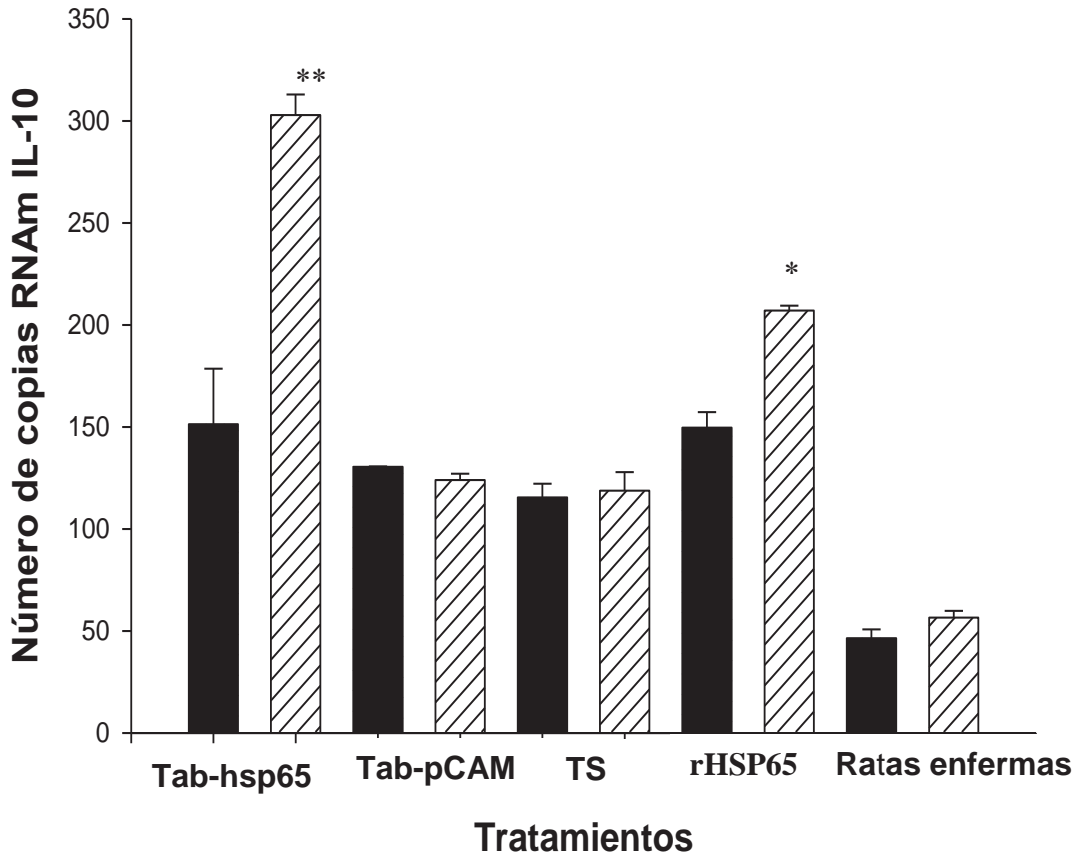


Figura 14. Niveles de expresión génica de mRNA de IL-10 en ganglios poplíteos de ratas artríticas tratadas: tabaco-hsp65 (tab-hsp65), tabaco-pCAMBIA2301 (tab-pCAM), tabaco silvestres (TS), proteína recombinante (rHSP65) y ratas enfermas sin tratamiento (R. enf s/t). Antes del tratamiento (▨) y después del tratamiento (■). Prueba de T-Student. Los valores de mRNA se expresan como media ($X \pm DE$ [copias mRNA (IL-10/ β -actina)]). Significativa (*) y altamente significativa (**) ($P < 0.05$) $n = 5$

IV. DISCUSIÓN

En este trabajo se logró la clonación del gen *hsp65* en un plásmido (pCAMBIA2301) para su expresión en plantas pCAMBIA2301. La clonación de dicho gen se realizó a partir de su amplificación utilizando como molde la secuencia contenida en el plásmido pCNA3.65 y con los oligonucleótidos diseñados. El producto amplificado de 1644 pb, fue corroborado en el gel de agarosa 1% y por el patrón de bandeo y confirmado por la secuencia proporcionada en www.ncbi.nlm.nih.gov (1626 pb más los sitios de restricción enzimática).

Estudios de transgénesis vegetal han reportado al plásmido pCAMBIA2301 como un vector importante que permite confirmar, de manera transitoria la estabilidad del material genético foráneo en el material vegetal, debido a la presencia de regiones reguladoras (promotor 35S) y genes reporteros como *uidA* y *gus* (McIntosh et al., 2004). La utilización de este plásmido ha permitido la obtención de niveles elevados de expresión de biomoléculas en algunas plantas como el tabaco en el que se han obtenido niveles superiores del 1% del total de proteína soluble (TPS), mientras que con la utilización de otros plásmidos se han reportado niveles inferiores al 1% TPS (Perea et al., 2008). Quizás por la presencia de regiones reguladoras como el promotor 35S por el que se han obtenido variaciones considerables en los niveles de expresión de hasta del 1.2% TPS (Gil et al. 2001). Así mismo, el porcentaje de anomalías fenotípicas presentadas en las plantas transgénicas ha sido mínimo (Huang et al., 2006).

Hoy en día, existen diversos métodos para la transferencia directa de ADN foráneo a células vegetales. Uno de los métodos con mayores logros es el empleo del fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens*, el cual está implicado exitosamente en la transformación de distintas plantas de dicotiledóneas como la papa, el tabaco, soya, zanahoria, algodón y jitomate entre otras, lo que sugiere que dicho sistema es probablemente el más efectivo para la transformación de cualquier especie vegetal (Cheng et al., 1999). Es por ello que después de confirmar la clonación del gen *hsp65* en el plásmido pChsp65 por prueba digestiva y de PCR, se llevó a cabo la transformación de *A. tumefaciens* logrando obtener el 80% de clones positivas.

Con *A. tumefaciens* transformado con el plásmido pChsp65 se realizó la infección y transformación de *Nicotiana. tabacum* (línea 34). De dicha transformación se obtuvieron de 20 – 25 brotes por explante resistentes al antibiótico kanamicina y libres de bacteria después de la exposición a carbanecilina. De los brotes obtenidos, el 72 % (18 brotes) fue regenerado a plantas completas en medio selectivo MS (100 mg/l de kanamicina). Es importante mencionar que las plantas control (sin transformar) crecidas en el mismo medio no sobrevivieron más de una o dos semanas a la presencia del antibiótico. Porcentajes de sobrevivencia similares o incluso superiores han sido observados en plantas de *N. benthamiana* por Perea et al. (2008) quienes obtuvieron solo 11 líneas de plantas transformadas con el gen de la glicoproteína del virus de la rabia.

Algunos reportes indican que el mayor éxito en la micropropagación de una especie vegetal transgénica como el tabaco, es obtener un mayor número de brotes por explante, y incrementó en el porcentaje de sobrevivencia de plantas regeneradas (vij et al., 1986). Sin embargo, se ha reportado que las plantas transgénicas micropropagadas muestran una menor sobrevivencia que las plantas no transgénicas, quizás por cambios pleiotrópicos que se presentan al introducir material genético foráneo. En este trabajo, aun cuando el número de plantas regeneradas fue reducido, éstas lograron adaptarse al medio natural y producir frutos y semillas, las cuales fueron viables en su germinación y generación a plantas completas (F2).

Una de las razones de la sobrevivencia de las plántulas regeneradas fue la resistencia conferida al antibiótico Kanamicina, ya que tanto plantas transformadas con el plásmido pChsp65 como las plantas transformadas con el plásmido pCAMBIA2301 resistieron a una concentración de 100 mg/l, concentración a la cual no sobrevivieron las plantas silvestres. Se ha determinado que la concentración de 100 mg/l es una concentración que permite detectar a las células transformadas de las no transformadas en algunas plantas como el tabaco las que de manera natural muestran resistencia a concentraciones menores del antibiótico (Brown, 1986).

Otra de las pruebas realizadas en la caracterización de las líneas transgénicas fue la prueba histoquímica con la expresión de la enzima β -glucuronidasa, la cual fue determinada mediante colorimetría. Del total de las líneas transgénicas resistentes al antibiótico, el 42.5 % mostraron

una reacción positiva a la prueba de GUS, de las cuales, 7 líneas (3, 6, 8, 10, 11, 12 y 23) fueron transformadas con el plásmido pCAMBIA2301 y 10 líneas (7, 9, 17, 20, 31,32, 33, 34, 38 y 40) con el plásmido pChsp65. Las líneas positivas a la prueba histoquímica presentaron una mayor actividad enzimática en tejidos conductores y tricomas. Resultados similares han reportado un porcentaje mínimo (0.3 – 0.5%) de actividad enzimática en cotiledones, hojas y raíces de algunas especies vegetales al ser transformadas con el plásmido pCAMBIA2301 (McIntoch et al., 2004; Malagón, 2007). Con lo anterior mostramos la expresión del gen *gus* en el ADN genómico de las plantas transgénicas de tabaco.

La presencia del gen *hsp65* en las líneas de tabaco transformadas con el pChsp65 fue confirmada por PCR. Dicho análisis reveló que de las 10 líneas positivas a ensayo de GUS sólo el 50% amplificaron un fragmento esperado de 1644 pb, mientras que dicho fragmento no fue observado en plantas transformadas con el plásmido pCAMBIA2301 ni con plantas silvestres. Porcentajes de integración similares de transgenes o incluso mayores han sido observados por Mason et al. (1992) en *N. tabacum* quienes obtuvieron un porcentaje reducido de plantas transformadas con la subunidad β del virus de la hepatitis. Rascón-Cruz (2003) notifica una frecuencia del 76% de integración para el gen de la amarantina.

Con la prueba de Western blot fue posible identificar 5 líneas positivas (7, 9, 20, 31 y 34) Cuyo análisis de densitometría mostró niveles diferenciales de expresión proteica (0.09%, 0.098%, 0.13%, 0.12% y 0.19% del total de proteína soluble respectivamente), mientras que plantas transformadas con el plásmido pCAMBIA2301 y plantas silvestres no mostraron producto alguno. Porcentajes similares o incluso inferiores de expresión han sido observados en tabaco transgénico; Weissenborn et al. (1990), obtuvieron 11 líneas transformadas con el gen de la proteína C humana. Aun cuando ellos utilizaron el mismo promotor constitutivo (CaMV 35S), encontraron niveles no inferiores a los obtenidos con otros promotores. Resultados, que sugieren que los reducidos niveles de expresión obtenidos en hojas de tabaco no fueron debido al promotor 35S, sino probablemente a la inestabilidad de la proteína o a la posición del transgen con respecto a genes vecinos que afectan la función transcripcional del transgen, en el cual la expresión del transgen puede ser reducida o incrementada. Maso et al. (1992) reportan un nivel de expresión de 0.01% del TPS en plantas transformadas con el gen

de la proteína de superficie de la hepatitis B, obteniendo un número reducido de líneas. Ma y colaboradores en 1995, logran obtener solo 4 líneas de tabaco transgénico que expresan la cadena ligera y la cadena pesada α de la IgA sérica (Larrick, 1997).

En este trabajo, el número reducido de líneas de tabaco-hsp65 obtenidas en este trabajo y los niveles variables de expresión, pudieron ser causa de distintos factores. Algunas investigaciones han mostrado que los bajos niveles de expresión de algunas moléculas foráneas en tabaco puede ser debido a factores como la utilización de un doble promotor constitutivo (35S), que no es siempre la mejor opción para la sobre expresión de genes, la inestabilidad del transgen en células de tabaco, la posición donde cae el gen en el genoma vegetal o la metilación de las moléculas como un mecanismo de defensa utilizado por la planta (Hao Ni, 1997). Sin embargo, es sabido que el tabaco hoy en día es considerado una de las especies vegetales más fiel en la expresión estable y funcional de moléculas foráneas, tanto en tallo y hojas como en semillas (Hiatt et al., 1989; Finnegan y McElroy; 1996; Dus Santos y Wigdorovitz, 2005).

Una de las grandes desventajas de la transgénesis son los cambios fenotípicos que pudieran presentar los individuos transgénicos. En este trabajo, aparentemente la expresión de la proteína HSP65 en las plantas transgénicas de tabaco no causó alteraciones fenotípicas; sin embargo, un porcentaje reducido de plántulas mostraron crecimiento reducido de tallo y poco follaje, probablemente significa que la secuencia del gen *hsp65* se insertó en una región necesaria para el crecimiento de la planta. Estudios realizados han reportado cambios pleiotrópicos muy importantes al expresar moléculas foráneas en tabaco transgénico como son los cambios observados en las rutas metabólicas y hormonales al expresar la proteína TPS1 (Trehalosa-6-fosfato sintetasa) de levadura. En este caso se presentan cambios fenotípicos como la pérdida de dominancia apical, reducción de crecimiento, hojas lanceoladas, esterilidad y alteraciones morfológicas en las flores (menor número de piezas por verticilio, mayor sensibilidad a etileno de forma constitutiva, inhibición de hipocotilo, incremento en la expansión radial y crecimiento horizontal) (Romero, 1999). Sin embargo, cuando en nuestros resultados algunas líneas presentaron modificaciones fenotípicas, estas tuvieron un nivel óptimo de expresión de la proteína HSP65.

Por otro lado, para confirmar si la proteína HSP65 expresada en tabaco transgénico conservaba sus características antigénicas se alimentaron ratas artríticas con tejido transgénico y se monitoreó el comportamiento de peso corporal, así como la desinflamación articular y su relación con el nivel de citocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias. El grupo de ratas alimentado con 10 µg de proteína expresada en tabaco mostró una recuperación significativa en peso y desinflamación articular desde la primera dosis con respecto a los demás grupos de ratas se acompañó de la disminución en el nivel de síntesis de IL-1β y TNF-α y un incremento significativo de IL-10. Resultados similares fueron observados por Harats y colaboradores (2002) al administrar por vía oral 10 µg de proteína HSP65 a ratas escleróticas, éstas mostraron un nivel significativo de IL-4 y TGF-β el cual fue traducido por una reducción importante en las lesiones de los tejidos. Así mismo, Cobelens y colaboradores (2000) al administrar oralmente una dosis mayor de proteína recombinante (30 µg de rHSP65), lograron controlar significativamente el desarrollo de la artritis a través de un incremento en el nivel de IL-10, IL-4 y TGF-β y una disminución de INF-γ. Sin embargo, este efecto sólo fue obtenido cuando la proteína fue coadministrada con inhibidor de tripsina de soya (ITS), el cual la protege de la degradación por enzimas digestivas.

En este trabajo, la dosis reducida de proteína activa no fue co-administrada con un inhibidor proteolítico, por lo que posiblemente el efecto significativo obtenido se debió a que la planta de tabaco sintetiza algún compuesto que potencializa el efecto de la proteína o bien que la protege de la degradación enzimática digestiva. Algunos estudios de pre-tratamiento muestran que administrar bajas dosis de proteína HSP65 en ausencia de ITS puede prevenir la inducción de la artritis en ratas hembras (Haque et al., 1996).

Otras investigaciones señalan que para obtener un efecto de tolerancia en ratas Lewis macho, es necesaria la coadministración de ITS con elevadas concentraciones de proteína HSP65 (Bitar et al., 1988; Jewell et al., 1998; Whitacre et al., 1996). Se ha determinado claramente que la inducción de tolerancia ésta mediada por mecanismos que dependen de la vía de administración, la concentración del antígeno, el número de repeticiones de la dosis y la supresión activa y delección clonal o anergia. La ingesta de concentraciones elevadas de

antígeno favorece a la destrucción de células T específicas al antígeno mediante apoptosis, resultando una disminución en la proliferación específica de éstas al antígeno (Melamed et al., 1993). El segundo mecanismo es llevado a cabo por la ingesta múltiple de dosis bajas de antígeno lo que ocasiona la supresión activa por la activación de células T reguladoras que sintetizan mediadores químicos (IL-10, IL-4 y TGF β), los cuales modulan y antagonizan el desarrollo de células T autorreactivas (Billingham et al., 1990).

Debido a los niveles de mRNA de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10) en los grupo de ratas, se sugiere que la ingesta múltiple de bajas concentraciones de la proteína HSP65 producida en tabaco, permitió el desbalance de citocínico a favor de citocinas anti-inflamatorias (IL-10), logrando de esta manera regular los niveles de mRNA de IL-1 β y TNF- α producidos por clonas de células T autoreactivas (Th1). Los resultados obtenidos relacionados con los de algunos investigadores que muestran que después de la administración nasal de bajas concentraciones de la proteína HSP70 de *Mycobacterium*, logran activarse células T que tienen el potencial de regular el desarrollo de la artritis a través de IL-10 (Wending et al., 1996). Sin embargo, en este grupo de ratas tratadas se observó que aun cuando los niveles de IL-10 fueron elevados, los niveles de IL-1 β y TNF- α no disminuyeron considerablemente, lo que sugiere que el efecto antiartrítico no ésta relacionado simplemente por las fluctuaciones de las citocinas, sino también, a la etapa de desarrollo de la artritis en que se inicia el tratamiento. En un ensayo antiartrítico en humanos, Choy y Panayi (2001) observaron que aún obteniendo niveles considerables de IL-10, la exacerbación de la enfermedad seguía conservándose, debido a que en una etapa crónica erosiva de ésta, los niveles de IL-1 β son significativamente importantes y aun habiendo una respuesta anti-inflamatoria ésta no es suficiente para contrarrestar los efectos.

Otros de los grupos analizados fue el tratado con tabaco pCAMBIA2301 y tabaco silvestre. Ambos grupos no mostraron diferencias importantes entre sí en la recuperación de peso corporal y desinflamación articular; cabe mencionar que la diferencia de estos grupos con respecto al grupo de ratas enfermas sin tratamiento en el proceso de desinflamación fue importante, el cual se relaciona con la disminución en los niveles obtenidos de mRNA de IL-1 β y TNF- α después del tratamiento. Estos resultados sugieren la presencia de algún

compuesto sintetizado en el tabaco que logró disminuir los niveles de IL-1 β y TNF- α en este grupo. En la literatura se ha reportado al tabaco como una de las plantas que sintetizan una serie de principios como la escopoletina que inhibe la síntesis de factores inflamatorios como el TNF- α (Hyung *et al.*, 2004; Julca *et al.*, 2008), el cual es sintetizado transitoriamente en etapas tempranas de algunos padecimientos como la artritis reumatoide (Raza *et al.*, 2005). El TNF- α ha sido considerado como una de las citocinas responsables de dirigir primeramente la inflamación de las articulaciones, seguido de un incremento en la síntesis de IL-1 β , la cual mantiene la inflamación y la activación de enzimas responsables de la destrucción de hueso y cartílago (Karatay *et al.*, 2004).

Con lo anterior, se sugiere que la razón por la cual las variaciones en los niveles de TNF- α no fueron significativas en los distintos grupos de ratas tratadas antes ni después del tratamiento, se debió a que las muestras fueron obtenidas en la fase crónica de la enfermedad, por lo cual los niveles de expresión de mRNA de TNF- α fueron sólo los basales, relacionándose así la diferencia irrelevante entre grupos. Se ha reportado que la acción de TNF- α depende del momento de su liberación, del lugar en el que actúan, de la presencia de otros elementos competitivos o sinérgicos, de la densidad de sus receptores y de la capacidad de respuesta del tejido en cuestión (Karatay *et al.*, 2004). En estudios experimentales con ratas se ha observado un pico precoz de TNF- α después de 1 a 2 horas de la inmunización con lipopolisacárido (LPS) debido a que después las 4-6 horas es indetectable. Este mismo patrón ha sido documentado en la sepsis humana y sólo se detecta en cuadros clínicos fulminantes con signos inflamatorios intensos (Sanchez *et al.*, 2005). Así mismo se ha confirmado que las concentraciones elevadas de TNF- α causan la pérdida de apetito y el fracaso en el funcionamiento renal. Mientras que en pacientes con meningitis bacteriana fulminante los niveles de TNF- α elevados se correlacionan con la mortalidad (Waage *et al.*, 1987).

Actualmente se sabe que en condiciones fisiológicas, las citocinas anti-inflamatorias actúan como moléculas inmuno-moduladoras y, por lo tanto, limitan el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. Sin embargo, en condiciones patológicas, la respuesta anti-inflamatoria puede ser insuficiente para contrarrestar la actividad inflamatoria o, por el contrario, ser sobre-compensadora e inhibir el sistema inmune y dejar al huésped a merced de

la infección (Blackwell y Christman, 1996). Un aspecto que complica la fisiología de las citocinas anti-inflamatorias es que estas también presentan propiedades pro-inflamatorias, ya que su acción depende del momento de su liberación, del lugar en el que actúan y la capacidad de respuesta de ese tejido a estas (Sánchez et al., 2005).

A pesar de los resultados tan promisorios obtenidos en este trabajo, aun no podemos afirmar que la expresión de la proteína HSP65 en tabaco sea la mejor opción, ya que lo más conveniente es lograr su expresión en algún modelo vegetal que se pueda ingerir de manera fresca o bien dirigir su expresión hacia ciertas regiones de la planta como son los frutos, así mismo falta determinar la dosis apropiada que permita la supresión de la artritis en pacientes enfermos o en individuos sanos.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la expresión de la proteína HSP65 de *M. leprae* en plantas de tabaco y su efectividad como tratamiento oral en la recuperación del peso corporal y desinflamación articular en la artritis inducida por adyuvante en ratas Lewis. Estos resultados, además, sugieren que dicha respuesta podría ser un efecto sinérgico entre la proteína HSP65 y algunos metabolitos producidos por la planta, la cual está mediada por la inducción de niveles significativos de IL-10 y una disminución importante en los niveles de IL-1 β que posiblemente activaron procesos fisiológicos e inmunológicos que regularon de manera coordinada la recuperación de las ratas artríticas.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Akilesh S., D.J. Shaffer y D. Roopenian 2003. **Customized molecular phenotyping by quantitative gene expression and pattern recognition analysis.** *Gen. Res.* 13:1719–1727.
- Andersen C.L., J.L. Jensen y T.F. Orntoft. 2004. **Normalisation of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalisation, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer Res.* 64:5245–5250.
- Arakawa T., D.K.X. Chong y W.H.R. Langridge. 1998. **Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine.** *Nature Biotech.* 16:292-297.
- Argüello G.R. y L.R. Herrera- Estrella. 1993. **Métodos de transformación y vectores de expresión en plantas. Avances de ingeniería genética.** Consejo Superior de Investigación Científica. Madrid, España. Vicente, M. 41-70 pp.
- Barberá A y M.C. Dominguez. 2004. **Características inmunopatogenesis de la artritis reumatoide: estado actual del tratamiento.** *Biotechnología aplicada.* 21:189- 201.
- Bas A., G. Forsberg, S. Hammarstrom y M.L. Hammarstrom. 2004. **Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalisation in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes.** *Scand. J. Immuno.* 59:566–57.
- Billingham M.E.J., S.L. Carney, R. Butler y M. J. Colson. 1990. **A mycobacterial 65-kD heat shock protein induces antigen-specific suppression of adjuvant arthritis, but is not itself arthritogenic.** *J. Exp. Med.* 171:339-344
- Birnboim H.C. y J. Doly. 1979. **A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523
- Bitar D.M. y C.C. Whitacre. 1988. **Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein.** *Cell Immunol.* 112:364–70.
- Blackwell T.S. y J.W. Christman. 1996. **Sepsis and cytokines: curr status.** *Br J Anaesth.* 77:110-7.
- Blass S., J.M. Engel, G.R. Burmester. 1999. **The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* 42:2499-06.

- Blaschke V, Reich K, Blaschke S, Zipprich y S, Neumann. 2000. **Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology.** *J. Immunol. Methods.* 246:79-90.
- Bradford M.M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Annual Biochem* 72:248–254
- Brown T.A. 1986. **Cloning an introduction.** Van Nostrand Reinhold (international University of Manchester Institute of Science and Technology. 234 pp.
- Bustin S.A. 2000 **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J. Mol Endocrinol.* 25 169–193.
- Bustin S.A., V. Benes, T. Nolan y M.W. Pfaffl. 2005. **Quantitative real-time RT-PCR a perspective.** *J. Mol. Endocrinol.* 34: 597-601.
- Bustin S.A. y T. Nolan. 2004. **Pitfalls of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.** *J.Biomol Tech.* 15:155–166.
- Bustin S.A., V.G. Gyselman, N.S. Williams y S. Dorudi. 1999. **Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients.** *Br. J. Cancer.* 79:1813–1820.
- Chebolu S. y H. Daniell. 2009. **Chloroplast-derived vaccine Antigens and Biopharmaceuticals: Expression, folding, assembly and functionality.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 332: 33–54.
- Chen W., U. Syldath, K. Bellmann, V. Burkart y H. Kolb. 1999. **Human 60 kDa heat- shock protein: A danger signal to the innate immune system.** *J Immunol.* 162:3212-9.
- Chiang M.T., A. Rinaldy, y A. H. Kang. 1997. **Cloning, characterization, and functional studies of a nonintegrin platelet receptor for type I collagen.** *The J. Clin Invest.* 100: 514–521.
- Choy E.H. y G.S. Panayi. 2001. **Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med.* 344:907–16.
- Clancy R.M., A.R. Amin y A.B. Abramson. 1998. **The role of nitric oxide in inflammation and immunity.** *Arthritis Rheum* 7:1141-51.
- Clementi M., S. Menzo, P. Bagnarelli, A. Manzin, A. Valenza, y E. Varaldo. 1993. **Quantitative PCR and RT-PCR in virology.** *Gen Res.* 2: 191-196.

- Cobelens P.M., C.J. Heijnen, E.E.S. Nieuwenhuis, P.P.G. Kramer, R. VAN DER Zee, W van Eden, y A. Kavelaars. 2000. **Treatment of adjuvant induced arthritis by oral administration of *Mycobacterial Hsp65* during disease.** *Arthritis Rheum.* 43: 2694-2702.
- Dorak M.T. 2008. **Real-Time PCR.** <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>
- Doyle J.J. y J.L. Doyle. 1987. **A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochem Bull* 9:11-15
- Dus Santos M.J. y A. Wigdorovitz. 2005. **Expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas transgénicas.** *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 24 1:175-187.
- Edwards K.J. 2004. **Performing Real-Time PCR.** In: **Real-Time PCR; An Essential Guide.** ed. Horizon Bioscience. Wymondham. 71-84 pp.
- Edwards K. J., J. Logan, y N. Saunders. 2004. **Real-Time PCR; An Essential Guide.** Ed. Horizon Bioscience Wymondham. 85-92 pp.
- Finnegan, J. y D. McElroy. 1996. **Transgene stability.** In: **Owen, M.R.L. and Pen, J. (eds) Transgenic plants: A production system for industrial and pharmaceutical proteins.** John Wiley y Sons, Chichester, U.K. 169-186 pp
- Forre OM Haugen y W.G. Hassfeld. 2000. **New possibilities of treatment in AR.** *Scand J Rheumatol.* 29: 73-84.
- Frydman J. y J. Höhfeld. 1997. **Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection.** *Trends Biochem Sci.* 22: 87-92.
- Garcia V.E., K. Uyemura y P.A. Sieling. 1999. **IL-18 promotes type I cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection.** *J Immunol.* 162:6114-21
- Gil F., A. Brun, A. Wigdorovitz, R. Catala, J.L. Martinez-Torrecedrada, I. Casal, J. Salinas, M.V. Borca y J.M. Escribano. 2001. **High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants.** *FEBS Lett* 488:13-17
- Ginzinger D.G. 2002 **Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream.** *Exp. Hematol.* 30 503-512.
- Goidin D, A. Mamessier, M.J. Staquet, D. Schmitt y O. Berthier-Vergnes. 2001. **Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations.** *Anal Biochem* 295:17-21.
- Gomez-Lim M.A. 2001. **Producción de vacunas y compuestos farmacéuticos en plantas transgénicas.** *Avan Persp.* 20: 365-375 pp.

- Hao Ni. 1997. **Expression of human protein C in transgenic tobacco.** Tesis de Maestría. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. 89 pp
- Haque M.A. 1996. **Suppression of adjuvant arthritis in rats by induction of oral tolerance to mycobacterial 65-kDa heat shock protein.** *Eur J Immunol* 26:2650-2656 pp.
- Herrera-Estrella L., M. De Block, E. Messens, J.P. Hernalsteens, M. Van Montagu, y J. Schell. 1983. **Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells.** *EMBO Journal*. 2: 987 - 995.
- Herrera-Estrella L., G. Argüello y J. Simpson. 1997. **Transformación genética de plantas.** *Avan Persp.* 105 pp
- Hall G. E., G. C. Allen, D. Loer, W. F. Thompson y S. Spiker. 1991. **Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants.** *PNAS*. 88:9320-9324 pp
- Hiatt A., R. Cafferkey y K. Bowdish. 1989. **Production of antibodies in transgenic plants.** *Nature* 342:76-78 pp
- Hooy-kass P.J.J. y R.A. Schilperrot. 1992. **Agrobacterium and plant genetic engineering.** *Plant Mol Biol.* 19:15-38
- Horn M.E., S.L. Woodard y J.A. Howars. 2004. **Plant Molecular farming: systems and products.** *Plant Cell Reports.* 22: 711-720
- Huang Z., L. Santi, K. LePore, J. Kilbourne, C.J. Arntzen y H.S. Mason. 2006. **Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice.** *Vaccine* 24:2506– 2513
- Hunter C.S. y S.J. Neill. 1990. **Induction of hairy root by *Agrobacterium rhizogenes* and growth of hairy roots in vitro.** *Methods in Molecular Biology. Vol 6, Plant Cell and Tissue Culture.* pp 105
- Hyung-Jin K., J. Seon Il, K. Young-Jun, Ch. Hun-Taeg , Y. Yong-Gab, K. Tai-Hyun, J. Ok-Sam y K. Youn-Chul. 2004. **Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE₂ from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells.** *Fitoterapia.* 75:261-166.
- Inman R.D. 1992. **The role of infection in chronic arthritis:** *J. Rheumatol.* 19:98-104.
- Jendoubi, M. and S. Bonnefoy. 1988. **Identification of a heat shock-like antigen in *P. falciparum*, related to the heat shock protein 90 family.** *Nucleic Acids Res* 16: 10928-10928.

- Jewell S.D., I.E. Gienapp y K.L. Cox y C.C. Whitacre. 1998. **Oral tolerance as therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis and mul- Hsp65 Treatment of AIA during disease: demonstration of T cell anergy.** *Immunol Cell Biol.* 98: 76:74–82
- Johnson M., O. Petrauskene, P. Brzoska y C. Melancon. 2005. **Using Real-Time PCR for Pathogen Detection.** *Gen. Eng. News* 25:14.
- Jones D.B., A.F. Coulson y G.W. Duff. 1993. **Sequence homologies between Hsp60 and autoantigens.** *Immunol. Today* 14:115–118
- Julca O.A., N.J Vera, R. Blas-Sevillano, S. Bello-Amez y R. Carhuallanqui-Pérez. 2008. **Experiencias para el manejo integrado de *cercospora nicotianae* Ellis and Everh en tabaco negro.** *IDESIA* 26:15-27.
- Karatay S., T. Erdem, K. Yildirim, M.A. Melikoglu, M Ugur, E Cakir, F Akcay y K Senel. 2004. **The effect of individualized diet challenges consisting of allergenic foot on TNF α and IL1 β levels in patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatology.* 43: 1429- 1433.
- Kaufman, L., C. Warbaer, Duke y Brielmann. 1999. *Natural Products from Plants.* CRC. Boca Ratón, Florida. Pp. 105
- Kingston, A.E., A.C. Hicks, M.J. Colston y M.E.J. Billingham. 1996. **A 71-kD heat shock protein (HSP) from *Mycobacterium tuberculosis* has modulatory effects on experimental rat arthritis.** *Clin Exp Immunol* 103: 77-82
- Klein T., T. Gradziel y F. M. Sanford J. 1988. **Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles.** *Bio/Technol.* 6:559-563.
- Kubo T., C.A. Towle, H.J. Mankin y B.V. Treadwell. 1985. **Stress induced proteins in chondrocytes from patients with osteoarthritis.** *Arthritis Rheum.* 28:1140.
- Kyozuka F., y I. Shimamoto. 1991. **Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize Adh1 promoter in transgenic rice plants and their progeny.** *Mol. Gen. Genet.,* 228:40-48.
- Lamm M.E. 1997. **Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces.** *Annual Review Microbiol.* 51:311-340.
- Lacorte, C. 1998. **B-glucuronidase (GUS). Manual de transformación genética de plantas.** EMBRAPA, SPI/Embrapa, Cenargen, Brasilia. P. 309.
- Larrick, L. 1997. **Production of secretory IgA plantibodies. Presentation, molecular farming: new products from crops,** Canada p. 19-21.

- Life P., A. Hassell, K. Williams, S. Young, P. Baconn y T. Southwood. 1993. **Responses to gram negative enteric bacterial antigens by synovial T cells from patients with juvenile chronic arthritis: recognition of heat shock protein hsp60.** *J Rheumatol.* 20:1388-96.
- López-Gómez R., y M.A. Gómez-Lim. 1992. **A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango masocarp.** *Hort Science* 27:440-442
- Loza-Rubio E., y M.A. Gómez-Lim. 2006. **Producción de vacunas y otros compuestos biológicos en plantas transgénicas.** *Vet Mex. UAM* 37:441 – 455.
- Lukcas K.V., D.B. Lowrie, R.W. Stokes y M.J. Colston. 1993. **Tumor cells transfected with a bacterial heat shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors.** *J Exp Med* 178:343–348
- Ma, J. K.C., A. Hiatt, M. Hein, N.D. Vine, F. Wang, P. Stabila, C. van Dolleweerd, K. Mostov y T. Lehner. 1995. **Generation and assembly of secretory antibodies in plants.** *Proc Natl Acad Sci* 268:716-719
- Ma, S., D. Zhao, A. Yin, R. Mukherjee, B. Singh, H. Qin, C.R. Stiller y A.M. Jevnikar. 1997. **Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice induce oral immune tolerance.** *Nature Med.* 3:793-796
- Ma J.K.G., P.M.W. Drake y C. Christou. 2003. **The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants.** *Nature Rev Genetic.* 4:10
- Malagón-Quintana LM. 2007. **Micropropagación de la orquidea *Phalaenopsis amabilis* Luchia Lady por el cultivo de segmentos de hojas y base de tallo.** Tesis de Licenciatura. IIQB-UMSNH. Pp. 59
- Mason, H.S., J.M. Ball, J.J. Shi, X. Jiang, M.K. Estes, y C.J. Arntzen. 1996. **Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice.** *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 93: 5335-5340.
- Mason, H.S., M.K.D. Lam, y C.J. Arntzen. 1992. **Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants.** *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 89:11745-11749.
- Matthews, R. C., J.P. Burnie, D.T. R. Howat y F. Walton. 1991. **Autoantibody to Hsp90 can mediate protection against systemic candidosis.** *Immunol* 74: 20-24.
- Matzinger P. 1996. **Tolerance, danger and the extended family.** *Ann Rev Immunolo.* 12:991-1045.
- McIntosh J.L., L.W. Hulm, Young y P.C. Bonham-Smith. 2004. **A Rapid *Agrobacterium*-mediated *Arabidopsis thaliana* Plant Mol Biol. Rep.** 22:53–61

- Melamed D. y A. Friedman. 1993. **Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin.** *Eur J Immunol.* 23:935–942.
- Michaluart P., K.A. Abdallah, F.D. Lima, R. Smith, R.A. Moysés, V. Coelho, G.D. Victora, A. Socorro-Silva, E.C. Volsi, C.R. Zárate-Bladés, A.R. Ferraz, A.K. Barreto, M.C. Chammas, R. Gomes, E. Gebrim, L. Arakawa-Sugueno, K.P. Fernandes, P.A. Lotufo, M.R. Cardoso MR, J. Kalil, C. Lopes-Silva. 2008. **Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Cancer Gene Ther* 15:676-684
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** *Plant Physiol.* 15:473–493.
- Pearson C.M. y F.D. Wood. 1964. **Passive transfer of adjuvant arthritis by lympho node or spleen cell.** *J. Exp Med.* 120: 547-60.
- Perea A.I., R.E. Loza, A.E. Rojas, F.T. Olivera, V.F. González, M.A. Gómez –Lim. 2008. **Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice.** *Plant Cell Rep.* 27:677–685
- Prakken, B.J. 2001 **Induction of IL-10 and inhibition of experimental arthritis are specific features of microbial heat shock proteins that are absent for other evolutionarily conserved immunodominant proteins.** *J Immunol* 167:4147-4153
- Quintana F.J., P. Carmi, I.R. Cohen. 2003. **DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide.** *J Immunol* 17:3533–3541
- Ragno S., M.J. Colston, D.B. Lowrie, V.R. Winrow, D.R. Blake, R. Tascon. 1997. **Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65.** *Arthritis Rheum* 40: 277–283
- Ram R., J.C.C. Lorenzi, S. Giuliatti, C.L. Silva y A.A.M. Coelho-Castelo. 2009. **In Silico Prediction of the tertiary structure of *M. leprae* Hsp65 protein shows an unusual structure in carboxy-terminal region.** *J Comp Sci Syst Biol.* 1: 126-131.
- Rascón Cruz, Q., Bohorova, Y., Osuna Castro, J. y Paredes López, O. **Accumulation, assembly and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize.** *Theor. Appl. Genet.* 108(2):335-342
- Raza K, F. Falciani, S.J. Curnow, E.J. Ross, C.Y. Lee, A.N. Akbar. 2005. **Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T-cell and stromal cell origin.** *Arthritis Res Ther* 7:84–95.
- Ribeiro A.M., A.L. Bocca, A.C. Amaral, L.H. Faccioli, F.C.S. Galetti, C.R. Zárate-Bladés, F. Figueiredo, C. Lopes-Silva, M.S.S. Felipe. 2009. **DNAhsp65 vaccination induces**

- protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** *Vaccine* 27:606 – 613
- Romero S.C. 1999. **Tolerancia a los stress salino e hídrico y metabolismo de carbohidratos en plantas de tabaco transgénico que expresan elGen tps1 de levadura.** *IBMCP-Universidad Politécnica de Valencia*. Pp 105
- Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Plainview*, NY. Pp 55
- Sánchez- Gram M.C. y Calmo MC. 1996. **Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture.** *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 45:259-261
- Sánchez R.P., J.M. Sanz, A. Prieto-Martín, E. Reyes-Martín, M. Álvarez-De Mon Soto. Y.M. Sánchez-García. 2005. **Balance entre citocinas pro y anti-inflamatorias en estados sépticos.** *Med Intensiva.* 29:151-8.
- Santos-Júnior R.R., A. Sartori, V.L. Bonato, A.A. Coelho-Castelo, C.A. Vilella, R.L. Zollner, C.L. Silva. 2007. **Immune modulation induced by tuberculosis DNA vaccine protects non-obese diabetic mice from diabetes progression.** *Clin Exp Immunol* 149:570-578
- Sauza R.M.P., C.R. Zárate-Bladés, J.I. Hori, G.S. Ramos, D.S. Lima, T. Schneider, R. S. Rosada, L.G.L. Torre, M.H.A. Santana, I.T. Brandão, A.P. Masson, A.A.M. Coelho-Castelo, V.L. Bonato, F.C.S. Galetti, E.D. Gonçalves, D.A. Botte, J.B.M. Machado y C.L. Silva. 2008. **Protective efficacy of different strategies employing *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 against tuberculosis.** *Expert Opin. Biol.Ther.* 8:1255-1264.
- Schillberg S., R.M. Twyman, y R. Fischera. 2005. **Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment.** *Vaccine* 23: 1764–1769.
- Se G., C.S. Crowson, W.M. O’Fallon. 1999. **The epidemiology of RA in Rochester.** *Arthritis Rheum.* 42:415-20.
- Sheng J., V. Citovsky. 1996. ***Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel.** *Plant Cell* 8:1699–1710
- Shinnick M., M.H. Vodkin C. Williams. 1988. **The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* groEL protein.** *Infect Immun.* 56:446-451
- Sijmons P.C., B.M. Dekker, B. Schrammeijer. T.C. Verwoerd, P.J. van Den Elzen y A. HOEKEMA. 1990. **Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants.** *Biotechnol N Y* 8:217-21.

- Stachel S.E. y E.W. Nester. 1986. **The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*.** *EMBO J.* 5:1445–1454
- Thompson S.J. 1998. **An immunodominant epitope from mycobacterial 65-kDa heat shock protein protects against pristane-induced arthritis.** *J Immunol* 160:4628-4634
- Tokar B. 2001. **Redesigning Life? The Worldwide challenge to genetic engineering,** London: *Zed Books*, 2001, pp.75-102.
- Ulmansky, R. 2002. **Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion.** *J Immunol* 168:6463-6469.
- Valasek M.A. y J.J. Repa. 2005. **The power of real-time PCR.** *Adv Physiol Educ* 29: 151–159.
- van Eden Broek, M.F. 1989. **Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein.** *J Exp Med* 170:449-466
- van Eden W. 1988. **Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis.** *Nature* 331:171-173
- Van Eden W., J. Haloshitz, A. Nevo, A. Frenkel, A. Klajman, J.R. Cohen. 1985. **Arthritis induced by a T- lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and cartilage proteoglycans.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:5117- 5120.
- Vasil V. y A.C. Hildebrandt. 1965. **Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microtubules.** *Science* 150: 889 – 892
- Vaughan J.H. 1990. **Infection and rheumatic disease: a review.** *Bull Rheum Dis.* 39:1-8.
- Vij, S.P., M. Sharma & I.S. Toor. 1980. Cytogenetical investigations into some garden ornamentals II. The genus *Aloe* L. *Cytologia* 45:515-532
- Waage A., A. Halstensen, y T. Espevik. 1987. **Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease.** *Lancet.* 1:355-357
- Weissenborn D.L., E.A. Grabau, K. Pedersen, K.K. Oishi, S. Bennett, W. Velander y C.L. Cramer. 1990. **Production of human protein C in transgenic tobacco.** *unpublished data.*
- Wendling U. 2002. **A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-**

- producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp60 homologue.** *J Immunol* 164 5:2711-2717
- Weiner H. 1997. **Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update.** *Trends Immunol.* 22:665-669
- Whitacre C.C., I.E. Gienapp, A. Meyer, K.L. Cox, N. Javed. 1996. **Treatment of autoimmune disease by oral tolerance to autoantigens.** *Clin Immunol Immunopathol.* 80:531–539.
- White P.R. 1939. **Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient.** *Am. J. Bot.* 26:59-64.
- Young D., A. Mehlert y D.F. Smith. 1989. **Stress proteins and infectious diseases.** *Annu. Rev Immunol.* (85): 4267-70.
- Zárate-Bladés C.R., V.L. Deperon-Bonato, E.L. Volpe da Silveira, C.M. Junta, P. Sandrin-Garcia, A.L. Fachin-Stephano, S. M.R. Sousa-Cardoso, F. Cicero de Sa-Galetti, A.A.M. Coelho-Castelo, S. G. Ramos, E.A. Donadi, E.T. Sakamoto-Hojo, G.A. da Silva-Passos, C.Lopes-Silva. 2009. **Comprehensive gene expression profiling in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* following DNAhsp65 immunotherap.** *J Gene Med.* 11: 66–78.
- Zügel U., B. Schoel, S. Yamamoto, H. Hengel, B. Morein, S.H. Kanfmann. 1995. **Crossrecognition by CD8 T cell receptor alpha beta cytotoxic T lymphocytes of peptides in the self and the mycobacterial hsp 60 which share intermediate sequence homology.** *Eur J Immunol.* 25:451-458.