

EXPRESSÃO DE PROTEÍNA HETERÓLOGA EM ALFACE (*Lactuca sativa*)

MARCELY BRASIL SILVA¹; VANESSA GALLI²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹*Universidade Federal de Pelotas – marcelybrasil.silva7@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br*

³*Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A presença de endoparasitas, como helmintos, protozoários e outros, compromete a saúde dos animais, reduzindo a eficiência da produção e aumentando os custos com tratamentos veterinários (KUISEU et al., 2021; GAZZINELLI-GUIMARAES; NUTMAN, 2018). Um levantamento do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) relatou que 66,8% do diagnóstico de doenças em ovinos se trata de parasitoses (OLIVEIRA et al., 2017). Dentre essas parasitoses, os principais parasitos que infectam ovinos são o *Haemonchus contortus*, causador da doença hemoncosse (ADDUCI et al., 2022). O *Haemonchus contortus* é um nematoda gastrintestinal hematófago que causa anemia e hipoproteinemia nos animais infectados (BERTAGNON et al., 2019), os quais adquirem a infecção quando se alimentam de pasto contaminado (FLAY; HILL; MUGUIRO, 2022). O tratamento contra a hemoncosse é realizado com o uso de anti-helmínticos. Porém, a resistência adquirida aos anti-helmínticos presentes no mercado é crescente e contínua (BORDES et al., 2020). Desta forma, existe a necessidade de buscar por alternativas ao tratamento contra esta parasitose.

Nesse contexto, a toxicidade e atividade tóxica do *B. thuringiensis* foi descrita por (BRAVO et al., 2013; PÉREZ et al., 2005) e especificamente contra o nematoda *H. contortus* por (PANHWER et al., 2023; LARA et al., 2016). A aplicação de proteínas bioinseticidas produzidas pelo *B. thuringiensis*, como a Cry11Aa, no controle do *H. contortus* representa uma alternativa sustentável. (PANHWER et al., 2023; SANDERS et al., 2020). O objetivo desse trabalho é a expressão da proteína Cry11Aa em alface (*Lactuca sativa*) para futura avaliação de sua ação anti-helmíntica contra *H. contortus* em ovinos, ao ser incorporada na dieta destes animais.

2. METODOLOGIA

O plasmídeo pCAMBIA2300 foi sintetizado pela empresa GenOne. A clonagem foi realizada com uso das enzimas de restrição KpnI e SalI, o inserto codificador da proteína Cry11Aa sob o promotor CaMV 35S e foram adicionados uma cauda de histidina (6xHis) na região N-terminal e um gene repórter EGFP (proteína verde fluorescente aprimorada) fusionado à região C-terminal.

O plasmídeo recombinante pCAMBIA2300 foi propagado em *Escherichia coli* cepa DH5α através de choque térmico de acordo com (SALEH et al., 2023) e extraído através de lise alcalina para clonagem em *Agrobacterium tumefaciens*.

Foi plaqueada a cepa EHA105 de *A. tumefaciens* em meio Luria Bertani com rifampicina (50 mg/mL), e incubadas por 2 dias à 28 °C. Foi feito um inóculo líquido *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, a transformação por choque térmico de acordo com Siamalube et al. (2025).

Vinte mudas de alface foram mantidas em uma casa de vegetação sob condições controladas e divididas em dois grupos para transformação transiente por agroinfiltração (10 unidades no grupo controle e 10 unidades para transformação). A solução de agroinfiltração é preparada a partir de um inóculo de *A. tumefaciens* transformada $OD_{600} \approx 0.6$. O inóculo é centrifugado e o pellet ressuspendido com tampão de infiltração. Outros componentes adicionados como tampão MES 10 mM e acetoseringona 20 mM e aferida a $OD_{600} \approx 0.1$. A solução é injetada através de seringas sem agulha na parte adaxial das folhas, aplicando leve pressão. As plantas devem ser mantidas na casa de vegetação pelos seguintes três dias no período pós-infiltração e maceradas com nitrogênio líquido.

A extração de proteínas totais é feita com o tampão de extração (50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, Triton x100 1% (v/v), PVP 2,5% (w/v), B-mercaptoethanol (2%)) seguido de SDS-page e western blot. Os resultados obtidos serão analisados e registrados para continuação do trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O plasmídeo pCAMBIA2300 foi propagado em *E. coli* DH5α. A *A. tumefaciens* cresceu nas condições adequadas e foi transformada de acordo com Siamalube et al. (2025). Uma extração de DNA plasmidial e PCR convencional com primers Cry11Aa serão feitas para validar a transformação. A infiltração será em cultivar de alface lisa, por sua superfície lisa e sem ondulações permite uma distribuição regular pelo tecido.

O tecido vegetal será extraído e a expressão de proteína recombinante quantificada por técnicas de biologia molecular e proteômica. Os resultados obtidos serão levados à diante para desenvolver uma abordagem de potencial anti-helmíntico inserindo o alface transformado na alimentação de ovinos com o objetivo de obter uma diminuição na EPG de *H. contortus*.

4. CONCLUSÕES

A expressão da Cry11Aa em alface apresenta potencial como estratégia inovadora para o controle do *H. contortus* em ovinos em consequência da sua atividade larvicida, uma alternativa sustentável aos anti-helmínticos químicos atuais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDUCI, Isabella et al. Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus*. **Animals**, v. 12, n. 18, p. 2339, jan. 2022.

BERTAGNON, Heloisa Godoi et al. EFEITO DO PARASITISMO POR *Haemonchus contortus* SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO DE LEUCÓCITOS DE OVINOS. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. e, 2019.

BORDES, Léa *et al.* First report of multiple resistance to eprinomectin and benzimidazole in *Haemonchus contortus* on a dairy goat farm in France. **Parasitology International**, v. 76, p. 102063, 1 jun. 2020.

BRAVO, Alejandra *et al.* Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17–26, jan. 2013.

FLAY, Kate J.; HILL, Fraser I.; MUGUIRO, Daniela Hernandez. A Review: *Haemonchus contortus* Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. **Animals**, v. 12, n. 10, p. 1238, jan. 2022.

GAZZINELLI-GUIMARAES, Pedro H.; NUTMAN, Thomas B. Helminth parasites and immune regulation. **F1000Research**, v. 7, p. F1000 Faculty Rev-1685, 23 out. 2018.

KUISEU, Julienne *et al.* Prevalence, effects and alternative control methods of *Haemonchus contortus* in small ruminants: A review. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 13, n. 2, p. 84–97, 30 abr. 2021.

LARA, Ana Paula De Souza Stori De *et al.* Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry11Aa toxin against *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 143, n. 12, p. 1665–1671, out. 2016.

OLIVEIRA, Plínio Aguiar de *et al.* Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 797–801, ago. 2017.

PANHWER, Sana Noor *et al.* The anthelmintic potential of *Bacillus thuringiensis* to counter the anthelmintic resistance against *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v. 250, p. 108533, 1 jul. 2023.

PÉREZ, Claudia *et al.* *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18303–18308, 20 dez. 2005.

SALEH, B. *et al.* CLONING OF BRAZZEIN GENE (SWEET PROTEIN) INTO PBI121 VECTOR THROUGH PROKARYOTIC EXPRESSION SYSTEM. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 33, n. 3, p. 715–721, 18 jun. 2023.

SANDERS, John *et al.* A new paraprobiotic-based treatment for control of *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 230–236, 1 dez. 2020.

SIAMALUBE, Beenzu *et al.* Simple and Fail-safe Method to Transform Miniprep *Escherichia coli* Strain K12 Plasmid DNA Into Viable Agrobacterium tumefaciens EHA105 Cells for Plant Genetic Transformation. **Bio-Protocol**, v. 15, n. 1, p. e5174, 5 jan. 2025.