

MARIANA FONSECA XISTO

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA NÃO-ESTRUTURAL 1 (NS1)  
DO VÍRUS *DENGUE-2* EM *Arabidopsis thaliana***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

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

T

X6e  
2015 Xisto, Mariana Fonseca, 1989-  
Expressão heteróloga da proteína não estrutural 1 (NS1) do  
vírus *dengue-2* em *Arabidopsis thaliana* / Mariana Fonseca  
Xisto. – Viçosa, MG, 2015.  
ix, 41f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.35-41.

1. Proteínas - Análise. 2. Dengue. 3. Virologia.  
4. Antígenos. 5. *Arabidopsis thaliana*. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de  
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8633

MARIANA FONSECA XISTO

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA NÃO-ESTRUTURAL 1 (NS1)  
DO VÍRUS *DENGUE-2* EM *Arabidopsis thaliana***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 30 de julho de 2015.



Wagner Campos Otoni



Roberto Sousa Dias



Sérgio Oliveira de Paula  
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Fátima,  
que são a razão e a emoção da minha vida e os  
porquês das minhas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, responsável por todas as bênçãos e por ter me concedido tantas graças, pela força nos momentos de medo aumentando a minha fé, pela energia que fazia eu me sentir mais forte durante esta caminhada.

Aos meus pais, Paulo e Fátima, por serem meus maiores e melhores exemplos e por acreditarem em mim. Pela educação, pela formação e incentivo. “Com vocês, eu sei, me sinto forte, Com vocês não temo a minha sorte”. Por terem transformado a dor da minha ausência em crescimento e compreensão. Pelas vezes que chorei ao telefone e vocês foram a minha paz.

Ao meu irmão, João Paulo, que mesmo sem muito jogo de cintura esteve fazendo por mim o papel de filho, cuidando e dando trabalho aos nossos queridos pais.

A todos meus familiares pelo carinho, pelas mensagens de incentivo e pelas conversas.

Aos meus amigos, os de perto e os de longe, que levantaram o meu sorriso, que não me deixavam desanimar. Que estavam sempre presentes, desde o cafezinho da Livraria, dividindo a tomada na BBT, aos fins de semana com festas, cerveja e picanha. Pelos ouvidos que muitas vezes escutaram eu lamentar, que escutavam sobre os meus experimentos e não se cansavam (aparentemente). Por que deram asas a minha imaginação foram muitas vezes mais que amigos, foram anjos.

Agradeço ao Professor Sérgio de Paula, pela oportunidade, pela confiança no meu trabalho, pela orientação nesses anos todos e pela disponibilidade de sempre.

Agradeço ao Professor Wagner Otoni, primeiramente por gentilmente aceitar o convite para participar da banca, e também pela colaboração com este trabalho, cedendo o espaço do seu Laboratório de Cultura de Tecidos para realização dos meus experimentos.

Aos amigos do LIVM, por tornar a jornada de bancada menos cansativa e sempre divertida. Pelos cafezinhos das 12 ou das 24 xícaras, dependendo da população flutuante. Obrigada a cada um de vocês que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, sempre dispostos e ajudando a

resolver os problemas. Com vocês, trabalhar sempre foi motivo de alegria, a melhor “Galera do Lab”.

Ao Roberto, primeiramente por gentilmente aceitar o convite para participar da banca, e por ser um amigo e conselheiro a muitos anos, pela disposição de sempre me ajudar e sanar as minhas dúvidas.

À Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e aos professores, pela seriedade nos trabalhos e por serem sempre acessíveis no decorrer do curso.

À Universidade Federal de Viçosa pela excelência de ensino, por ser uma instituição de respeito e renomada por contribuir na capacitação de novos profissionais.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq que financiaram o projeto, me concederam a bolsa de estudos e foram essenciais para a concretização deste trabalho.

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

O meu muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Mariana Fonseca Xisto, nascida no dia 30 de março de 1989, natural de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, filha de Paulo Ribeiro Xisto e Maria de Fátima da Fonseca Xisto. Estudou no Colégio Padre Eustáquio, situado na mesma cidade que nasceu, completando o ensino médio no ano de 2006. Mudou-se para Viçosa, Minas Gerais, no ano de 2008, para cursar a graduação em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Ingressou no Laboratório de Immunovirologia Molecular, no ano de 2010, onde foi estagiária e bolsista de iniciação científica (FAPEMIG), até se formar Bacharela em Bioquímica no ano de 2013. No mesmo ano, iniciou o Mestrado no programa de Pós-Graduação stricto sensu em Biologia Celular e Estrutural pela UFV.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	8
2.1. Objetivo Geral .....	8
2.2. Objetivos Específicos .....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
3.1. Construção do plasmídeo pUC57/NS1 .....	9
3.1.1. Otimização da sequência do gene da proteína NS1 .....	9
3.1.2. Obtenção de <i>E. coli</i> TOP 10F competentes .....	9
3.1.3. Transformação de <i>E. coli</i> TOP 10F competentes com o vetor de clonagem pUC57/NS1 .....	10
3.1.4. Extração de plasmídeos pUC57/NS1 .....	10
3.1.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	11
3.1.6. Purificação de DNA do plasmídeo pUC57/NS1 .....	11
3.1.7. Clivagem do gene NS1 com enzimas de restrição .....	12
3.2. Construção do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 .....	12
3.2.1. Extração dos plasmídeos pCAMBIA3301 .....	12
3.2.2. Clivagem do plasmídeo pCAMBIA3301 com enzimas de restrição... .....	12
3.2.3. Purificação do inserto NS1 e do plasmídeo pCAMBIA3301 .....	13
3.2.4. Ligação do inserto NS1 no plasmídeo pCAMBIA3301 .....	13
3.2.5. Transformação de células competentes <i>E. coli</i> TOP 10F com pCAMBIA3301/NS1 .....	13
3.2.6. Análise e seleção das colônias transformadas .....	14
3.3. Transferência do vetor de expressão .....	14
3.3.1. Obtenção de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competentes .....	14
3.3.2. Transformação de <i>A. tumefaciens</i> competente com o vetor de expressão pCAMBIA3301/NS1 .....	15
3.3.3. Análise e seleção das colônias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas	15
3.4. Obtenção das plantas transformadas .....	16
3.4.1. Crescimento da planta .....	16
3.4.2. Preparo da cultura de <i>A. tumefaciens</i> para transformação .....	17
3.4.3. Transformação das plantas pelo método <i>floral-dip</i> .....	17
3.4.4. Desinfestação, germinação das sementes e seleção genética da terceira geração .....	18

3.5.	Análise das plantas transformadas .....	19
3.5.1.	Extração de DNA das plantas .....	19
3.5.2.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	19
3.5.3.	Imunolocalização <i>in situ</i> da proteína NS1 por microscopia confocal .....	20
4.	RESULTADOS.....	21
4.1.	Confirmação da transformação de <i>E. coli</i> TOP 10F com o plasmídeo pUC57/NS1 .....	21
4.2.	Digestão do plasmídeo pUC57/NS1 .....	21
4.3.	Digestão do plasmídeo pCAMBIA3301.....	22
4.4.	Confirmação da clonagem do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 em <i>E. coli</i> TOP 10F .....	23
4.5.	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com o plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 .....	23
4.6.	Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .. .....	24
4.7.	Germinação das sementes da geração T1 de <i>A. thaliana</i> .....	24
4.8.	Segregação genética e obtenção das <i>A. thaliana</i> transformadas na terceira geração .....	25
4.9.	Cultivo e estoque das <i>A. thaliana</i> transgênicas selecionadas .....	26
4.10.	Confirmação da transformação de <i>A. thaliana</i> .....	26
4.11.	Microscopia confocal comparativa .....	26
5.	DISCUSSÃO .....	30
6.	CONCLUSÕES .....	33
7.	PERSPECTIVAS.....	34
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## RESUMO

XISTO, Mariana Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2015. **Expressão heteróloga da proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus dengue-2 em *Arabidopsis thaliana***. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

A dengue é a doença mais importante causada por um arbovírus no mundo. O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* e possui 4 sorotipos antigenicamente distintos. São vírus de RNA fita simples, polaridade positiva, com o genoma de aproximadamente 11 Kb que é traduzido em uma poliproteína subdividida em três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais (que estão relacionadas com a replicação viral, expressão das proteínas virais e virulência dos sorotipos). Nos últimos vinte anos têm sido observado um incremento significativo na atividade epidêmica, expansão da distribuição geográfica e transmissão contínua dos diferentes sorotipos em áreas onde a doença não era prevalente. Um dos eventos mais alarmantes tem sido o aumento do número de casos da Febre da Dengue Hemorrágica (FDH) nas Américas. Um ponto ainda limitante dos testes diagnósticos que capturam o anticorpo presente no soro de pacientes infectados consiste na dificuldade de obtenção de baixo custo e produção em grande escala dos antígenos. Diante destas considerações objetivou-se expressar a proteína não-estrutural (NS1) do vírus *dengue-2* em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. O gene da proteína NS1 foi otimizado para a expressão em plantas e clonado no plasmídeo pCAMBIA3301. O vetor de expressão pCAMBIA3301/NS1 foi utilizado para transformação de *Arabidopsis thaliana*. A terceira geração de plantas transformadas foi selecionada em homozigose dominante. A transformação de *Arabidopsis thaliana* foi evidenciada pela imunolocalização da proteína NS1 marcada dentro do lúmen do retículo endoplasmático em tecidos foliares. Este sistema será utilizado para obtenção do antígeno NS1 com finalidade de aplicação em testes de diagnóstico da dengue.

## ABSTRACT

XISTO Mariana Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Heterologous expression of the nonstructural 1 protein (NS1) of dengue-2 virus in *Arabidopsis thaliana*.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula.

Dengue fever is the most important disease caused by an arbovirus in the world. The dengue virus belongs to the *Flaviviridae* family and has four antigenically distinct serotypes. They are single stranded RNA viruses, positive polarity, with a genome of approximately 11 Kb which is translated into a polyprotein subdivided in three structural proteins and seven non-structural proteins (that are related to viral replication, expression of viral proteins and virulence of serotypes). In the last twenty years, it was observed a significant increase in the epidemic activity, expansion of the geographical distribution and streaming of different serotypes in areas where the disease was not prevalent. One of the most alarming events was the increase in the number of cases of dengue hemorrhagic fever (DHF) in the Americas. A further limiting point of the diagnostic tests that capture antibody present in the serum of infected patients is the difficulty of obtaining low-cost and large-scale production of the antigens. Due to this factor, we aimed to build a system in transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing the nonstructural protein (NS1) of the *dengue-2* virus. The gene of the NS1 protein was optimized for expression in plants and cloned into the plasmid pCAMBIA3301. The expression vector pCAMBIA3301/NS1 was used for transformation of *Arabidopsis thaliana*. The third generation of transformed plants were selected by dominant homozygous. The construction of a transgenic *Arabidopsis thaliana* system was demonstrated by immunolocalization of the NS1 protein into the lumen of the endoplasmic reticulum in the leaf tissues. This system will be used to obtain the NS1 antigen with application purpose of dengue diagnostic tests.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das doenças humanas mais importantes no mundo e transmitidas por artrópodes é a infecção causada pelo vírus da dengue. A transmissão do vírus é feita por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, que se caracteriza por ser predominantemente urbano (LEMES *et al.*, 2005; OISHI *et al.*, 2007). É uma doença aguda e sistêmica que está estabelecida a nível mundial no ciclo de transmissão endêmica e epidêmica. Pode levar a uma grande variedade de manifestações clínicas, de febre rápida à potencialmente fatal síndrome do choque da dengue (BHATT *et al.*, 2013)

Foi estimado que 2,5 bilhões de pessoas no mundo correm risco de infecção e, aproximadamente, 975 milhões vivem em áreas urbanas de países tropicais e subtropicais no sudeste da Ásia, no Pacífico e nas Américas. A transmissão também ocorre na África e no Mediterrâneo Oriental (Fig. 1). O cálculo é de 50 milhões de infecções por ano, incluindo 500 mil hospitalizações por febre hemorrágica da dengue. O Brasil lidera o ranking dos países onde a doença é endêmica com 1.476.917 de casos já notificados segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (GUZMAN *et al.*, 2010; OMS, 2013).



Figura 1. Países e áreas com relatos de dengue (OMS, 2014).

O vírus da dengue (DENV) pertence à família *Flaviviridae* e possui 4 sorotipos antígenicamente distintos, denominados *dengue-1*, *dengue-2*, *dengue-3* e *dengue-4*. Contém um genoma de RNA de cadeia simples, polaridade positiva, inserido num nucleocapsídeo icosaédrico rodeado por um envelope lipídico. O genoma é traduzido em três proteínas estruturais (proteína E do envelope, proteína M de membrana e a proteína C do capsídeo) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Fig. 2). As proteínas não-estruturais (NS) estão relacionadas à replicação viral, à expressão das proteínas virais e à virulência dos sorotipos (LINDENBACH e RICE, 2003; WHITEHEAD *et al.*, 2007).

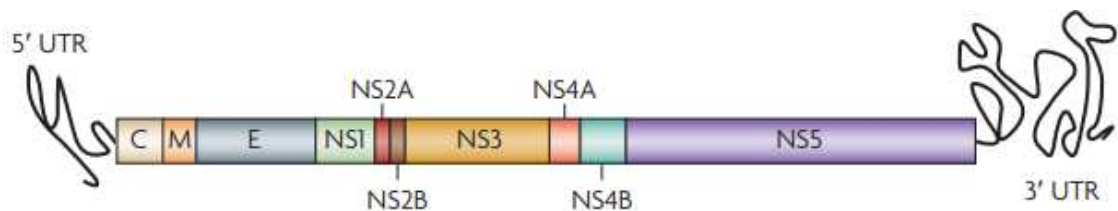


Figura 2. O genoma do vírus da dengue. Uma única poliproteína é traduzida em três glicoproteínas estruturais (C do capsídeo, M da membrana, E do envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (GUZMAN *et al.*, 2010).

A proteína NS1, foco deste trabalho, é uma glicoproteína de 43-48 kDa, apresenta-se na forma de monômeros solúveis que dimerizam-se no lúmen do retículo endoplasmático (WINKLER *et al.*, 1988; FLAMAND *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2006). Posteriormente é transportada para a superfície celular onde pode permanecer ancorada à membrana ou liberada para o meio extracelular na sua forma hexamérica. A proteína NS1 processada possui uma sequência sinal na região C-terminal da glicoproteína do envelope do DENV, que serve como sinal de translocação para o lúmen do retículo endoplasmático. (FALGOUT *et al.*, 1989; FALGOUT e MARKOFF, 1995).

Mesmo que todas as funções da proteína NS1 não tenham sido completamente elucidadas, evidências experimentais indicam que a proteína está envolvida na replicação do RNA do DENV (MACKENZIE *et al.*, 1996; MUYLEAERT *et al.*, 1996; LINDENBACH e RICE, 1997). As funções das formas extracelulares da proteína NS1 também não estão claras, mas têm sido proposto um envolvimento específico nos mecanismos de patogênese e evasão do sistema

imune. Muitos estudos têm a proteína NS1 como alvo para: desenvolvimento de vacinas, terapia com drogas antivirais e diagnóstico precoce e diferencial da doença (AMORIM *et al.*, 2014).

A proteína NS1 ativa a produção de anticorpos anti-NS1 pelo sistema imune. Esses anticorpos são fixadores de complemento e conferem atividade protetora relacionada com a lise das células infectadas pelo DENV, que expressam NS1 na sua superfície. Os anticorpos anti-NS1 não reconhecem nenhum epítipo na partícula viral livre, portanto não são facilitadores de infecção (SCHLESINGER *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 2007; CHUANG *et al.*, 2013).

O quadro clínico dos pacientes infectados com dengue vai desde infecções com sintomas brandos a manifestações graves de hemorragia e choque, conhecidas como dengue hemorrágica e síndrome do choque, que são a causa dos altos índices de morbidade e mortalidade. As formas graves da doença são muitas vezes confundidas com doenças caracterizadas por distúrbios de permeabilidade capilar (DE PAULA e FONSECA, 2004).

O diagnóstico precoce da dengue, seguido pelo tratamento dos sintomas, é um fator importante na sobrevivência dos pacientes, principalmente para aqueles que apresentam a forma mais grave da doença (ANANDARAO *et al.*, 2005). Os procedimentos para detecção de partículas e genoma viral feitos em laboratório envolvem um trabalho demorado, oneroso e inviável quando se trata da necessidade de diagnóstico imediato. Em alternativa, ensaios sorológicos de detecção de anticorpos IgM (fase aguda) e IgG (fase de convalescência) foram descritos e são recomendados para diagnóstico de infecções por DENV (GROEN *et al.*, 2000; OMS, 2009).

Os métodos imunoenzimáticos têm sido muito visados para o desenvolvimento de teste diagnóstico da dengue nos últimos anos, por serem de simples execução e de baixo custo. Atualmente já existem testes em desenvolvimento ou no mercado para o diagnóstico da dengue durante a fase aguda da infecção (ARYA *et al.*, 2007; BERLIOZ-ARTHAUD *et al.*, 2008). No ano 2000 foi publicado o primeiro trabalho que detectou NS1 presente no soro de pacientes através do teste de ELISA. NS1 foi encontrada altamente conservada nas formas solúveis e de membrana (YOUNG *et al.*, 2000). Vários estudos avaliaram a eficiência dos testes para diagnosticar precocemente a

dengue. Num recente trabalho, foi mostrado que o ensaio de ELISA apresentou maior sensibilidade quando comparado com testes comerciais de diagnóstico rápido para detectar NS1 em infecções primárias de dengue (PAL *et al.*, 2014). A quantidade de falsos negativos foi significativa, e a isso foi atribuído o fato de que a quantidade de NS1 detectável no soro dos pacientes é flutuante e sofre mudanças temporais no decorrer dos dias após o aparecimento dos sintomas (MCBRIDE *et al.*, 2009).

Para melhorar a sensibilidade e especificidade dos kits diagnósticos, alguns autores levantaram a hipótese da combinação de abordagens que detectem em conjunto o antígeno NS1 circulante e os anticorpos anti-NS1 (ZAINAH *et al.*, 2009; RAMIREZ *et al.*, 2009). Isso também possibilitaria o diagnóstico para infecções secundárias, que são mascaradas pelos testes já existentes. Esse fenômeno ocorre porque os anticorpos anti-NS1 de uma primeira infecção formam complexo antígeno-anticorpo, impossibilitando a detecção pelos testes numa nova infecção (HANG *et al.*, 2009; OSORIO *et al.*, 2010).

A obtenção e produção de antígenos tem sido um desafio para os centros de pesquisa que trabalham com ensaios imunoenzimáticos. A dificuldade está na produção em escala do antígeno que tenha baixo custo. Obter a proteína NS1 do vírus da dengue, a partir do sobrenadante da cultura de células infectadas é um obstáculo devido ao rendimento ser baixo.

O estudo e desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos e baratos representa uma necessidade emergente no Brasil, uma vez que a dengue abrange todo território nacional, inclusive em regiões mais afastadas onde as ações de controle, prevenção e tratamento têm se mostrado inefetivas (CAVALCANTI *et al.*, 2011). Devido a esta demanda, a transformação de uma planta modelo expressando, de forma heteróloga, a proteína NS1 foi desenvolvida neste estudo, com a finalidade de obter um antígeno em quantidade e qualidade.

Nos últimos anos, a biotecnologia ampliou o uso de organismos vegetais visando expressão de transgenes. A expressão de genes em plantas apresenta diversas vantagens em relação a outros organismos. A maquinaria de processamento pós-traducional vegetal é similar a de mamíferos uma vez que o sítio alvo das glicosilases é o mesmo, o que difere é apenas um resíduo do

açúcar adicionado. Já as leveduras além de possuir o sítio de glicosilação diferente de mamíferos, adiciona um açúcar não correspondente, o que pode interferir na estrutura terciária final da proteína depois do processamento. Plantas não carregam vírus, patógenos ou oncogenes de mamíferos (BLAIS e ALTOSAAR, 2006). Em adição, a produção em massa de proteínas de interesse se torna comercialmente mais barata, ampliando os estudos com proteínas recombinantes para uso em prevenção, diagnóstico e terapias (STREATFIELD, 2006).

A primeira proteína de interesse farmacêutico produzida em plantas foi o hormônio do crescimento humano, expresso em tabaco transgênico em 1986 (BARTA *et al.*, 1986). Desde então, pesquisas mostraram que uma gama de proteínas com alto valor econômico podem ser expressas eficientemente em plantas (SHRAWAT *et al.*, 2007). Tais como, a expressão do fator estimulante de colônias de granulócitos (SARDANA *et al.*, 2002), fator de crescimento 1 (IGF1) semelhante a insulina (PANAHI *et al.*, 2004), antígenos vacinais do vírus da hepatite B (THANAVALA *et al.*, 2005), produção de alérgenos de pólen (SIEGERT *et al.*, 2012) e um exemplo recente, a produção de anticorpo monoclonal contra a proteína GP1 do vírus ebola (FULTON *et al.*, 2015).

Diversas metodologias para transformação de plantas foram desenvolvidas e estão sob constante aperfeiçoamento. As técnicas de transformação indireta do genoma da planta são mediadas por infecção via *Agrobacterium*, biobalística (bombardeamento de partículas) ou utilização de vírus recombinantes, que integram o transgene no genoma vegetal, induzindo a expressão da proteína de interesse (GIDDINGS *et al.*, 2000).

As agrobactérias são microrganismos aeróbicos, gram-negativos e tipicamente encontrados no solo. O gênero *Agrobacterium*, pertencente à família *Rhizobiaceae*, está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela patogenicidade e pelo modo de infecção em diferentes plantas. A espécie *A. tumefaciens* é o agente etiológico da galha-da-coroa, doença que se caracteriza pela formação de tumores nos tecidos afetados (ANDRADE *et al.*, 2003).

A agrobactéria penetra no tecido vegetal através de ferimentos sofridos pela planta, a atração acontece por quimiotactia em relação as moléculas-sinal

que são exsudadas das células lesionadas. Essas moléculas-sinal também são responsáveis pela ativação de genes que estão localizados no plasmídeo *Ti* (indução de tumor), que promove a transferência de genes da bactéria para a célula vegetal (GELVIN, 2012).

A região *vir* (região de virulência), presente no plasmídeo *Ti*, é um *regulon* composto de seis a oito *operons*, contendo aproximadamente 25 genes, os quais codificam diversas proteínas que vão promover a transferência da região T-DNA (DNA de transferência) do plasmídeo para o genoma da planta (Fig. 3)(BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998; CHRISTIE *et al.*, 2005).

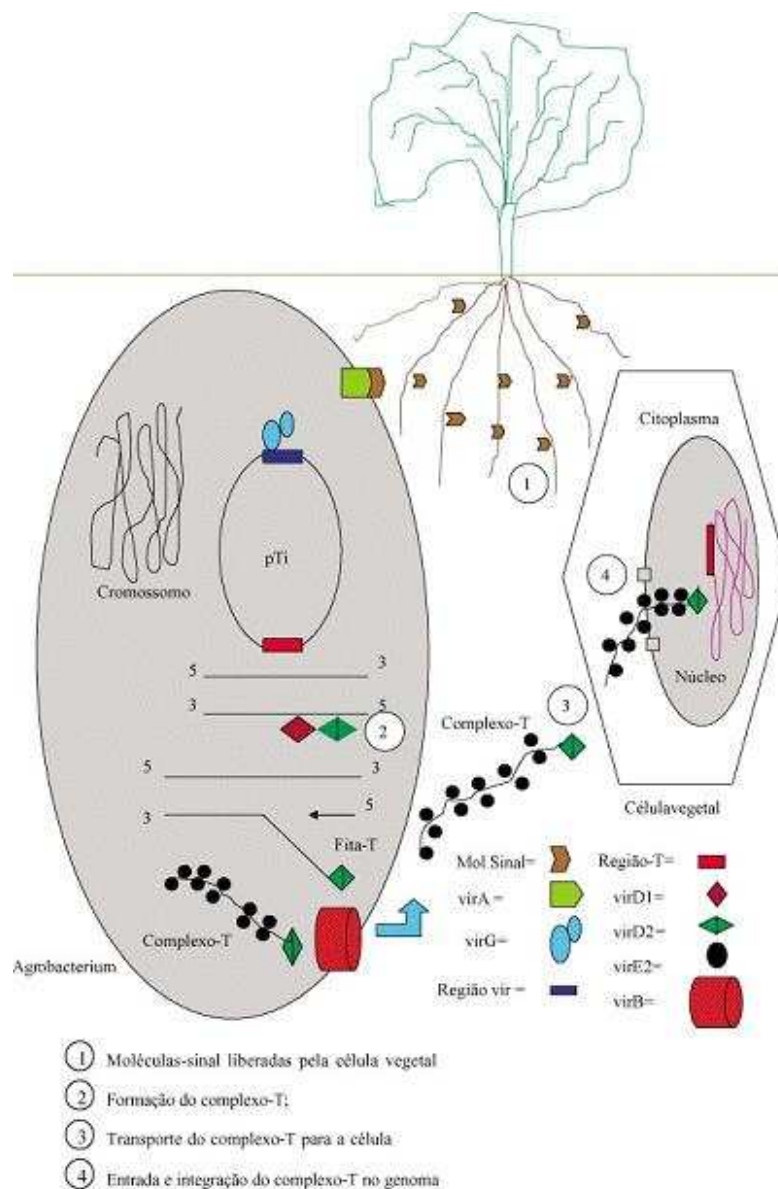


Figura 3. Representação esquemática do processo de infecção de uma célula vegetal por *A. tumefaciens* (ANDRADE *et al.*, 2003).

Com intuito de se obter grande quantidade da proteína do vírus dengue para utilização em testes diagnósticos, adotou-se a metodologia para transformação e obtenção de plantas transgênicas. Escolheu-se a proteína NS1 devido às características já descritas e também por ser uma das primeiras proteínas a serem secretadas pelas células infectadas, o que possibilita o diagnóstico rápido da doença. Utilizou-se a *Arabidopsis thaliana* por ser uma espécie de reprodução rápida, com ciclo de vida curto e com grande produção de sementes (MEINKE *et al.*, 1998).

Dentre as vantagens da *Arabidopsis thaliana* em relação à outras plantas de comum utilização em laboratórios de pesquisa, diz respeito ao seu porte pequeno. Este fato possibilita crescer grande número de plantas em espaços reduzidos, como casas de vegetação ou mesmo câmaras de crescimento. Ela pode ser cultivada inclusive em placas de Petri o que facilita muito o trabalho e a condução de grande número de plantas ao mesmo tempo. O pequeno porte de planta aliado à facilidade de cultivo, hábito reprodutivo e ciclo de vida, resultam em um aspecto positivo, o custo de produção reduzido (DELATORRE e SILVA, 2008).

Nesse trabalho transformou-se bactérias do gênero *Agrobacterium* com plasmídeo que carrega o gene responsável por codificar a proteína NS1 do vírus *dengue-2*, e as utilizamos para transformação genética da *Arabidopsis thaliana*. Realizou-se a segregação genética da geração inicial transformada para chegar na geração homocigota dominante para o gene de interesse. E verificou-se por microscopia confocal de imunofluorescência a expressão da proteína NS1 nas plantas transformadas.

Neste trabalho todas as recomendações e exigências referentes à saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente foram cumpridas de acordo com as normas técnicas estabelecidas para atividades que envolvam experimentação, cultivo, manipulação, armazenamento e descarte de organismos geneticamente modificados (OGM) e derivados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Construir um sistema de expressão transgene em plantas *Arabidopsis thaliana* visando a obtenção do antígeno não estrutural 1 (NS1) do vírus dengue-2.

### 2.2. Objetivos Específicos

- 1- Otimizar a sequência do gene da proteína não estrutural (NS1) do vírus *dengue-2* para a expressão em *Arabidopsis thaliana*;
- 2- Transformar bactérias *E. coli* TOP 10F com a sequência otimizada;
- 3- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor de expressão pCAMBIA3301 contendo o gene NS1 otimizado;
- 4- Transformar *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens*;
- 5- Obter a geração da planta transformada que tenha segregado o gene NS1 e esteja em homozigose dominante;
- 6- Verificar a expressão do gene NS1 através de localização *in situ* por microscopia confocal de imunofluorescência.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Construção do plasmídeo pUC57/NS1**

##### **3.1.1. Otimização da sequência do gene da proteína NS1**

Com o objetivo de obter altos níveis de expressão da proteína NS1 na planta transgênica, foi adquirido o vetor de clonagem pUC57 (Fig. 4) com a sequência otimizada do gene da proteína NS1 e sequências específicas (Fig. 5) adicionadas: sítios de restrição para as enzimas *Bgl II* e *BstE II*, que foram utilizados para clonagem do plasmídeo pCAMBIA3301 (Fig. 6); sequência de recombinação para *AttB1* e *AttB2*; sequência Kozak para reconhecimento do ribossomo visando a expressão em células eucarióticas; códon de iniciação; peptídeo sinal da proteína Bip At5g44620 (LEE *et al.*, 2011) para o endereçamento da sequência para o retículo endoplasmático; gene da proteína não-estrutural 1 do vírus *dengue-2* cepa *New Guinea C.*; cauda de polihistidina, que pode ser utilizada para a purificação de proteínas recombinantes (WU *et al.*, 2003); sequência de retenção no retículo endoplasmático através do ancoramento a membrana visando aumentar a expressão do gene NS1 (MUNRO e PELHAM, 1987; KOIZUMI, 1996; NAPIER *et al.*, 1992) e códon de terminação.

##### **3.1.2. Obtenção de *E. coli* TOP 10F competentes**

Células *E. coli* TOP 10F competentes foram preparadas para utilização no tratamento com choque térmico. Para tanto, a bactéria TOP 10F foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB líquido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, pH 7,0) e crescida durante 12 horas, a 37 °C sob uma agitação de 250 rpm. O pré-inóculo foi transferido para 250 mL de meio LB líquido e incubado a 37 °C sob agitação de 250 rpm até atingir a densidade ótica (DO) = 0,4/0,5, na absorvância de 600nm ( $A_{600}$ ). Em seguida, as células foram centrifugadas, em tubos de 50 mL estéreis, a 4.500 x g por 10 minutos, a 4 °C e o precipitado foi suspenso gentilmente em 15 mL de  $CaCl_2$  (50 mM)

gelado. A solução foi incubada no gelo por 10 minutos e, então, novamente centrifugada a 4.500 x g por 10 minutos, a 4 °C. O precipitado foi suspenso em 2,85 mL de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) gelado e 150 µL de glicerol puro estéril foi adicionado e homogeneizado. As células competentes foram aliquotadas em tubos com 200 µL da solução, colocadas no nitrogênio líquido imediatamente e estocadas a -80 °C.

### **3.1.3. Transformação de *E. coli* TOP 10F competentes com o vetor de clonagem pUC57/NS1**

*E. coli* TOP 10F competentes foram transformadas com o plasmídeo pUC57/NS1, com o objetivo de aumentar os clones de plasmídeos recombinantes e formação de um estoque do mesmo. Para a transformação, 200 µL de bactérias competentes foram estabilizadas à temperatura no gelo em tubo de 1,5 mL. Foi adicionado 2 µL da solução de plasmídeo recombinante ao tubo, e incubado em gelo por 30 minutos. Em seguida, as bactérias foram incubadas a 42 °C por 90 segundos, colocadas no gelo e mantidas por 15 minutos (choque térmico). Posteriormente, foi adicionado 110 µL de meio SOC (20 g/L de bacto triptose, 5 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de NaCl e 20mM de glicose) e, finalmente, incubadas a 37 °C por 30 minutos. Foi plaqueado 100 µL da solução em meio LB sólido contendo o antibiótico (ampicilina – 100 µg/mL) e incubada a 37 °C.

### **3.1.4. Extração de plasmídeos pUC57/NS1**

Para obtenção dos plasmídeos recombinantes pUC57/NS1 foi realizada uma extração de DNA plasmidial. As colônias de *E. coli* TOP 10F que cresceram no meio sólido foram transferidas, uma a uma, para 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e deixadas para crescer durante 12 horas, a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Foram recolhidas por centrifugação a 10.000 x g por 2 minutos (descartado o sobrenadante) e suspensas em 200 µL de tampão de lise (50 mM glicose, 25 mM tris-HCl, 10 mM EDTA, lisozima 1 mg/mL, pH 8,0). Após 5 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 400 µL

de solução alcalina fresca (0,2 M NaOH, 1% SDS) e a mistura foi incubada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 300 µL de solução de acetato de amônio 7,5 M, e a mistura agitada gentilmente por alguns segundos e novamente incubada em gelo, por 10 minutos, para precipitação de proteínas, RNAs de alto peso molecular e DNA cromossomal. A mistura foi centrifugada por 3 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 450 µL de isopropanol e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos para precipitação dos plasmídeos. Em seguida, foi centrifugado a temperatura ambiente, por 10 minutos a 15.000 x g e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 200 µL de álcool a 70% e, deixado para secar em temperatura ambiente.

### **3.1.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para a PCR, foi desenhado 1 par de iniciadores sintéticos (primers), pCambNS1sense (5` GGAGATCTATGGATAGTGGTTGCGTTGTGA 3`) e pCambNS1antisense (5` GGGGTAACCTGAGGCTGTGACCAAGGAGT 3`) que flanqueiam a região do gene que codifica a proteína não estrutural NS1 do vírus *dengue-2*, resultando num fragmento de 1056 pares de bases (pb). Os primers contém os sítios de restrição das enzimas *BstE II* e *Bgl II*. Na reação foram utilizados aproximadamente 100 ng do DNA plasmidial cujo volume final foi de 50 µL contendo 0,5 pmol/µL dos “primers” sense e antisense, 0,2 mM dNTPs, tampão 1X da enzima e 2,5 U da Platinum® *Taq*DNA polimerase, recombinante (Invitrogen™). Para ativação da enzima *Taq* DNA polimerase, foi realizado um ciclo inicial de 94 °C por 5 minutos. Em seguida as amplificações foram feitas por 35 ciclos de 95 °C a 1 minuto, 55°C a 2 minutos e 72°C a 2 minutos e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos. O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

### **3.1.6. Purificação de DNA do plasmídeo pUC57/NS1**

Foi realizada uma eletroforese, em gel de agarose a 1%, com o produto da extração de DNA plasmidial dos clones de *E. coli* TOP 10F recombinantes. A banda referente ao plasmídeo pUC57/NS1 foi excisada do gel e o DNA foi

purificado usando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN™), de acordo com as normas do fabricante. Para tanto, a banda de DNA retirada do gel foi adicionada a solução “tampão QG” e incubada a 50 °C por 10 minutos. Foi adicionado 150 µL de isopropanol e a solução foi transferida para a minicoluna e submetida à centrifugação de 13.000 x g por 1 minuto. Foram feitas duas lavagens, da membrada da minicoluna com 750 µL de solução “tampão PE” seguidas de centrifugação.

### **3.1.7. Clivagem do gene NS1 com enzimas de restrição**

Após a purificação do plasmídeo pUC57/NS1 foi realizada a dupla digestão com as enzimas de restrição *Bgl II* e *BstE II* (Fermentas™) para clivar o inserto NS1 otimizado. Para a reação de digestão foram adicionados 8 µL do plasmídeo, 1,5 µL de “tampão 3” (Fermentas™), 0,5 µL de cada uma das enzimas, completando com água deionizada para volume final de 15 µL. A reação foi incubada por 12 horas a 37 °C. O resultado da clivagem foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

## **3.2. Construção do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1**

### **3.2.1. Extração dos plasmídeos pCAMBIA3301**

O plasmídeo pCAMBIA3301 utilizado para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens*, foi extraído a partir do estoque de *E. coli* DH5α mantido no Laboratório de Imunovirologia Molecular (UFV). (Idem ao item 3.1.4).

### **3.2.2. Clivagem do plasmídeo pCAMBIA3301 com enzimas de restrição**

Após extração, o plasmídeo pCAMBIA3301 foi submetido a digestão dupla com as enzimas de restrição *Bgl II* e *BstE II* (Fermentas™) para linearização. (Idem ao item 3.1.7).

### **3.2.3. Purificação do inserto NS1 e do plasmídeo pCAMBIA3301**

A banda do gel de eletroforese referente ao inserto NS1 e ao plasmídeo pCAMBIA3301 linearizado, foram excisadas e purificadas usando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN™), de acordo com as normas do fabricante. Para tanto, a banda de DNA retirada do gel foi adicionada a solução “tampão QG” e incubada a 50 °C por 10 minutos. Foi adicionado 150 µL de isopropanol e a solução foi transferida para a minicoluna e submetida à centrifugação de 13.000 x g por 1 minuto. Foram feitas duas lavagens da membrada da minicoluna com 750 µL de solução “tampão PE” seguidas de centrifugação.

### **3.2.4. Ligação do inserto NS1 no plasmídeo pCAMBIA3301**

O inserto do gene responsável por codificar a proteína NS1 do vírus *dengue-2*, após digestão e purificação, foi adicionado a uma reação para se ligar ao plasmídeo pCAMBIA3301 purificado e linearizado. Na reação de ligação foi utilizado o kit T4 DNA Ligase (Promega™). Para tanto, foi adicionado 2,0 µL de tampão da ligase, 0,5 µL da enzima T4 ligase, 4,5 µL do pCAMBIA3301 (3,2 ng/µL), 2,5 µL do inserto NS1 (17,3 ng/µL), resultando num volume final de 10 µL. A solução foi incubada a 23 °C durante 1 hora.

### **3.2.5. Transformação de células competentes *E.coli* TOP 10F com pCAMBIA3301/NS1**

O produto da ligação anterior foi utilizado para transformar *E. coli* TOP 10F competente com finalidade de se produzir grande quantidade de plasmídeos recombinantes pCAMBIA3301/NS1. Para a transformação, foi adicionado 50 µL de *E. coli* TOP 10F competente aos 10 µL da reação de ligação anterior. A solução foi incubada em gelo por 20 minutos. Em seguida incubada a 42 °C por 90 segundos, colocadas no gelo e mantidas por 15 minutos (choque térmico). Posteriormente, foi adicionado 110 µL de meio SOC (20 g/L de bacto triptose, 5 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de NaCl e 20 mM de glicose) e, finalmente, incubadas a 37 °C por 30 minutos. A solução foi

plaqueada em meio LB sólido contendo o antibiótico canamicina (50 µg/mL) e incubada a 37 °C.

### **3.2.6. Análise e seleção das colônias transformadas**

Para análise das colônias transformadas quanto a presença de plasmídeos recombinantes pCAMBIA3301/NS1, foi realizada uma extração de DNA plasmidial seguida de digestão enzimática para verificação da eficiência da transformação. Colônias crescidas no meio LB sólido, após a ligação seguida de transformação, foram crescidas em 5 mL meio LB líquido com canamicina (50 µg/mL) durante 12 horas, a 37 °C sob agitação de 180 rpm. A extração plasmidial foi realizada (idem ao item 3.1.4). Em seguida, os plasmídeos foram submetidos à digestão enzimática (idem ao item 3.1.7), para análise dos clones quanto à presença do inserto NS1 no vetor recombinante. O resultado foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os clones de *E. coli* TOP 10F que continham a banda correspondente ao gene da proteína NS1 foram crescidos em meio LB líquido contendo canamicina.

### **3.3. Transferência do vetor de expressão**

#### **3.3.1. Obtenção de *Agrobacterium tumefaciens* competentes**

Células de *A. tumefaciens* GV3101 competentes foram preparadas para utilização no tratamento com choque térmico. Para tanto, uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* foi pré-inoculada em 5 mL de meio YEB líquido (5 g/L de peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de extrato de carne, 5 g/L de sacarose e 240 mg/L de MgSO<sub>4</sub>, pH 6,8) com o antibiótico gentamicina (100 µg/mL) e crescida durante 12 horas, a 28 °C sob uma agitação de 150 x g. O pré-inóculo foi transferido para 50mL de meio YEB e incubado à 28 °C sob agitação de 150 rpm até atingir a DO = 0,4/0,5, na absorvância de 600 nm. Em seguida, a cultura foi incubada no gelo por 15 minutos e as células foram recolhidas por centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante

foi descartado e as células suspensas em 30 mL de água ultra-pura autoclavada e gelada. As células foram, novamente, recolhidas por centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, então, suspenso em 2,85 mL de CaCl<sub>2</sub> (20 mM) gelado e 150 µL de glicerol puro estéril foi adicionado e homogeneizado. As células competentes foram aliqüotadas em tubos com 200 µL da solução, colocadas no nitrogênio líquido imediatamente e estocadas a -80 °C.

### **3.3.2. Transformação de *A. tumefaciens* competente com o vetor de expressão pCAMBIA3301/NS1**

A uma alíquota de 100 µL de *A. tumefaciens* competente foi adicionado 1 µg do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 e a solução foi incubada no gelo por 30 minutos. Em seguida, o tubo foi colocado em nitrogênio líquido por 1 minuto e incubado a 37 °C por 5 minutos (choque térmico). Após foi adicionado 1 mL de meio YEB ao tubo e as células incubadas por 2 horas a 28 °C. Foi plaqueado 100 µL da solução em meio YEB sólido contendo os antibiótico canamicina (50 µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL), de resistência plasmidial e da própria bactéria, respectivamente, e incubada a 28 °C por 24 horas, para seleção das colônias transformadas.

### **3.3.3. Análise e seleção das colônias de *A. tumefaciens* transformadas**

Para análise das colônias transformadas quanto a presença de plasmídeos recombinantes pCAMBIA3301/NS1 (Fig. 7) foi realizada uma extração de DNA plasmidial seguida de digestão enzimática para verificação da eficiência da transformação. As colônias crescidas no meio YEB sólido com canamicina e gentamicina, após a transformação anterior, foram crescidas em 10 mL de meio YEB líquido com canamicina (50 µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL) durante 36 horas, a 28 °C sob agitação de 180 rpm. Com 5 mL do meio YEB incubado foi realizada a extração plasmidial (idem ao item 3.1.4). Em seguida, os plasmídeos foram submetidos à digestão enzimática (idem ao item 3.1.7) para confirmação da presença do inserto NS1 no vetor dos clones

recombinantes. O resultado foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os clones de *Agrobacterium tumefaciens* que continham a banda correspondente ao gene da proteína NS1 foram estocados com glicerol 25% a – 80 °C.

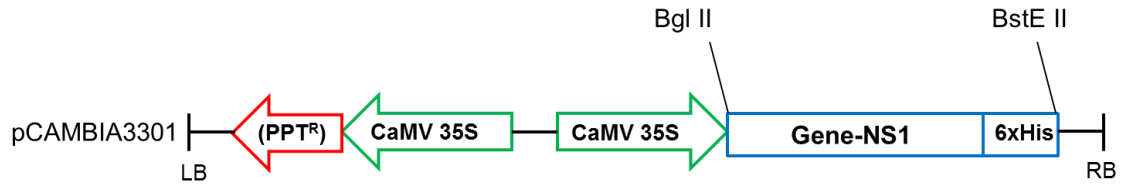


Figura 7. Representação do T-DNA do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1

O gene PPT<sup>R</sup> confere resistência ao herbicida fosfonitrínicos utilizado para selecionar as plantas transformadas e foi clonado junto com o gene otimizado NS1. A região T-DNA do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 que é transferida para a planta *Arabidopsis thaliana* possui estes dois genes sob controle do promotor constitutivo e bidirecional CaMV35S. Isto garante que a planta selecionada em meio seletivo contendo o gene de resistência ao herbicida está expressando também o gene NS1 de interesse.

O CaMV35S (Cauliflower mosaic virus) é um promotor constitutivo do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor, que pertence a família *Caulimoviridae* e são pararetrovírus que infectam plantas. Este promotor tem sido bastante utilizado na transformação de plantas através de vetores plasmidiais (BENFEY e CHUA, 1990), por produzir altos níveis de expressão do transgene (KHELIFA *et al.*, 2010; ACHARYA *et al.*, 2014; GASTON *et al.* 2015).

### 3.4. Obtenção das plantas transformadas

#### 3.4.1. Crescimento da planta

Sementes de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagens (WT – do inglês: wild type, Columbia, Col-0) foram crescidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz (200 µmol/m<sup>2</sup>s) e 8 horas de escuro a 24-26 °C sobre substrato composto (substrato orgânico:vermiculita grossa, 2:1, v:v).

Após a emergência das primeiras flores, foi feita a remoção do broto principal para emergência de maior número de brotos laterais. Plantas com brotos laterais de aproximadamente 45 dias, no estágio de início da floração foram usadas para transformação.

#### **3.4.2. Preparo da cultura de *A. tumefaciens* para transformação**

Foram crescidas culturas isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* (clones com o plasmídeo pCAMBIA3301/NS1) em pré inóculos de 10 mL de meio YEB líquido com canamicina (50 µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL) durante 18 horas, a 28 °C sob agitação de 180 rpm. Em seguida, o pré inóculo foi adicionado em 500mL de meio YEB com os mesmos antibióticos e a cultura foi colocada para crescer durante 48 horas, a 28 °C sob agitação de 180 rpm. A suspensão celular crescida foi centrifugada a 8.000 x g e o precipitado suspenso em 250 mL de sacarose 5% (p/v), com Silwett L-77 0,05% (p/v). A solução foi utilizada para transformar as plantas *A. thaliana* do tipo selvagem.

#### **3.4.3. Transformação das plantas pelo método *floral-dip***

Foram removidas flores abertas das plantas *Arabidopsis thaliana* que estavam com 45 dias de idade, mantendo apenas botões florais fechados. O procedimento realizado foi o método *floral-dip* (CLOUGH e BENT, 1998), que consiste no 'mergulho dos botões florais' por 30 segundos na solução de *A. tumefaciens*, descrita no item anterior. Após o mergulho foi feita uma câmara úmida para manter as plantas em ambiente escuro por 24 horas; em seguida elas foram mantidas na câmara de crescimento. Para taxas mais elevadas de transformação, as mesmas plantas foram mergulhadas mais duas vezes pelo procedimento inicial, no intervalo de 10 dias, e mantidas na câmara de crescimento a 22 °C, até completar o ciclo reprodutivo, maturação e coleta das sementes.

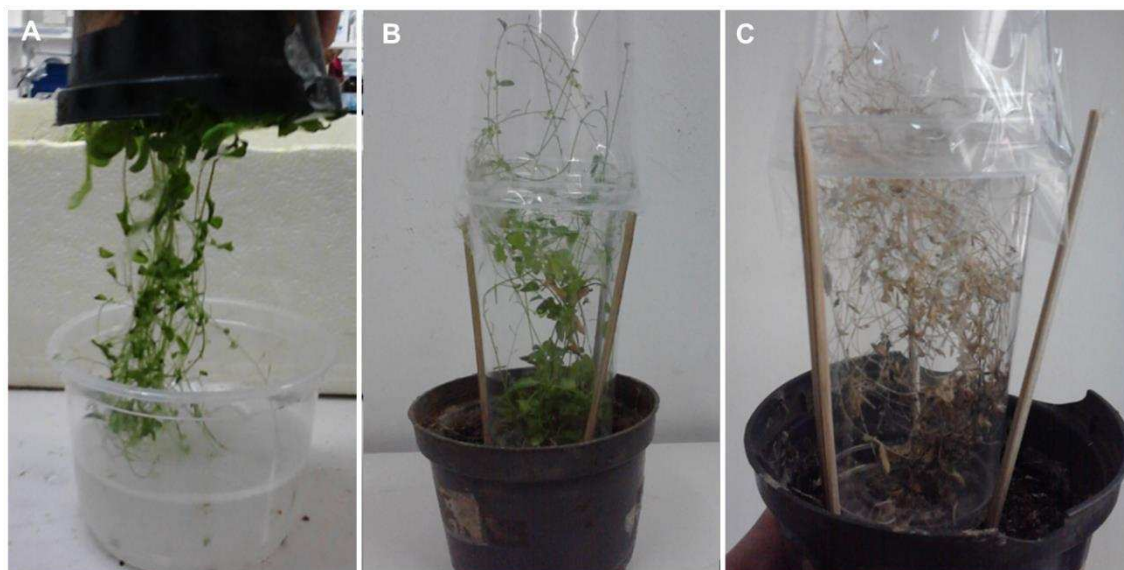


Figura 8. Transformação de *Arabidopsis thaliana*. A- Mergulho floral em solução com suspensão de *Agrobacterium tumefaciens*; B- Sistema para coletar sementes; C- Planta seca pronta para coleta de sementes.

#### 3.4.4. Desinfestação, germinação das sementes e seleção genética da terceira geração

As sementes T1 (coletadas da planta T0 – transformada inicial) foram tratadas com 1 mL de solução de desinfestação (hipoclorito de sódio:água destilada autoclavada, 1:1, v/v) e uma gota de Tween 20, por 5 minutos sob agitação leve, e lavadas 5 vezes com água destilada autoclavada. Em seguida, foram plaqueadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com agente seletivo fosfotricina (7,5 µg/mL), para seleção das plantas transgênicas. As placas com as sementes, foram incubadas a 4 °C, no escuro por 72 horas, para quebra da dormência, e posteriormente foram colocadas na câmara de crescimento com fotoperíodo de 8 horas de luz (200 µmol/m<sup>2</sup>s) e 16 horas de escuro a 24-26 °C, para germinação. Após 10 dias as plantas resistentes à fosfotricina (PPT<sup>R</sup>) foram selecionadas, avaliando visualmente o vigor vegetativo da plântula, e transplantadas em vasos de plástico com substrato composto (substrato orgânico:vermiculita grossa, 2:1, v:v). Foram, então, mantidas em câmara de crescimento a 22 °C até completar o ciclo reprodutivo, maturação e coleta das sementes T2. As sementes T2 foram selecionadas e

cultivadas, como anteriormente até a geração T3, para seleção de plantas em homozigose dominante para o transgene NS1 (Fig. 8).

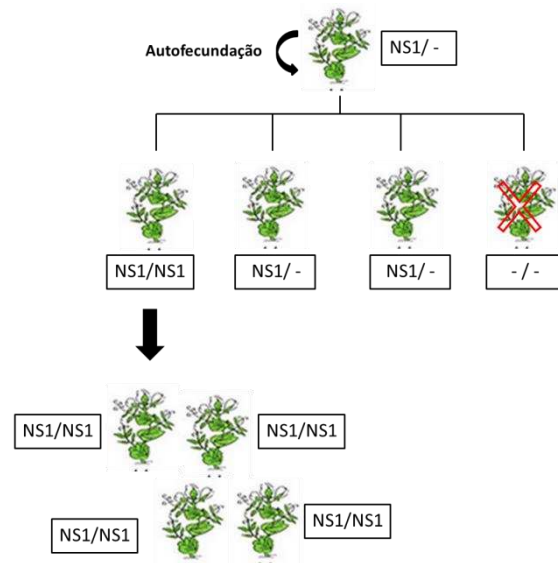


Figura 9. Seleção genética da terceira geração de plantas transformadas

### 3.5. Análise das plantas transformadas

#### 3.5.1. Extração de DNA das plantas

As folhas das plantas da geração T3 foram coletadas, maceradas com nitrogênio líquido, utilizando almofariz de porcelana previamente congelado. O macerado foi transferido para microtubos. E o procedimento utilizado para extração do DNA vegetal foi pelo método do CTAB (MOGG e BOND, 2003).

#### 3.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído das folhas das plantas da geração T3 foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), para análise dos clones quanto à presença do inserto contendo o gene codificador da proteína NS1 do vírus *dengue-2*. Na PCR foram utilizados os primers pCambNS1a e pCambNS1as, como descrito anteriormente. O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

### **3.5.3. Imunolocalização *in situ* da proteína NS1 por microscopia confocal**

As plantas selecionadas da terceira geração foram cultivadas em câmara de crescimento com fotoperíodo curto (para favorecer o crescimento vegetativo) de 8 horas de luz e 16 horas de escuro a 24-26°C. Com 30 dias de vida foram excisadas uma folha de cada planta para análise de expressão e localização *in situ* da proteína NS1 do vírus dengue-2 pela detecção de imunofluorescência no microscópio confocal.

As folhas foram lavadas, colocadas em microtubos e deixadas em solução de fixação com paraformaldeído 4% por 3 horas. Após, foram feitas 3 lavagens com solução de PBS 1x (0,02% KCl, 0,8% NaCl, 0,18% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), adicionado metanol puro e incubado por 10 minutos a 37 °C (com 2 repetições). O metanol foi então removido e adicionado uma solução de etanol/xilol (1:1) e incubada por 10 minutos a 37°C (com 2 repetições). O etanol/xilol foi removido e adicionado etanol 99% incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguido de uma série decrescente de lavagens com etanol (90%, 75%, 50% e 25%), por 5 minutos cada. Após foi adicionado água destilada por 5 minutos. Na etapa seguinte as folhas foram estabilizadas na solução de PBS 1x por 10 minutos e incubadas numa solução com anticorpo primário monoclonal Anti-Histag (Sigma) (1:500; v/v) em PBS 1x, durante 4 horas a 37 °C. Após este passo, as folhas foram lavadas 5 vezes com solução de PBS 1x, e incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (Sigma) (1:500; v/v) em solução de PBS 1x, durante 2 horas a 37 °C. Por fim, as folhas foram lavadas 5 vezes com PBS 1x, as lâminas foram montadas em Mowiol® (Sigma), analisadas e fotografadas utilizando o microscópio confocal *Zeiss LSM 510* no Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Confirmação da transformação de *E. coli* TOP 10F com o plasmídeo pUC57/NS1

Para análise das colônias transformadas com o plasmídeo recombinante pUC57/NS1, foi realizada uma extração de DNA plasmidial e seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificação das colônias transformadas. O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1% (Fig. 9).

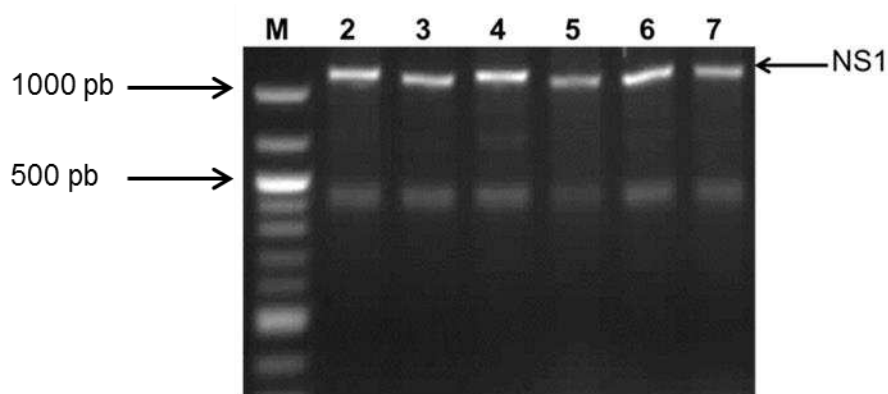


Figura 10. PCR do gene NS1 no plasmídeo pUC57/NS1. M- Marcador de 100pb DNA ; 2-7- fragmento amplificado do gene NS1

### 4.2. Digestão do plasmídeo pUC57/NS1

As *E. coli* TOP 10F recombinantes com o vetor pUC57/NS1 foram crescidas em meio seletivo para extração de DNA plasmidial. O plasmídeo foi então submetido a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Bgl II* e *BstE II*. O produto da digestão foi detectado em gel de agarose a 1% (Fig. 10) e a banda referente ao fragmento do gene otimizado NS1 liberado foi excisada do gel e purificada através do kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN™).

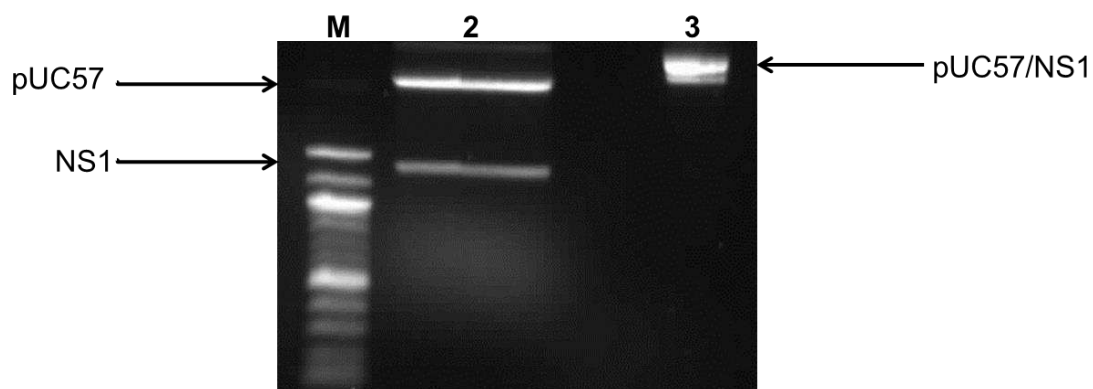


Figura 11. Digestão do plasmídeo pUC57/NS1 com enzimas de restrição *Bgl II* e *BstE II*. M- Marcador de 100pb DNA ; 2- Plasmídeo pUC57/NS1 digerido; 3- Plasmídeo pUC57/NS1 não digerido.

#### 4.3. Digestão do plasmídeo pCAMBIA3301

O estoque de *E. coli* DH5 $\alpha$  com plasmídeo pCAMBIA3301 foi crescido em meio seletivo para extração de DNA plasmidial. Os plasmídeos foram submetidos a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Bgl II* e *BstE II*. O produto da digestão foi detectado em gel de agarose a 1% (Fig. 11) e a banda referente ao plasmídeo linearizado foi excisada do gel e purificada através do kit QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction (QIAGEN<sup>™</sup>).

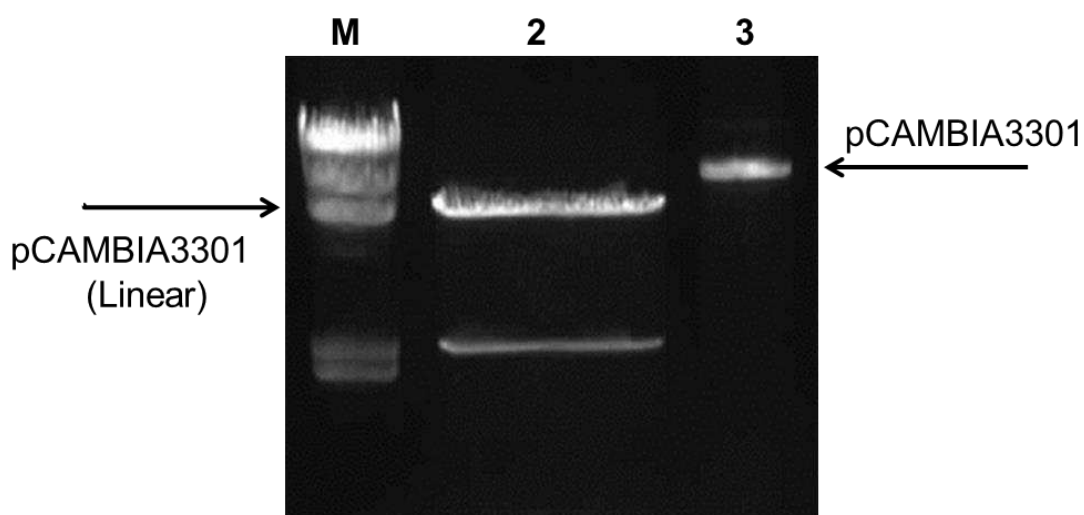


Figura 12. Digestão do plasmídeo pCAMBIA3301 com enzimas de restrição *Bgl II* e *BstE II*. M- Marcador Lambda *HindIII* DNA ; 2- Plasmídeo pCAMBIA3301 digerido; 3- Plasmídeo pUC57/NS1 não digerido.

#### 4.4. Confirmação da clonagem do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 em *E. coli* TOP 10F

Após a reação de ligação do inserto NS1 com o plasmídeo pCAMBIA3301 linearizado, foi feita a transformação bacteriana de *E. coli* TOP 10F. Para a confirmação da clonagem, as colônias transformadas com plasmídeos recombinantes pCAMBIA3301/NS1 foram crescidas em meio seletivo, e em seguida foi realizada uma extração de DNA plasmidial. Os plasmídeos foram submetidos a uma reação de digestão com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Bst*E II. O produto da digestão foi detectado em gel de agarose a 1% (Fig. 12)..

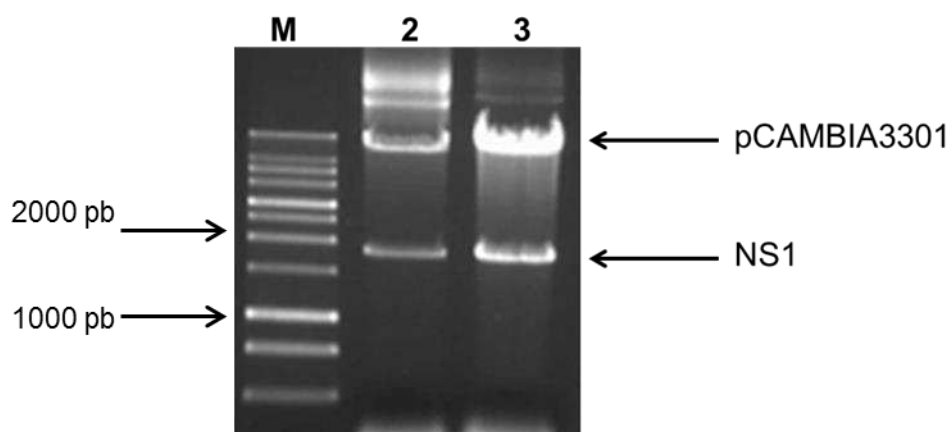


Figura 13. Digestão do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 com enzimas de restrição *Bgl* II e *Bst*E II, extraído de *E. coli* TOP 10F. M- Marcador 1Kb DNA; 2-3- Plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 digerido.

#### 4.5. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo pCAMBIA3301/NS1

Os plasmídeos pCAMBIA3301/NS1 estocados em bactérias *E. coli* TOP 10F foram extraídos e posteriormente utilizados para transformação bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101). Para a confirmação da clonagem, as colônias transformadas com plasmídeos recombinantes pCAMBIA3301/NS1 foram crescidas em meio seletivo e, em seguida, foi realizada uma extração de DNA plasmidial com uma alíquota de cada amostra. Os plasmídeos foram

submetidos a uma reação de digestão com as enzimas de restrição *Bgl II* e *BstE II*. O produto da digestão foi detectado em gel de agarose a 1% (Fig. 13).

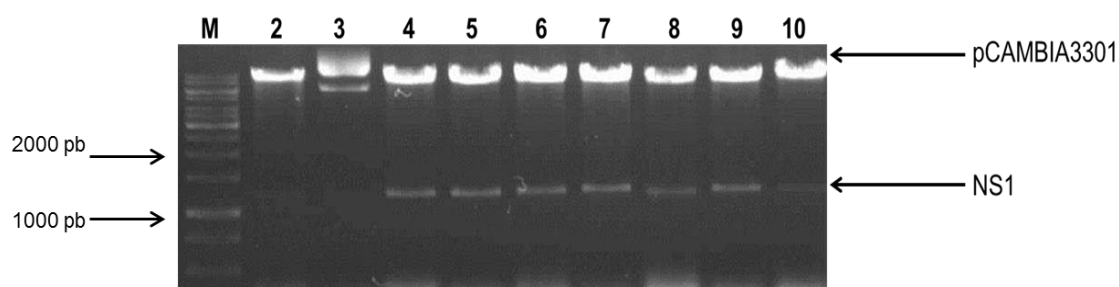


Figura 14. Digestão do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 com enzimas de restrição *Bgl II* e *BstE II*, extraído de *Agrobacterium tumefaciens*. M- Marcador 1Kb DNA ; 2-10- Plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 digerido.

#### 4.6. Transformação de *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens*

Após a germinação e o aparecimento dos brotos de floração laterais das *Arabidopsis thaliana* selvagens foi realizado o primeiro ciclo de três, do método 'floral-dip', para transformação genética das plantas. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e as plantas T0 (transformadas iniciais) foram mantidas na câmara de crescimento até completar o ciclo reprodutivo para maturação, secagem das siliquis e coleta das sementes T1.

#### 4.7. Germinação das sementes da geração T1 de *A. thaliana*

A primeira geração (T1) de sementes de *Arabidopsis thaliana* foi semeada em placa contendo meio MS sólido com agente seletivo (PPT<sup>R</sup>) e a eficiência de transformação foi de 3,59% (Tabela 1).

$$\text{Eficiência de Transformação} = \frac{\text{Total de sementes germinadas}}{\text{Total de sementes plaqueadas}} \times 100\%$$

Tabela 1. Eficiência da transformação de *Arabidopsis thaliana* na primeira geração.

	Sementes T1 plaqueadas	Sementes T1 que germinaram
Placa 1	138	2
Placa 2	114	8
Placa 3	54	1

As sementes que germinaram em plântulas saudáveis apresentavam desenvolvimento vegetativo superior, notório visualmente a partir do décimo dia, comparado às sementes que não conseguiram se desenvolver com vigor (Fig. 16A-E). As plântulas saudáveis possuíam coloração verde, características fisiológicas do estado vegetativo normal do padrão de desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*. Diferente das outras sementes que não germinaram ou deram origem a plântulas que não se desenvolveram e apresentavam coloração amarelada, com estado vegetativo de crescimento alterados consequentes da ação do herbicida (PPT<sup>R</sup>).

#### **4.8. Segregação genética e obtenção das *A. thaliana* transformadas na terceira geração**

As 11 plântulas, geração T2, foram transplantadas em vasos com substrato composto e mantidas em câmara de crescimento (Fig. 16F). Das 11, 9 chegaram até o estágio completo do ciclo reprodutivo com formação de inflorescência, maturação e desenvolvimento dos embriões produzindo siliquis com sementes. As sementes T2 das 9 plantas (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9) foram coletadas, posteriormente propagadas e analisadas quanto à segregação genética do gene NS1 de interesse.

As *Arabidopsis thaliana* da terceira geração (T3) que apresentaram segregação gênica característica de homozigose dominante, com crescimento equivalente a 100% das sementes T2 germinadas (Fig. 16G), foram selecionadas e são resultado deste estudo.

#### 4.9. Cultivo e estoque das *A. thaliana* transgênicas selecionadas

As plantas transgênicas (em homozigose dominante) selecionadas foram cultivadas em câmara de crescimento (Fig. 16H), mantidas sobre condições controladas para completar o ciclo reprodutivo, maturação e produção de sementes. No final essas sementes foram coletadas e estocadas a 4°C.

#### 4.10. Confirmação da transformação de *A. thaliana*

Para análise das *Arabidopsis thaliana* transformadas foi realizada uma extração de DNA genômico e seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação da obtenção das plantas transgênicas. O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1% (Fig. 15).

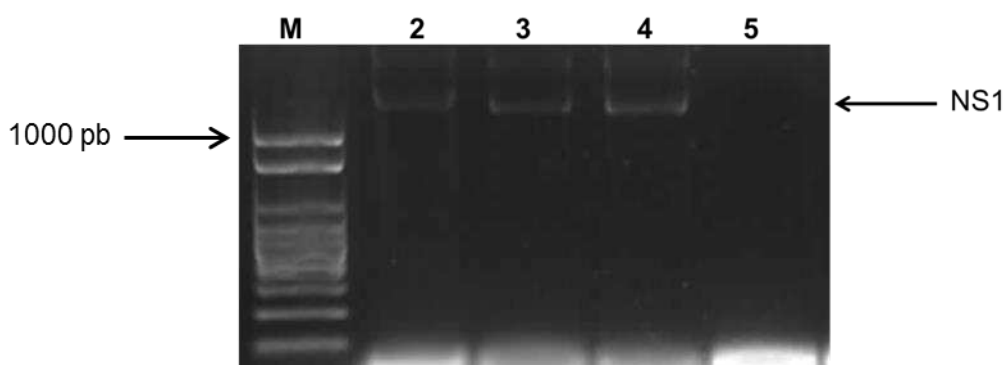


Figura 15. PCR do gene NS1 no genoma de *A. thaliana*. M- Marcador de 100pb DNA; 2-4- fragmento amplificado do gene NS1; 5- amostra de genoma da planta WT.

#### 4.11. Microscopia confocal comparativa

As plantas P9 da terceira geração (Fig. 16I-J) foram utilizadas para detectar a expressão e localização *in situ*, da proteína NS1 do vírus *dengue-2*, através da microscopia confocal. A folha da planta P9 e da planta selvagem (WT) foram coletadas com 30 dias após a germinação, para análise comparativa (Fig. 17). Um desenvolvimento vegetativo inferior foi observado na planta transgênica P9, em relação a planta do tipo WT, com o diâmetro da roseta e área foliar menores.

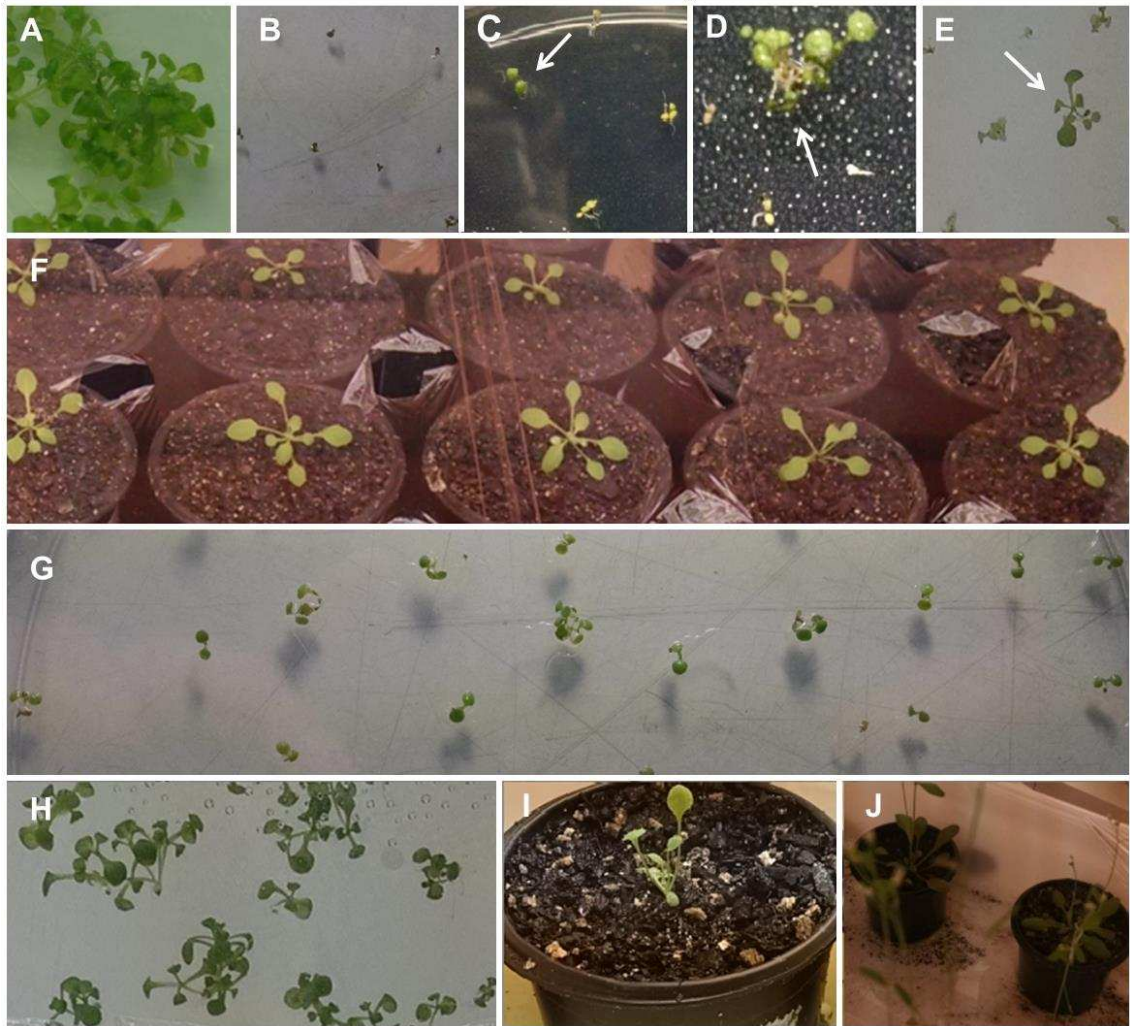


Figura 16. Germinação e seleção de *Arabidopsis thaliana*. A- *A. thaliana* WT em meio MS sem agente seletivo; B- *A. thaliana* WT em meio MS com agente seletivo; C-E- Germinação *A. thaliana* geração T1 (detalhe na seta branca para as plântulas com vigor vegetativo); F- Cultivo das *A. thaliana* geração T2; G- Germinação de 100% das sementes em homozigose dominante; H- Germinação das sementes da geração T3 de *A. thaliana*; I-J- Cultivo da planta transgênica P9.

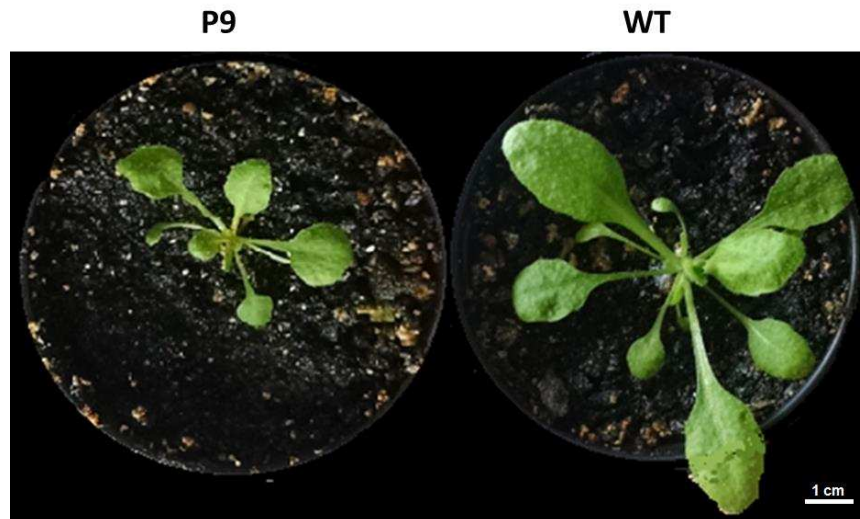


Figura 17. Análise comparativa entre a *A. thaliana* transgênica P9 e a *A. thaliana* selvagem (WT).

As folhas de *Arabidopsis thaliana* com 30 dias após a germinação foram fixadas e preparadas para aumentar a permeabilização do tecido vegetal. Foram incubadas com anticorpo primário monoclonal para calda de polihistidina, usada para marcar a proteína heteróloga NS1. E, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário com FITC (Fig. 18). As folhas da planta do tipo selvagem não apresentaram marcação verde com imunofluorescência. As marcações em vermelho observadas são autofluorescência da clorofila que ainda permaneceram no tecido após a preparação das amostras (Fig. 19).

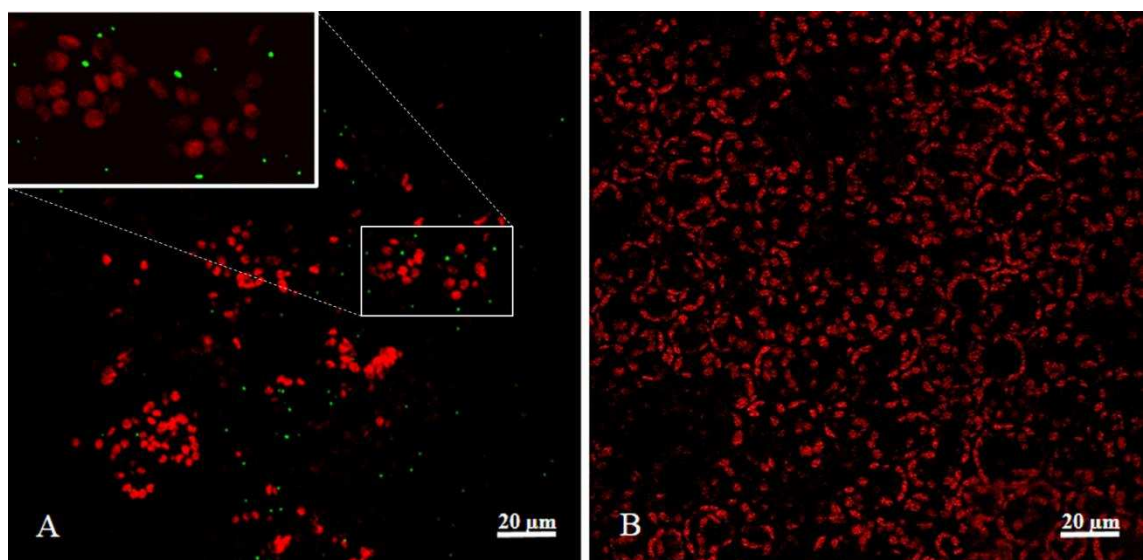


Figura 18. Microscopia confocal do tecido da folha de *A. thaliana*. A- Planta transgênica P9; B- Planta selvagem (WT).

Foram observadas marcações por todo tecido da folha da planta P9, em forma de agregados ovais, que são evidências notórias da presença, expressão e localização da proteína NS1 no interior das células vegetais da planta transgênica de *Arabidopsis thaliana*.

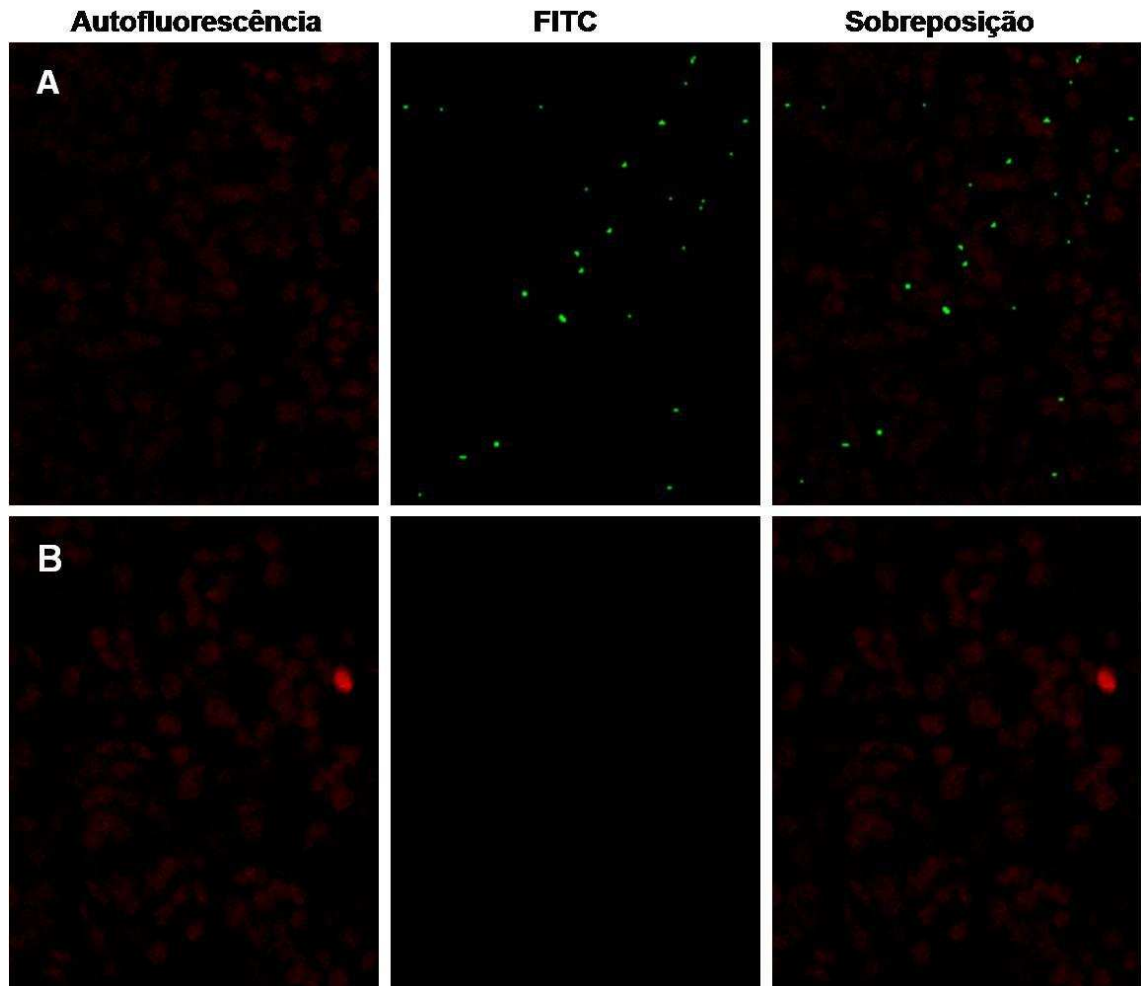


Figura 19. Grade de microscopia confocal. A- Planta transgênica P9; B- Planta selvagem (WT).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho são essenciais para confirmação da eficiência da clonagem do gene NS1 do vírus *dengue-2* na *Arabidopsis thaliana*. Na primeira etapa o gene foi otimizado para expressão em plantas, e acrescido com sequencias específicas para obtenção de maiores níveis de expressão da proteína NS1. No trabalho anterior de Amaro *et al.* (2015) os resultados da expressão de NS1 em tabaco foram satisfatórios e significativos, porém a quantidade do antígeno variou muito entre os transformantes, onde pudemos levantar a hipótese de que a proteína não estava se mantendo integra no interior da célula vegetal. As sequências adicionadas na construção deste trabalho estão envolvidas com mecanismos de tradução e localização específica de proteínas dentro das células eucariotas. A adição de pequenas sequências consenso no cassete do gene NS1 possuem a função de garantir o endereçamento e retenção da proteína no retículo endoplasmático, evitando uma possível degradação proteica caso estas estivessem livres circulantes no citoplasma ou uma exportação indesejada para o exterior da célula.

Já foi demonstrado por ensaios do tipo ELISA que a proteína NS1/DENV tem potencial de aplicação para diagnóstico laboratorial precoce (Platelia™, Dengue NS1 Ag kit, Bio-Rad, França) com sensibilidade de 93,4% e especificidade de 100%. Outros resultados mostraram a eficiência para detecção de IgG anti-NS1 em infecções agudas (DUTRA *et al.*, 2009; KUMARASAMY *et al.*, 2007). Assim como nos recentes trabalhos de Kosasih *et al.* (2013) e Tuan *et al.* (2015) que demonstraram a sensibilidade e especificidade da proteína NS1 utilizada em testes diagnósticos para detectar pacientes com infecção de dengue.

Foram demonstradas as transformações de *E. coli* TOP 10F com os plasmídeos pUC57/NS1 e pCAMBIA3301/NS1. A construção o gene otimizado possui 1290 pb. Para amplificação por PCR foram utilizados primers específicos para a região da proteína NS1 (1056 pb) e nas reações de digestão plasmidial foram utilizadas as enzimas de restrição (*Bgl II* e *BstE II*) que flanqueiam toda região do cassete de construção do gene.

A figura 10 confirma a primeira clonagem do plasmídeo pUC57/NS1 em *E.coli* TOP 10F.

Nos géis das figuras 11 e 12 com os produtos da reação de digestão dos plasmídeos pUC57/NS1 e pCAMBIA3301, foram purificadas a banda inferior da figura 11 (referente ao inserto do gene otimizado NS1) e a banda superior da figura 12 (referente ao plasmídeo pCAMBIA3301 linearizado). A reação de ligação entre elas formou o vetor de expressão pCAMBIA3301/NS1. O gel de agarose da figura 13 é referente a confirmação da clonagem do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 em *E.coli* TOP 10F. Por fim, os plasmídeos pCAMBIA3301/NS1 foram utilizados para transformação bacteriana de *Agrobacterium tumefaciens*. Na figura 14 o resultado da clonagem por reação de digestão dos plasmídeos pCAMBIA3301/NS1 extraídos de *A. tumefaciens* transformadas confirma a obtenção dos clones que foram utilizados como sistema de transferência natural de genes para *transformação* de *Arabidopsis thaliana*.

As sementes de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) foram cultivadas e as plantas com maior número de brotos florais foram utilizadas para transformação genética mediada por *A. tumefaciens* recombinante contendo o plasmídeo pCAMBIA3301/NS1. Assim como em outros trabalhos, como Chaudhury *et al.* (2007), Khan *et al.* (2015), Schneider *et al.* (2015), o método *floral-dip* foi repetido por duas vezes para garantir a eficiência de transformação e uma taxa maior de transformantes. Das sementes obtidas na primeira geração, 306 foram semeadas em placa com meio seletivo e destas, 11 germinaram. A eficiência de transformação obtida neste trabalho foi de 3,59% e esta de acordo com a estimativa do protocolo original descrito por Clough e Bent (1998).

A segregação genética foi essencial para alcançar o objetivo final proposto neste trabalho. As três gerações foram monitoradas quanto ao crescimento, desenvolvimento e diferenças fisiológicas entre as plantas transformantes e a planta do tipo selvagem. Foram observadas alterações fenotípicas, como o retardo do crescimento e estresse das plantas transformadas com mesma idade das plantas selvagens.

As plantas da terceira geração são homozigotas para o gene NS1 do vírus *dengue-2*, seleção positiva de 100% das sementes descendentes das *A.*

*thaliana* T3 quando crescidas em meio seletivo contendo o herbicida. A confirmação da transformação e obtenção das plantas transgênicas foi mostrada pelo resultado da PCR com amplificação do gene NS1 a partir do DNA genômico extraído das plantas selecionadas.

A análise por microscopia confocal da *Arabidopsis thaliana* P9 da terceira geração mostrou a localização *in situ*, no tecido foliar, da proteína NS1 do vírus dengue-2 marcada com anticorpo fluorescente. Foi utilizado um anticorpo primário para reconhecer a cauda de polihistidina adicionada à sequência de DNA otimizada da proteína NS1. A marcação foi notória e positiva na planta transgênica e negativa na planta selvagem, ambas receberam o mesmo processamento antes da avaliação microscópica.

A construção do gene possui sequências específicas, já conhecidas e descritas na literatura, envolvidas no transporte do RNA mensageiro para o retículo endoplasmático rugoso (RER), e na retenção da proteína transgênica no lúmen desta mesma organela celular. O endereçamento e a permanência da proteína no RER foram estratégias utilizadas para garantir uma expressão em maior quantidade e evitar que a proteína NS1 expressada fosse degradada no citoplasma ou exportada para o exterior da célula.

As marcações encontradas nas folhas da planta transgênica P9 foram nítidas e localizadas com sinal fluorescente forte em pontos concentrados. Esta análise nos possibilitou levantar a hipótese de que as proteínas NS1 estão formando agregados, e de acordo com os resultados encontrados nos trabalhos de Stacey *et al.* (1999) e Zang *et al.* (2010), que também utilizaram *A. thaliana* para expressão de proteínas, esses agregados correspondem à corpos de inclusão. No recente estudo de Ishikawa *et al.* (2015), foi demonstrada a expressão de proteína transgênica, que também possuía o sinal de retenção no RER, em folhas de tabaco. Os resultados da microscopia confocal demonstraram a formação de corpos de inclusão, condizentes com as marcações encontradas neste trabalho, reforçando a hipótese anterior.

As contribuições destes resultados poderão ser verificadas indiretamente no controle da dengue, através do desenvolvimento de testes diagnósticos que capturem os anticorpos circulantes precoces anti-NS1 em pacientes com suspeita da doença.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O inserto do gene otimizado NS1, com as sequências adicionais, foi integrado no plasmídeo pCAMBIA3301;
- As colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas e selecionadas contém o plasmídeo pCAMBIA3301/NS1;
- As plantas transformadas da terceira geração estão em homozigose dominante para o transgene NS1;
- As plantas transgênicas expressam a proteína NS1, em forma de corpos de inclusão no lúmen do retículo endoplasmático rugoso.

## 7. PERSPECTIVAS

Os sistemas de expressão transgênica, da proteína NS1 do vírus dengue-2, em *Arabidopsis thaliana* gerados neste trabalho, são importantes para a continuação da linha de pesquisa principal que tem como objetivo final a obtenção do antígeno NS1 em grande quantidade para ser utilizado no desenvolvimento de testes diagnósticos da doença dengue.

Análises subsequentes deverão ser realizadas para verificar os níveis de expressão da proteína NS1 em cada transformante independente da terceira geração. Uma vez que a inserção do DNA exógeno pelo sistema de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* é aleatório, os transformantes são independentes e a transcrição do gene pode variar dependendo da posição e do local em que foi inserido. Podendo assim buscarmos um transformante, dentre os obtidos da terceira geração, que se destaque pela superexpressão da proteína NS1.

Etapas experimentais subsequentes serão realizadas para purificar e concentrar a proteína NS1. Após a obtenção, os antígenos serão analisados de forma comparativa em diferentes métodos de detecção como MAC-ELISA e ELISA, sendo correlacionados com o teste de neutralização em placas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S., RANJAN, R., PATTANAIK, S., MAITI, I. B., DEY, N. Efficient chimeric plant promoters derived from plant infecting viral promoter sequences, **Planta**, v.239, p.381-396. 2014.

AMARO, M.O., XISTO, M.F., DIAS, A.C., VERSIANI, A.F., CARDOSO, S.A., OTONI, W.C., DA SILVA, C.C., DE PAULA, S.O. Antigen production using heterologous expression of dengue virus-2 non-structural protein 1 (NS1) in *Nicotiana tabacum* (Havana) for immunodiagnostic purposes, **Plant Cell Rep**, v.34, p.919-928. 2015.

AMORIM, J. H., ALVES, R. P. S., BOSCARDIN, S. B., FERREIRA, L. C. S. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits, **Virus Research**, v. 181, p. 53–60. 2014.

ANANDARAO, R., SWAMINATHAN, S., JANA, A.M., KHANNA N. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 136-147. 2005.

ANDRADE, G. M., SARTORETTO, L. M., BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp, **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 465-476. 2003.

ANDRADE, G.M., SARTORETTO, L.M., BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp, **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 465-476. 2003.

ARYA, S. C., AGARWAL, N. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections, **J Clin Virol**, 2007.

BARTA, A., SOMMERGRUBER, K., THOMPSON, D., HARTMUTH, K., MATZKE, M. A., MATZKE, A. J. M. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue, **Plant Molecular Biology**, v.6, p.347–357. 1986.

BENFEY, P. N., CHUA, N. H. The cauliflower mosaic virus-35s promoter - combinatorial regulation of transcription in plants, **Science**, v.250, p.959–966. 1990.

BERLIOZ-ARTHAUD, A., GURUSAMY, A. Comparison of PanBio dengue IgM ELISA assay with pentax dengue IgM particle agglutination assay to evaluate factors affecting false positive results, **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 39, p. 55–61. 2008.

BHATT, S., GETHING, P. W., BRADY, O. J., MESSINA, J. P., FERLOW, A. W., MOYES, C.L., *et al.* The global distribution and burden of dengue, **Nature**, v. 496, p. 504-7. 2013.

BLAIS, D.R., ALTOSAAR, I. Human CD14 Expressed in seeds of transgenic tobacco displays similar proteolytic resistance and bioactivity with its mammalian-produced counterpart, **Transgenic Research**, v.15 p.151-64. 2006.

BRASILEIRO, A.C.M., CARNEIRO, V.T.C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa - SPI / Embrapa - Cenargem, 309p. il. 1998.

BRICKS, L.F. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatria**, v. 26, p. 268-281. 2004.

CAVALCANTI, L. P., VILAR, D., SANTOS, R. S., TEIXEIRA, M. G. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis**. v.17, n.1, 2011.

CHAUDHURY, D., MANDAPOTRA, S., JAIWAL, R., SAINI, R., KUMAR, P.A., JAIWAL, P.K. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny, **Plant Science**, v.172, p.692-700. 2007.

CHRISTIE, P. J., ATMAKURI, K., KRISHNAMOORTHY, V., JAKUBOWSKI, S., and CASCALES, E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 59, p. 451–485. 2005.

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, Oxford, v. 16, p. 735-743, 1998.

COSTA, S.M., AZEVEDO, A.S., PAES, M.V., SARGES, F.S., FREIRE, M.S., ALVES, A.M.B. DNA vaccines against dengue vírus based on the *ns1* gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice, **Virology**, v. 358, n. 2, p.413-423. 2007.

DE PAULA, S.O., FONSECA, B.A.L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinican must know to achieve a correct diagnosis, **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 390-398. 2004.

DELATORRE, C. A., SILVA, A. *Arabidopsis thaliana*: Uma pequena planta um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias**, v.31, n.2, p.58-67. 2008.

DUTRA, N. R., DE PAULA, M. B., DE OLIVEIRA, M. D., DE OLIVEIRA, L. L., DE PAULA, S. O. The laboratorial diagnosis of dengue: Applications and implications, **Journal of Global Infection Diseases**. v.1, p.38-44. 2009.

FALGOUT, B., CHANOCK, R., LAI, C. J., B. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a, **J. Virol.**, v. 63 (1989), p. 1852–1860. 1989.

FALGOUT, B., MARKOFF, L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endo-plasmic reticulum, **J. Virol.**, v. 69, p. 7232–7243. 1995.

FLAMAND, M., MEGRET, F., MATHIEU, M., LEPAULT, J., REY, F. A., DEUBEL, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion, **J. Virol.**, v. 70, p. 6104–6110. 1999.

FULTON, A., LAI, H., CHEN, Q., ZHANG, C. Purification of monoclonal antibody against Ebola GP1 protein expressed in *Nicotiana benthamiana*, **Journal of Chromatography A**, v.1389, p. 128–132. 2015.

GELVIN, S.B. Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome. **Front. Plant Sci.** v. 3, p. 52. 2012.

GIDDINGS, G., ALLISON, G., BROOKS D., CARTER, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**, v.18, p.1151-1155. 2000.

GROEN, J., KORAKA, P., VELZING, J., COPRA, C., OSTERHAUS, A. D. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies, **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, p. 867–871. 2000.

GUZMÁN, M.G., HALSTEAD, S.B., ARTSOB, H., BUCHY, P., FARRAR, J., GUBLER, D. J., *et al.*: Dengue: a continuing global threat, **Nat Rev Microbiol**, v.8, p. S7-S16. 2010.

HANG, V. T., NGUYET, N. M., TRUNG, D. T., TRICOU, V., YOKSAN, S., *et al.* Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses, **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n.1, e360. 2009.

ISHIKAWA, K., MIURA, C., MAEJIMA, K., KOMATSU, K., HASHIMOTO, M., TOMOMITSU, T., *et al.* Nucleocapsid Protein from Fig Mosaic Virus Forms Cytoplasmic Agglomerates That Are Hauled by Endoplasmic Reticulum Streaming, **J. Virol.**, v. 89 n.1, p.480-491. 2015.

KHAN, K., AGARWAL, P., SHANWARE, A., SANE, V. A. Heterologous Expression of Two *Jatropha* Aquaporins Imparts Drought and Salt Tolerance and Improves Seed Viability in Transgenic *Arabidopsis thaliana*, **PLoS ONE**, v.10, n.6, e0128866. 2015.

KHELIFA, M., MASSÉ, D., BLANC, S., DRUCKER, M. "Evaluation of the minimal replication time of Cauliflower mosaic virus in different hosts", **Virology**, v.396, n. 2, p. 238–45, 2010.

KOIZUMI, N. Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana*, **Plant Cell Physiol.**, v.37, n.6, p. 862-865. 1996.

KOSASIH, H., ALISIAHBANA, B., WIDJAJA, S., NURHAYATI, DE MAST, Q., PARWATI, I., *et al.* The Diagnostic and Prognostic Value of Dengue Non-Structural 1 Antigen Detection in a Hyper-Endemic Region in Indonesia. **PLoS ONE**, v.8(11): e80891.

KUMARASAMY, V., WAHAB, A. H., CHUA, S.K., HASSAN, Z., CHEM YK, MOHAMAD, M. *et al.* Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen capture-ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection, **J Virol Methods**, v.140, p.75-9. 2007.

LEE, J., LEE, H., KIM, J., LEE, S., KIM, D. H., KIM, S., HWANG, I. Both the hydrophobicity and a positively charged region flanking the C-terminal region of the transmembrane domain of signal-anchored proteins play critical roles in determining their targeting specificity to the endoplasmic reticulum or endosymbiotic organelles in *Arabidopsis* cells, **The Plant Cell**, v.23, p.1588-1607. 2011.

LINDENBACH, B. D., RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res**, v.59, p. 23-61. 2003.

LINDENBACH, B. D., RICE, C. M. Trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication, **J. Virol.**, v. 71, p. 9608–9617. 1997.

MACKENZIE, J. M., JONES, M. K., YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication, **Virology**, v. 220, p. 232–240. 1996.

MCBRIDE, W. J. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever, **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, p. 31–36. 2009.

MEINKE, D.W. *et al.* *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis, **Science**, v.282, p.662-682.1998.

MOGG, R. J., BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants, **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 666-668. 2003.

MUNRO, S.; PELHAM, H. R. B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins, **Cell**, v.48, n.5, p. 899-907. 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

MUYLAERT, I. R., GALLER, R. G., RICE, C. M. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence, **Virology**, v. 222, p. 159–168. 1996

NAPIER, M. R., FOWKE, L. C., HAWES, C., LEWIS, M., PELHAM, H. R. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum, **Journal of Cell Science**, v.102, p. 261-271. 1992.

OSORIO, L., RAMIREZ, M., BONELO, A., VILLAR, L. A., PARRA, B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection, **Viol J**, v.7, p.361. 2010.

PAL, S., DAUNER, A. L., MITRA, I., FORSHEV, B. M., GARCIA, P., MORRISON, A. C., et al. Evaluation of Dengue NS1 Antigen Rapid Tests and ELISA Kits Using Clinical Samples, **PLoS ONE**, v. 9, n.11, 2014.

PANAHI, M., ALLI, Z., CHENG, X., BELBARAKA, L., BELGOUDI, J., SARDANA, R., et al. Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial E. coli fermentation and plant systems produce biologically active human insulin-like growth factor- 1 in transgenic rice and tobacco plants, **Transgenic Res**, v.13, p. 245–259. 2004.

PIZZIO, G. A., VALENCIA-PAEZ, J. P., KHADILKAR, A., S., REGMI, K., SOBERANO-PATRON, A., ZHANG, S., et al. Arabidopsis Type I Proton-Pumping Pyrophosphatase Expresses Strongly in Phloem, Where It Is Required for Pyrophosphate Metabolism and Photosynthate Partitioning, **Plant Physiology**, v.167, p.1541-1553.2015

RAMIREZ, A.H., MOROS, Z., COMACH, G., ZAMBRANO, J.,BRAVO, L.,PINTO, B., VIELMA, S., CARDIER, J., LIPRANDI, F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela, **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 65, p. 247–253. 2009.

SARNADA, R. K., ALLI, Z., DUDANI, A., TACKABERRY, E., PANAH, M., NARAYANAN, M., et al. Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide, **Transgenic Res**, v.11, p. 521–531. 2002.

SCHLESINGER, J.J., FOLTZER, J.M., CHAPMAN, S. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. **Virology**, v. 192, p. 132-141. 1993.

SCHNEIDER, J., CASTILHO, A., PABST, M., ALTMANN, F., GRUBER, C., STRASSER, R., et al. Characterization of plants expressing the human  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase gene, **Plant Physiology and Biochemistry**, v.92, p.39-47. 2015.

SHRAWAT, A., BECKER, D., LÖRS, H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

STACEY, M. G., HICKS, S. N., VON ARNIM, A. G. Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localization of *Arabidopsis* COP1, **Plant Cell**, v.11, p. 349–364. 1999.

SHRAWAT, A. K., BECKER, D., LORZ, H. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.), **Plant Science**, v.172, p.281-290. 2007.

SIEGERT, M., PERTL-OBERMEYER, H., GADERMAIER, G., FERREIRA, F., & OBERMEYER, G. Expression of the major mugwort pollen allergen Art v 1 in tobacco plants and cell cultures: problems and perspectives for allergen production in plants. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 561–571. 2012.

STREATFIELD, S.J. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines, **Methods**, v.38, p.150-157. 2006.

TDR/WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control (TDR/WHO, Geneva, Switzerland, 2009).

THANAVALA, Y., MAHONEY, M., PAL, S., SCOTT, A., RICHTER, L., NATARAJAN, N., et al. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, p.3378–3382. 2005.

THE *Arabidopsis* GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v.408, p.796-815. 2000.

TUAN, N.M., NHAN, H.T., CHAU, N.V.V., HUNG, N.T., TUAN, H.M., TRAM, T.V., et al. Sensitivity and Specificity of a Novel Classifier for the Early Diagnosis of Dengue. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9

WHITEHEAD, S.S., BLANEY, J.E., DURBIN, A.P., MURPHY, B.R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature**, v. 5, p. 518-528. 2007.

WINKLER, G., RANDOLPH, V. B., CLEAVES, G. R., RYAN, T. E., STOLLAR, V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer, **Virology**, v.1, p.187–196. 1988.

World Health Organization. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1 (World Health Organization, 2009)

WU, C. Y., SUEN, S. Y., CHEN, S. C., TZENG, J. H. Analysis of Protein Adsorption on Regenerated Cellulose-based Immobilized Copper Ion Affinity Membranes, **Journal of Chromatography**, v.996, p. 53-70. 2003.

YOUNG, P. R., HILDITCH, P. A., BLETCHLY, C., HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients, **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1053–1057. 2000.

YOUNG, P. R., HILDITCH, P. A., BLETCHLY, C., HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients, **J Clin Microbiol**, v.38, p.1053–1057. 2000.

ZAINAH, S., WAHAB, A. H., MARIAM, M., FAUZIAH, M. K., KHAIRUL, A. H., ROSLINA, I. et al. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromato-graphy test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA, **J. Virol. Methods**, v. 155, p. 157–160. 2009.

ZANG, A., XU, X., NEILL, S., CAI, W. Overexpression of OsRAN2 in rice and Arabidopsis renders transgenic plants hypersensitive to salinity and osmotic stress, *J. Exp Bot.*, v.61, p.777-789. 2010.

ZHOU, J. M., TANG, Y. X., FANG, D. Y., ZHOU, J. J., LIANG, Y., GUO, H., Y., JIANG, L. F. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*, **Virus Genes**, v. 33, p. 27–32. 2006.