

MARILANE DE OLIVEIRA FANI AMARO

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL (NS1)
DO VÍRUS DENGUE-2 VISANDO A PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PARA
KITS DIAGNÓSTICOS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A485e
2013

Amaro, Marilane de Oliveira Fani, 1981-

Expressão heteróloga da proteína não estrutural (NS1) do vírus dengue-2 visando a produção de antígenos para kits diagnósticos / Marilane de Oliveira Fani Amaro. – Viçosa, MG, 2013.

viii, 52 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 48-52

1. Dengue. 2. *Aedes aegypti*. 3. Proteínas. 4. Glicoproteínas. 5. *Nicotiana tabacum*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.772

MARILANE DE OLIVEIRA FANI AMARO

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL (NS1)
DO VÍRUS DENGUE-2 VISANDO A PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PARA
KITS DIAGNÓSTICOS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2013.

Rodrigo Siqueira Batista

Aline Dias Paiva

Leandro Licursi de Oliveira

Monique Renon Eller

Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

*“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,
nem jamais penetrou no coração humano
o que Deus tem preparado para aqueles
que O amam.”
I Coríntios 2.9*

Dedico este trabalho aos meus pais e irmã
Ao meu sempre companheiro, amigo e esposo Camilo Amaro
Aos meus amigos, sogro e sogra, Eli e Hilda
Aos meus tesouros preciosos Caroline, Carine, Davi e Samuel

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força, sabedoria e a oportunidade de concluir este sonho. Obrigado Senhor! Toda honra e toda glória sejam dadas a Ti.

Aos meus pais e irmã, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram. Obrigado por todos os ensinamentos!

Ao meu esposo Camilo, pelo constante apoio, amizade e amor dedicado durante todo este tempo. Não conseguiria esta vitória sem a sua ajuda e compreensão. Vencemos mais uma batalha, te amo!

À Universidade Federal de Viçosa pelo apoio e à brilhante contribuição na capacitação de novos profissionais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Oliveira de Paula, por fazer de mim uma profissional mais capacitada e crítica.

Aos professores da banca, por todas as considerações que certamente contribuirão para a melhoria deste trabalho.

Ao Departamento de Medicina e Enfermagem que muito contribuiu para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunovirologia, em especial a Mariana Xisto, Silva Cardoso e Michele. Obrigado por toda a experiência vivida e por toda torcida para a conquista desta etapa. Vocês são responsáveis por esta vitória!

Meu muito obrigado!

Marilane Amaro

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
OBJETIVOS	11
MATERIAL E MÉTODOS	12
1-EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DENGUE-2 EM <i>Nicotina tabacum</i> “Havana”	12
1.1-Estoque viral e plasmídeos	12
1.2- Amostras de soro.....	12
1.3-Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase.....	15
1.4-Purificação do gene NS1 e clivagem com enzimas de restrição.....	15
1.5-Transformação de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α com os plasmídeos pGEM-T/NS1.....	16
1.6-Transformação de <i>A. tumefaciens</i> com os plasmídeos recombinantes pCAMBIA 3301/NS1.....	16
1.7-Desinfestação das sementes e micropropagação de <i>N. tabacum</i> <i>in vitro</i>	17
1.8-Transformação genética mediada por <i>A. tumefaciens</i>	18
1.9-Obtenção dos brotos transgênicos.....	19
1.10-Extração de DNA e RNA de tecidos vegetais.....	20
1.11-Extração de proteínas dos fragmentos foliares.....	20
1.12-Detecção da expressão da proteína NS1 por Dotblot.....	21
1.13-Confirmação da expressão e caracterização da proteína NS1: SDS-PAGE e immunoblot.....	21
1.14- Preparação do extrato para realização de imunoenensaio.....	22
1.15-ELISA indireto e tipo sanduiche para detecção de IgM e IgG.....	22
1.16-Análise estatística.....	24
2-CONSTRUÇÃO DE UM VETOR OTIMIZADO CONTENDO O GENE DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 DO VÍRUS DENGUE-2 PARA A EXPRESSÃO EM <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.1-Otimização da sequência do gene da proteína NS1.....	24

2.2-Recuperação dos plasmídeos sintetizados.....	27
2.3-Transformação de células competentes <i>E. coli</i> TOP10F com osplasmídeos pUC57/NS1.....	27
2.4- Germinação das sementes e crescimento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.5- Transformação genética mediada por <i>A. tumefaciens</i>	28
RESULTADOS	30
1- EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DENGUE-2 EM <i>Nicotina tabacum</i> “Havana”	30
1.1- Obtenção de <i>Escherichia coli</i> DH5 α recombinantes contendo o plasmídeo pGEM-T/NS1.....	30
1.2- <i>Escherichia coli</i> DH5 α e <i>A. tumefaciens</i> LB4404recombinantes contendo o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1.....	31
1.3- Expressão da proteína NS1 do vírus dengue-2 em plantas <i>N. tabacum</i>	33
1.4- Padronização de soros.....	35
1.5- Caracterização e purificação da proteína NS1 recombinante.....	35
2- CONSTRUÇÃO DE UM VETOR OTIMIZADO CONTENDO O GENE DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 DO VÍRUS DENGUE-2 PARA A EXPRESSÃO EM <i>Arabidopsisthaliana</i>	40
2.1- Obtenção de <i>Escherichia coli</i> TOP10F recombinantes contendo o plasmídeo pUC57/NS1	40
2.2- Obtenção de <i>E. coli</i> TOP10F e <i>A. tumefaciens</i> recombinantes contendo o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1.....	41
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO	47
PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS	48

RESUMO

AMARO, Marilane de Oliveira Fani, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Expressão heteróloga da proteína não estrutural (NS1) do vírus dengue-2 visando a produção de antígenos para kits diagnósticos.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientador: Silvia Almeida Cardoso.

A dengue é uma das doenças mais importantes causada por arbovírus no mundo, sendo observado nos últimos vinte anos um aumento significativo na distribuição geográfica, transmissão contínua de vários sorotipos e emergência da Febre hemorrágica em áreas onde a doença não era prevalente. Apesar dos processos metodológicos de diagnóstico da dengue estarem na atualidade em profundo desenvolvimento e aperfeiçoamento, um empecilho para a realização de testes diagnósticos para dengue reside na dificuldade de produção em grande escala de antígenos a serem utilizados em testes diagnósticos. Devido a esta demanda, os objetivos deste trabalho foram a obtenção da proteína não estrutural 1(NS1) do sorotipo dengue 2, através da expressão heteróloga em *Nicotiana tabacum* e a construção de um vetor otimizado para expressão em plantas com o intuito de elevar os níveis de expressão da proteína recombinante nas plantas transgênicas e facilitar sua purificação. Após a confirmação da expressão em *Nicotina tabacum*, a proteína heteróloga foi caracterizada por imunoblot. Em ensaio imunoenzimático a proteína NS1 recombinante, apresentou potencial como antígeno para desenvolvimento de Kits de diagnóstico da dengue e foi confirmado a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor otimizado. Estudos posteriores verificarão a expressão da proteína NS1 recombinante em *Arabidopsis thaliana* e sua potencial utilização em Kits diagnósticos.

ABSTRACT

AMARO, Marilane de Oliveira Fani, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Heterologous expression of the nonstructural protein (NS1) of dengue virus-2 aimed at the production of antigens for diagnostic kits.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Coadviser: Silvia Almeida Cardoso.

Dengue is one of the most important diseases caused by arboviruses in the world, being reported in the last twenty years a significant increase in geographical distribution, continuous transmission of various serotypes and emergence of hemorrhagic fever in areas where the disease was not prevalent. Despite the methodological processes of diagnosis of dengue are at present in-depth development and improvement, a hindrance to the realization of diagnostic tests for dengue is the difficulty of large-scale production of antigens for use in diagnostic tests. Due to this demand, the aim of this work was to obtain the nonstructural protein 1 (NS1) of dengue serotype 2 by heterologous expression in *Nicotiana tabacum* and the construction of a vector optimized for expression in plants in order to raise the levels of expression recombinant protein in transgenic plants and facilitate their purification. Upon confirmation of expression in *Nicotiana tabacum*, the heterologous protein was characterized by immunoblotting. In enzyme immunoassay recombinant NS1 protein, presented as potential antigen for the development of dengue diagnostic kits and the confirmed transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with the optimized vector was confirmed. Further studies will verify the expression of recombinant NS1 protein in *Arabidopsis thaliana* and its potential use in diagnostic kits.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Infecções causadas pelo vírus da dengue estão entre as mais importantes doenças humanas transmitidas por artrópodes no mundo. A transmissão deste vírus é feita por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, que se caracteriza por ser predominantemente urbano na sua distribuição e por circular principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, o que leva a doença a ser predominante nestas regiões (Lemes, 2005; Oishi, 2007).

A ocorrência global da dengue tem crescido drasticamente nas últimas décadas, tornando-se um problema mundial de saúde pública. Os fatores responsáveis por este aumento estão associados com as mudanças sociais e demográficas dos últimos 50 anos, principalmente com o crescimento populacional sem precedentes e a urbanização sem planejamento e descontrolada, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento (De Paula, 2004; Tanya-Conyer, 2009).

A cada ano, estima-se que infecções pelo vírus da dengue sejam responsáveis por mais de 100 milhões de casos de dengue clássica (Halstead, 2007). Segundo dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), o Brasil apresentou em 2012 mais de 590.000 casos de dengue. Entretanto, a real prevalência não é bem conhecida, uma vez que as notificações em países menos desenvolvidos são insatisfatórias.

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* e possui 4 sorotipos antigenicamente distintos, denominados *dengue-1*, *dengue-2*, *dengue-3*, e *dengue-4*. A imunidade adquirida após infecção com cada um dos sorotipos é duradoura (Halstead, 2007). O genoma destes vírus consiste de RNA de 11 kilobases. Os genes estão dispostos na seguinte ordem, da extremidade 5' para a 3': C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5. A tradução do genoma resulta em uma única poliproteína precursora que é clivada por proteases celular e viral para formar as proteínas virais finais (Figura 1). As proteínas C, M e E são componentes estruturais do vírus que protegem o RNA viral. As proteínas não estruturais estão relacionadas à replicação viral, à expressão das proteínas virais e à virulência dos sorotipos (Pugachev, 2003; Whitehead, 2007).

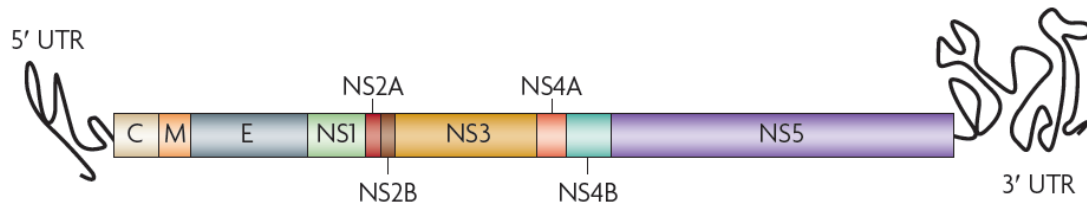


Figura 1. O genoma do vírus dengue. Tradução do genoma resulta em uma única poliproteína precursora que é clivada por proteases celular e viral. Três proteínas estruturais: glicoproteínas do capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E). Sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Guzman *et al.*, 2010).

A NS1 é uma glicoproteína que possui aproximadamente 45 kDa e existe em múltiplas formas (monômero, dímero e hexâmero) em diferentes compartimentos das células de inseto e de mamíferos infectadas pelo vírus dengue. Ela pode se encontrar associada à membrana ou na forma solúvel, que é secretada pelas células infectadas, e por isso pode ser encontrada em meio de cultura de células ou no soro de pacientes infectados. As funções da NS1 nas infecções do vírus dengue ainda não foram claramente elucidadas. No entanto, diversos estudos sugerem sua participação na fase precoce da replicação viral, na montagem, na maturação e na virulência (Noisakran, 2007; Amorim, 2012). É uma das primeiras proteínas a serem secretadas após infecção em humanos, o que torna este antígeno candidato para desenvolvimento de um diagnóstico sorológico eficiente.

As infecções com *Flavivirus* induzem anticorpos anti-NS1 fixadores do complemento contra epítomos tipo-específicos, alguns dos quais têm atividade protetora. A proteção parece ocorrer pela lise das células infectadas que expressam NS1 na superfície, via lise mediada pelo complemento dependente de anticorpo (Schlesinger *et al.*, 1993; Costa *et al.*, 2007).

NS2a e NS2b têm sido relacionadas com o processamento da poliproteína, enquanto NS3 é provavelmente a protease viral e pode estar envolvida com a duplicação e a transcrição do genoma. A região NS4 codifica duas pequenas proteínas

hidrofóbicas NS4a e NS4b que parecem estar relacionadas com a estabilização do complexo de replicação do RNA e na maturação da partícula viral. A proteína codificada pelo gene NS5 é uma RNA polimerase viral com peso molecular de 105 kDa e é a mais conservada entre as proteínas dos *Flavivirus* (Guzman *et al.*, 2010).

As manifestações clínicas da dengue vão desde infecções assintomáticas a alterações graves caracterizadas por hemorragia e choque, conhecidas como febre hemorrágica e síndrome do choque da dengue, e que são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade (Lemes, 2005; Oishi, 2007). Clinicamente a febre hemorrágica da dengue e a síndrome do choque da dengue são de difícil diagnóstico, sendo confundidas com outras doenças caracterizadas por distúrbios da permeabilidade capilar (De Paula e Fonseca, 2004). A patogênese da dengue hemorrágica e da síndrome do choque da dengue é ainda controversa e várias teorias existem para explicar as mudanças patogênicas. A mais comumente aceita refere-se a um fenômeno denominado “aumento da infecção mediado pelo sistema imune” (*immune enhancement of infection*). Esta hipótese defende a ideia de que anticorpos adquiridos em infecções prévias, por um determinado sorotipo do vírus do dengue, não seriam neutralizantes ou teriam títulos muito baixos para neutralizarem o sorotipo responsável pela infecção atual. Em uma futura infecção, ocorre a ligação de um anticorpo pré-existente com o vírus infectante, formando o complexo antígeno-anticorpo. Esse complexo é então reconhecido pelas células monocitárias, especialmente macrófagos, que são as células-alvo do nosso organismo para a replicação viral. Essas células expressam em sua superfície receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, região implicada na ligação dos complexos antígenos-anticorpos, facilitando assim a ligação do vírus do dengue ao seu receptor bem como a internalização desses complexos durante a reciclagem das membranas celulares. Esta facilidade de penetração do vírus nestas células resulta em uma maior carga viral, maior intensidade da resposta imune a esta infecção com liberação de citocinas e aminas vasoativas e como consequência uma doença mais grave (Lei *et al.*, 2001; Tan e Alonso, 2009; Brown *et al.*, 2009).

O diagnóstico precoce, seguido pelo tratamento dos sintomas, é um fator importante na sobrevivência dos pacientes. O diagnóstico laboratorial definitivo da

dengue depende do isolamento destes vírus, detecção de antígenos virais ou RNA em soro ou tecidos, ou detecção de anticorpos específicos no soro dos pacientes (Guzman,1996; Anandarao, 2005).

A identificação do vírus por intermédio do seu isolamento pode durar vários dias e nem sempre é bem sucedida, devido à pequena quantidade de vírus viáveis encontrados nas amostras. Antígenos virais podem ser detectados por imunohistoquímica ou imunofluorescência, porém a complexidade destes ensaios e o alto custo impedem a sua utilização (De Paula e Fonseca, 2004; Lemmer *et al.*, 2004). Em todos estes meios para identificação viral, ocorre a necessidade de que o paciente se encontre no período de viremia, isto é, que possua vírus, antígenos virais ou RNA viral nas amostras coletadas. Logo, o pequeno espaço de tempo médio de viremia (aproximadamente 5 dias) disponível para uma detecção bem sucedida da infecção, também é um empecilho na utilização destes testes no diagnóstico da dengue. Deste modo, na maioria dos casos, o único provável teste de diagnóstico deve ser baseado na identificação de anticorpos anti-dengue (Anandarao *et al.*, 2005).

Os sistemas imunoenzimáticos têm sido considerados de grande utilidade para o diagnóstico da dengue devido a sua alta sensibilidade e rapidez. A pesquisa de anticorpos distintos, ou seja, de fase aguda (IgM) e de convalescência (IgG), assim como a pesquisa de antígenos é possível pelo método de ELISA (Figura 2). Por sua simplicidade de execução e a necessidade de equipamentos não muito sofisticados, estes testes têm se tornado os métodos sorológicos mais utilizados para o diagnóstico da dengue nos últimos anos (Vordam e Kuno, 1997; Kumarasamy *et al.*, 2007).

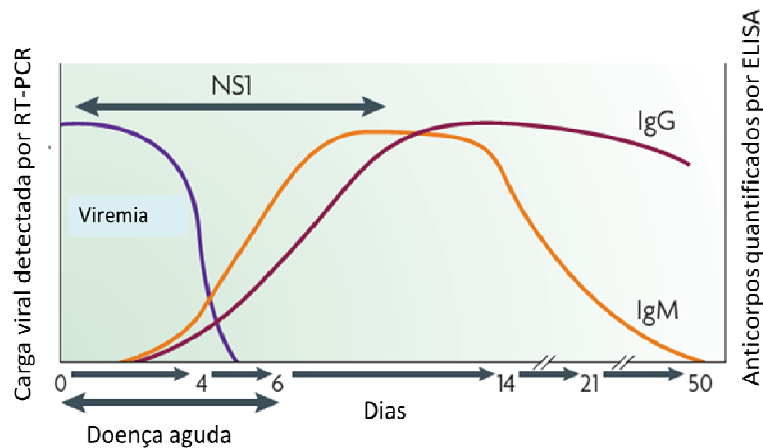


Figura 2. Resposta de anticorpos e antígenos usadas no diagnóstico da dengue. Ig: imunoglobulina; NS: não estrutural (Guzman *et al.*, 2010).

A resposta imune adquirida observada na dengue difere-se na infecção primária ou secundária. A resposta primária de anticorpos é observada em indivíduos que não são imunes a dengue e uma resposta imune secundária é observada em pacientes que tiveram uma infecção anterior. A infecção primária caracteriza-se por uma resposta lenta de anticorpos e de baixos títulos. Anticorpos IgM são o primeiro isotipo a aparecer, em torno do terceiro ao quinto dia da doença em 50% dos pacientes hospitalizados e em torno do sexto ao décimo dia em 93-99% dos casos. Os maiores picos de IgM ocorrem aproximadamente na segunda semana após o início da febre e diminuiu a níveis indetectáveis durante os próximos dois a três meses. Anticorpos IgG são detectáveis em baixos títulos no final da primeira semana da doença e aumentam lentamente. Durante uma infecção secundária, os níveis elevados de anticorpos IgG são detectáveis mesmo na fase aguda e aumentam grandemente nas primeiras semanas (WHO, 2009).

Na atualidade, o maior entrave no que tange a um melhor desempenho dos ensaios imunoenzimáticos diz respeito à obtenção dos antígenos. Os principais centros de pesquisa e diagnóstico do mundo apresentam grandes dificuldades na obtenção de

preparações com conteúdo adequado de antígeno. Os métodos utilizados atualmente são a centrifugação zonal contínua de sobrenadantes de culturas infectadas, o que apresenta produção relativamente baixa do vírus dengue, ou a produção de antígenos a partir de cérebros de camundongos recém-nascidos artificialmente infectados, que é um método árduo e dispendioso. Esses fatores surgem como um obstáculo importante na produção em larga escala dos antígenos empregados em diversos ensaios usados na captura do anticorpo presente no soro do paciente infectado (Mendonça *et al.*, 2004; Honda *et al.*, 2012).

Kits comerciais utilizando o antígeno NS1 têm sido utilizados para o diagnóstico laboratorial de rotina da dengue. Kumarasamy *et al.* (2007), realizaram um ensaio MAC-ELISA para a proteína NS1/DENV (PLATELIA™ DENGUE NS1 AG test Kit, BIO-RAD, França) objetivando demonstrar sua potencial aplicação em diagnóstico laboratorial precoce, obtendo uma sensibilidade de 93,4% e especificidade de 100%. Das 314 amostras analisadas, 213 eram de infecções agudas. A técnica foi comparada com isolamento viral em culturas de células e com RT-PCR, e alcançou ótimos resultados, além da técnica de ELISA para a detecção de IgG anti-NS1 (Panbio Dengue IgG Capture ELISA, Austrália), justificando a utilização da NS1 como marcador para infecções agudas e o teste ELISA como um ensaio eficaz na detecção de anticorpos anti-dengue.

Nos últimos anos a biotecnologia vegetal ampliou o uso das plantas através da transferência, integração e expressão de genes que tenham necessidades de serem produzidos em grandes quantidades ou ainda que contenham propriedades medicinais. Comparadas com outros organismos, as plantas oferecem diversas vantagens. Elas possuem uma maquinaria de processamento pós-transcricional semelhante à dos mamíferos e não carregam oncogenes humanos (Blais, 2006). Em adição, a produção em larga escala de proteínas de interesse se torna comercialmente mais barata. Essas vantagens permitem a expressão de uma ampla diversidade de proteínas para prevenção, diagnóstico e terapias (Streatfield, 2006).

O tabaco é conhecido como planta-modelo de transformação, uma vez que sua cultura *in vitro* já está bem estabelecida, e que possui características que facilitam o processo, como: facilidade de germinação e de regeneração, ciclo curto e ampla

produção de sementes (Brasileiro, 1998). Diversas proteínas recombinantes já foram expressas em tabaco com sucesso, como a proteína de fusão do hormônio de crescimento humano, albumina sérica humana, anticorpos e o receptor CD14 humano (Barta *et al.*, 1986; Hiatt *et al.*, 1989; Sijmons *et al.*, 1990; Blais e Altosaar, 2006).

Os estudos com a expressão do domínio III da proteína E do vírus dengue em *Nicotiana benthamiana*, demonstraram a produção desta proteína recombinante, cujos ensaios de imunização induziram a produção de anticorpos anti-dengue com atividade neutralizante (Saejung *et al.*, 2007).

A *Arabidopsis thaliana* é uma espécie de reprodução rápida, com ciclo de vida curto e com grande produção de sementes, em torno de 5.000 por planta (Meinke *et al.*, 1998). Uma das vantagens da *Arabidopsis thaliana* em relação às demais plantas diz respeito ao porte da planta que é muito pequeno. Este fato possibilita crescer milhares de plantas em espaços reduzidos como casas de vegetação ou mesmo câmaras de crescimento. 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). Um fator que foi decisivo no estabelecimento de *Arabidopsis* como uma espécie modelo é o fato de ser possível sua transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens* de maneira muito eficiente inclusive pela aspersão de suas flores com solução contendo a bactéria recombinante (Labra *et al.*, 2004; Delatorre e Silva, 2008).

Várias metodologias para transformação de plantas foram desenvolvidas. A transformação indireta consiste no uso de um vetor, como a *Agrobacterium* para intermediar a transferência de DNA (Giddings *et al.*, 2000).

As agrobactérias são organismos aeróbicos, gram-negativos e tipicamente encontrados no solo. 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 infecção se inicia pela penetração da bactéria no tecido vegetal através de uma lesão sofrida pela planta por geadas, insetos, animais, dentre outros. As bactérias são atraídas por moléculas-sinal que são exsudadas pelas células no local da lesão. Essas moléculas-sinal também são responsáveis pela ativação de

genes que estão localizados no plasmídeo *Ti* (indução de tumor, do inglês *tumor-inducing*), que promove a transferência de genes da bactéria para a célula vegetal.

A região *vir*, 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 de outra região do plasmídeo *Ti* da bactéria para o vegetal (Figura 3).

Existem evidências de que 11 proteínas codificadas na região *vir* formam um complexo tubular associado à membrana, dando passagem ao ssT-DNA. Segundo Kado (2000) e Veena *et al.*, (2003) esse complexo ou poro, teria uma anatomia, em termos de estrutura, semelhante a um pilus. Este poro funcionaria como uma “seringa molecular”, transpassando a parede celular da bactéria e a parede celular da planta, dispensando o fragmento de ssDNA diretamente no citoplasma eucariota.

A região denominada T-DNA (DNA de transferência, do inglês *transferred DNA*), é delimitada por duas sequências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda. Uma vez no núcleo da célula, o T-DNA é integrado, de forma estável, no genoma vegetal. Foi verificado, que para a infecção de plantas são necessárias apenas as duas extremidades direita e esquerda, desta forma os genes que causam a proliferação celular podem ser removidos e genes de interesse podem ser inseridos em seus lugares (Brasileiro e Carneiro, 1998).

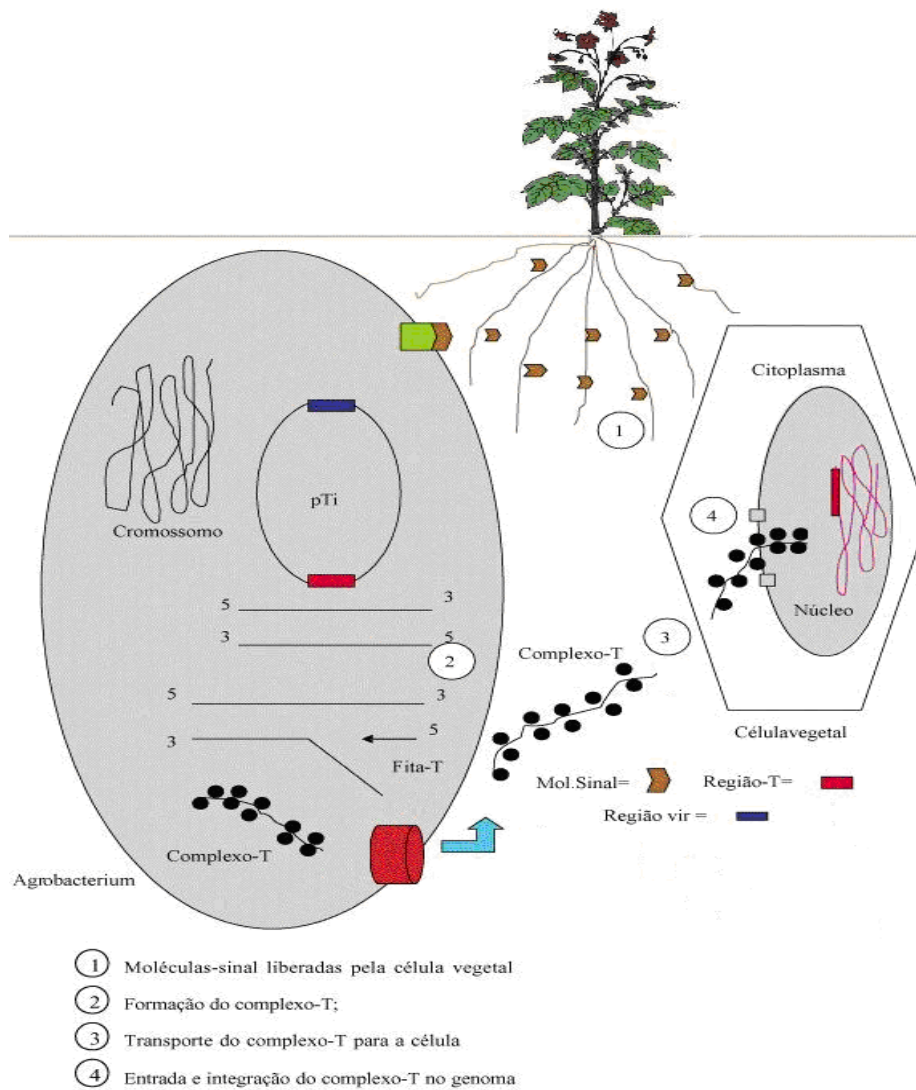


Figura 3. Representação esquemática do processo de infecção de uma célula vegetal por *Agrobacterium*. Transferência do complexo-T para a célula vegetal. (Andrade *et al.*, 2003).

Com o intuito de obtermos proteínas NS1 do vírus dengue-2 visando à produção de antígeno para utilização em testes diagnósticos foi aplicada a metodologia de expressão heteróloga de proteínas em plantas.

Primeiramente foi utilizada a transformação indireta do genoma de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Análises foram realizadas para verificar a integração do gene NS1 no genoma vegetal, a expressão e avaliação da proteína como potencial candidato a ser utilizado em testes diagnósticos.

Posteriormente, foi realizada a construção de um vetor otimizado para expressão em plantas com o intuito de elevar os níveis de expressão da proteína recombinante nas plantas transgênicas e facilitar sua purificação. Este vetor foi utilizado para transformar *Arabidopsis thaliana*.

A contribuição dos resultados obtidos poderá ser verificada indiretamente no controle da dengue e no cuidado aos pacientes, por intermédio do desenvolvimento de Kits de diagnóstico, possibilitando o início imediato da intervenção terapêutica em todos os casos.

OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- 1- Expressar a proteína não estrutural (NS1) do vírus dengue- 2 em plantas *Nicotiana tabacum* “Havana” visando à produção de antígenos para kits diagnósticos.
- 2- Construir um sistema de expressão otimizado para plantas com o intuito de elevar os níveis de expressão da proteína NS1 recombinante nas plantas transgênicas e facilitar sua purificação.

Objetivos específicos:

- 1- Construir o vetor de expressão pCAMBIA 3301 contendo o gene responsável por codificar a proteína não estrutural (NS1) do vírus dengue-2;
- 2- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor de expressão pCAMBIA 3301/NS1;
- 3- Transformar *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*, visando à utilização de plantas na produção de proteínas heterólogas;
- 4- Analisar de forma comparativa o antígeno obtido em diferentes métodos de diagnóstico, como ELISA indireto e ELISA tipo sanduiche;
- 5- Construir um vetor de expressão otimizado para plantas contendo o gene responsável por codificar a proteína NS1 do vírus dengue-2;
- 6- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor de expressão pCAMBIA 3301/NS1 otimizado.

MATERIAL E MÉTODOS

1- EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DENGUE-2 EM *Nicotina tabacum* “Havana”

1.1- Estoque viral e plasmídeos

Células C6/36 derivadas de linhagem celular do mosquito *Aedes albopictus* crescidas em meio L15 a 28 °C e infectadas com 25 µL de vírus dengue-2, cepa New Guinea C (Genbank accession nº. M29095), foram utilizadas para montar o estoque viral. A infecção viral foi confirmada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o par de iniciadores: AD3 (5' TAACATCATCATGAGACAGAGC 3') e AD4 (5' TGTTGTCTTAAACAAGAGAGGTC 3').

O gene de interesse que codifica a proteína não estrutural NS1, foi clonado primeiramente no vetor de clonagem pGEM-T (Figura 4). Posteriormente, foi utilizado o plasmídeo pCAMBIA 3301 (Figura 5A) modificado para a expressão do gene do vírus dengue-2, e se caracteriza por conter um “replicon” pVS1 de alta estabilidade em *Agrobacterium*, gene de seleção bacteriana com canamicina e gene de seleção de planta com fosfotricina (glufosinato de amônio). Este foi obtido junto ao Laboratório de Clonagem e Sequenciamento de DNA - Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - Universidade Federal de Viçosa - Brasil. As Figuras 5B e 5C mostram as sequências gênica e proteica esperadas.

Os anticorpos anti-NS1 (Abcam) e anti-D4 (Imuny) que foram utilizados no ELISA tipo sanduiche foram obtidos comercialmente.

1.2- Amostras de soro

Amostras de soros de 188 pacientes (142 pacientes previamente confirmados para dengue e 46 amostras de soro de doadores saudáveis) foram fornecidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Rondônia (LACEN/ RO) e do Banco de Sangue Central do Estado de Rondônia, Brasil (FHEMERON/RO). Todos os soros foram testados de acordo com protocolos aprovados pelo Banco de Sangue Central do Estado de Rondônia e confirmadas como IgM ou IgG positivo para dengue pelo MAC-

ELISA IgM (Pan-Bio, Austrália) e Duo Dengue IgM e IgG Kits ELISA de Captura (Sanofi, NJ, EUA).

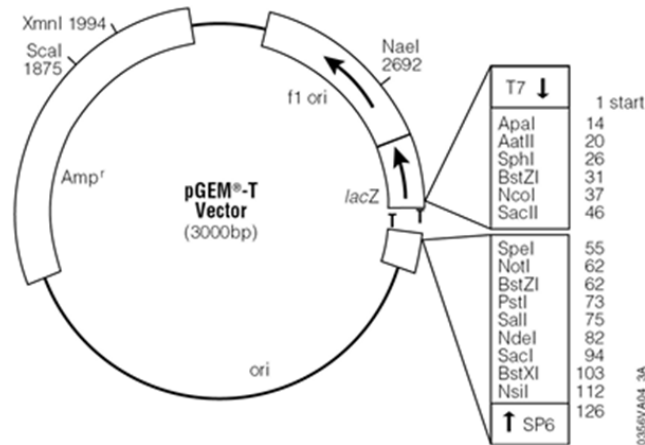


Figura 4. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T (Promega). Este vetor possui gene de seleção bacteriana com ampicilina e sítios de restrição para as enzimas *Bgl* II e *Bst* II.

1.3- Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase

O Kit QIAamp[®] Viral RNA (QIAGEN) foi utilizado para a extração do RNA total da cultura celular infectada pelo vírus. Aproximadamente 10 µg do RNA total foram utilizados para sintetizar as primeiras fitas do DNA complementar, utilizando “primers” randômicos pd(N)₆ (Amersham Pharmacia Biotech). A síntese do cDNA foi realizada utilizando o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para a PCR foi utilizado o par de iniciadores pCambNS1s (5' GGAGATCTATGGATAGTGGTTGCGTTGTGA 3') e pCambNS1as (5' GGGGTAACCTGAGGCTGTGACCAAGGAGT 3'), que flanqueia a região do genoma que codifica a proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus dengue-2, resultando num fragmento de 1056 pares de bases. Os iniciadores também contêm os sítios de restrição das enzimas *BstE* II e *Bgl* II. Na reação foram utilizados aproximadamente 100 ng do cDNA em uma reação cujo volume final foi de 50 µL. A desnaturação inicial do cDNA foi realizada a 94 °C por 5 minutos. As amplificações foram feitas em 35 ciclos (95 °C/1 minuto, 55 °C/2 minutos e 72 °C/2 minutos cada ciclo) e incubação final a 72 °C/10 minutos. O resultado da amplificação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% e corado com brometo de etídio 1 µL/mL para visualização.

1.4- Purificação do gene NS1 e clivagem com enzimas de restrição

A banda referente ao gene NS1 foi excisada do gel e o DNA foi purificado usando-se o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conforme instrução do fabricante. Após a purificação, foi realizada a clivagem do fragmento com as enzimas de restrição *Bgl* II e *BstE* II (Fermentas). Os vetores pGEM-T e pCAMBIA também foram clivados com as mesmas enzimas. Para esta reação, foram adicionados 17 µL do plasmídeo, tampão tango (Fermentas), para dupla digestão, e 1 µL de cada uma das enzimas. A reação foi incubada por 8 horas a 37 °C. Nas reações de ligação foi utilizada a enzima T4 ligase (Promega), tampão de ligação, vetor de interesse e o gene NS1, num volume total de 10 µL. A solução foi incubada a temperatura ambiente

durante 12 horas. O produto desta ligação foi então utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α .

1.5- Transformação de células competentes *E. coli* DH5 α com os plasmídeos pGEM-T/NS1 e pCAMBIA 3301/NS1

Células *E. coli* DH5 α competentes foram obtidas através de tratamento com choque térmico (Lewin, 1997). Para a transformação, foi adicionada às células uma solução contendo os plasmídeos pGEM-T/NS1 resultantes da reação de ligação, e incubadas em gelo por 30 minutos e em seguida, a 42 °C por 30 segundos e após, foram rapidamente colocadas no gelo. Foi adicionado 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 as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Para análise e seleção das colônias transformadas com plasmídeos recombinantes pGEM-T/NS1 foi realizada a extração de DNA plasmidial com kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme instruções do fabricante, seguida de uma PCR para confirmação da presença do inserto. O gene NS1 foi clivado do vetor de clonagem pGEM-T/NS1, e o gene de interesse foi ligado ao vetor de expressão pCAMBIA 3301, como descrito anteriormente. O plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α . Após, foi realizada a extração de DNA plasmidial com kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme instruções do fabricante, seguida de uma PCR para confirmação da presença do inserto. O plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1 foi utilizado para a transformação de células competentes de *A. tumefaciens* LB4404.

1.6- Transformação de *A. tumefaciens* com os plasmídeos recombinantes pCAMBIA 3301/NS1

Células de *A. tumefaciens* LB4404 competentes foram obtidas através de tratamento com choque térmico e CaCl₂ (Brasileiro e Carneiro, 1998). Para tanto, uma colônia isolada da linhagem de *Agrobacterium* foi coletada e transferida para 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 MgSO₄, pH 6,8) com os antibióticos canamicina e

estreptomicina nas concentrações finais de 50 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Estas foram incubadas a 28 °C, com agitação de 150 rpm, por 16 h. Posteriormente, 2 mL da cultura foram transferidos para 50 mL de meio YEB e incubadas a 28 °C, com agitação de 150 rpm, por 12 horas. A cultura foi incubada no gelo por 15 minutos e em seguida as células foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, estas foram ressuspensas em 150 mL de água ultra-pura autoclavada e gelada. As células foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O precipitado formado foi suspenso em 20 mL de ultra-pura autoclavada e gelada, e novamente recolhidas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi então suspenso em solução de CaCl₂ 20 mM contendo 10% glicerol, previamente refrigerada. Às células competentes de *Agrobacterium* foram adicionados 3 µL do plasmídeo e estas foram incubadas no gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico em nitrogênio líquido por 1 minuto e 15 segundos e em seguida a 37 °C por 5 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio YEB ao tubo e as células foram incubadas por 2 horas a 28 °C, com agitação de 180 rpm. Para análise das colônias transformadas quanto à presença de plasmídeos recombinantes pCAMBIA 3301/NS1, foi realizada extração de DNA plasmidial seguida de PCR.

1.7- Desinfestação das sementes e micropropagação de *N. tabacum in vitro*

As sementes de *N. tabacum* foram cedidas pelo Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - Universidade Federal de Viçosa - Brasil. O processo de desinfestação das sementes constou da imersão em álcool a 70% (v/v) por 5 minutos, em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) e de Tween-20 por 15 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada autoclavada e semeadas em placas de Petri descartáveis em meio contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg.L⁻¹ de i-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 8 g.L⁻¹ de Agar, pH 5.7, esterilizados por autoclavagem. Após a inoculação das sementes, as culturas foram incubadas à temperatura de 27 °C, sob irradiância de 24 a 36 µmoles m⁻² s⁻¹ com um fotoperíodo de 16 horas. A cada trinta dias, as culturas foram subcultivadas utilizando como explantes caules com aproximadamente dois centímetros de comprimento, com

no mínimo duas folhas. Plantas cultivadas *in vitro* com 5 a 6 semanas foram utilizadas para o processo de transformação.

1.8- Transformação genética mediada por *A. tumefaciens*

Células de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo recombinante pCAMBIA 3301/NS1 foram inoculadas em meio YEB líquido, com canamicina (100 mg/L) e estreptomicina (50 mg/L) e incubadas a 28 °C por 48h. Após o crescimento das bactérias (absorbância 1,0 em 600 nm), estas foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C a 6000 rpm, e ressuspendidas em meio MS líquido com 50 g.L⁻¹ de sacarose, pH 5,6. As folhas de *N. tabacum* foram cortadas em quadrados de aproximadamente 0,5 cm², sobre papel filtro estéril embebido em água ultra-pura, retirando-se a nervura central, e colocadas em uma placa de Petri contendo 20 mL de meio MS líquido para evitar ressecamento. A suspensão bacteriana foi adicionada aos fragmentos foliares cortados, agitando-se delicadamente a placa. A co-cultura foi incubada no escuro, durante 48 horas, a uma temperatura de 25 ± 2 °C (Figura 6A). Após a co-cultura, lavaram-se pelo menos duas vezes os fragmentos foliares em meio MS líquido e estes foram transferidos para papel filtro estéril, eliminando o excesso de bactéria.

A observação da formação de brotos foi realizada diariamente (Figura 6B e 6C). Após 30 dias da transformação, os brotos foram individualizados. Foi observado crescimento lento dos possíveis transformantes em relação à planta não transformada (Figura 6D). Uma vez enraizadas e bem desenvolvidas *in vitro*, as plantas que foram analisadas e apresentaram o gene NS1/DENV2 foram submetidas ao processo de aclimatização (Figura 6E) e transferidas para casa de vegetação, sob condições controladas de cultivo para serem utilizadas em análises moleculares posteriores (Figura 6F).

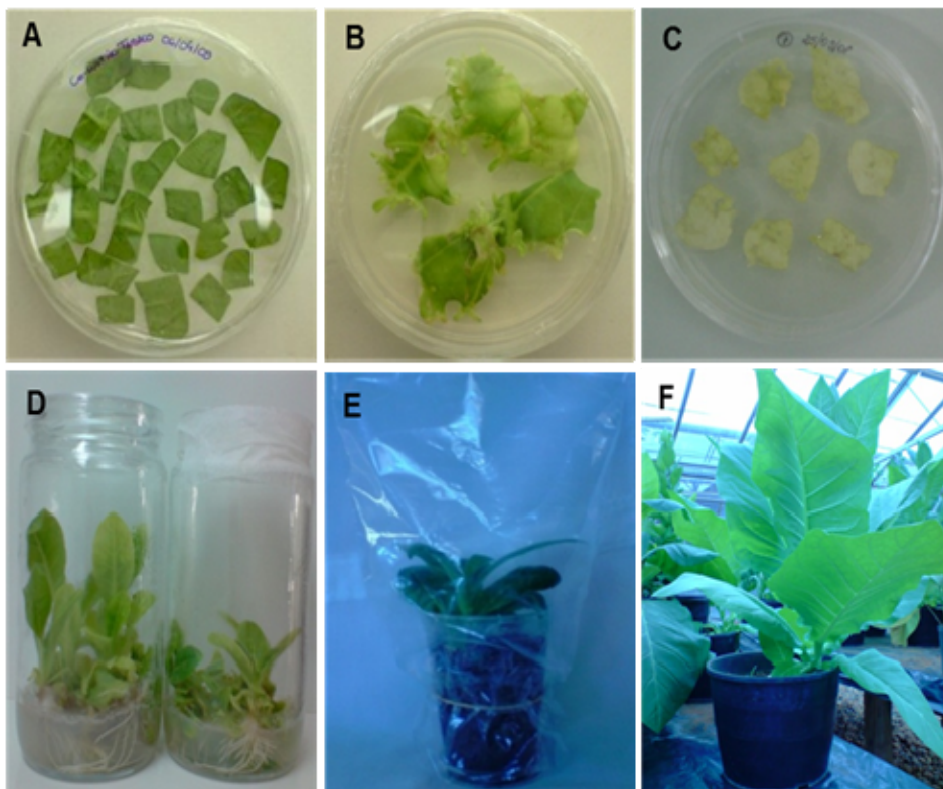


Figura 6. Transformação de *N. tabacum*. (A) Explantes foliares de *N. tabacum* após co-cultivo. (B) Regeneração advéncia dos brotos 21 dias após o co-cultivo. (C) Controle positivo-explantes da planta não transformada, meio com agente seletivo. (D) Comparação de crescimento da planta não transformada em relação à planta transformada. (E) Planta inicialmente no processo de aclimatização. (F) Plantas transgênicas de *N. tabacum* em casa de vegetação.

1.9- Obtenção dos brotos transgênicos

Os fragmentos foliares possivelmente transformados foram, então, inoculados em meio MS sólido contendo BAP (6-benzilaminopurina 1 mg/L), para indução de brotos; timentin® (GlaxoSmith Kline- 500 mg/L), para eliminação das bactérias e 0,5 mg/L de glufosinato de amônio para selecionar as células transformadas (Vasudevan, 2007). A individualização dos brotos foi realizada após identificação daqueles maiores que 0,7 cm, que foram surgindo a partir dos calos resistentes. Os brotos foram excisados na base, procurando excluir tecidos do calo, transferidos individualmente para vidros autoclavados com meio MS para o enraizamento contendo o regulador de

crescimento AIB (ácido indol-butírico - 0,5 mg/L), acrescido de timentin (500 mg/L), glufosinato de amônio (fosfotricina 0,5 mg/L), e foram mantidos nesse meio até o desenvolvimento completo das raízes. Subcultivou-se, por multiplicação de gemas axilares, cada planta potencialmente transgênica, mantendo assim uma ou mais cópias (clones) *in vitro*.

1.10-Extração de DNA e RNA de tecidos vegetais

Foram coletadas cerca de 200 a 300 mg de folha de cada possível transformante para a extração do DNA vegetal, que foi realizada pelo método do brometo de cetiltrimetilamônio (Weising *et al.*, 1995). Posteriormente foi realizada a PCR. O RNA vegetal foi extraído com o Kit SV Total RNA Isolation System® (Promega) e a síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O resultado das amplificações foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,0% e visualizado com brometo de etídio 1 µL/mL. As plantas transgênicas foram separadas para aclimatização e transferidas para a casa de vegetação. Após a colheita das sementes, estas foram armazenadas a 4 °C e as folhas, os caules e as raízes foram armazenados a -80 °C.

1.11-Extração de proteínas dos fragmentos foliares

Foi adicionado 10 mL de SDS denso (0,75 M de sacarose, 2% de SDS, 0,1 M de tris-HCl; pH 8,0) para cada grama de folha de planta. Após, foi realizada a maceração em braço mecânico e adicionado uma solução de extração (100 µL de solução de fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF; 0,2 g de polivinilpolipirrolidona - PVPP; 10 mL de acetona gelada 100%). As amostras foram sonicadas por 10 segundos numa amplitude de 30% por duas vezes e incubadas no gelo por 30 minutos; estas foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 10 mL de acetona a 100% com 1,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 100%. As amostras foram colocadas no gelo por 30 minutos, centrifugadas e o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 10 mL de acetona a 100% com 1,25 mL de TCA a 100%. Este passo foi realizado repetidas vezes até a amostra

obter um aspecto esbranquiçado. Após, esta foi ressuspensa em 2 mL de uréia 8 M por 12 horas, centrifugada a 6.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido. Ao final da extração alíquotas foram utilizadas para o doseamento proteico pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

1.12-Detecção da expressão da proteína NS1 por Dot blot

As soluções de proteínas extraídas das plantas foram aplicadas em membrana de nitrocelulose em locais previamente marcados. Deixou-se secar a membrana por 10 minutos e em seguida esta foi imersa em BSA (albumina de soro bovino) a 5% em TBS (10 mM de tris-HCl, pH 7,4 e 0,9% de NaCl), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) e foi adicionado soro de pacientes previamente confirmado para dengue na diluição 1:100 durante 40 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes e incubada com o anticorpo anti-IgM humano durante 40 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes e a revelação foi realizada com anticorpo monoclonal anti-IgM humano marcado com peroxidase (Sigma), utilizando-se o TMB liquid substrate (Sigma) de acordo com as especificações do fabricante.

1.13- Confirmação da expressão e caracterização imunológica da proteína NS1: SDS-PAGE e immunoblot

Alíquotas do material extraído dos fragmentos foliares foram caracterizadas por SDS-PAGE a 12%. Os géis foram corados com solução de Coomassie (Oakley *et al.*, 1980), para determinação do perfil proteico ou eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose, para realização de immunoblot. A membrana de nitrocelulose foi incubada por duas horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado a 5% em TBS (10 mM de tris-HCl, pH 7,4 e 0,9% de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve, e depois lavada em tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com soro de pacientes previamente confirmados para dengue ou amostras de soro de doadores saudáveis, diluído 1/2000 em leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS, por 16 horas na temperatura de 4 °C. Após este

período, a membrana foi lavada e a revelação foi realizada com anticorpo monoclonal anti-IgM humano marcado com peroxidase (Sigma), utilizando-se o TMB liquid substrate (Sigma) de acordo com as especificações do fabricante.

1.14- Preparação do extrato para realização de imunoensaio

Com intuito de excluir a interferência da ureia presente nos extratos previamente caracterizados, estes foram diluídos em tampão de sensibilização do imunoensaio (carbonato-bicarbonato pH 9,6), ou aplicados em coluna Dessalting (GE lifesciences) previamente equilibrada com tampão PBS.

As amostras de extratos de plantas transformadas ou não que foram submetidos à troca de tampão por PBS, foram utilizadas diretamente nos imunoensaios ou depletados com anticorpo irrelevante. Para tanto, 10 mL de extrato em PBS foi adicionado de 1 mL de soro de camundongo não imunizado. Esta amostra foi incubada a 37 °C por uma hora e posteriormente centrifugada a 6000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi recuperado para posteriores ensaios e descartado o material precipitado.

Os extratos em PBS também foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna Cpto Q (GE lifesciences) equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Após a passagem da amostra, foi adicionado dez vezes o volume da coluna de tampão de equilíbrio para remover proteínas ligadas não-especificamente, e a proteína de ligação específica foi eluída utilizando concentrações de 10%, 25%, 50% e 100% de tampão com 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH8,0. As amostras eluídas foram caracterizadas em gel de poliacrilamida 15%.

As amostras previamente descritas foram dosadas e utilizadas nos imunoensaios enzimáticos, sendo que as amostras diluídas foram utilizadas na concentração final de 10 µg/poço e as amostras submetidas à dessalting 1 µg/poço.

1.15- ELISA indireto e tipo sanduiche para detecção de IgM e IgG

Na realização do ELISA para padronizar a diluição do soro de pacientes previamente confirmados para dengue e soro de doadores saudáveis utilizado nas análises imunoenzimáticas, foram realizadas diluições de 1:10, 1:50, 1:100, 1:250,

1:500, 1:1000, 1:10000 dos soros em PBS. A partir deste resultado, as análises passaram a serem realizadas utilizando a diluição de 1:100.

Para a padronização de ensaio imunoenzimático com extratos de plantas transformadas ou não previamente caracterizados e dosadas, foram testados dois protocolos. Inicialmente foi realizado o imunoensaio indireto com sensibilização (50 µL) de placas de 96 poços (Jet Biofil), na concentração de 1 µg ou 10 µg de proteína total em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) por poço, estas foram mantidas por 12 horas a 4 °C, após este período as placas foram incubadas com 100 µL de solução de bloqueio (PBS/ Soro bovino fetal 5%). No ensaio tipo sanduiche, as placas foram sensibilizadas com 50 µL de anticorpo monoclonal anti-NS1 e anti-D4 diluído 1:100, em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), e também mantido por 12 horas a 4 °C, após a sensibilização estas placas foram incubadas com 100 µL de solução de bloqueio e após lavagem (PBS-Tween 0,05%), acrescentou-se 50 µL dos extratos de planta transformada ou não diluídos em PBS na concentração de 10 µg de proteína total por poço. As etapas seguintes foram similares para os dois ensaios realizados. Posteriormente, as placas foram lavadas em tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) e então incubadas por uma hora e trinta minutos a 37 °C (somente nos dois últimos ELISAs realizados as amostras foram incubadas a 37 °C, nas análises iniciais estas permaneceram em temperatura ambiente) com 50 µL de soro de pacientes previamente confirmados para dengue ou amostras de soro de doadores saudáveis na diluição 1:100. A placa foi então lavada e incubada com anticorpo anti-IgM humano ou anti-IgG humano ambos conjugado com peroxidase (Sigma, EUA). Após lavagem, foi adicionado substrato TMB (1 comprimido de TMB, 10 mL de 0,05 M de tampão de fosfato-citrato / pH 5,0, 2 mL de peróxido de hidrogênio). As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 min e a reação foi interrompida com solução a 2 M de H₂SO₄ (ácido sulfúrico). A intensidade da cor de cada poço foi medida em um espectrofotômetro (Multiskan, Thermo Scientific, EUA) com um filtro de 450 nm. Em cada quadrante foi realizado o controle negativo utilizando água como amostra.

1.16-Análise estatística

Curvas ROC (*receiver operating characteristic*) foram utilizadas para estimar os pontos de corte com relação à sensibilidade e especificidade (INSTAT software, GraphPad, San Diego, CA, USA).

2- CONSTRUÇÃO DE UM VETOR OTIMIZADO CONTENDO O GENE DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 DO VÍRUS DENGUE-2 PARA A EXPRESSÃO EM *Arabidopsis thaliana*

2.1- 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 pUC 57 (Figura 7A), que possui gene de seleção bacteriana com tetraciclina, com a sequência otimizada do gene da proteína NS1 e sequências específicas (Figura 7B) adicionadas (Genone): sítios de restrição para as enzimas *Bgl II* e *Bste II*, que foram utilizados para clonagem no plasmídeo pCAMBIA 3301; sequência de recombinação para recombinases AttB1 e AttB2, a serem utilizadas no sistema de recombinação homóloga; sequência Kozak para reconhecimento do ribossomo visando a expressão em células eucarióticas; códon de iniciação (códon necessário para iniciar a tradução); peptídeo sinal da proteína Bip At5g44620 (Lee *et al.*, 2011) para o direcionamento da sequência para o retículo endoplasmático; gene da proteína não-estrutural 1 do vírus *dengue 2* cepa *New Guinea C.*; cauda de polihistidina, utilizada para a purificação de proteínas recombinantes (Wu *et al.*, 2003); sequência de retenção no retículo endoplasmático visando aumentar a expressão do gene NS1 (Munro e Pelham, 1987; Koizumi, 1996; Napier *et al.*, 1992); códon de terminação (códon necessário para terminar a tradução), resultando em uma sequência de 1295 pares de bases (Figura 7C). A Figura 8 mostra o alinhamento das sequências de DNA do gene NS1 original e o gene NS1 otimizado.

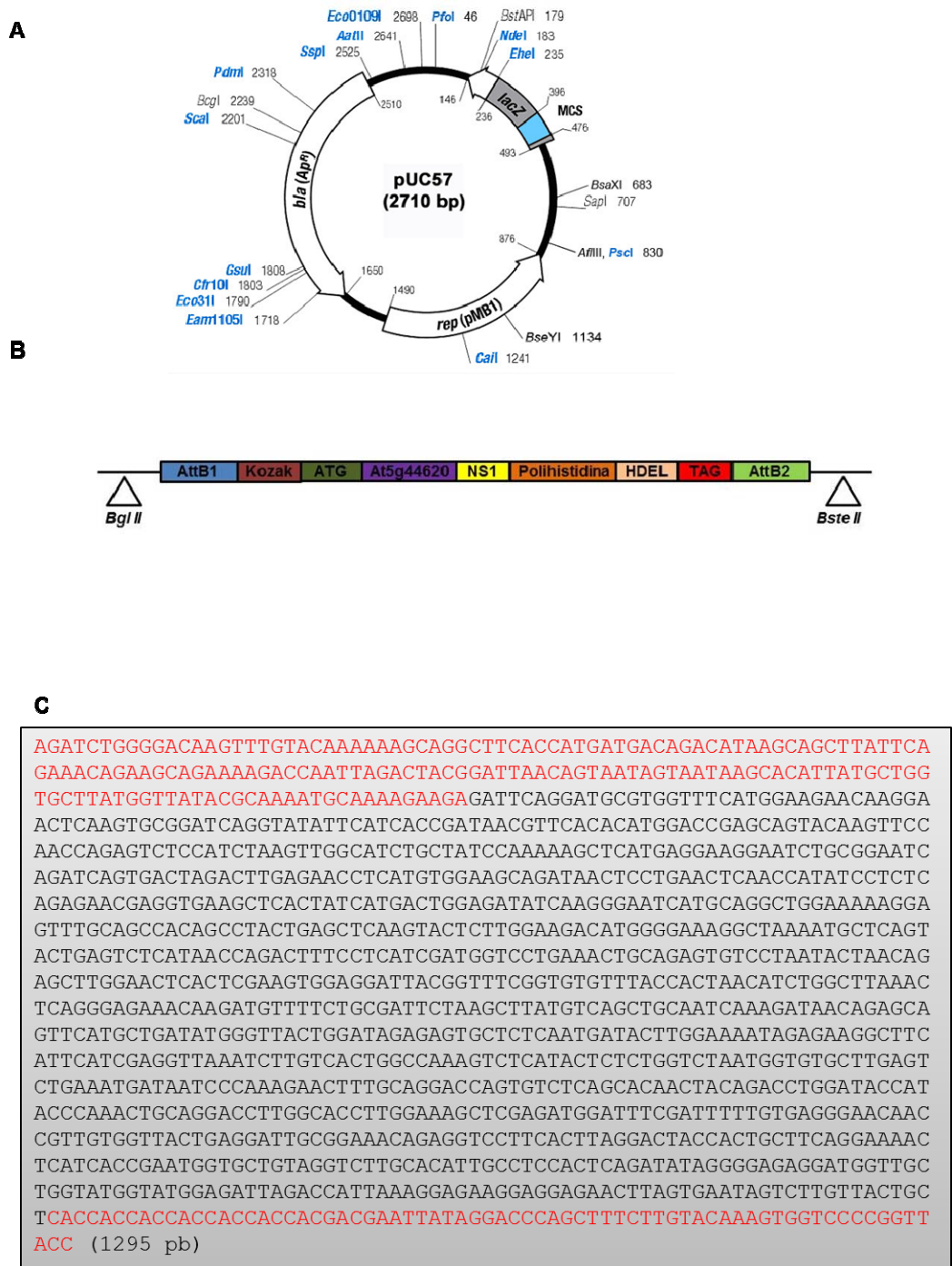


Figura 7. Construção do vetor otimizado para expressão em plantas. (A) Representação esquemática do plasmídeo pUC57. **(B)** Representação esquemática da sequência sintetizada. **(C)** Sequência gênica do inserto referente à NS1 otimizada em preto e sequências específicas adicionadas em vermelho.

Optimizada 170	GATTCAGGATGCGTGGTTTCATGGAAGAACAAGGAACTCAAGTGCGGATCAGGTATATTC
Original 170	GATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGMMAAACMAAGAACTGAAAGTGGCAGTGGGATTTTC
Optimizada 230	ATCACCGATAACGTTACACACATGGACCGAGCAGTACAAGTTCACACAGAGTCTCCATCT
Original	ATCACAGACAACGTCACACATGGACAGAACAAATACAAGTTCACACAGAAATCCCTTCA
Optimizada 290	AAGTTGGCATCTGCTATCCAAAAGCTCATGAGGAAGGAATCTGCGGAATCAGATCAGTG
Original 290	AACTAGCTTCAGCTATCCAGAAAGCTCATGAAAGAGGGCAATTTGTGGAATCCGCTCAGTA
Optimizada 350	ACTAGACTTGAGAACCCTCATGTGGAAGCAGATAACTCCTGAACTCAACCATATCCTCTCA
Original 350	ACAAGACTGGAAAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAATTGAATCACATTCATATCA
Optimizada 410	GAGAACGAGGTGAAGCTCACTATCATGACTGGAGATATCAAGGGAAATCATGCAGGCTGGG
Original 410	GAAAATGAGGTGAAGTTCACTATTATGACAGGAGACATCAAAGGAATCATGCAGGAGGA
Optimizada 470	AAAAGGAGTTTGACAGCCACAGCCTACTGAGCTCAAGTACTCTTGGAAAGACATGGGGAAAG
Original 470	AAACGATCTCTGCAGCCCCAGCCACTGAGCTGAAGTATTATGAAAACATGGGGCAAA
Optimizada 530	GCTAAAATGCTCAGTACTGAGTCTCATAACCAGACTTTCCTCATCGATGGTCTGAAACT
Original 530	GCGAAAATGCTCTCTACAGAGTCTCATAACCAGACTTTCCTCATGATGGCCCCGAAAACA
Optimizada 590	GCAGAGTGTCTAATACTAACAGAGCTTGGAACTCACTCGAAGTGGAGGATTACGGTTTC
Original 590	GCAGAATGCCCAACACAAACAGAGCTTGGAAATCGCTGGAAGTGAAGACTATGGCTTT
Optimizada 650	GGTGTGTTTACCCTAACATCTGGCTTAAACTCAGGGAGAAACAAGATGTTTCTCGGAT
Original 650	GGAGTATTCACCACCAATATATGGCTAAAGTTGAGAGAAAAGCAGGATGTATTCTCGCAG
Optimizada 710	TCTAAGCTTATCTCAGCTCAATCAAAAGATAACACAGCAGTTCATCCTGATATGGCTTAC
Original 710	TCAAAACTCATGTGACGGCCATAAAAGACAACAGAGCCGTCATGCCGATATGGGTATAT
Optimizada 770	TGGATAGAGAGTGCCTCAATGATACTTGGAAAATAGAGAAGGCTTCAATCATCGAGGTT
Original 770	TGGATAGAAAAGTGCCTCAATGACACATGGAAGATAGAGAAGGCTCTTTCATCGAAGTT
Optimizada 830	AAATCTTGTCACTGGCCAAAGTCTCATACTCTCTGGTCTAAATGGTGTGCTTGAGTCTGAA
Original 830	AAAAGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACCCCTCTGGAGTAATGGAGTGTAGAAAAGTGAG
Optimizada 890	ATGATAATCCCAAAGAACCTTTCAGGACCAGTGTCTCAGCACAACTACAGACCTGGATAC
Original 890	ATGATAATCCCAAAGAATTCGCTGGACCAGTGTCAACACAACTACAGACCAGGCTAC
Optimizada 950	CATACCCAACTGCAGGACCTTGGCACCTTGGAAAGCTCGAGATGGATTTGATTTTGT
Original 950	CATACACAAACAGCAGGACCATGGCATCTAGGTAAGCTTGAGATGGACTTTGATTTCTGC
Optimizada 1010	GAGGGAACAACCGTTGTGGTTACTGAGGATTGGGAACAGAGGCTCTCACTTAGGACT
Original 1010	GAAGGAACCCACAGTGGTGGTGAAGTACTGAGGACTGTGGAAATAGAGGACCTCTTTAAGAACA
Optimizada 1070	ACCCTGCTTCAGGAAAACCTATCACCGAATGGTGCCTGAGGTCTTGACATTCGCTCCA
Original 1070	ACTACTGCCTCTGAAAACCTATAACAGAAATCCTCCTCCGATCTTGACATTCACACCC
Optimizada 1130	CTCAGATATAGGGGAGAGGATGGTTGCTGGTATGGATATGGAGATTAGACCAATTAAGGAG
Original 1130	CTAAGATACAGAGGTGAGGACGGATGCTGGTACGGGATGGAAATCAGACCATTGAAAGAG
Optimizada 1190	AAGGAGGAGAACTTAGTGAATAGTCTTGTACTGCT
Original 1190	AAAGAAGAGAATTTGGTCAACTCCTTGGTCACAGCC

Figura 8. Alinhamento das sequências do gene NS1 original e otimizado.

2.2- Recuperação dos plasmídeos sintetizados

Os plasmídeos sintetizados foram recuperados a partir de papel de filtro de acordo com as instruções do fabricante (Genone): a área onde o DNA estava aplicado foi recortada com uma lâmina de bisturi estéril e colocada em um tubo eppendorf com 100 µL de H₂O destilada. Foi agitado em vórtex e centrifugado por 2 minutos a 5000 rpm. Foi utilizado 2 µL desta amostra para transformar *E. coli* TOP10F competentes para posterior extração de DNA plasmidial.

2.3- Transformação de células competentes *E. coli* TOP10F com os plasmídeos pUC57/NS1

Células *E. coli* TOP10F competentes foram obtidas através de tratamento com choque térmico (Lewin, 1997). Para a transformação, foi adicionada às células uma solução contendo 2 µL da amostra de DNA e incubadas em gelo por 30 minutos e em seguida, a 42 °C por 30 segundos e após, foram rapidamente colocadas no gelo. Foi adicionado 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 as células foram incubadas a 37 °C por uma hora. Para análise e seleção das colônias transformadas com plasmídeos recombinantes pUC57/NS1 foi realizada a extração de DNA plasmidial com kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme instruções do fabricante, seguida de uma PCR para confirmação da presença do inserto. O gene NS1 foi clivado do vetor de clonagem pUC57/NS1 com as enzimas de restrição *Bgl* II e *BstE* II (Fermentas), e o gene de interesse foi ligado ao vetor de expressão pCAMBIA 3301, como descrito anteriormente. O plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* TOP10F. Após, foi realizada a extração de DNA plasmidial com kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme instruções do fabricante, seguida de reação de digestão para confirmação da presença do inserto. O plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1 foi utilizado para a transformação de células competentes de *A. tumefaciens* LB4404. Após a transformação, foi realizada a extração de DNA plasmidial seguida de dupla

digestão do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1, para a confirmação da presença do inserto, como descrito anteriormente.

2.4- Germinação das sementes e crescimento de *Arabidopsis thaliana*

As sementes de *A. thaliana* foram cedidas pelo Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - Universidade Federal de Viçosa - Brasil. As sementes foram mantidas a 4 °C durante uma semana para quebra de dormência. Após, estas foram transferidas para um tubo de 1,5 mL autoclavado, adicionado 500 µL de álcool 70% e em câmara de fluxo foram agitadas por pipetagem durante 30 segundos. O álcool a 70% foi descartado cuidadosamente e as sementes lavadas com H₂O MilliQ autoclavada. Após, foi adicionada 500 µL de solução (hipoclorito de sódio: H₂O MilliQ autoclavada, 2:3 v:v) e agitada em vórtex durante 8 minutos. Em câmara de fluxo, a solução foi descartada e as sementes foram lavadas cinco vezes com H₂O MilliQ com auxílio de uma pipeta. A água foi descartada cuidadosamente e as sementes transferidas com auxílio de uma pipeta para vasos contendo substrato autoclavado (Figura 9A). Posteriormente ao aparecimento das primeiras folhas, cada plântula foi individualizada em pequenos vasos (Figura 9B). Os vasos permaneceram em uma câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas, a temperatura em torno de 25 °C por aproximadamente 60 dias.

2.5- Transformação genética de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens*

As plantas *A. thaliana* utilizadas para a transformação genética foram crescidas até o estágio de crescimento de flores. Células de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pCAMBIA 3301/NS1 foram inoculadas em meio YEB líquido, com canamicina (100 mg/L) e estreptomicina (50 mg/L) e incubadas a 28 °C por 48 h. Após o crescimento das bactérias (absorbância 1,0 em 600nm), estas foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C a 8000 rpm, e ressuspendidas em 250 mL de sacarose 5% (p/v), com Silwett L-77 0,05% (p/v). Esta solução foi utilizada para transformar as plantas pelo método de “mergulho” de escapes florais, vertendo-se o vaso com as plantas por dois a três segundos na solução de sacarose com *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 9C). As plantas submetidas a este processo foram colocadas dentro de um isopor e

mantidas sob uma cobertura de plástico por 24 horas para manter a alta umidade (modificado de Clough e Bent, 1998). Para taxas mais elevadas de transformação, as plantas foram mergulhadas três vezes em intervalos de sete dias. As plantas recém-transformadas foram mantidas em câmara de crescimento a 22 °C, expostas a luz branca, até a produção de sementes. Posteriormente, copos coletores de sementes foram colocados em cada planta (Figura 9D) e esperou-se até que as plantas ficassem totalmente secas liberando as sementes que foram armazenadas a 4 °C (Figura 9E).

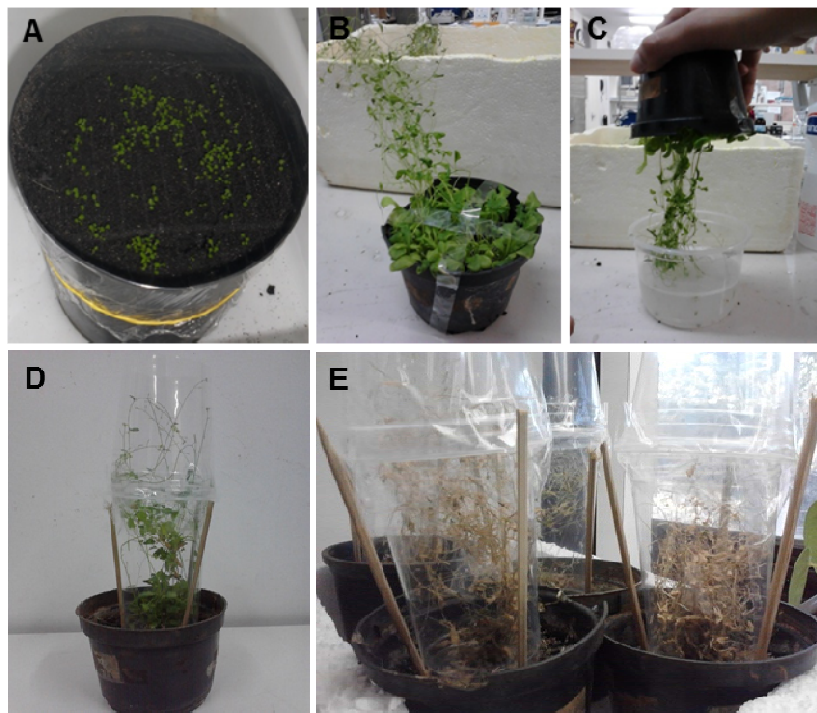


Figura 9. Transformação de *Arabidopsis thaliana* com vetor recombinante pCAMBIA3301/NS1. (A) *Arabidopsis thaliana* cultivadas em câmara de crescimento após 2 semanas da germinação com temperatura e fotoperíodo controlados. (B) Plantas individualizadas com 8 semanas de crescimento preparadas para o processo de transformação. (C) Processo de transformação das plantas. (D) Plantas 45 dias após a transformação. (E) Plantas 60 dias após a transformação.

RESULTADOS

1- EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DENGUE-2 EM *Nicotina tabacum* “Havana”

1.1- Obtenção de *Escherichia coli* DH5 α recombinantes contendo o plasmídeo pGEM-T/NS1

Para obtermos a amplificação do gene NS1 (Figura 10A), o RNA total extraído das células C6/36 infectadas com vírus dengue-2 foi submetido a transcrição reversa seguida de PCR. Após a realização de ligação do gene NS1 ao vetor pGEM-T, células competentes *E. coli* DH5 α foram transformadas (Figura 10B). Posteriormente, o plasmídeo pGEM-T/NS1 foi submetido a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Bst*E II e o fragmento do gene NS1 foi liberado (Figura 10C).

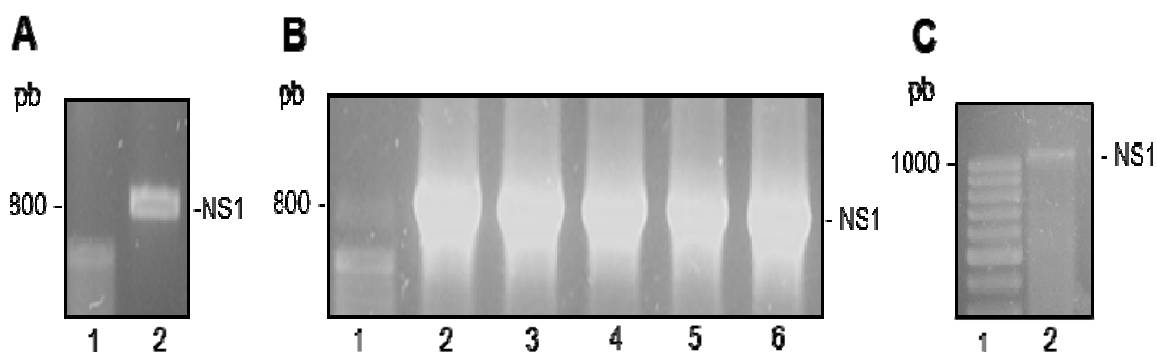


Figura 10. Obtenção do vetor de clonagem pGEM-T/NS1. (A) Amplificação do gene NS1/DENV2. 1- Marcador de DNA 50 bp 2- Fragmento de aproximadamente 1000 pares de bases correspondente ao gene NS1. (B) Amplificação do gene NS1/DENV2 a partir da extração plasmidial de 5 clones recombinantes de *E. coli* transformadas com pGEM-T/NS1. 1- Marcador de DNA 50 pb; 2 a 6- Fragmento de aproximadamente 1000 pares de bases correspondente ao gene NS1. (C) Dupla digestão do plasmídeo pGEM-T/NS1. 1- Marcador de DNA 100 pb. 2- Fragmento de aproximadamente 1000 pares de bases correspondente ao gene NS1.

1.2- *Escherichia coli* DH5 α e *A. tumefaciens* LB4404 recombinantes contendo o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1

Após a clivagem do gene NS1 do vetor pGEM-T/NS1, este fragmento foi inserido no vetor pCAMBIA 3301. Para isso, foi realizada a extração do DNA plasmidial de *Escherichia coli* DH5 α transformadas com o vetor de expressão pCAMBIA 3301. Na Figura 11A são visualizadas as bandas referentes às formas encontradas do plasmídeo pCAMBIA 3301: fechado, linear e superenovelado. Após extração, o plasmídeo pCAMBIA 3301 foi submetido a dupla digestão que gerou uma banda de aproximadamente 9800 pb correspondente ao vetor linearizado (Figura 11B). O gene NS1 foi ligado ao vetor pCAMBIA 3301 e *E. coli* DH5 α foram transformadas (Figura 11C). Após a realização da extração do DNA plasmidial e a confirmação da presença do inserto por PCR, foi realizada a transformação de *A. tumefaciens* com este vetor recombinante (Figura 11D).

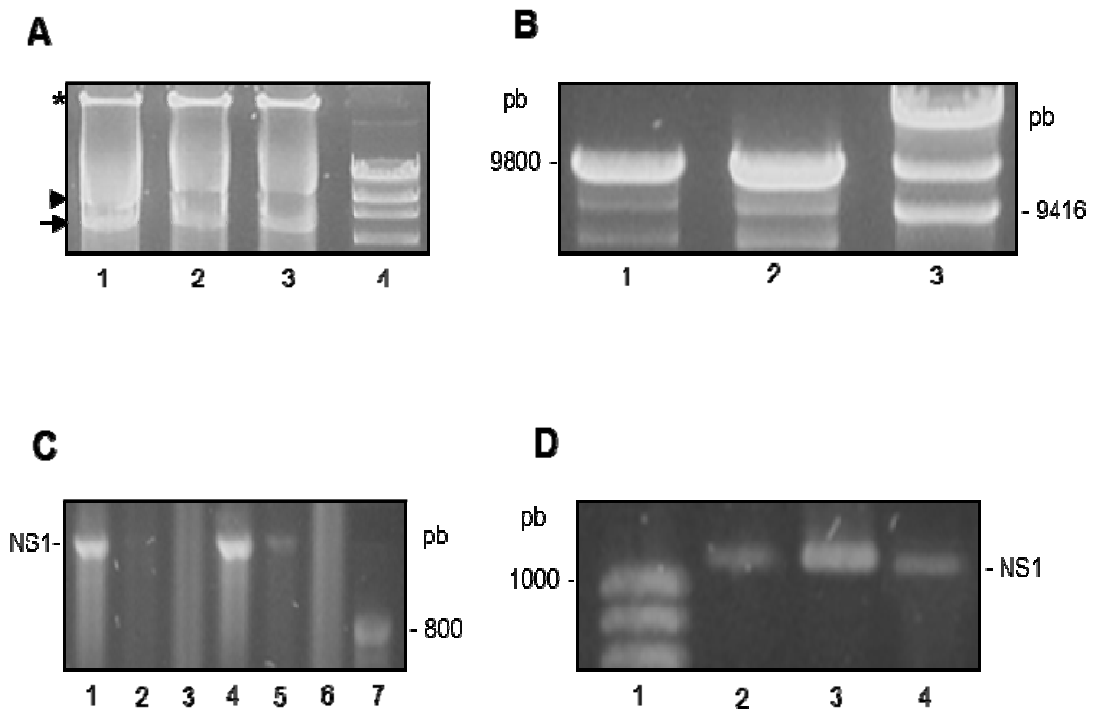


Figura 11. Obtenção do vetor de expressão pCAMBIA 3301/NS1. (A) Extração de pCAMBIA 3301 de *E. coli*. 1 a 3- Plasmídeos pCAMBIA 3301 extraídos de 4 estoques diferentes resultantes da transformação de células competentes *E. coli* DH5 α . * - plasmídeo fechado, ▶ - plasmídeo linear, → - plasmídeo superenovelado. 4- Marcador de DNA λ *Hind* III. (B) Dupla digestão do plasmídeo pCAMBIA 3301. 1 e 2- Plasmídeos pCAMBIA 3301 digeridos com *Bgl* II e *Bst* EII; 3- Marcador de DNA λ *Hind* III. (C) Amplificação do gene NS1/DENV2. 1 a 6- DNA amplificado de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1; 7- Marcador de DNA 50 pb. (D) DNA amplificado de *A. tumefaciens* transformadas com o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1. 1- Marcador de DNA 100 pb; 2 a 4- Fragmento de aproximadamente 1000 pares de bases correspondente ao gene NS1.

1.3- Expressão da proteína NS1 do vírus dengue-2 em plantas *N. tabacum*

Após a realização do processo de transformação das plantas, o DNA genômico de *N. tabacum* foi extraído de fragmentos foliares de plantas submetidas ao processo de transformação e de plantas não transformadas para avaliar a presença do gene NS1. A figura 12A apresenta o produto da amplificação do gene NS1 apenas nos transformantes, o que confirma a integração do gene de interesse ao genoma vegetal. Para detectar a transcrição do gene NS1, o RNA total de folhas de *N. tabacum* foi extraído. Houve a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb correspondente ao gene NS1/DENV2 no material vegetal transformado (Figura 12B). Posteriormente, foi realizada a extração de proteínas dos fragmentos foliares das plantas transformadas e não transformadas para a realização de Dot Blot (Figura 12C) e para a análise do perfil proteico dos extratos por SDS-PAGE (Fig. 12D), a caracterização da amostra transformada foi realizada por imunoblotting com soro de pacientes previamente confirmados para dengue (Fig. 12E). Pode-se observar uma banda de aproximadamente 45 kDa diferencialmente expressa nas plantas transformadas em relação ao controle não transformado, esta banda foi revelada no imunoblotting, confirmando assim a expressão da proteína NS1.

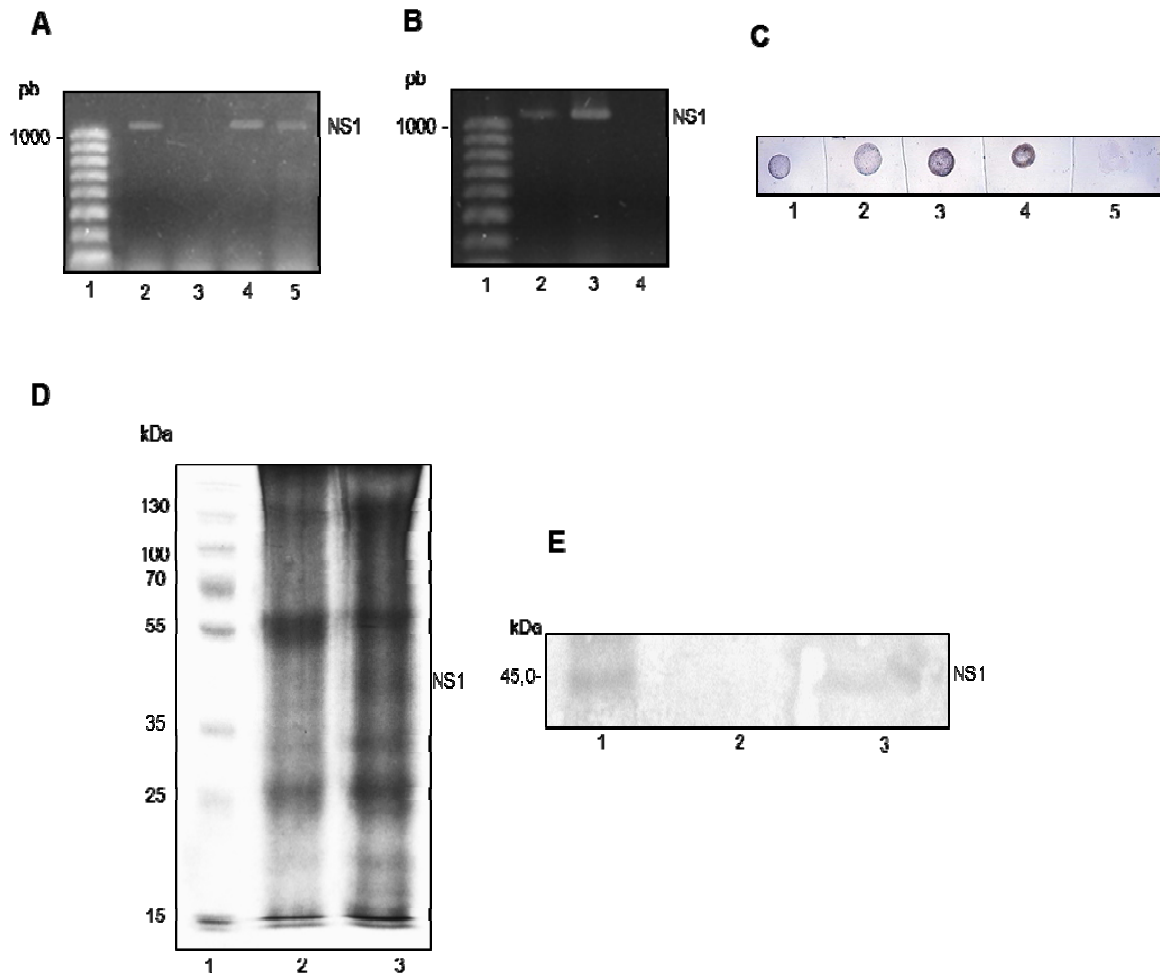


Figura 12. Expressão da proteína NS1 do vírus dengue-2. (A) Amplificação do gene NS1. 1- Marcador de DNA 100 pb; 2- Controle positivo da PCR; 3- Controle negativo-planta não transformada; 4 e 5- Amostras de plantas transformadas. (B) RT-PCR para transcritos do gene NS1. 1- Marcador de DNA 100 pb; 2 e 3- Amostras equivalentes a *N. tabacum* transformada; 4- Controle negativo-planta não transformada. (C) Detecção da proteína NS1 por dot blot. 1 a 4- Amostras equivalentes a *N. tabacum* transformada apresentando a expressão da proteína NS1; 5- Controle negativo-planta não transformada. (D) Perfil eletroforético dos extratos, em gel de poliacrilamida 12%. 1- Marcador de peso molecular; 2- Controle negativo-planta não transformada; 3- Amostra equivalente a *N. tabacum* transformada. (E) Imunoblotting. 1- Marcador de peso molecular; 2- Controle negativo-planta não transformada; 3- Amostra equivalente a *N. tabacum* transformada.

1.4- Padronização de soros

Para padronizar a concentração de soros utilizada nas análises foi realizado ELISA indireto. A partir dos resultados encontrados pode-se observar que a melhor diluição a ser utilizada de soro na análise com anti-IgM humano é de 1:100 (Figura 13B), não apresentando diferença significativa na análise com anticorpos anti-IgG em nenhuma das diluições de soros (Figura 13A).

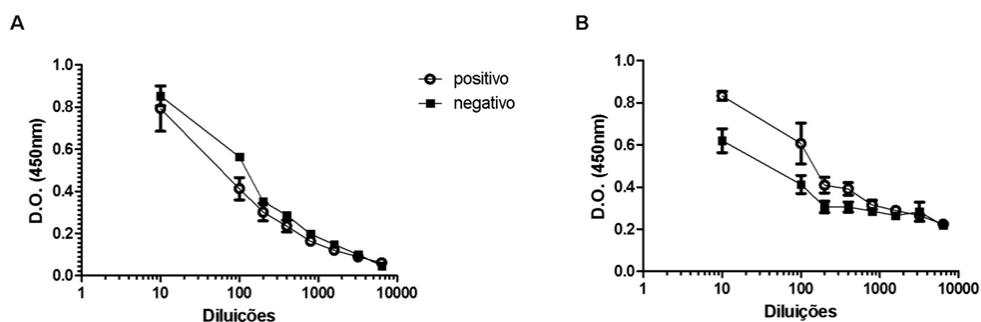


Figura 13. Padronização da concentração de anticorpos por ELISA indireto. (A) Diferentes diluições de soro com anti-IgG. (B) Diferentes diluições de soro com anti-IgM. Negativo: soro de doadores saudáveis como anticorpo primário. Positivo: soro de paciente previamente confirmado para dengue como anticorpo primário.

1.5- Caracterização e purificação da proteína NS1 recombinante

Para avaliar a utilização da proteína NS1 como um potencial candidato para métodos diagnósticos, realizou-se ELISA indireto com amostras de plantas transformadas com anti-IgM humano na concentração 1:100. Após a extração de proteínas, as amostras foram passadas em coluna Dessalting no HPLC, para retirada de ureia (foi utilizado 1 µg de proteína total por poço). Como anticorpo primário foi utilizado soro de pacientes previamente confirmados para dengue ou amostras de soro de doadores saudáveis (Figura 14A). Não houve diferença significativa entre as amostras testadas. Devido à hipótese de que constituintes da planta poderiam estar

interferindo nos resultados do ELISA, decidiu-se incubar as amostras com soro de camundongo não imunizado antes da realização do ELISA na tentativa de adsorver estes constituintes (Figura 14B). Os resultados não apresentaram diferença significativa entre as amostras testadas.

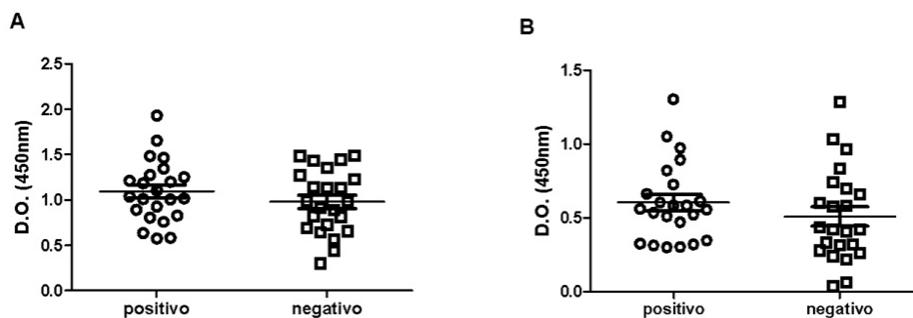


Figura 14. Caracterização da proteína NS1/DENV2 por ELISA indireto. (A) Amostra de extrato total de planta transformada. (B) Amostra de extrato de planta transformada após adsorção com soro de camundongo não imunizado. Negativo: soro de doadores saudáveis como anticorpo primário (n=23); Positivo: soro de pacientes previamente confirmados para dengue como anticorpo primário (n= 23).

Na tentativa de purificar a proteína NS1 recombinante, foi realizada uma cromatografia por troca iônica com concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl), a partir de 0% de NaCl no tampão de eluição até 100% do mesmo (1: 10%; 2: 10%; 3: 25%; 4: 50%; 5: 100%), e posteriormente foi realizado SDS-PAGE a 12% com as frações obtidas. Observou-se uma banda de aproximadamente 43 kDa na canaleta correspondente a eluição com 25% do tampão, o que comprova a presença da proteína NS1 nas amostras testadas (Figura 15A e B). No ELISA realizado com esta fração de amostra não houve diferença significativa entre as amostras testadas com soro de doador saudável ou soro previamente confirmado para dengue (Figura 16).

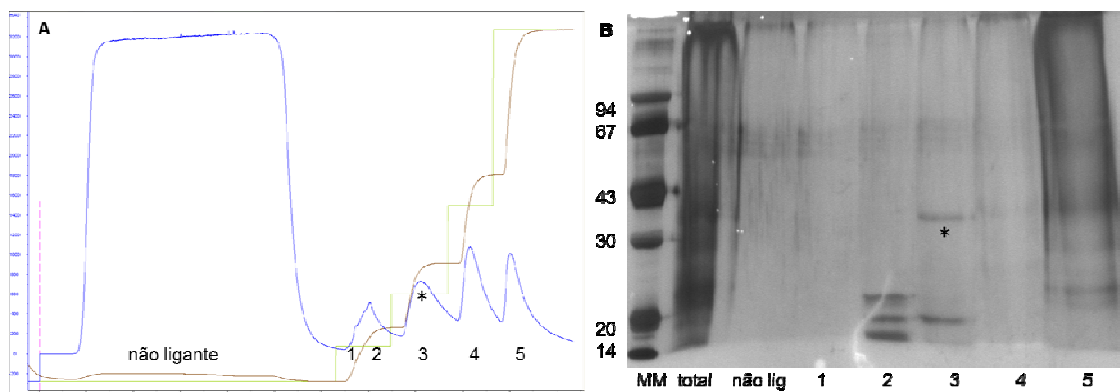


Figura 15. Purificação da proteína recombinante por cromatografia. (A) Cromatograma da purificação de NS1 recombinante em concentrações crescentes de NaCl (1: 10%; 2: 10%; 3: 25%; 4: 50%; 5: 100% do tampão de eluição). (B) SDS-PAGE indicando as frações obtidas a partir da purificação de NS1. *: banda de aproximadamente 43 kDa correspondente a proteína NS1.

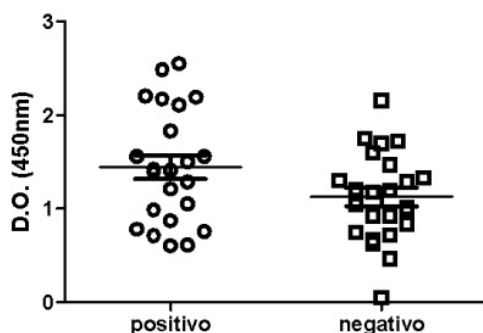
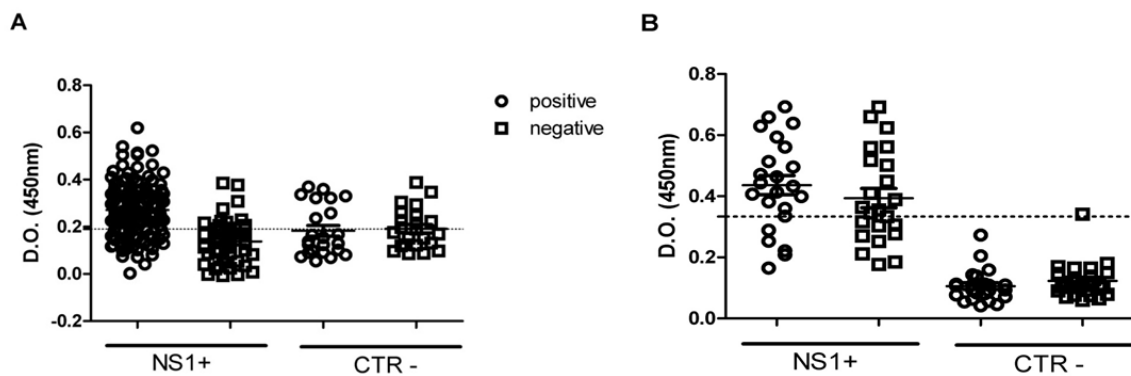


Figura 16. Caracterização da proteína NS1/DENV2 por ELISA indireto após cromatografia. Fração de amostra de planta transformada após cromatografia por troca iônica com 25% do tampão de eluição. Negativo: soro de doadores saudáveis como anticorpo primário (n=20); Positivo: soro de paciente previamente confirmado para dengue como anticorpo primário (n=20).

Devido à hipótese de que ao eluir nossas amostras em coluna Dessalting no HPLC para a retirada de ureia, a concentração de proteínas totais poderiam estar diminuídas nas amostras, foi realizado imunoensaio com amostras de plantas

transformadas e não transformadas sem esta etapa (foi utilizado 10 µg de proteína total por poço). Para realização deste ELISA, as placas foram incubadas a 37 °C após a etapa de incubação com soro de pacientes.

Como anticorpo primário foi utilizado soro de pacientes previamente confirmados para dengue e soro de doadores saudáveis, totalizando 181 amostras de soro (140 amostras de soros previamente confirmados para dengue e 41 amostras de doadores saudáveis). Para IgM anti-dengue obteve-se 71.74% especificidade e 73.24% de sensibilidade (Figura 17A) e para IgG anti-dengue foi observado 73.91% de especificidade e 43.48% de sensibilidade (Figura 17B).

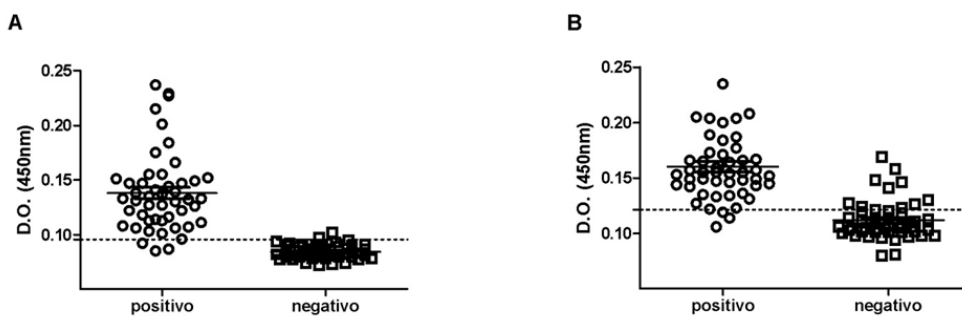


	Especificidade %	Sensibilidade %
Anti-IgM	71,74	73,24
Anti-IgG	73,91	43,48

Figura 17. Elisa indireto utilizando a proteína NS1 recombinante. (A) ELISA indireto utilizando anticorpos anti-IgM humano. (B) ELISA indireto utilizando anticorpos anti-IgG humano. NS1+: amostra de planta transformada. CTR-: amostra de planta não transformada.

Na tentativa de aumentarmos a especificidade e sensibilidade do teste para IgM anti-dengue que apresentou melhor resultado no primeiro ensaio, foi realizado um segundo ensaio, do tipo sanduíche, neste as placas foram previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-NS1 e anti-D4 (produzido a partir de extrato total de

vírus dengue-4) e posteriormente acrescentou-se os extratos de planta transformada ou não (foi utilizado 10 µg de proteína total por poço). Como anticorpo secundário foi utilizado somente anti-IgM humano. De acordo com os resultados encontrados, a sensibilidade e especificidade dos testes aumentaram significativamente (Figura 18A e B). Com o anti-NS1 obteve-se 93,75% de especificidade e 95,74% de sensibilidade. Para anti-D4 foi observado 93,75 % de sensibilidade e 78,72% de especificidade.



	Especificidade %	Sensibilidade %
Anti-NS1	93,75%	95,74%
Anti-D4	78,72%	93,75%

Figura 18. Elisa tipo sanduíche utilizando a proteína NS1 recombinante. (A) ELISA sanduíche utilizando anticorpos anti-NS1 e extrato de planta transformada. (B) ELISA sanduíche utilizando anticorpos anti-D4 e extrato de planta transformada.

2- CONSTRUÇÃO DE UM VETOR OTIMIZADO CONTENDO O GENE DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 DO VÍRUS DENGUE-2 PARA A EXPRESSÃO EM *Arabidopsis thaliana*

2.1- Obtenção de *Escherichia coli* TOP10F recombinantes contendo o plasmídeo pUC57/NS1

O gene da proteína NS1 otimizado com as sequências específicas para a expressão em plantas foi sintetizado no plasmídeo pUC57. O vetor pUC57/NS1 foi utilizado para a transformação de *E. coli* TOP10F competentes e posteriormente foi realizado a extração de DNA plasmidial. Um fragmento de aproximadamente 1000 pb foi amplificado por PCR (Figura 19A). O plasmídeo pUC57/NS1 foi submetido a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Bst*E II e o fragmento do gene NS1 foi liberado (Figura 19B).

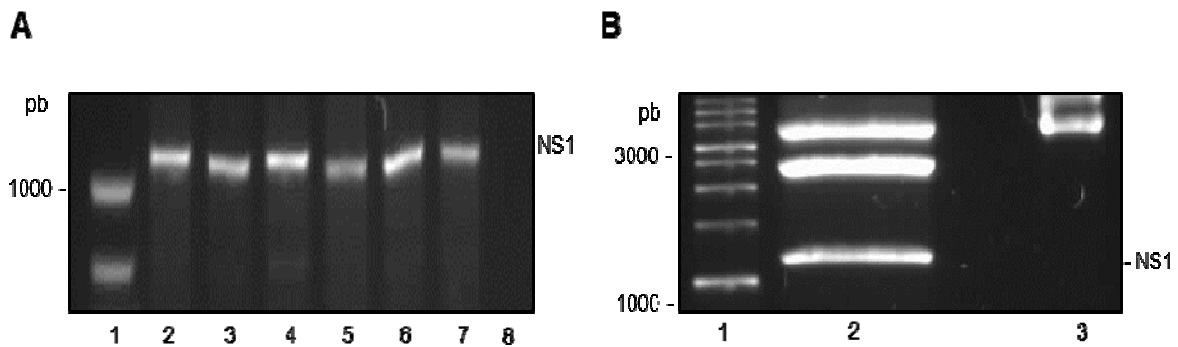


Figura 19. Obtenção do vetor de clonagem pUC57/NS1. (A) Amplificação do gene NS1/DENV2 sintetizado. 1- Marcador de DNA 100 pb; 2 a 7- Amplificação do gene NS1/DENV2 a partir da extração plasmidial de clones recombinantes de *E. coli* transformadas; 8- Controle negativo. (B) Digestão do plasmídeo pUC57/NS1. 1- Marcador de peso molecular; 2- Dupla digestão do plasmídeo pUC57/NS1 de colônias de *E. coli* TOP 10F transformadas; 3- Plasmídeo pUC57/NS1 não-digerido.

2.2- Obtenção de *E. coli* TOP10F e *A. tumefaciens* recombinantes contendo o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1

Foi realizada a extração do DNA plasmidial de *E. coli* TOP10F transformadas com o vetor de expressão pCAMBIA 3301. Na Figura 20A são visualizadas as bandas referentes às formas encontradas do plasmídeo pCAMBIA 3301: fechado, linear e superenovelado. Após a extração, o plasmídeo pCAMBIA 3301 foi submetido a dupla digestão com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Bst* EII que gerou um fragmento de aproximadamente 9800 pb correspondente ao vetor linearizado (Figura 20B). Após a ligação do inserto ao plasmídeo pCAMBIA3301, foi realizada a transformação de *E. coli* TOP10F (Figura 21A). As colônias transformadas foram crescidas em meio seletivo para a realização da extração do DNA plasmidial e posterior transformação de *A. tumefaciens* LB4404. A Figura 21B mostra três clones diferentes de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com o gene NS1.

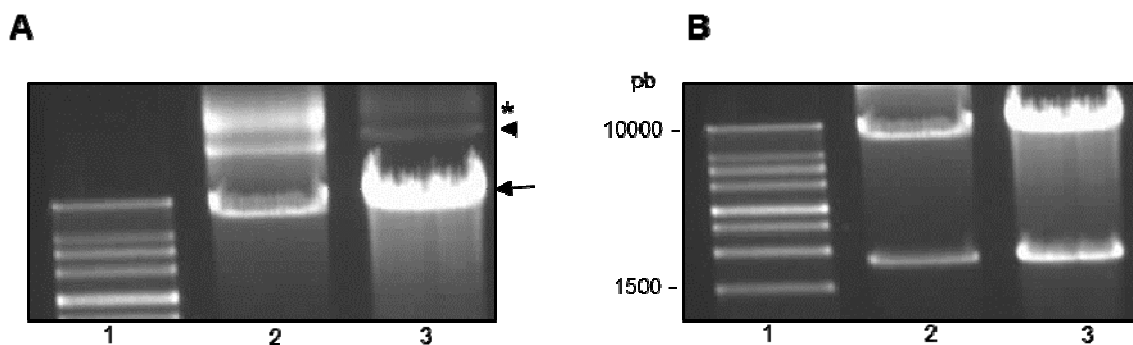


Figura 20. Obtenção do vetor de expressão pCAMBIA3301/NS1. (A) Extração de DNA plasmidial de *E. coli* transformadas com pCAMBIA 3301. 1- Marcador de DNA λ Hind III. 2 e 3- Plasmídeos pCAMBIA 3301 extraídos de 2 estoques diferentes resultantes da transformação de células competentes *E. coli* TOP10F. * - fechado, ▶ - linear, - → superenovelado. (B) Digestão do plasmídeo pCAMBIA 3301. 1- Marcador de peso molecular; 2 e 3- Dupla digestão do plasmídeo pCAMBIA 3301 extraídos de dois estoques diferentes resultantes da transformação de células competentes *E. coli* TOP 10F.

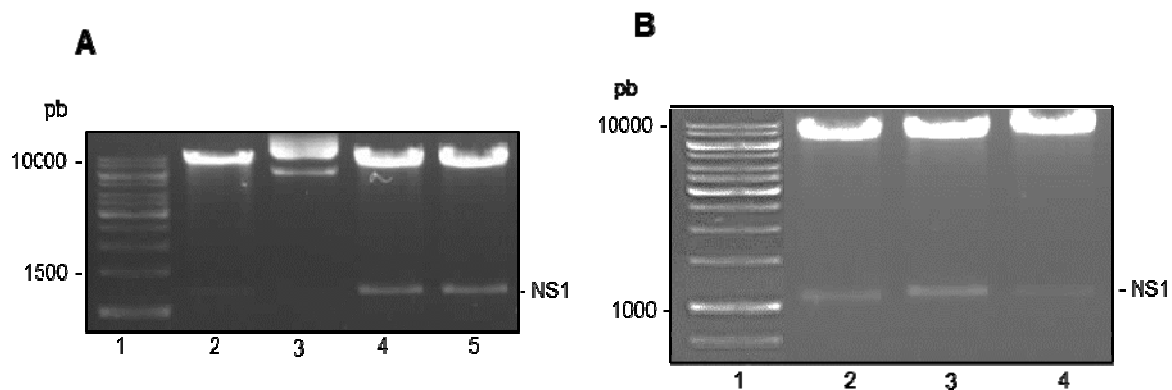


Figura 21. Transformação de *A. tumefaciens* com o vetor de expressão pCAMBIA 3301/NS1. (A) Digestão do plasmídeo pCAMBIA3301/NS1 de *E. coli* transformadas; 1- Marcador de peso molecular; 2 a 5- Fragmento de aproximadamente 1300 pb resultante da dupla digestão do plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1 extraídos de diferentes clones de *E. coli* TOP10F transformadas. (B) Transformação de *A. tumefaciens* com o vetor pCAMBIA 3301/NS1. 1- Marcador de peso molecular; 2 a 4- Banda de aproximadamente 1300 pb resultante da dupla digestão do plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1 extraídos de diferentes clones de *A. tumefaciens* transformadas.

DISCUSSÃO

Um diagnóstico rápido de qualquer doença infecciosa pode conduzir ao início de intervenção terapêutica de todos os casos suspeitos. Em muitas doenças virais, a eliminação do vírus é maior durante o início da fase sintomática. Tem sido relatado que o antígeno NS1 é encontrado na circulação a partir do primeiro dia após o início dos sintomas até o nono dia (Dipankar *et al.*, 2009), por isso justifica-se a utilização da proteína NS1 como potencial candidato para métodos diagnósticos.

Um empecilho para a realização de testes diagnósticos para dengue reside na dificuldade de produção em grande escala de antígenos a serem usados na captura do anticorpo presente no soro de pacientes infectados. Estudos demonstram que a

proteína recombinante purificada a partir de células procarióticas tem demonstrado ser inadequada para estudos imunológicos, devido à sua conformação e ausência de determinantes antigênicos da proteína nativa (Georgiou e Valax, 1996; Kolaj *et al.*, 2009). Neste trabalho objetivou-se a expressão da proteína NS1 do vírus dengue-2 em *Nicotiana tabacum* “Havana” visando à produção de antígeno para diagnósticos sorológicos e a construção de um sistema de expressão otimizado para plantas. As plantas possuem uma maquinaria de processamento pós-transcricional semelhante à dos mamíferos, por isso são capazes de produzir proteína com determinantes antigênicos semelhantes à proteína nativa (Blais, 2006; Streatfield, 2006). Dentro do lúmen do retículo endoplasmático, monômeros de NS1 sofrem N-glicosilações e rápida dimerização. Posteriormente, no complexo de Golgi, outras modificações nos carboidratos nos dímeros de NS1 são realizadas antes de seu transporte para a superfície celular e posterior liberação a partir das células infectadas, o que justifica a utilização de um organismo eucarioto para a expressão da proteína NS1 (Noisakran *et al.*, 2007).

O vetor recombinante pCAMBIA/NS1 foi utilizado para transformar *A. tumefaciens*, originando bactérias recombinantes que foram utilizadas como sistema de transferência natural de genes para transformação do tabaco. O sistema de transformação via *Agrobacterium* foi utilizado por ser um sistema com baixo custo operacional e simplicidade na realização dos protocolos de transformação e seleção (Brasileiro e Carneiro, 1998).

Plantas cultivadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes foliares no processo de transformação de *N. tabacum* via *A. tumefaciens* contendo o gene codificador da proteína NS1/DENV2. O produto da PCR do DNA vegetal derivado das plantas transformadas gerou, na análise em gel de agarose, um fragmento de aproximadamente 1000 pb. Este resultado indica, por similaridade de tamanho, que a sequência obtida é correspondente ao gene responsável por codificar a proteína NS1/DENV-2.

Posteriormente, foram realizadas as técnicas de SDS-PAGE e imunoblot para comprovar a expressão da proteína NS1. A proteína NS1 é uma glicoproteína de aproximadamente 43 a 48 kDa (Young *et al.*, 2000; Chung, 2007). Nestas análises

foram detectadas uma banda de aproximadamente 45 kDa somente nas plantas transgênicas, juntamente com a análise do imunoblotting com soro de paciente previamente diagnosticado com dengue, comprova que somente as plantas transgênicas expressam esta proteína.

A detecção de anticorpos específicos utilizando ELISA representa um dos mais importantes avanços e se tornou uma ferramenta bastante valiosa no diagnóstico laboratorial de rotina para dengue (Oliveira *et al.*, 2011). Um estudo realizado por Blacksell *et al.*, (2012), comparando 7 kits comerciais para detecção de anticorpos anti-dengue em fase aguda, amostras de 239 pacientes positivos e 98 pacientes negativos para dengue foram testados. As sensibilidades e especificidades dos testes ELISA para a proteína NS1/DENV variaram de 45 a 57% e de 93 a 100% e dos testes ELISA para IgM anti-NS1 variou de 85 a 89%, e 88 ao 100%, respectivamente.

No presente trabalho, realizou-se ELISA com diferentes diluições dos soros de pacientes previamente confirmados para dengue e soro de doadores saudáveis com anticorpos anti-IgM e anti-IgG humano para padronizar a melhor concentração a ser utilizada nas análises imunoenzimáticas posteriores. Diferentes títulos de anticorpos podem alterar o resultado encontrado nas análises por ensaios imunoenzimáticos, resultados em amostras falso-negativas pelo excesso de anticorpos (Nadal e Framil, 2007). A partir dos resultados encontrados pode-se observar que a melhor diluição a ser utilizada de soro na análise com anti-IgM humano é de 1:100, não apresentando diferença significativa na análise com anticorpos anti-IgG em nenhuma das diluições de soros.

No primeiro ELISA indireto realizado, não houve diferença significativa entre as amostras testadas com soro previamente confirmado para dengue e soro de doadores saudáveis. Uma justificativa para o resultado obtido é a ligação inespecífica dos metabólicos secundários das plantas aos anticorpos dos soros de pacientes utilizados como anticorpo primário nestes ensaios. Estes compostos podem ter agido como interferentes nestas análises, o que não ocorreu no imunoblotting, porque devido ao seu baixo peso molecular, estes metabólicos se separaram da proteína NS1 durante a eletroforese, o que auxiliou na detecção desta proteína nesta técnica (Pereira e Cardoso, 2012). Outro fator relevante pode ter sido a conformação das proteínas. No

imunoblot, as amostras são tratadas com um detergente aniônico (dodecil sulfato de sódio) e aquecidas anteriormente. A ebulição e o detergente desnaturam proteína, desenovelando-a completamente, o que resulta na linearização das proteínas das amostras, o que pode ter facilitado a ligação do anticorpo ao seu sítio antigênico, o que não ocorre neste ELISA (Almeida e Kurtenbach, 2002).

Posteriormente, foi realizado o tratamento das amostras com soro de camundongo não imunizado antes da realização do ELISA, na tentativa de remover proteínas das plantas que poderiam estar agindo como interferentes através de ligações com anticorpos inespecíficos deste soro. Os resultados não apresentaram diferença significativa entre as amostras testadas.

Após, foi realizado a purificação da proteína NS1 através de cromatografia por troca iônica. Analisando o SDS-PAGE, foi visualizada uma banda de aproximadamente 43 kDa referente ao pico de eluição com 25% de NaCl, o que pode-se inferir a presença da proteína NS1 nesta fração cromatográfica. No ELISA realizado com esta fração de amostra não houve diferença significativa entre as amostras testadas com soro previamente confirmado para dengue e soro de doadores saudáveis.

Devido à hipótese de que ao eluir as amostras em coluna Dessalting no HPLC para a retirada de ureia, a concentração das proteínas totais poderia estar diminuída nas amostras, foi realizado ELISA indireto com amostras de plantas transformadas e não transformadas sem esta etapa. Para realização deste ELISA, as placas também foram incubadas a temperatura 37 °C após incubação com soro de pacientes. Segundo Almeida e Kurtenbach (2002) até mesmo a exposição a temperaturas moderadas (como 37 °C) pode causar lenta e gradativa mudança de conformação de algumas proteínas.

No ELISA indireto, em 181 amostras de soro testadas, observou-se 71.74% de especificidade e 73.24% de sensibilidade para IgM e 73.91% de especificidade e 43.48% de sensibilidade para IgG.

Posteriormente foi realizado ELISA sanduíche utilizando anticorpos anti-NS1 e anti-D4 adsorvidos a placa e anticorpos anti-IgM humano. Com anticorpo anti-NS1 resultou 95,74% de sensibilidade e 93,75% de especificidade e com anticorpo anti-dengue 4 resultou em 93,75% de especificidade e 78,72% de sensibilidade, justificando a utilização da proteína NS1 como potencial candidato para métodos diagnósticos.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura. Anticorpos IgM são o primeiro isotipo a aparecer durante a infecção primária na dengue, em torno do terceiro ao quinto dia da doença em 50% dos pacientes hospitalizados e em torno do sexto ao décimo dia em 93-99% dos casos. Os maiores picos de IgM ocorrem aproximadamente na segunda semana após o início da febre e diminuiu a níveis indetectáveis durante os próximos dois a três meses. Anticorpos IgG são detectáveis em baixos títulos no final da primeira semana da doença e aumentam lentamente (WHO, 2009). Uma razão IgM/IgG maior que 1,78 é considerada indicativa de infecção primária, enquanto a razão inferior a esse valor seria indicativa de infecção secundária (Guzman e Kouri, 2004). A técnica de captura de IgM por ELISA (em inglês, MAC-ELISA), que é baseada na detecção específica de IgM anti-dengue humano previamente adsorvida à fase sólida, tem apresentado em torno de somente 10% de reações falso-negativas e 1,7% de reações falso-positivas (Nawa *et al.*, 2001; Guzman e Kouri, 2004).

Um problema comum em testes diagnósticos sorológicos é a detecção de anticorpos circulantes de reação cruzada com outros *Flavivirus*. De acordo com Blacksell *et al.*, (2012), através da combinação de resultados de métodos de detecção de antígenos e anticorpos resultados ideais de sensibilidade e especificidade nos testes serológicos são alcançados.

Estudos anteriores relatam que algumas variáveis como as respostas imunológicas individuais dos pacientes, o tipo de sorotipo, infecção primária ou secundária, podem provocar alterações na sensibilidade e especificidade de 65 a 100% (Guzman *et al.*, 2010; Duong *et al.*, 2011).

Paralelamente, na tentativa de padronizar a expressão da proteína NS1, construiu-se um vetor otimizado para expressão em plantas com o intuito de elevar os níveis de expressão da proteína recombinante nas plantas transgênicas e facilitar sua purificação. Foi realizada a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e a confirmação do inserto em algumas colônias. Posteriormente foi realizada a transformação de *Arabidopsis thaliana*. Esta planta foi utilizada por ser possível sua transformação genética de maneira muito eficiente e rápida, inclusive pela aspersão de

suas flores com solução contendo a bactéria recombinante, facilitando a obtenção de proteínas recombinantes (Delatorre e Silva, 2008).

CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos concluir que as plantas *N. tabacum* “Havana” expressam a proteína NS1 recombinante. Com os resultados do ELISA, justifica-se a utilização da proteína NS1 recombinante como potencial candidato para métodos diagnósticos e posteriormente as *Agrobacterium tumefaciens* foram transformadas com o vetor de expressão otimizado para plantas.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para a continuação de estudos para obtenção de um potencial antígeno a ser utilizado em kits de diagnóstico para dengue. Trabalhos posteriores irão confirmar a presença do inserto de interesse em *Arabidopsis thaliana* e verificarão a expressão da proteína NS1 recombinante nas plantas transgênicas.

As contribuições destes resultados poderão ser verificadas indiretamente no controle da dengue e no cuidado aos pacientes, através do desenvolvimento de kits de diagnóstico. Finalmente, a realização de testes nos pacientes suspeitos permitirá a medicação correta para cada caso e viabilizará a correlação entre o histórico do paciente a infecções anteriores com a ocorrência da síndrome do choque e da dengue hemorrágica.

REFERÊNCIAS

- Almeida MS, Kurtenbach, E. (2002) Como Purificar proteínas? *Biotecnologia Ciência e desenvolvimento* 24:30-35.
- Amorim JH (2012) Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine* 30: 837-845.
- Anandarao R, Swaminathan S, Jana AM, Khanna N (2005) A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. *Protein Expression and Purification* 41:136-147.
- Andrade GM, Sartoretto LM, Brasileiro ACM (2003) Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. *Fitopatologia Brasileira* 28:465-476.
- Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM (1986) The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology* 6:347-357.
- Blacksell SD, Jarman RG, Gibbons RV, Tanganuchitcharnchai A, Mammen PM, Nisalak A, Kalayanaroj S, Bailey MS, Premaratna R, Silva JH, Day NPJ, Lalloo DG (2012) Comparison of Seven Commercial Antigen and Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Acute Dengue Infection. *Clinical and Vaccine Immunology* 19:804-810.
- Blais DR, Altosaar I (2006) Human CD14 Expressed in seeds of transgenic tobacco displays similar proteolytic resistance and bioactivity with its mammalian-produced counterpart. *Transgenic Research* 15:151-64.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Brasileiro ACM, Carneiro VTC (1998) Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-Cenargen. 309 p.
- Brown MG, Huang YY, Marshall JS, King CA, Hoskin DW, Anderson, R (2009) Dramatic caspase-dependent apoptosis in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells. *Journal of leukocyte Biology* 85:71-80.
- Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AMB (2007) DNA vaccines against dengue virus 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* 358:413-423.

Chung J (2007) Proteoma diferencial de células Vero infectadas com o vírus da dengue, sorotipo 2. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 45 p.

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16:735-743.

Dan Y, Armstrong CL, Dong J, Feng X, Fry JE, Keithly GE, Martinell BJ, Roberts G.A, Smith LA, Tan LJ, Duncan DR (2009) Lipoic acid-a unique plant transformation enhancer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 45:630-638.

Delatorre CA, Silva A (2008) *Arabidopsis thaliana*: Uma pequena planta um grande papel. *Revista de Ciências Agrárias* 58-67.

De Paula SO, Fonseca BAL (2004) Dengue: a review of the laboratory tests a clinical must know to achieve a correct diagnosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 8:390-398.

Duong V, Ly S, Lorn TP, Tuiskunen A, Ong S, Chroeung N, Lundkvist A, Leparc-Goffart I, Deubel V, Vong S, Buchy P (2011) Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5:1-10.

Dipankar D, Sunundha M, Mavanur R (2009) Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 66:66-72.

Georgiou G, Valax P (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion Biotechnology* 7:190-197.

Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* 18:1151-1155.

Guzman MG, Kouri G (1996) Advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3:621-627.

Guzman MG, Kouri G (2004) Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases* 8:69-80.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegriño JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW (2010) Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology* 8:7-16.

Halstead SB (2007) Dengue. *The Lancet* 370:1644-1652.

Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76-78.

- Honda ER, Zanchib F, Riose K, Lira E, Vieira D, Silva LHP, De Paula SO (2012) Design and heterologous expression of dengue virus envelope protein (E) peptides and their use for serological diagnosis. *Journal of Virological Methods* 186:55-61.
- Kado CI (2000) The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. *Current Opinion in Microbiology* 3:643-648.
- Koizumi N (1996). Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 37:862-865.
- Kolaj O, Spada S, Robin S, Wall JG (2009) Use of folding modulators to improve heterologous protein roduction in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 27:8-9.
- Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chen YK, *et al.* (2007) Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen capture-ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *Journal Virology Methods* 140:75-79.
- Labra M *et al.* (2004) Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. *Theoretical and Applied Genetics* 7:1512-1518.
- Lee J, Lee H, Kim J, Lee S, Kim DH, Kim S, Hwang I (2011) Both the hydrophobicity and a positively charged region flanking the C-terminal region of the transmembrane domain of signal-anchored proteins play critical roles in determining their targeting specificity to the endoplasmic reticulum or endosymbiotic organelles in *Arabidopsis cells*. *The Plant Cell* 23:1588-1607.
- Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC (2001) Immunopathogenesis of Dengue virus infection. *Journal of Biomedical Science* 8:377–388.
- Lemmer K, Mantke OD, Bae H, Groen J, Drosten C, *et al.* (2004) External quality control assessment in PCR diagnostics of dengue virus infections. *Journal of Clinical Virology* 30: 291-296.
- Lemes EMB, Miagostovicsh MP, Alves AMB, Costa SM, Fillipis AMB, *et al.* (2005) Circulating human antibodies against dengue NS1 protein: potential of recombinant D2V-NS1 proteins in diagnostic tests. *Journal of Clinical Virology* 32:305-312.
- Lewin B (1997) *Genes VI*. New York, Oxford University Press and cell Press Meinke DW *et al.* (1998) *Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis*. *Science* 282:662-682.
- Mendonça RZ, Oliveira MI, Faz-de-Lima LRA, Mendonça RMZ, Andrade GP, Pereira CA, Hoshino-Shimizu S (2004) Effect of cell culture system on the production of human viral antigens. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 4:147-51.

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Munro S, Pelham HRB (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907.
- Nadal SR, Framil VMS (2007) Interpretação das Reações Sorológicas para Diagnóstico e Seguimento Pós-Terapêutico da Sífilis. *Revista Brasileira de Coloproctologia* 27:479-482.
- Nawa M, Takasaki T, Yamada KI, Akatsuka T, Kurane I (2001) Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *Journal of Virological Methods* 92:65-70.
- Napier MR, Fowke LC, Hawes C, Lewis M, Pelham HR (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 102:261-271.
- Noisakran S, Dechtawewt T, Rinkaewkan P, Puttikhunt C, Kanjanahaluethai A et al. (2007) Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. *Journal of Virological Methods* 142:67-80.
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 105:361-3.
- Oishi K, Saito M, Mapua CA, Natividad FF (2007) Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *Journal of Infection and Chemotherapy* 13:125-133.
- Oliveira AS, Dutra NR *et al.* (2011) Diagnóstico laboratorial para dengue: situação atual e perspectivas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 43:125-130.
- Pereira RJ, Cardoso MG (2012) Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *J. Biotec. Biodivers* 3:146-152.
- Pugachev KV, Guirakko F, Trent DW, Monath TP (2003) Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *International Journal for Parasitology* 33:567-582.
- Saejung W, Fujiyama K, Takasaki T, Ito M, Hori K, Malasit P, Watanabe Y, Kurane I, Seki T (2007) Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. *Vaccine* 25:6646-6654.
- Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, Peter JM, Elzen VD, Hoekema A (1990). Production of Correctly Processed Human Serum Albumin in Transgenic Plants *Nature Biotechnology* 8:217-221.

- Schlesinger JJ, Foltzer JM, Chapman S (1993) The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. *Virology* 192: 132-141.
- Streatfield SJ (2006) Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods* 38:150-157.
- Tan GK, Alonso S (2009) Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. *Current Opinion Infectious Diseases* 22:302-308.
- Tapia-Conyer R, Mendez-Galvan JF, Rincon H (2009) The growing burden of dengue in Latin America. *Journal of Clinical Virology* 46:53-56.
- Vasudevan A, Selvaraj N, Ganapath A, Choi CW (2007) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3:24-32.
- Veena JH, Doerge RW, Gelvin SB (2003) Transfer of T-DNA and *Vir* proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation e suppresses host defense gene expression. *Plant Journal* 35: 219-236.
- Vordam V, Kuno G (1997) Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In D.J. Guber and G. Kuno (ed) *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, London, United Kingdom, pp 313-334.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1995) *DNA fingerprinting in plants and fungi*. Taylor e Francis, E.U.A.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR (2007) Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature* 5:518-528.
- World Health Organization (2009) *In Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva, Switzerland, pp 3-55.
- Wu CY, Suen SY, Chen SC, Tzeng JH (2003) Analysis of Protein Adsorption on Regenerated Cellulose-based Immobilized Copper Ion Affinity Membranes. *Journal of Chromatography* 996:53-70.
- Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W (2000) An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal Clinical Microbiology* 38:1053-1057.