

MARILANE DE OLIVEIRA FANI AMARO

**CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NÃO
ESTRUTURAL (NS1) DO VÍRUS DENGUE-2 EM *Nicotiana tabacum*
“Havana” E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO TRANSGENE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

MARILANE DE OLIVEIRA FANI AMARO

**CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NÃO
ESTRUTURAL (NS1) DO VÍRUS DENGUE-2 EM *Nicotiana tabacum*
“Havana” E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO TRANSGENE**

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

APROVADA: 15 de dezembro de 2009.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Coorientador)

Prof. Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof^a. Juliana Lopes Rangel Fietto

Prof. Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

“Quão melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro, e quão melhor é adquirir a prudência do que a prata!”

(Provérbios 16: 16)

Aos meus amados pais e irmã
Ao meu sempre companheiro, amigo e esposo Camilo
Aos meus amigos, sogro e sogra, Hilda e Eli
Aos meus tesouros preciosos Caroline e Carine

Dedico

Aos meus orientadores e amigos Sérgio Oliveira de Paula, Leandro Licursi de
Oliveira e Wagner Campos Otoni.

AGRADECIMENTOS

A Deus, responsável por todas as bênçãos e conquistas em minha vida, inclusive esta.

Aos meus pais Antônio e Véra, responsáveis pela minha existência, pessoas maravilhosas que sempre acreditaram em mim e me apoiaram. Vocês são exemplos de vida para mim! Obrigada por todos os ensinamentos!

A minha irmã Meire, pelo apoio e amizade!

Ao meu esposo Camilo, pelo constante apoio, amizade e amor dedicado durante todos estes anos. Não conseguiria mais esta vitória sem a sua ajuda e compreensão. Te amo!

Às minhas sobrinhas Caroline e Carine, que me proporcionaram o prazer de ser tia, e que souberam entender meus momentos de ausência por acreditarem que cada meta que temos na vida é para o bem de toda a família.

Ao meu sogro Eli e a minha sogra Hilda, por me apoiar e incentivar nesta jornada. Muito obrigada!

Aos meus cunhados Rodrigo, Monique, Eliana, Marcelo, e Ricardo por proporcionar momentos de alegria e felicidade em família durante os encontros em Itaperuna, Viçosa, Ubá e Muriaé.

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

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela seriedade dos seus trabalhos e por ter sido acessível a todas as solicitações no decorrer do curso.

Ao meu orientador e amigo Sérgio Oliveira de Paula, por sempre acreditar em mim e fazer de mim uma profissional mais capacitada e crítica.

Aos professores e coorientadores Leandro Licursi de Oliveira e Wagner Campos Otoni pela amizade e contribuições ao longo deste trabalho.

Aos professores da banca Luciano Gomes Fietto e Juliana Lopes Rangel Fietto, por todas as considerações que certamente contribuirão para a melhoria deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

Aos meus amigos do laboratório de Immunovirologia Molecular e Glicoimunologia; aos técnicos de laboratório João, Jorge e José Maria pelo apoio incondicional durante o curso e principalmente durante o experimento.

Aos amigos do laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e a Ana Paula Peconick pelo auxílio durante o experimento.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- OBJETIVOS.....	13
2.1- Objetivo geral.....	13
2.2- Objetivos específicos.....	13
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1- Clonagem e expressão: Células, plasmídeos e estoque viral.....	14
3.2- Estoque viral proveniente de cultura celular.....	15
3.3- Obtenção de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	15
3.4- Extração de RNA.....	15
3.5- Síntese do DNA complementar (cDNA).....	16
3.6- Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	16
3.7- Análise por eletroforese e purificação do gene responsável por codificar a proteína não-estrutural NS1.....	17
3.8- Clonagem do gene codificador da proteína NS1 e transformação de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	17
3.9- Análise e seleção das colônias transformadas.....	19
3.10- Extração de plasmídeos pGEM-T/NS1.....	19
3.11- Clivagem do gene responsável por codificar a proteína NS1 com enzimas de restrição.....	19
3.12- Extração de plasmídeos pCAMBIA 3301.....	20
3.13- Clivagem de plasmídeos pCAMBIA 3301.....	21
3.14- Clonagem do gene codificador da proteína NS1 em plasmídeos pCAMBIA 3301 e transformação de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	21
3.15- Análise e seleção das colônias transformadas.....	22
3.16- Transferência de vetores para <i>Agrobacterium</i> : Obtenção de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e transformação com os plasmídeos recombinantes pCAMBIA 3301/NS1.....	23
3.17- Análise e seleção das colônias de <i>Agrobacterim</i> transformadas.....	24
3.18- Cultura de tecidos vegetais: Germinação e crescimento de <i>Nicotiana tabacum</i>	24

3.19- Transformação de explantes de <i>N. tabacum</i> com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LB4404 contendo o gene responsável por codificar a proteína NS1.....	25
3.20- Obtenção dos brotos transgênicos.....	25
3.21- Extração de DNA de plantas pelo método do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio).....	26
3.22- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e análise por eletroforese do DNA obtido das plantas cultivadas.....	27
3.23- Aclimatização das plantas transgênicas.....	27
3.24- Extração do RNA total dos tecidos vegetais.....	28
3.25- Síntese do DNA complementar (cDNA).....	28
3.26- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	29
4- RESULTADOS.....	30
4.1- Extração de RNA, Síntese do cDNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	30
4.2- Clonagem do gene da proteína NS1 em vetor pGEM-T.....	30
4.3- Digestão do plasmídeo pGEM-T/ NS1.....	31
4.4- Extração do plasmídeo pCAMBIA 3301.....	32
4.5- Digestão do plasmídeo pCAMBIA 3301.....	32
4.6- Análise e seleção das colônias transformadas.....	33
4.7- Análise e seleção das colônias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contendo o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1.....	34
4.8- Germinação e Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
4.9- Técnicas para a detecção da transformação de <i>Nicotiana glauca</i> : Extração de DNA vegetal e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	36
4.10- Aclimatação das plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> transgênicas.....	36
4.11- Extração do RNA vegetal, Síntese do cDNA e PCR.....	37
5- DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS.....	38
6- CONCLUSÕES.....	42
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMO

FANI, Marilane de Oliveira, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2009. **Construção de um sistema de expressão da proteína não estrutural (NS1) do vírus dengue-2 em *Nicotiana tabacum* “Havana” e análise da expressão do transgene.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira e Wagner Campos Otoni.

A dengue é a doença mais importante causada por arbovírus no mundo, sendo observado nos últimos vinte anos um aumento significativo na atividade epidêmica, expansão da distribuição geográfica, transmissão contínua de vários sorotipos e emergência da Febre hemorrágica (DHF) em áreas onde a doença não era prevalente. Apesar dos processos metodológicos de diagnóstico da dengue estar na atualidade em profundo desenvolvimento e aperfeiçoamento, um empecilho na 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. Devido a este fator, o objetivo é a obtenção de antígeno em grande quantidade e qualidade utilizando um sistema de expressão heteróloga de proteínas em plantas. Para tanto, foi extraído o RNA total do sobrenadante de cultura de células infectadas e a partir deste foi sintetizado o cDNA. O gene da proteína não estrutural (NS1) do sorotipo *dengue 2* foi obtido através de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), separado por eletroforese e purificado. O gene foi, então, clonado em vetores pGEM-T e pCAMBIA. Bactérias *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas, selecionadas em meio seletivo e estocadas a -80° C. O vetor pCAMBIA foi anteriormente clivado com as mesmas enzimas e o gene da proteína NS1 foi ligado a este por enzima T4 ligase. Nova transformação de *E. coli* DH5 α foi realizada e as colônias foram, então, analisadas quanto a presença do gene que codifica a proteína NS1 através de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). As colônias transformantes recombinantes foram selecionadas e estocadas. Este vetor recombinante, pCAMBIA 3301/NS1, foi utilizado para transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e, posteriormente, de *Nicotiana tabacum* para expressão da proteína não-estrutural NS1. A extração do DNA e do RNA proveniente das plantas do tabaco foi realizada. A integração do gene da proteína NS1 no genoma vegetal e sua transcrição foram confirmadas por PCR. Análises subsequentes serão realizadas para verificar a expressão efetiva da mesma, que será purificada e concentrada.

ABSTRACT

FANI, Marilane de Oliveira, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, December of 2009. **Construction of a expression system of the non structural protein (NS1) of the dengue-2 virus in *Nicotiana tabacum* "Havana" and analysis of the transgene expression.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Leandro Licursi de Oliveira and Wagner Campos Otoni.

The dengue is the most important arbovirus disease in the world, being observed in the last twenty years a significant increase in the epidemic activity, expansion of the geographical distribution, continuous transmission of several serotypes and emergency of the Hemorrhagic Fever (DHF) in areas where the disease was not prevalent. In spite of the methodological processes of the dengue's diagnosis are in deep development and improvement, a difficulty in the accomplishment of diagnostic tests for dengue lives in the difficult production of antigens in great scale to be used in the capture of the present antibody in the infected patients serum. Thus, our aim in this work is to obtain antigen in great amount and quality using a system of heterologous expression of proteins in plants. To achieve that, total RNA of the culture supernatant of infected cells was extracted and the cDNA was made. The gene of the non structural protein (NS1) of the serotype dengue-2 was obtained by Polimerase Chain Reactions (PCR), separate by eletroforesis and purified. The gene was, then, cloned in pGEM-T and pCAMBIA vectors. *Escherichia coli* DH5 α were transformed, selected in selective medium and stored at -80 °C. The vector pCAMBIA was previously cleaved with the same enzymes and the gene of the NS1 protein was binded to it. New transformation of *E. coli* DH5 α was accomplished and the colonies were, then, analyzed for the presence of NS1 gene by PCR. The transformed recombinant colonies were selected and stored. The recombinant vector, pCAMBIA 3301/NS1, was used for transformation in *Agrobacterium tumefaciens* and, later, in *Nicotiana tabacum* for expression of the non-structural protein NS1. DNA and RNA extraction from the tobacco plants was accomplished. The integration of the NS1 protein gene in the plant genome and its transcription were confirmed by PCR. Subsequent analyses will be accomplished to verify its effective expression, and it will be further purified and concentrated.

1- INTRODUÇÃO

Infecções causadas pelo vírus da dengue são umas das 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. Devido a este fator a doença é predominante nestas regiões (OISHI *et al.*, 2007; LEMES *et al.*, 2005). A ocorrência global da dengue tem crescido drasticamente nas últimas décadas. Os fatores responsáveis pelo aumento da dengue como um problema mundial de saúde pública estão associados com as mudanças sociais e demográficas dos últimos 50 anos. Os maiores fatores têm sido o crescimento populacional sem precedentes e a urbanização sem planejamento e descontrolada, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento. No entanto, mudanças epidemiológicas nas Américas foram as mais drásticas. Nas décadas de 50 e 60, epidemias de dengue nas Américas eram raras devido à erradicação do mosquito vetor (Fig. 1). Entretanto, o programa de erradicação do mosquito foi descontinuado no início dos anos 70 e essa espécie voltou a aparecer, chegando a reocupar a partir dos anos 90 a distribuição geográfica que tinha antes da erradicação ter iniciado (DE PAULA e FONSECA, 2004; TAPIA-CONYER *et al.*, 2009).

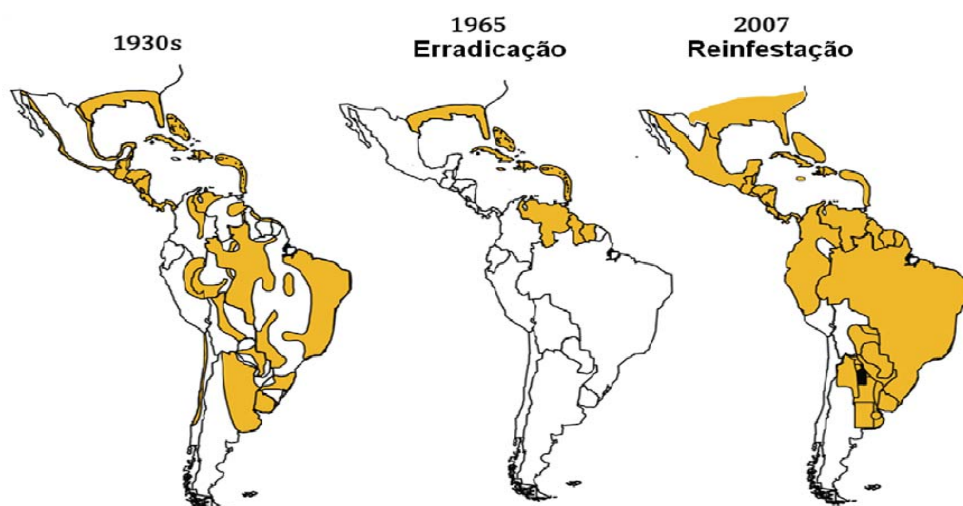


Figura1. Reinfestação com *Aedes aegypti* na América Latina. Em laranja áreas infestadas (TAPIA-CONYER *et al.*, 2009).

Até meados de 1990, o Sudeste Asiático foi a região mais afetada pela dengue (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Desde então, os países da América Central e América do Sul começaram a se destacar e agora têm mais da metade dos casos mundiais relatados desta doença. Só em 1998, o Brasil registrou mais de 700 mil casos. A introdução no país do sorotipo DENV-3 foi confirmada em janeiro de 2001, isolado em um indivíduo que vivia no Rio de Janeiro (Teixeira *et al.*, 2008). Este sorotipo foi responsável pela epidemia no Brasil em 2002, quando aproximadamente 800 mil casos foram relatados. Após este ano, houve queda na taxa de casos notificados, até 2005, quando começaram a crescer novamente. Em 2008, dados preliminares revelaram que mais de 700 mil casos e mais de 45 mil internações por dengue foram registradas pelo Ministério da Saúde (Fig. 2). Um exemplo bastante atual é a epidemia que se refere ao município do Rio de Janeiro, em 2008, que afetou outras cidades do estado, onde houve mais de 240 mil casos de dengue (uma incidência de 1.527/100 mil habitantes), mais de 11 mil internações, 1.364 casos de dengue hemorrágica, 169 mortes confirmadas e mais de 150 outras mortes sob investigação (BARRETO e TEIXEIRA, 2008).

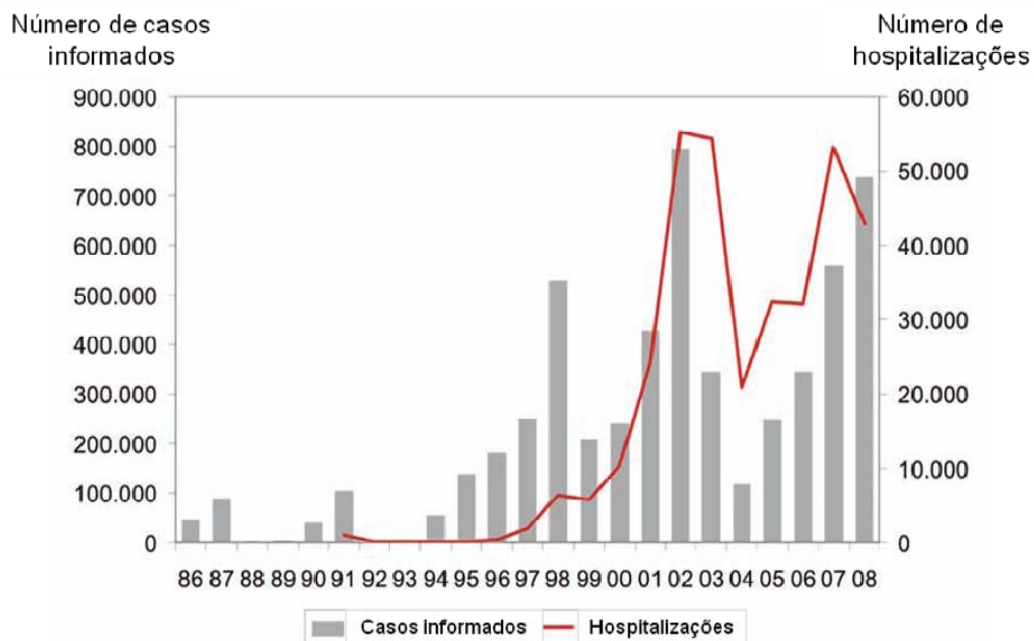


Figura 2. Números dos casos de dengue e hospitalizações no Brasil; 1986-2008 (BARRETO e TEIXEIRA, 2008).

As manifestações clínicas da dengue vão desde infecções assintomáticas a doenças graves caracterizadas por hemorragia e choque, conhecidas como febre hemorrágica da dengue (DHF) e síndrome do choque da dengue (DSS), e que são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade (Oishi *et al.*, 2007; Lemes *et al.*, 2005). 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 idéia 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 (Fig. 3). 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 (Gubler, 1998; Lei *et al.*, 2001; Whitehead *et al.*, 2007).

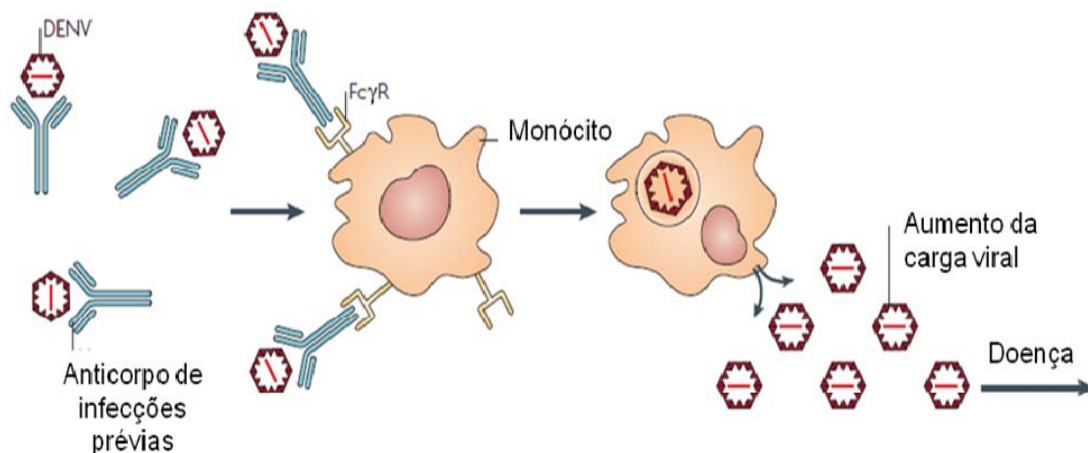


Figura 3. Modelo para fenômeno denominado “aumento da infecção mediado pelo sistema imune” (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

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 (DE PAULA e FONSECA, 2004).

O genoma destes vírus, bem como o de todos os flavivírus, consiste de RNA de 11 kilobases (Kb) de comprimento de polaridade positiva e com peso molecular aproximado de $3,3 \times 10^6$ daltons. A tradução do genoma resulta em uma única poliproteína precursora que é clivada por proteases celular e viral para formar as proteínas virais finais. Estas estão na seguinte ordem, da extremidade 5' para a extremidade 3': C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5. As proteínas C, M e E são componentes estruturais do vírus que protegem o RNA viral (Fig. 4). As proteínas não-estruturais (NS) estão relacionadas à replicação viral, à expressão das proteínas virais e à virulência dos sorotipos (PUGACHEV *et al.*, 2003; WHITEHEAD *et al.*, 2007).

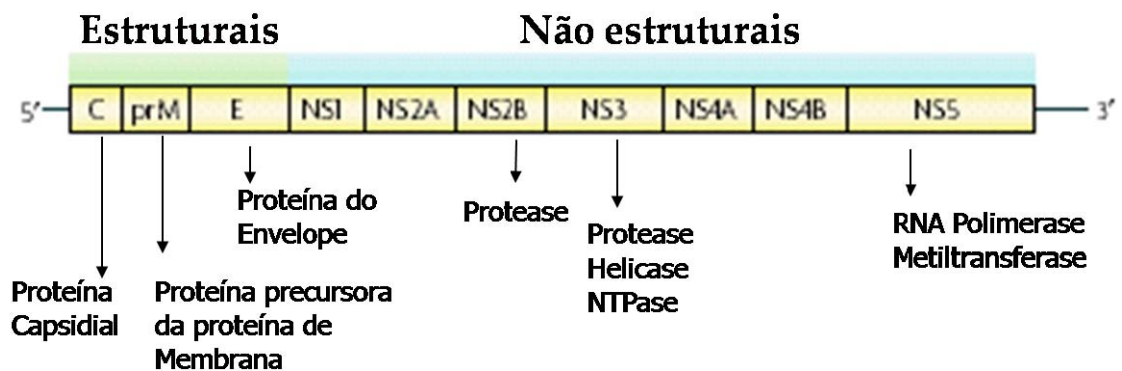


Figura 4. Esquema do genoma do vírus dengue e tradução das proteínas virais (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

A proteína NS1 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. A proteína NS1 pode ser encontrada 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 (RICE, 1996; LEE *et al.*, 1989; NOISAKRAN *et al.*, 2007).

NS1 é sintetizada inicialmente como uma porção da poliproteína com a sequência hidrofóbica da região C-terminal da proteína E, servindo como peptídeo sinal para sua translocação para o lúmen do retículo endoplasmático (RE). Clivagens nas regiões C-terminal e N-terminal ocorrem no RE por proteases celulares, gerando moléculas monoméricas de NS1. Dentro do RE, monômeros de NS1 são modificados por glicosilações e sofrem dimerização rapidamente. Modificações adicionais nos dímeros de NS1 ocorrem no Complexo de Golgi, antes de serem transportadas para a superfície celular ou secretadas pelas células infectadas (NOISAKRAN *et al.*, 2007).

As funções da NS1 nas infecções do vírus dengue não foram claramente elucidadas, no entanto, diversos estudos sugerem sua participação na fase precoce da replicação viral, na montagem, maturação e na virulência (RICE, 1996; PLETNEV *et al.*, 1993; NOISAKRAN *et al.*, 2007).

As infecções com *Flavivirus* induzem anticorpos anti-NS1 fixadores do complemento, contra epítomos tipo-específicos e grupo-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 (RUSSELL *et al.*, 1980; SCHLESINGER *et al.*, 1993). A proteína NS1 não está associada a partículas virais livres, não induzindo com isso a formação de anticorpos facilitadores da infecção, sendo assim uma alternativa promissora para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue (BRICKS, 2004).

Tem sido observado frequentemente que anticorpos circulantes IgM e IgG contra NS1 são encontrados em amostras de pacientes com infecções primárias e secundárias, em diferentes concentrações. Esforços estão sendo feitos para determinar como essa proteína atua na patogênese da dengue, assim como o seu potencial diagnóstico (LEI *et al.*, 2001; LEMES *et al.*, 2005).

O diagnóstico precoce, seguido pelo tratamento dos sintomas, é um fator importante na sobrevivência dos pacientes, principalmente para aqueles acometidos com as infecções mais graves da dengue. O diagnóstico definitivo da infecção pelos vírus dengue pode ser feito somente no laboratório e 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 e KOURI, 1996; ANANDARAO *et al.*, 2005).

A identificação do vírus através 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. O RNA viral pode ser detectado, com um alto grau de sensibilidade, utilizando a técnica de RT-PCR (*Reverse transcription - polymerase chain reaction*). Além da complexidade de execução e da necessidade de aparelhagem sofisticada, ampla variabilidade na realização deste método é verificada, podendo apresentar diferentes resultados influenciados pela sensibilidade e especificidade de cada técnica (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 (aproximadamente 5 dias, o tempo médio da viremia) disponível para uma detecção bem sucedida da infecção, período chamado Janela Imunológica, 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).

Cinco testes sorológicos básicos têm sido usados para diagnóstico da infecção por dengue: inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (TN), ELISA tipo captura e ELISA sanduíche.

O teste de neutralização é o mais específico teste sorológico para o vírus dengue. Por sua elevada especificidade, o TN pode ser empregado para identificar o sorotipo infectante em infecções primárias por dengue, devido à relativa resposta monotípica que é observada no soro de pacientes em fase de convalescência (VORDAM e KUNO; 1997).

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 de fase aguda (IgM) e de convalescência (IgG), assim como a pesquisa de antígenos (Ag) é possível pelo método de ELISA. 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. Além disso, por serem muito sensíveis no diagnóstico de anticorpos de fase aguda, dispensam a necessidade de uma amostra pareada no período de convalescência (VORDAM e KUNO; 1997).

O MAC-ELISA ("IgM antibody capture ELISA") é uma valiosa ferramenta na vigilância da dengue e DHF/DSS. Em áreas onde a dengue não é endêmica, este método pode ser usado na detecção clínica dos casos com sinais de infecção viral ou até mesmo ao acaso, através de uma soro-inspeção da população, podendo indicar uma infecção recente. Durante epidemias, uma vantagem do MAC-ELISA é a determinação rápida da propagação da transmissão. Em áreas onde a dengue é endêmica, MAC-ELISA pode ser usado como um valioso meio na avaliação de

um grande número de amostras laboratoriais com relativa facilidade (GUBLER e SATHE, 1988).

O IgG-ELISA foi desenvolvido para ser utilizado na diferenciação de infecções primárias e secundárias por dengue (CHUNGUE *et al.*, 1989). O teste é simples e de fácil manipulação, podendo ser assim utilizado na análise de grandes volumes de amostras. O IgG-ELISA não é muito específico, podendo resultar em reação cruzada com outros *Flavivirus*, e não pode ser utilizado na identificação dos sorotipos virais do dengue (GUBLER, 1998).

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 têm apresentado grandes dificuldades na obtenção de preparações com conteúdo adequado de antígeno, necessitando concentrar o antígeno através de centrifugação zonal contínua de sobrenadantes de culturas infectadas, sendo que a produção relativamente baixa do vírus dengue nas culturas celulares surge 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. No Brasil, os antígenos atualmente utilizados para diagnóstico da dengue são proteínas virais estruturais, preparados a partir do cérebro de camundongos recém-nascidos artificialmente infectados, sendo esta obtenção de antígenos extremamente laboriosa e cara (GUZMAN e KOURI, 1996).

A realização de testes diagnósticos rápidos e baratos representa uma necessidade crescente no Brasil viabilizando a realização do diagnóstico em larga escala e em todo o País, mesmo nas regiões mais afastadas das grandes cidades. Devido a esta demanda, tentativas de se obter um antígeno em quantidade e qualidade foram realizadas neste projeto, utilizando um sistema de expressão heteróloga de proteínas em plantas.

Nos últimos anos a biotecnologia ampliou o uso das plantas por introduzir genes que tenham necessidades de serem expressos 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 aos mamíferos e não

carreiam viroses, patógenos ou oncogenes humanos (BLAIS e ALTOSAAR, 2006). Em adição, a produção em massa de proteínas de interesse se torna comercialmente mais barata. Essas vantagens têm permitido a expressão de uma ampla diversidade de proteínas para prevenção, diagnóstico e terapias (STREATFIELD, 2006).

A primeira proteína de interesse farmacêutico produzida em plantas foi o hormônio do crescimento humano, expresso em tabaco transgênico em 1986 (BARTA *et al.*, 1986). Desde então, pesquisas realizadas mostram que uma gama enorme de proteínas com alto valor econômico pode ser expressa eficientemente em plantas (SHRAWAT *et al.*, 2007).

Os estudos com expressão de receptores CD14 humanos em sementes de tabaco transgênicas demonstraram a introdução de genes de interesse em plantas sendo estes expressos estavelmente e herdados nas gerações sucessivas da planta transgênica (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).

Várias metodologias para transformação de plantas foram desenvolvidas ou estão em aperfeiçoamento. Aquelas utilizadas rotineiramente são a transformação direta do genoma da planta mediada por *Agrobacterium* ou por biobalística (bombardeamento de partículas) e a utilização de vírus recombinantes, cuja estratégia é infectar plantas com vírus recombinantes que expressem os transgenes durante sua replicação no hospedeiro (GIDDINGS *et al.*, 2000).

As agrobactérias são organismos aeróbicos, gram-negativos e tipicamente encontrados no solo. O gênero *Agrobacterium*, pertencente à família Rhizobiaceae, está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela patogenicidade e pelo modo de infecção em diferentes plantas. A espécie *A. tumefaciens* é o agente etiológico da galha-da-coroa, doença que se caracteriza pela formação de tumores nos tecidos afetados (ANDRADE *et al.*, 2003). A 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 (Fig. 5).

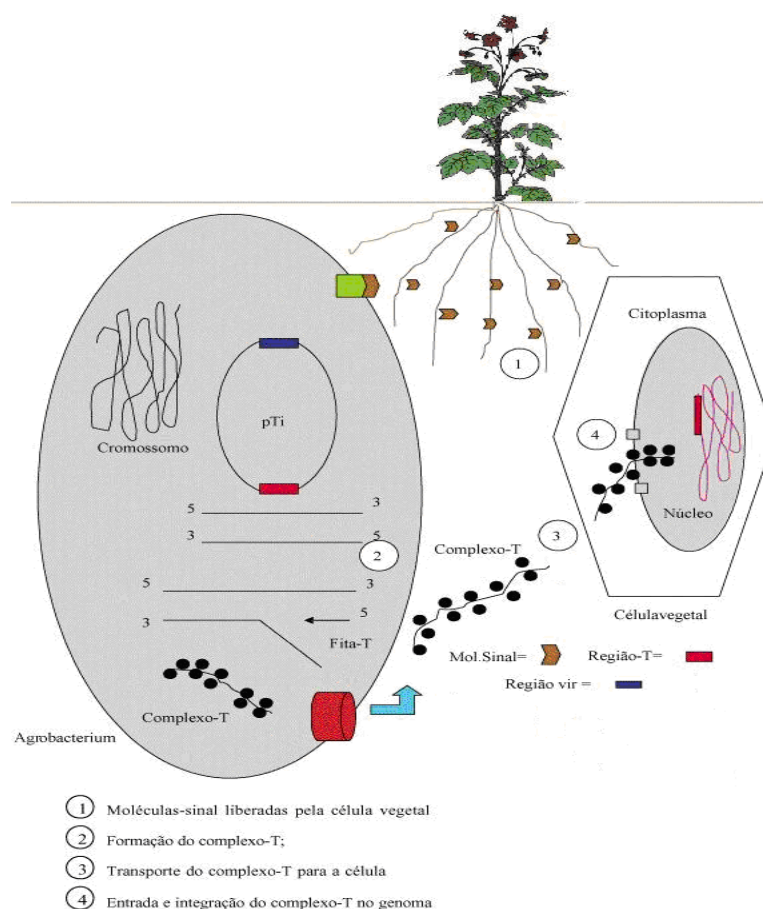


Figura 5. Representação esquemática do processo de infecção de uma célula vegetal por *Agrobacterium* (ANDRADE *et al.*, 2003).

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 (Fig. 6).

Essa região, denominada T-DNA (DNA de transferência, do inglês *transferred DNA*), é delimitada por duas seqüências 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).

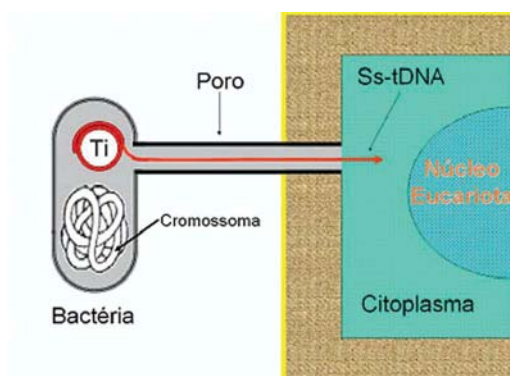


Figura 6. Formação de um poro, com estrutura semelhante à de um pilus, que funcionaria como uma “seringa genômica”, permitindo que o procariota (*Agrobacterium tumefaciens*) injete um fragmento de genoma no citoplasma da planta hospedeira (KADO, 2000; VEENA *et al.*, 2003).

Para a obtenção de proteínas NS1 do vírus dengue em larga escala visando à produção de testes diagnósticos foi aplicado esta metodologia de expressão heteróloga de proteínas em plantas, em especial em plantas do gênero *Nicotiana* (*Nicotiana tabacum*). Foi utilizada a proteína NS1 devido às características já descritas e também por ser uma das primeiras proteínas a serem secretadas, o que possibilita o desenvolvimento de um diagnóstico rápido e seguro. Para tanto, o tabaco foi infectado com bactérias *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 transformadas com plasmídeos que carregam o gene

responsável por codificar a proteína NS1. Análises moleculares subsequentes foram realizadas para verificar sua integração no genoma vegetal, sua transcrição e também para verificar a expressão da mesma, que depois de detectada será purificada e concentrada. Após a obtenção, os antígenos serão analisados de forma comparativa em diferentes métodos de detecção como MAC-ELISA e ELISA, sendo correlacionados com o teste de neutralização em placas.

A contribuição dos resultados obtidos poderá ser verificada indiretamente no controle da dengue, 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 do dengue hemorrágico.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral:

1- Construir um sistema de expressão em plantas *Nicotiana tabacum* “Havana” (tabaco) para expressar a proteína não estrutural (NS1) do vírus *dengue-2* visando à obtenção de antígenos em grande quantidade.

2.2- Objetivos específicos:

1- Isolar o gene da proteína NS1 do vírus *dengue-2* e construir um plasmídeo (vetor) de expressão para plantas *Nicotiana tabacum* “Havana” (tabaco);

2- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor de expressão pCAMBIA 3301 contendo o gene responsável por codificar a proteína não estrutural (NS1) do vírus *dengue-2*;

3- Transformar *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*, visando à utilização de plantas na produção de proteínas heterólogas;

4- Verificar através de análises moleculares a integração do gene que codifica a proteína NS1 no genoma vegetal e detectar sua transcrição.

3.2- Estoque viral proveniente de cultura celular

Garrafas de 75 cm² foram semeadas com células C6/36 e crescidas a 28°C em meio L15 modificado (GIBCO-BR, New York, USA), suplementado com soro fetal bovino (2-10%), triptose fosfato (10%) e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 1mg/mL). Quando as monocamadas estavam contínuas, estas foram inoculadas com 25µl do vírus *dengue-2*, cepa New Guinea C, e incubadas novamente à mesma temperatura por 7 dias. A infecção viral foi confirmada pela Reação em Cadeia da Polimerase conforme descrito a seguir. O sobrenadante foi recolhido e estocado a - 70°C.

3.3- Obtenção de células competentes *E. coli* DH5α

Células *E. coli* DH5α competentes foram obtidas através de tratamento com choque térmico e DMSO (dimetil sulfoxido). Para tanto, bactérias DH5α foram incubadas em meio LB líquido (10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl, pH 7,0) e crescidas durante 12 horas a 37°C sob uma agitação de 215 rpm. A estas foram adicionados meio SOB (20g/L de bacto triptose, 5g/L de extrato de levedura e 0.5g/L de NaCl) e solução de MgCl₂ 2M. Em seguida, foram incubadas a 27°C por 6 horas sob agitação de 215 rpm. Determinou-se a absorbância a 600nm (A₆₀₀) e, em seguida, as células foram incubadas no gelo por 10 minutos, recolhidas por centrifugação a 4500 xg por 10 minutos à 4°C. O precipitado formado foi suspenso em meio LB incubado em gelo por 10 minutos e a solução foi novamente centrifugada a 4500 xg por 10 minutos a 4°C. O novo precipitado foi então suspenso em meio LB e solução de DMSO. Após aliquotar as células competentes, estas foram estocadas a -70°C.

3.4- Extração de RNA

O Kit QIAamp[®] Viral RNA (QIAGEN[®], Califórnia, USA) foi utilizado na extração do RNA total da cultura celular. Para tanto, 200 µL da cultura infectada foi lisada pela solução tampão AVL e após lise, a amostra foi aplicada a uma coluna com afinidade para RNA e submetida a uma centrifugação de 8000 xg por

1 minuto. Após centrifugação, o RNA foi lavado duas vezes com subsequentes centrifugações a 8000 xg por 1 minuto, a primeira lavagem foi realizada com a solução tampão AW1 e a segunda com a solução AW2. Terminada a lavagem, o RNA foi eluído da coluna, pela solução tampão AVE, a uma centrifugação de 8000 xg por 1 minuto e estocado a -70°C. Aproximadamente 10 µg do RNA total foram utilizados para sintetizar as primeiras fitas de cDNA, utilizando “primers” randômicos.

3.5- Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen™, New York, USA). Para tanto, 1 µL do “primer” randômico (pd(N)₆) (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, England) foi adicionado a 11 µL (~2 µg) de RNA extraído do sobrenadante da cultura infectada, sendo submetido a aquecimento por 10 minutos a 70°C, em seguida resfriado brevemente em gelo. Um coquetel foi preparado contendo tampão 1X da transcriptase reversa, DTT (ditiotreitól) e dNTPs (desoxinucleotídeo trifosfato). Promoveu-se então o aquecimento do coquetel e da mistura RNA/primer por 5 minutos a 42°C e, em seguida, foi adicionado 1 µL da enzima transcriptase reversa ao coquetel e o volume deste foi adicionado à amostra. Incubou-se a solução por 1 hora a 42°C, e por 15 minutos a 70°C, para inativar a transcriptase reversa.

3.6- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a PCR, foi desenhado 1 par de iniciadores sintéticos, “primers”, pCambNS1a (5` GGAGATCTATGGATAGTGGTTGCGTTGTGA 3`) e pCambNS1as (5`GGGGTAACCTGAGGCTGTGACCAAGGAGT 3`) que flanqueia a região do genoma que codifica a proteína não-estrutural NS1 do vírus *dengue-2*, resultando num fragmento de 1055 pares de bases (pb). Os primers também contém os sítios de restrição das enzimas *Bst* EII e *Bgl* II, utilizadas para a clonagem do DNA do gene que codifica a proteína NS1 em vetores pCAMBIA. Na reação foram utilizados aproximadamente 100 ng do cDNA numa reação cujo

volume final foi de 50 μL contendo 0,5 pmol/ μL dos “primers” sense e antisense, 0,2 mM dNTPs, tampão 1X da enzima e 2,5U da Platinum[®] Taq DNA polymerase, recombinant (Invitrogen[™], New York, USA). Para ativação da enzima Taq DNA polimerase, foi realizado um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos. Em seguida as ampliações foram feitas por 35 ciclos de 95°C 1 minuto, 55°C 2 minutos e 72°C 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

3.7- Análise por eletroforese e purificação do gene responsável por codificar a proteína não-estrutural NS1

O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose (SIGMA, St. Louis, MI) a 1,0%, corado com brometo de etídio 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, visualizado à luz ultravioleta e digitalizado pelo Alpha Digidoc 1201 (Alpha Innotech Corporation).

A banda referente ao gene responsável pela expressão da NS1 foi então excisada deste gel e o DNA foi purificado usando-se o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA). Para tanto, a banda de DNA retirada do gel foi adicionada a solução de suspensão “Membrane Binding Solution”. Em seguida foi incubada a 50-65°C, até que o gel estivesse completamente dissolvido, e a solução transferida para uma minicoluna. Após ser submetido à centrifugação a 13000 xg por 1 minuto, foram feitas duas lavagens com solução “Membrane Wash Solution” seguidas de centrifugações. O DNA foi então eluído com água deionizada seguida de centrifugação a 13000 xg.

3.8- Clonagem do gene codificador da proteína NS1 e transformação de células competentes *E. coli* DH5 α

O DNA purificado do gel foi então clonado em vetor de clonagem pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) conforme mostrado na figura 8, utilizando-se o kit pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA). Este sistema consiste na ligação de um fragmento de DNA amplificado ao vetor de clonagem por meio de extremidades coesivas, sendo a extremidade do DNA amplificado formada por uma adenina resultante da amplificação e a extremidade do vetor formada por uma timina. Na reação de ligação foi utilizada uma solução

contendo tampão 1X da enzima T4 ligase, vetor de clonagem, o gene da proteína NS1 e a enzima T4 ligase, 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 *E. coli* DH5α competente, com o objetivo de se produzirem clones de plasmídeos recombinantes que contenham o gene responsável por codificar a proteína NS1 dos vírus da dengue para formação de um estoque do mesmo. Para a transformação, células competentes foram incubadas em gelo. Foi adicionada, às células, uma solução contendo plasmídeos resultantes da reação de ligação, e estas foram incubadas em gelo por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas a 42°C por 30 segundos e rapidamente colocadas no gelo (choque térmico). Foi adicionado meio SOC (20g/L de bacto triptose, 5g/L de extrato de levedura e 0,5g/L de NaCl e 20 mM de glicose) e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora. Uma alíquota da mistura foi plaqueada em meio LB com antibiótico (ampicilina) para seleção das colônias transformantes.

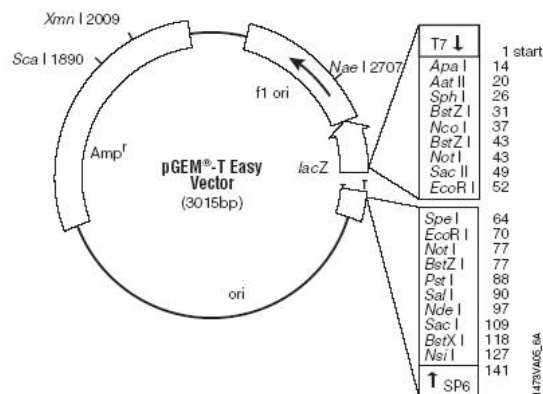


Figura 8. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin).

3.9- Análise e seleção das colônias transformadas

Para análise e seleção das colônias transformadas com plasmídeos recombinantes pGEM-T/NS1, foi realizada uma extração “mini-prep”, como a descrita a seguir, seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificação da ligação do inserto ao vetor. O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose (SIGMA, St. Louis, MI) a 0.8%. Após serem analisadas, as colônias recombinantes transformantes foram crescidas em meio LB, aliquotadas e estocadas a – 70°C.

3.10- Extração de plasmídeos pGEM-T/NS1

Para obtenção dos plasmídeos recombinantes pGEM-T/NS1 foi realizada uma extração “mini-prep”. Bactérias contendo o plasmídeo foram crescidas em meio LB com ampicilina durante 12 horas, a 37°C sob agitação de 180 rpm. Foram então recolhidas por centrifugação a 8000 xg por 1 minuto e suspensas em tampão de lise (50mM glicose, 25mM tris-HCl, 10mM EDTA, lisozima 4mg/mL, pH 8,0). Após 5 minutos à temperatura ambiente, foi adicionada uma solução alcalina (0.2N NaOH, 1% SDS) e a mistura foi incubada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi adicionada uma solução de acetato de amônio 7,5 M e novamente incubada em gelo, por 10 minutos, para precipitação de proteínas, RNAs de alto peso molecular e DNA cromossomal. A mistura foi centrifugada por 3 minutos a 10000 xg e o sobrenadante removido e transferido para um novo tubo. A este foi adicionado isopropanol e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos para precipitação dos plasmídeos. A solução foi centrifugada e o sobrenadante removido por aspiração. O precipitado foi lavado com etanol e, após a secagem, foi eluído com água ultra-pura.

3.11- Clivagem do gene responsável por codificar a proteína NS1 com enzimas de restrição

Após obtenção do clone recombinante e extração do plasmídeo recombinante pGEM-T/NS1, este foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl* II e *BstE* II (Fermentas, Hanover, USA) para ser ligado em vetores pCAMBIA,

também digeridos com as mesmas enzimas. Para a reação de digestão, foram adicionados 17 µL do plasmídeo a uma solução contendo o tampão tango, para dupla digestão, e 1 µL de cada uma das enzimas. A reação foi incubada por 8 horas a 37°C. O resultado da clivagem foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

A banda referente ao gene responsável pela expressão da NS1 foi então excisada deste gel e o DNA foi purificado usando-se o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA). Para tanto, a banda de DNA retirada do gel foi adicionada a solução de suspensão “Membrane Binding Solution”. Em seguida incubada a 50-65°C, até que o gel estivesse completamente dissolvido, e a solução foi transferida para uma minicoluna. Após ser submetido à centrifugação a 13000 xg por 1 minuto, foram feitas duas lavagens com solução “Membrane Wash Solution” seguidas de centrifugações. O DNA foi então eluído com água deionizada seguida de centrifugação a 13000 xg.

3.12- Extração de plasmídeos pCAMBIA 3301

O plasmídeo pCAMBIA 3301, a ser utilizado para a transformação de *A. tumefaciens*, foi extraído a partir do estoque de células mantido no Laboratório de Imunovirologia Molecular e Glicoimunologia. Para tanto, foi realizada uma extração “mini-prep”. Bactérias contendo o plasmídeo foram crescidas em meio LB com canamicina (Sigma, St. Louis, MI), durante 12 horas, a 37°C sob agitação de 180 rpm. Foram então recolhidas por centrifugação a 8000 xg por 1 minuto e suspensas em tampão de lise (50mM glicose, 25mM tris-HCl, 10mM EDTA, lisozima 4mg/mL, pH 8.0). Após 5 minutos à temperatura ambiente, foi adicionada uma solução alcalina (0.2 N NaOH, 1% SDS) e a mistura foi incubada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi adicionada uma solução de acetato de amônio 7,5 M e novamente incubada em gelo, por 10 minutos, para precipitação de proteínas, RNAs de alto peso molecular e DNA cromossomal. A mistura foi centrifugada por 3 minutos a 10000 xg e o sobrenadante removido e transferido para um novo tubo. A este foi adicionado isopropanol e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos para precipitação dos plasmídeos. A solução foi centrifugada e o

sobrenadante removido por aspiração. O precipitado foi lavado com etanol e, após a secagem foi eluído com água ultra-pura.

3.13- Clivagem de plasmídeos pCAMBIA 3301

Após extração do plasmídeo pCAMBIA 3301, o mesmo foi submetido a digestão com as enzimas de restrição *Bgl* II e *BstE* II (Fermentas, Hanover, USA) para neste ser inserido o gene responsável por codificar a proteína não estrutural NS1. Para a reação de digestão foram adicionados 17 µL do plasmídeo a uma solução contendo o tampão tango, para dupla digestão, e 1 µL de cada uma das enzimas. A reação foi incubada por 12 horas a 37°C. O resultado da dupla digestão foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 0.8%, e a banda referente ao pCAMBIA 3301 digerido foi então excisada do gel e o vetor foi purificado usando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA). Para tanto, a banda do plasmídeo retirada do gel foi adicionada uma solução de suspensão “Membrane Binding Solution”. Em seguida incubada a 50-65°C, até que o gel estivesse completamente dissolvido, e a solução foi transferida para uma minicoluna. Após ser submetido à centrifugação a 13000 xg por 1 minuto, foram feitas duas lavagens com solução “Membrane Wash Solution” seguidas de centrifugações. O vetor foi então eluído com água deionizada seguida de centrifugação a 13000 xg.

3.14- Clonagem do gene codificador da proteína NS1 em plasmídeos pCAMBIA 3301 e transformação de células competentes *E. coli* DH5α

O gene responsável por codificar a proteína não estrutural NS1 após ser digerido e purificado do gel foi inserido no vetor pCAMBIA 3301 utilizando o kit T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA). Na reação de ligação foi utilizada uma solução contendo tampão 1X e a enzima T4 ligase, 4µL do plasmídeo, 2µL do gene da proteína NS1, num volume total de 20µL. A solução foi incubada a 4°C durante 12 horas e 1 hora a 37°C.

O produto desta ligação foi então utilizado para transformar *E. coli* DH5α competente no sentido de se produzirem clones de plasmídeos recombinantes

que contenham o gene responsável pela expressão da proteína dos vírus dengue para transformação de *A. tumefaciens* LB4404. Para a transformação, células competentes foram incubadas em gelo. Foi adicionada uma solução do plasmídeo às células e estas foram incubadas em gelo por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas a 42°C por 45 segundos e rapidamente colocadas no gelo (choque térmico). Foi adicionado meio SOC (20g/L de bacto triptose, 5g/L de extrato de levedura, 0,5g/L de NaCl e 20 mM de glicose) e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora. As células foram recolhidas por centrifugação (8000 xg, 3 minutos) e suspensas em 350 µL do meio. Alíquotas de 50 µL da mistura foram plaqueadas em meio com antibiótico canamicina para seleção das colônias transformantes.

3.15- Análise e seleção das colônias transformadas

Para análise das colônias transformadas quanto a presença de plasmídeos recombinantes pCAMBIA 3301/NS1, foi realizada uma extração “mini-prep” seguida da PCR para verificação da ligação do inserto ao vetor. Colônias obtidas do plaqueamento da transformação foram crescidas em meio LB líquido com canamicina, durante 12 horas, a 37°C sob agitação de 180 rpm e a extração do plasmídeo foi realizada como a descrita anteriormente. Em seguida, os plasmídeos foram submetidos à PCR para análise dos clones quanto à presença do inserto no vetor recombinante. Para a PCR, foram utilizados os “primers” pCambNS1a (5` GGAGATCTATGGATAGTGGTTGCGTTGTGA 3`) e pCambNS1as (5`GGGGTAACC TGAGGCTGTGACCAAGGAGT 3`) responsáveis pela amplificação do gene responsável por codificar a proteína NS1. Na reação foram utilizados aproximadamente 100 ng do plasmídeo numa reação cujo volume final foi de 25 µL contendo 0,5 pmol/µL dos “primers” sense e antisense, 0,2 mM dNTPs, tampão 1X da enzima e 1,25 U da *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Hanover, USA). Para ativação da enzima *Taq* DNA polimerase, foi realizado um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos. Em seguida as amplificações foram feitas por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 0.8%. As colônias referentes aos clones que continham bandas correspondentes ao gene da proteína NS1 foram crescidas em meio LB líquido contendo antibiótico canamicina, aliqüotadas e estocadas a – 70°C.

3.16- Transferência de vetores para *Agrobacterium*: Obtenção de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* e transformação com os plasmídeos recombinantes pCAMBIA 3301/NS1

Células de *A. tumefaciens* LB4404 competentes foram obtidas através de tratamento com choque térmico e CaCl₂. Para tanto, uma colônia isolada da linhagem de *Agrobacterium* foi coletada e transferida para meio YEB líquido (5g/L de peptona, 1g/L de extrato de levedura, 5g/L de extrato de carne, 5g/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. Após esse tempo, 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 xg por 15 minutos à 4°C. Em seguida, estas foram suspensas em 150 mL de água ultra-pura autoclavada e gelada. As células foram recolhidas por centrifugação a 4000 xg por 15 minutos à 4°C. O precipitado formado foi suspenso em 20 mL de ultra-pura autoclavada e gelada, e novamente recolhidas por centrifugação a 4000 xg por 15 minutos à 4°C. O precipitado foi então suspenso delicadamente em solução de CaCl₂ 20 mM contendo 10% glicerol, previamente gelada. Após aliqüotar as células competentes, estas foram estocadas a -70°C.

Às células competentes de *Agrobacterium* foram adicionados 3 µL do plasmídeo e estas foram incubadas no gelo por 30 minutos. O choque térmico foi dado submetendo as células ao nitrogênio líquido por 1 minuto e 15 segundos e em seguida ao banho-maria 37°C por 5 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio YEB ao tubo e as células cultivadas por 2 horas a 28°C, com agitação de 180 rpm. A cultura foi semeada em placas de petri contendo meio YEB sólido

acrescido dos antibióticos canamicina e estreptomicina nas concentrações finais de 50 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

3.17- Análise e seleção das colônias de *Agrobacterium* transformadas

Para análise das colônias transformadas quanto a presença de plasmídeos recombinantes pCAMBIA 3301/NS1 foi realizada uma extração “mini-prep” seguida de PCR. Colônias obtidas do plaqueamento da transformação de *Agrobacterium* foram crescidas em meio YEB com canamicina e estreptomicina, durante 12 horas, a 28°C sob agitação de 180 rpm e extração do plasmídeo foi realizada como descrita anteriormente. Em seguida, os plasmídeos foram submetidos à PCR para análise dos clones quanto à presença do inserto no vetor recombinante como descrito anteriormente.

O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As colônias referentes aos clones que continham bandas correspondentes ao gene da proteína NS1 foram crescidas em meio LB contendo antibiótico canamicina, aliqüotadas e estocadas a – 70°C.

3.18- Cultura de tecidos vegetais: Germinação e crescimento de *Nicotiana tabacum*

As sementes de *Nicotiana tabacum* foram obtidas comercialmente. 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, semeadas em placas de Petri descartáveis e vedadas com fita microporosa, em meio semi-sólido contendo a metade da concentração de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg/L de mio-inositol, 2 mg/L de tiamina-HCl, 0,5 mg/L de piridoxina-HCl, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 30 g/L de sacarose e 6 g/L de ágar (Sigma Chemical Company, EUA), em pH 5,8. Após a inoculação das sementes, as culturas foram incubadas à temperatura de 27°C, sob irradiância de 24 a 36 µmoles m⁻²s⁻¹ e com um fotoperíodo de 16 horas.

3.19- Transformação de explantes de *Nicotiana tabacum* com *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 contendo o gene responsável por codificar a proteína NS1

A infecção dos fragmentos foliares foi realizada após o crescimento das colônias analisadas por PCR e selecionadas como transformantes de *Agrobacterium tumefaciens*. Este crescimento foi realizado em meio LB sólido contendo os antibióticos estreptomicina (300 mg/L) e canamicina (100 mg/L), durante 48 horas, entre 25 e 28°C. Após, transferiu-se de duas a quatro colônias isoladas e recém-crescidas com uma alça de platina para 5 mL de meio LB líquido, mantendo os mesmos antibióticos. Cultivou-se as bactérias em agitador do tipo orbital, durante aproximadamente 16 horas, a uma frequência de agitação entre 100 e 150 rpm e a uma temperatura entre 25 e 28°C, até a cultura atingir a fase exponencial de crescimento. Após a turvação do meio, verificou-se a absorvância a 600 nm (A_{600}), que encontrou-se entre 0,5 e 1,0. Transferiu-se, então, 1 mL da suspensão bacteriana para um tubo de microcentrifuga estéril e centrifugou-se a amostra a 5000 xg, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 1 mL de NaCl 0,85% estéril, mantendo-as em temperatura ambiente.

Plantas cultivadas *in vitro* com 5 a 6 semanas foram utilizadas para o processo de transformação. Cortou-se uma folha de cada vez em quadrados de 0,5 a 1,0 cm², sobre papel de filtro estéril embebido em água ultra-pura. Transferiu-se imediatamente os fragmentos foliares cortados para 20 mL de meio MS₀ líquido em uma placa de petri e foi adicionado 200 µL da suspensão bacteriana, agitando delicadamente a placa. As placas foram seladas com Parafilm[®] ou filme de PVC. A co-cultura foi incubada no escuro, durante 48 horas, a uma temperatura de 25 ± 2°C. Após a co-cultura, lavou-se pelo menos duas vezes os fragmentos foliares em meio MS₀ líquido e estes foram transferidos para papel de filtro estéril, eliminando o excesso de bactéria.

3.20- Obtenção dos brotos transgênicos

Os fragmentos foliares possivelmente transformados foram, então, inoculados em meio MS₀ sólido contendo BAP (6-benzilaminopurina 1 mg/L), para

indução de brotos; timentina (500 mg/L), para evitar o crescimento de bactérias remanescentes; canamicina (100 mg/L) e 0,5 mg/L de glufosinato de amônio (Vasudevan *et al.*, 2007) para selecionar as células transformadas. Foram colocados aproximadamente dez explantes por placa, com a face abaxial da folha em contato com o meio. As placas foram seladas com Parafilm® ou filme de PVC e incubadas em uma sala de cultura com um fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

A individualização dos brotos foi realizada após identificação dos maiores de 0,7cm 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 MS₀ para o enraizamento contendo regulador de crescimento AIB (ácido indol-butírico 0,5 mg/L), acrescido de timentina (500 mg/L), canamicina (100 mg/L), glufosinato de amônio (fosfotricina 0,5 mg/L) e 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*.

3.21- Extração de DNA vegetal pelo método do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio)

Foram coletadas cerca de 200 a 300 mg de folha da planta de interesse e maceradas com nitrogênio líquido, utilizando almofariz de porcelana previamente congelado. O macerado foi então transferido para microtubos de 1,5 mL, congelados e devidamente identificados. Acrescentou-se 800 µL de tampão CTAB (2x) com 2% de polivinilpirrolidona (PVP) e 15 µL de β-mercaptoetanol. A amostra foi agitada em vórtex por 2 minutos e incubada a 65°C por 5 minutos para melhor homogeneização. Adicionou-se 600 µL de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) para precipitação do material genético. Agitou-se a amostra em vórtex por 1 minuto e centrifugou-se a 13.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado isopropanol gelado em uma proporção de 1:1 em relação ao sobrenadante, incubando os microtubos a -20°C de 2 a 3 horas.

Após a incubação, centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 xg e um precipitado branco foi formado no fundo do tubo. O sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado de 1 a 2 vezes com 300 µL de etanol 70% e 1 vez com 300 µL de etanol 95%, centrifugando-se o precipitado a 14000 xg por 3 minutos à cada lavagem. O precipitado secou a temperatura ambiente e foi suspenso em 300 µL de tampão TE 1mM (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo 1,2 µL de RNase na concentração final de 40 µg/mL. A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos. Adicionou-se acetato de amônio 7,5 M na proporção de 1:10 e 200 µL de isopropanol gelado para precipitar o DNA novamente. Incubou-se a 4°C durante 12 horas. A lavagem com etanol 70% e 95% foi realizada novamente. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e suspenso em 40 µL de tampão TE 0,1 mM ou água ultra-pura.

3.22- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e análise por eletroforese do DNA obtido das plantas cultivadas

O DNA extraído das folhas da planta de interesse foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para análise dos clones quanto à presença do inserto contendo o gene codificador da proteína NS1. Para a PCR, foi utilizado os “primers” pCambNS1a e pCambNS1as responsáveis pela amplificação do gene responsável por codificar a proteína NS1 como descrito anteriormente.

O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Os clones referentes às plantas que continham bandas correspondentes ao gene da proteína NS1 foram separadas para aclimatização e transferência para a casa de vegetação.

3.23- Aclimatização das plantas transgênicas

Para a aclimatização, retirou-se delicadamente as plantas enraizadas (entre 5 e 8 cm de altura) do vidro estéril, removendo o excesso de meio de cultura. Estas foram transferidas para copos de plástico de aproximadamente 8 cm de altura, contendo a mistura solo:vermiculita estéril. A parte aérea da planta foi coberta com um saco plástico, para evitar seu ressecamento. Após 3 semanas, o saco plástico foi retirado e as plantas foram transferidas para a casa de

vegetação em vasos contendo solo adubado. As plantas se desenvolveram normalmente sob condições parcialmente controladas de temperatura (20 a 30°C) e umidade (~ 70%).

3.24- Extração do RNA total de tecidos vegetais

O RNA vegetal foi extraído com o Kit SV Total RNA Isolation System® (Promega). Para tanto foram coletadas cerca de 100 mg de folha da planta de interesse e mantidas em nitrogênio líquido, maceradas utilizando almofariz de porcelana previamente autoclavado. Foi adicionado 30 mg de tecido vegetal para 175 µL da solução “RNA Lysis Buffer”, para homogeneizar a amostra. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionada 350 µL da solução “RNA Dilution Buffer”, misturou-se por inversão e centrifugou-se por 10 minutos a 4000 xg. A solução clara lisada foi transferida para um novo tubo por pipetagem e adicionado 200 µL de etanol a 25%, misturado por 3 a 4 vezes. Essa mistura foi transferida para uma coluna e centrifugada a 14000 xg por 1 minuto. O líquido do tubo coletor foi descartado e a coluna foi recolocada no mesmo. Após foi adicionada 600 µL da “RNA Wash Solution” e centrifugada a 14000 xg por 1 minuto. O tubo coletor foi esvaziado e adicionado 50 µL de um solução recém-preparada com DNase (5 µL de DNA I, 40 µL “Yellow Core Buffer”, 5 µL 0,09M MnCl₂) diretamente na membrana da coluna e incubado por 15 minutos a 20°C. Após foi adicionada 200 µL da “DNase Stop Solution” na coluna e centrifugou-se a 14000 xg por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 600 µL da “RNA Wash Solution” e centrifugou-se a amostra a 14000 xg por 1 minuto. O tubo coletor foi esvaziado e adicionou-se 250 µL da “RNA Wash Solution” e centrifugou-se a 14000 xg por 2 minutos. A coluna do tubo coletor foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, e adicionou-se 100 µL de água livre de nuclease à membrana. Centrifugou-se a amostra a 14000 xg por 1 minuto. A coluna foi removida e descartada. O RNA foi estocado a -70°C.

3.25- Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen™, New York, USA). Para tanto, 1 µL do primer

randômico (pd(N)₆) (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, England) foi adicionado a 11 µL de RNA extraído do tecido vegetal, sendo submetido a aquecimento por 10 minutos a 70°C, sendo em seguida resfriado brevemente em gelo. Um coquetel foi preparado contendo tampão 1X da transcriptase reversa, DTT e dNTPs. Promoveu-se então o aquecimento do coquetel e da mistura RNA/primer por 5 minutos a 42°C e, em seguida, foi adicionado 1µL da enzima transcriptase reversa ao coquetel e o volume deste foi adicionado à amostra. Incubou-se a solução por 1 hora a 42°C, e por 15 minutos a 70°C, para inativar a transcriptase reversa.

3.26- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O RNA extraído das folhas de *Nicotiana tabacum* foi submetido à PCR para análise dos clones quanto à presença do inserto contendo o gene codificador da proteína NS1. Para a PCR, foi utilizado os “primers” pCambNS1a e pCambNS1as responsáveis pela amplificação do gene responsável por codificar a proteína NS1 como descrito anteriormente.

O resultado da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

4- RESULTADOS

4.1- Extração de RNA, Síntese de cDNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a extração do RNA total das amostras, a primeira fita de cDNA foi sintetizada e em seguida foi realizada a PCR. Houve a detecção do gene responsável por codificar a proteína NS1 de tamanho de 1055 pb (Fig. 9).

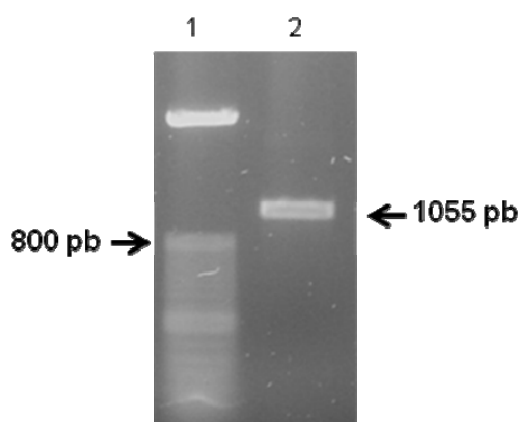


Figura 9. Gel de agarose 0,8% demonstrando a amplificação do gene NS1/DENV2. 1- Marcador de DNA 50 bp (50 pb DNA Ladder, Invitrogen, Califórnia, EUA); 2- Fragmento de 1055 pb correspondente ao gene NS1.

4.2- Clonagem do gene da proteína NS1 em vetor pGEM-T

Após a realização da clonagem do gene da proteína NS1 no vetor pGEM-T, foi feita a transformação das células competentes *E. coli* DH5 α e as colônias recombinantes obtidas foram estocadas a -70°C. Realizada a extração de plasmídeos, foi feita uma nova amplificação para confirmação dos insertos ligados ao vetor de clonagem utilizando-se os “primers” pCambNS1s e pCambNS1as, e o produto das amplificações foi detectado por eletroforese em gel de agarose 0.8% (Fig. 10).

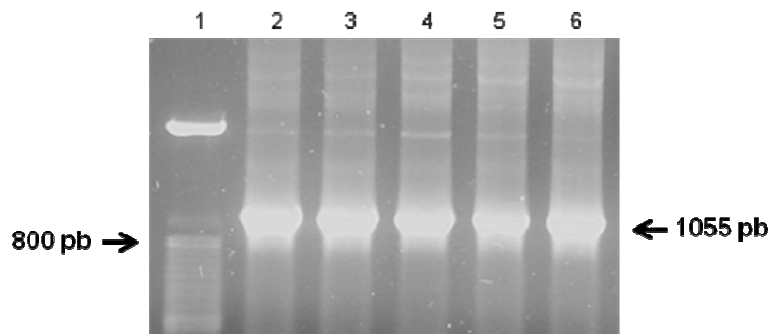


Figura 10. Gel de agarose 0.8% demonstrando a amplificação do gene NS1/DENV2 por PCR, a partir da extração plasmidial de 5 clones recombinantes de *E. coli* pGEM-T/NS1. 1- Marcador de DNA 50 pb; 2 a 6- Cinco bandas referentes ao fragmento de 1055 pb, correspondente ao gene NS1.

4.3- Digestão do plasmídeo pGEM-T/ NS1

Bactérias transformadas com o vetor pGEM-T/NS1 foram crescidas em meio seletivo para a realização da extração do DNA plasmidial. O plasmídeo pGEM-T/NS1 foi então submetido a uma dupla digestão e o fragmento do gene responsável pela expressão da proteína NS1 foi liberado (Fig. 11).

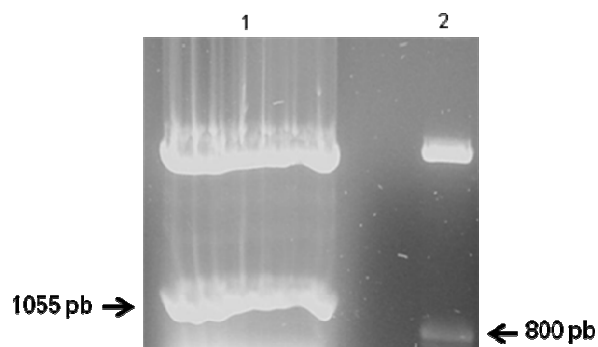


Figura 11. Gel de agarose 0,8% demonstrando a dupla digestão do plasmídeo pGEM-T/NS1. 1- Fragmento de 1055 pb, correspondente ao gene NS1; 2- Marcador de DNA 50 pb.

4.4 - Extração do plasmídeo pCAMBIA 3301

Bactérias transformadas com o vetor pCAMBIA 3301 foram crescidas em meio seletivo para a realização da extração do DNA plasmidial. A presença do vetor foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0.8%. Foram visualizadas as bandas referentes às formas encontradas do plasmídeo pCAMBIA 3301: “supercoiled”, linear e fechado (Fig.12).

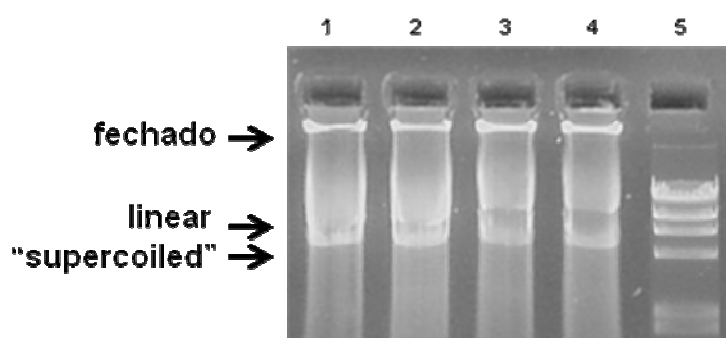


Figura 12. Gel de agarose 0,8% demonstrando a extração de DNA plasmidial de *E. coli* pCAMBIA 3301. 1 a 4- Plasmídeos pCAMBIA 3301 extraídos de 4 estoques diferentes resultantes da transformação de células competentes *E. coli* DH5 α . As três bandas (setas) são referentes às três formas encontradas do plasmídeo (supercoiled, linear e fechado). 5- Marcador de DNA λ *Hind* III.

4.5- Digestão do plasmídeo pCAMBIA 3301

Após extração, o plasmídeo pCAMBIA 3301 foi submetido a dupla digestão com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Bst* EII. A dupla digestão gerou uma banda de aproximadamente 9800 pb correspondente ao vetor linearizado (Fig.13).

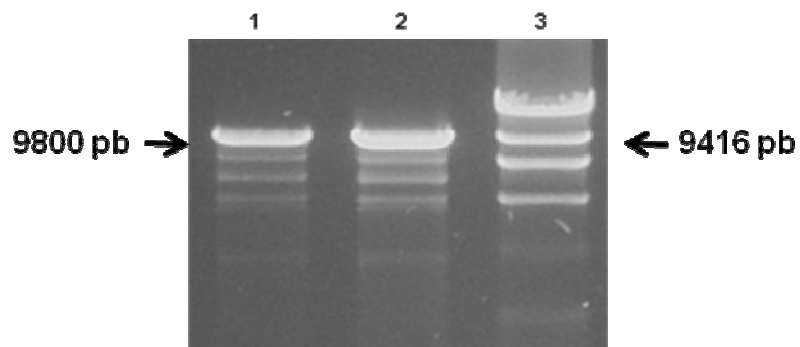


Figura 13. Gel de agarose 0,8% demonstrando dupla digestão do plasmídeo pCAMBIA 3301. 1 e 2- Plasmídeos pCAMBIA 3301 digeridos com *Bgl* II e *Bst* EI1 resultando em bandas de aproximadamente 9800 pb; 3- Marcador de DNA λ *Hind* III.

4.6- Análise e seleção das colônias transformadas

Foram analisadas 171 colônias de *E. coli* quanto a presença do gene responsável por codificar a proteína NS1 inserido no plasmídeo pCAMBIA 3301. Das 171 colônias analisadas, 15 colônias apresentaram o gene NS1 (Fig.14).

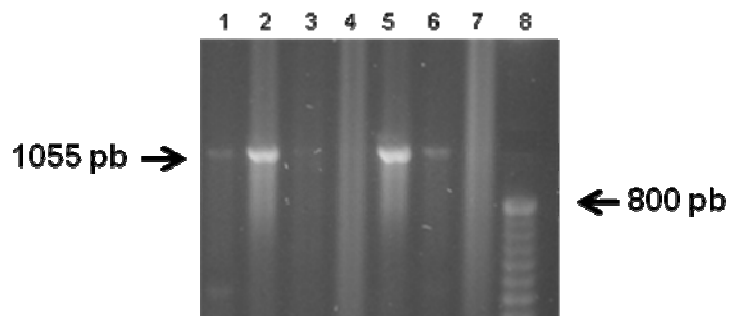


Figura 14. Gel de agarose 1,0% demonstrando a amplificação do gene NS1/DENV2. 1 a 7- Bandas referentes ao fragmento de 1055 pb, correspondente ao gene NS1; 8- Marcador de DNA 50 pb.

4.7- Análise e seleção das colônias de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1

Após extração dos plasmídeos recombinantes pCAMBIA 3301/NS1, foi realizada a transformação de *A. tumefaciens* LB4404. Das 77 colônias analisadas, apenas 3 apresentaram o gene NS1 (Fig.15).

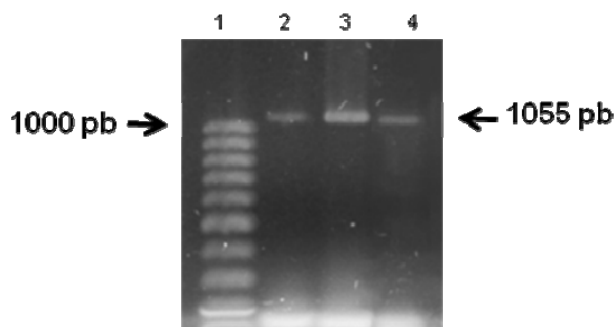


Figura 15. Gel de agarose 1,0% demonstrando a amplificação do gene NS1/DENV2. 1- Marcador de DNA 100 pb; 2 a 4- Bandas referentes ao fragmento de 1055 pb, correspondente ao gene NS1.

4.8- Germinação e transformação de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*

Após a desinfestação das sementes de *Nicotiana tabacum*, a germinação foi realizada. Ao aparecimento das primeiras radículas e emissão das primeiras folhas, cada plântula foi retirada delicadamente da placa e inoculada em um pote de vidro autoclavado (Fig. 16).

Para a transformação de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene codificador da proteína NS1/DENV2, foram utilizados aproximadamente 400 explantes foliares das plantas cultivadas *in vitro* com 5 a 6 semanas. O co-cultivo foi realizado em ambiente escuro, onde os explantes foram deixados por 48 horas. A observação da formação de brotos foi realizada diariamente (Fig. 16).

Após 30 dias da transformação, os brotos foram individualizados, utilizando somente a parte aérea da planta, sem tecidos basais. Os brotos foram

transferidos para potes de vidro contendo meio MS₀ sólido para promover o enraizamento e alongamento das plântulas. Foram utilizados quatrocentos explantes de *Nicotiana tabacum* para a transformação, sendo que destes, 80 brotos foram individualizados. Foi observado crescimento lento dos possíveis transformantes em relação à planta não-transformada. (Fig. 16). Após o crescimento de 10 cm das plantas transformadas, foi realizada a micropropagação para manutenção dos clones *in vitro* para realização das análises moleculares.

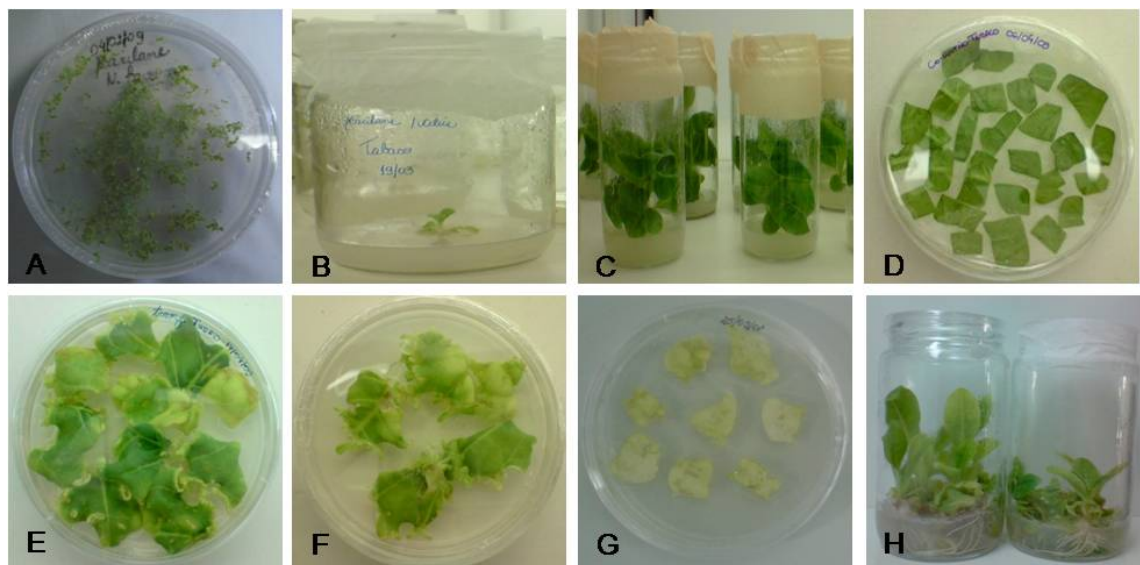


Figura 16. Germinação e transformação de *Nicotiana tabacum*. A- Germinação em placa de petri descartável; B- Individualização da plântula; C- Plantas cultivadas *in vitro* com 5 a 6 semanas; D- Explantes foliares de *Nicotiana tabacum* imediatamente após co-cultivo; E- Controle negativo (planta não-transformada, meio sem agente seletivo); F- Regeneração dos brotos 21 dias após o co-cultivo; G- Controle positivo (planta não-transformada, meio com agente seletivo); H- Comparação de crescimento da planta não-transformada em relação à planta transformada.

4.9- Técnicas para a detecção da transformação de *Nicotiana tabacum*: Extração de DNA vegetal e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico de *N. tabacum* foi extraído tanto de plântulas submetidas ao processo de transformação genética (80 plântulas), quanto daquelas que não foram submetidas, para avaliar a presença do gene NS1. A figura 17 apresenta a amplificação por PCR do gene da NS1/DENV2 apenas nos transformantes, o que confirma a integração do gene de interesse ao genoma vegetal. Das 80 plântulas individualizadas, 16 plântulas apresentaram o gene NS1/DENV2.

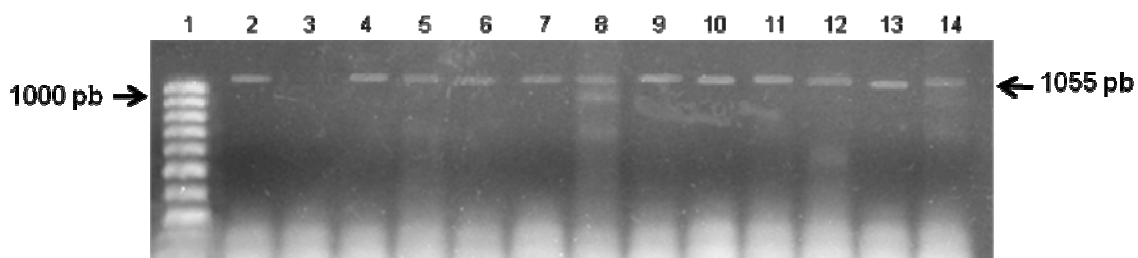


Figura 17. Gel de agarose 1.0% demonstrando a amplificação do gene NS1/DENV2. 1- Marcador de DNA 100 pb; 2- Controle positivo (amostra previamente confirmada); 3- Controle negativo do processo de transformação (planta não-transformada); 4 a 14- DNA genômico das plantas transformadas apresentando uma banda de 1055 pb correspondente ao gene NS1.

4.10- Aclimatização das plantas de *Nicotiana tabacum* transgênicas

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 e transferidas para casa de vegetação, sob condições controladas de cultivo (Fig. 18).

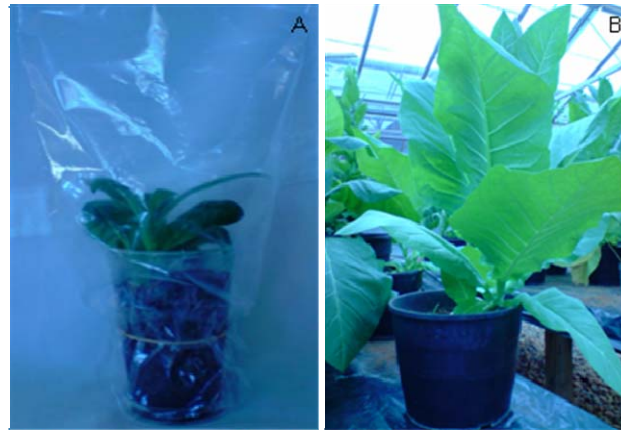


Figura 18. Processo de aclimatização de *Nicotiana tabacum* contendo o gene NS1/DENV2. A- Planta inicialmente no processo de aclimatização; B- Plantas transgênicas de *N. tabacum* em casa de vegetação.

4.11- Extração do RNA vegetal, Síntese de cDNA e PCR

Para se detectar a transcrição do gene NS1/DENV2, o RNA total de folhas de *Nicotiana tabacum* foi extraído utilizando-se o KiT SV Total RNA isolation System (Promega). Houve a amplificação por PCR de uma banda de 1055 pb correspondente ao gene da NS1/DENV2 no material vegetal transformado (Fig. 19).

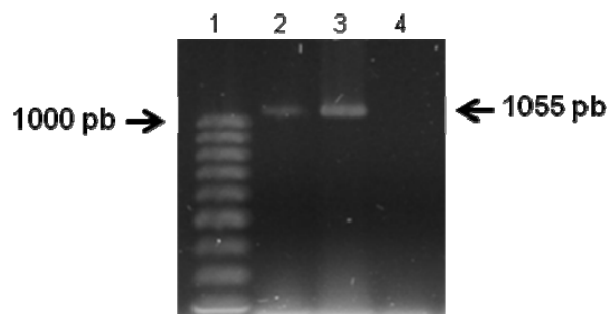


Figura 19. Gel de agarose 1,0% demonstrando a amplificação do gene NS1/DENV2. 1- Marcador de DNA 100 pb; 2 e 3- Amostras equivalentes a *Nicotiana tabacum* transformada, apresentando uma banda de 1055 pb correspondente ao gene NS1; 4- Amostra da planta controle (não transformada).

5- DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

O presente trabalho teve como objetivo a construção de um sistema de expressão em plantas *Nicotiana tabacum* “Havana” (tabaco) para expressar a proteína não estrutural (NS1) do vírus *dengue-2* visando à obtenção de antígenos em grande quantidade.

Foi realizado um ensaio MAC-ELISA para a proteína NS1/DENV (PLATELIA TM DENGUE NS1 AG test Kit, BIO-RAD, França), com o objetivo de 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 bons resultados com o uso 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 (DUTRA *et al.*, 2009; KUMARASAMY *et al.*, 2007).

Segundo Brasileiro e Carneiro (1998), a transformação genética de plantas, para ser bem sucedida depende de muitas variáveis, como por exemplo, a escolha correta da planta a ser utilizada. O tabaco é utilizado 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.

O sistema de transformação via *Agrobacterium* foi utilizado por ser um sistema com alta eficiência de transformação, baixo custo operacional e simplicidade na realização dos protocolos de transformação e seleção (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998). O método ideal de transformação deve combinar, ao mesmo tempo, a descontaminação do tecido infectado pela bactéria, a seleção das células que foram transformadas e que expressam o gene marcador, e a regeneração dessas células em plantas (BLOCK, 1993).

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram a clonagem do gene NS1 e confirmaram a presença deste no plasmídeo pGEM-T e pCAMBIA 3301. O gene clonado possui 1055 pb e foi amplificado utilizando primers específicos, que flanqueiam a região do gene da proteína. A clonagem do gene foi confirmada a partir de reações de PCR utilizando estes primers. Na análise em

gel de agarose ficou demonstrado que o produto das reações de PCR possui tamanho aproximado de 1000 pb quando comparado aos marcadores moleculares. Este resultado indica, por similaridade de tamanho, que a sequência obtida é correspondente ao gene NS1/DENV-2.

Na primeira etapa deste trabalho foi realizada a construção de um vetor de clonagem pGEM-T/NS1 que carrega o gene NS1 do vírus *dengue-2*. Este plasmídeo recombinante foi utilizado para a transformação de *E. coli* DH5 α , dando origem a bactérias recombinantes que foram utilizadas para a produção de múltiplas cópias do inserto de interesse. Na etapa seguinte, foi realizada a construção do vetor de expressão, o plasmídeo pCAMB3301/NS1, que carrega o gene NS1 do vírus *dengue-2*. Este plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, originando bactérias recombinantes que foram utilizadas como sistema de transferência natural de genes para transformação do tabaco.

A confirmação da obtenção de 77 colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com o plasmídeo recombinante pCAMBIA 3301/NS1 foi feita a partir da análise em gel de agarose do produto de amplificação dos plasmídeos com os “primers” pCambNS1s e pCambNS1as. O produto da PCR dos plasmídeos derivados das bactérias transformadas gera na análise em gel de agarose uma banda de 1055 pb, confirmando a presença do inserto correspondente ao gene NS1.

As sementes de *Nicotiana tabacum* foram desinfestadas para a descontaminação do tecido vegetal a ser utilizado e germinadas em placas de petri descartáveis. Plantas cultivadas *in vitro* com aproximadamente 5 a 6 semanas foram utilizadas como fonte de explantes foliares no processo de transformação de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene codificador da proteína NS1/DENV2. Neste trabalho aproximadamente 400 explantes foliares foram utilizados. De acordo com análise de outros experimentos de transformação já realizados, como Ferreira (1998), Chaudhury *et al.*, (2007), Kim *et al.*, (2007), Shrawat *et al.*, (2007), o aumento da taxa de transformantes ocorre pelo aumento dos eventos de transformação, ou seja, quanto mais

explantes forem submetidos ao processo de transformação, maior será a quantidade de transformantes obtidos.

Após 30 dias da transformação, os brotos foram individualizados e transferidos para potes de vidro contendo meio MS₀ sólido para promover o enraizamento e alongamento das plântulas. Dos 400 explantes de *Nicotiana tabacum* que passaram pelo processo de transformação, 80 brotos foram individualizados. Foi observado o crescimento lento dos possíveis transformantes em relação ao controle, que foi um forte indício da ocorrência do processo de transformação genética, que já foi demonstrado por Coutinho (2005).

Dentre as técnicas para a detecção da transformação de *Nicotiana tabacum* foi realizada a extração do DNA vegetal e PCR do DNA obtido das plantas cultivadas. O DNA genômico de *N. havana* foi extraído tanto de plantas submetidas ao processo de transformação genética (80 plantas), quanto daquelas que não foram submetidas. O produto da PCR do DNA vegetal derivado das plantas transformadas gerou na análise em gel de agarose uma banda de 1055 pb, confirmando a presença do gene correspondente a proteína NS1. Com este resultado pode-se comprovar a integração do gene da proteína NS1/DENV2 ao genoma vegetal. De 400 explantes utilizados na transformação, originaram-se 80 plantas, onde 16 plantas foram confirmadas quanto à presença do gene da proteína NS1; com esses resultados podemos afirmar que a eficiência de transformação foi de 4%. O ideal é que somente transformantes verdadeiros sejam regenerados. Entretanto, segundo Lewin (2000), os sistemas de seleção não são, em geral, totalmente eficientes e alguns “escapes” podem ocorrer. “Escapes” são plantas não-transformadas que, apesar de não expressarem o gene marcador de seleção conseguem regenerar na presença do agente de seleção.

Outras análises moleculares foram realizadas para detectar a transcrição do gene da proteína NS1, como extração do RNA vegetal e RT-PCR. Conforme observado, o produto da RT-PCR derivado das plantas transformadas gerou na análise em gel de agarose uma banda de 1055 pb, comprovando que o gene da NS1 foi inserido no genoma vegetal e está sendo transcrito.

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para a continuação dos experimentos para obtenção de um antígeno em grande quantidade e qualidade a ser utilizado no desenvolvimento de vacinas e kits de diagnóstico da dengue.

Análises subseqüentes deverão ser realizadas para verificar a expressão da proteína NS1 e sua purificação. Após a obtenção, o antígeno deverá ser analisado para verificar sua imunogenicidade e testado nos diferentes métodos de detecção, como o MAC-ELISA e o ELISA. As contribuições destes resultados poderão ser verificadas indiretamente no controle da dengue, 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.

6- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- As colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas e selecionadas contém o plasmídeo pCAMBIA 3301/NS1;
- Após extração de DNA celular vegetal verificou-se que as plantas *Nicotiana tabacum* apresentaram a integração do gene codificador da proteína NS1 em seu genoma, confirmando a transformação das mesmas;
- Após a extração do RNA total dos tecidos vegetais detectou-se a transcrição do gene codificador da proteína NS1/DENV-2 nas plantas transformadas.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANDARAO, R., SWAMINATHAN, S., JANA, A.M., KHANNA N. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. **Protein Expression and Purification**, 41: 136-147. 2005.
- ANDRADE, G.M., SARTORETTO, L.M., BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, 28: 465-476. 2003.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue fever: a call for local, national, and international action. **Lancet**, v.372:205. 2008.
- BARRETO, F. R. TEIXEIRA, M. G., COSTA, M. C. N., CARVALHO, M. S., BARRETO, M. L. Spread pattern of the first dengue epidemics in the City of Salvador, Brazil. **BMC Public Health**, v.8, n.1, p.51. 2008.
- BARTA, A., SOMMERGRUBER, K., THOMPSON, D., HARTMUTH, K., MATZKE, M. A., MATZKE, A. J. M. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. **Plant Molecular Biology**, 6, 347–357. 1986.
- BISHT, H., CHUGH, D.A., SWAMINATHAN, S., KHANNA, N. Expression and purification of dengue virus type 2 envelope protein as a fusion with hepatitis B surface antigen in *Pischia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 23: 84-96. 2001.
- BLAIS, D.R., ALTOSAAR, I. Human CD14 Expressed in seeds of transgenic tobacco displays similar proteolytic resistance and bioactivity with its mammalian-produced counterpart. **Transgenic Research**, 15: 151-64. 2006.
- BLOCK, M., The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica*, 71:1-14. 1993.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Plano Nacional de controle da dengue. **Ministério da Saúde**: Brasília. 2002.
- BRASILEIRO, A.C.M., CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa - SPI / Embrapa - Cenargen, 309p. il. 1998.
- BRICKS, L.F. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatria**, 26: 268-281. 2004.
- CHAUDHURY, D., S. MADANPOTRA, JAIWAL, R., SAINI,R., KUMAR, P. A., JAIWAL, P. K. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. **Plant Science**, 172, 692–700. 2007.

CHUNGUE, E., MARCHÉ, R., PLICHART, R., BOUTIN, J.P. and ROUX J. Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and hemagglutination inhibition (HI) test for the detection of dengue antibodies. Prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 83: 708-711. 1989.

COUTINHO, C. Regeneração e infecção por *Agrobacterium tumefaciens* em explantes de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. SR1. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

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

DUTRA, R.D., PAULA. M.B., OLIVEIRA. D.M., OLIVEIRA, L.L., DE PAULA. S.O. The laboratorial diagnosis of dengue: Applications and implications. **Journal of Global Infections Diseases**, 1: 38-44.2009.

FERREIRA, A.T. Transformação de batata (*Solanum tuberosum* L. cvs. Baronesa e Macaca) via *Agrobacterium tumefaciens* visando à obtenção de plantas resistentes ao vírus do enrolamento das folhas (PLRV). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 1998.

FISCHER, R., STOGER, E., SCHILLBERG, S., CHRISTOU, P., TWYMAN, R.M. Plant-based production of biopharmaceuticals. **Current Opinion in Plant Biology**, 7: 152-158. 2004.

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

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, 11:480-496. 1998.

GUBLER, D.J., SATHE R. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. In A Homma and JF Cunha (ed.), **Proccedings of the international symposium on yellow fever and dengue**, pp. 291-322. 1988.

GUZMAN, M.G., KOURI G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 3: 621-627. 1996.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, 370: 1644-52. 2007.

HENCHAL, E.A., PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, 3:376-396. 1990.

HUANG, J., SHU, P., CHEN, L., CHANG, S., YUEH, Y., CHOW, L., CHIEN, J., CHIN, C., YANG, H., LIN, T. Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the

seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. **Journal of Clinical Microbiology**, 40: 1840-1844. 2002.

JAISWAL, S., KHANNA, N., SWAMINATHAN, S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, 33: 80-91. 2004.

KADO, C. I. The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. **Current Opinion in Microbiology** 3:643-648. 2000.

KIM, T., KIM, M.Y., KIM, B. G., KANGA, T.J., KIMA, Y.S., JANG, Y.S., ARNTZENB, C. J., YAN, M.S. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). **Protein Expression and Purification**, 51 (1), 22-27. 2007.

KUMARASAMY, V. WAHAB, A.H. CHUA, S.K., HASSAN, Z. CHEN, Y.K. MOHAMD, M. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen capture-ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. **Journal Virology Methods** 140:75-79. 2007.

LEE, J.M., CROOKS, A.J., STEPHENSON, J.R. The synthesis and maturation of a non structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein. **Journal of General Virology**, 70: 335-343. 1989.

LEI, H.Y., YEH, T.M., LIU, H.S., LIN, Y.S., CHEN, S.H., LIU, C.C. Immunopathogenesis of Dengue virus infection. **Journal of Biomedical Science**, 8: 377-388. 2001.

LEMES, E.M.B., MIAGOSTOVICSH, M.P., ALVES, A.M.B., COSTA, S.M., FILLIPIS, A.M.B., ARMOA G.R.G., ARAUJO, M.A.V. Circulating human antibodies against dengue NS1 protein: potential of recombinant D2V-NS1 proteins in diagnostic tests. **Journal of Clinical Virology**, 32:305-312. 2005.

LEMMER, K., MANTKE, O.D., BAE, H., GROEN, J., DROSTEN, C., NIEDRIG, M. External quality control assessment in PCR diagnostics of dengue virus infections. **Journal of Clinical Virology**, 30: 291-296. 2004.

LEWIN, B. **Genes VII**. Oxford: Oxford University Press, 990 p. 2000.

MA, Y., LIN, S., GAO, Y., LI M., LUO, W., ZHANG, J., XIA, N. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomato and immunoactivity of expression products. **World Journal of Gastroenterology**, 9: 2211-2215. 2003.

MALAVIGE, G.N., FERNANDO, S., FERNANDO, D.J., SENEVIRATNE, S.L. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, 80: 588-601. 2004.

McGARVEY, P.B., HAMMOND, J., DIENELT, M.M., HOOPER, D.C., FU, Z.F., DIETZSCHOLD, B., KOPROWSKI, H., MICHAELS, F.H. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. **Nature Biotechnology**, 13: 1484-1487. 1995.

MONATH, T.P., HEINZ, F.X. Flaviviruses. In: **Fields Virology**, 3th ed., (B.N. Fields, B.M. Knipe, P.M. Howley, eds), p. 961-1034. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996.

NOISAKRAN, S., DECHTAWEW, T., RINKAEWKAN, P., PUTTIKHUNT, C., KANJANAHALUETHAI, A., KASINRERK, W., SITTISOMBUT, N., MALASIT, P. Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. **Journal of Virological Methods**, 142: 67-80. 2007.

OISHI, K., SAITO, M., MAPUA, C.A., NATIVIDAD, F.F. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 13: 125-133. 2007.

OGAWA, Y.; MII, M. Meropenem and moxalactam: Novel b-lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Science**, 172 , 564–572. 2007.

OHMANN, H.B., BEASLEY, D.W., FITZPATRICK, D.R., AASKOV, J.G. Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. **Journal of General Virology**, 78: 2723-2733. 1997.

PLETNEV, A.G., BRAY, M., LAI C.J. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: Effects of mutations on neurovirulence in mice. **Journal of Virology**, 67: 4956-4963. 1993.

PUGACHEV, K.V., GUIRAKKO, F., TRENT, D.W., MONATH, T.P. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. **International Journal for Parasitology**, 33: 567-582. 2003.

RICE C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: **Fields Virology**, 3th ed., (B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, eds), p. 931-959. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996.

RIO DE JANEIRO. Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil. Relatório de casos de dengue – 2008. Disponível em: http://www.saude.rj.gov.br/Acoes/Dengue_estado.shtml. Acesso em: 1º out. 2008.

ROMMENS, C. Kanamycin resistance in plants: an unexpected trait controlled by a potentially multifaceted gene. **Trends in Plant Science**, 11: 317-319. 2006.

RUSSELL, P.K., BRANDT, W.E, DALRYMPLE, J.M. Chemical and antigenic structure of Flaviviruses. In **The Togaviruses: Biology, Structure, Replication**, pp: 503-529. Edited by R.W. Schlesinger. New York: Academic Press. 1980.

SAEJUNG, W., FUJIYAMA, K., TAKASAKI, T., ITO M., HORI, K., MALASIT, P., WATANABE, Y., KURANE, I., SEKI T. Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. **Vaccine**, 25: 6646-6654. 2007.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491. 1988.

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

SCOTTI, N., ALAGNA, F., FERRAILOLO, E., FORMISANO, G., SANNINO, L., BUONAGURO, L., DE STRADIS, A., VITALE, A., MONTI, L., GRILLO, S., BUONAGURO, F. M., CARDI, T. High-level expression of the HIV-1 Pr55gag polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. **Springer-Verlag**, v.229. p.1109–1122. 2009.

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

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

SOUTHGATE, E. M., DAVEY, M. R., POWER, J. B., WESTCOTT, R. J. A Comparison of Methods for Direct Gene Transfer into Maize (*Zea mays* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 218-224. 1998.

TAPIA-CONYER, R., MENDEZ-GALVAN, J.F., RINCON, H. The growing burden of dengue in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, 46: 53-56. 2009.

TEIXEIRA, M. G., BARRETO, M. L. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciência & Saúde Coletiva**, 1:122-35.1996.

TEIXEIRA, M.G, BARRETO, M.L, GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.8, n.4, p.5-33. 1999.

TZFIRA, T., CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, 17:147–154. 2006.

VALLE, J.R., ANGEL, R.M. Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligant. **Journal of Virological Methods**, 116: 95-102. 2004.

VASUDEVAN, A., SELVARAJ, N., GANAPATH, A., CHOI, C.W. *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). **American Journal of Biotechnology and Biochemistry** 3, 1: 24-32, 2007.

VEENA, J. H., DOERGE, R. W., GELVIN, S. B. 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. 2003.

VORDAM, V., KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections, pp. 313-334. *In* D.J. Guber and G. Kuno (ed.), **Dengue and dengue hemorrhagic fever – 1997**. CAB International, London, United Kingdon. 1997.

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