



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA MOLECULAR

Tese de Doutorado

**Expressão de antígeno tetra-epitopo do vírus Dengue em
cloroplastos de alface e avaliação do seu potencial diagnóstico
para detecção de anticorpos IgG contra os quatro sorotipos
da Dengue**

Franciele Roberta Maldaner

Brasília, 2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA MOLECULAR

**Expressão de antígeno tetra-epitopo do vírus Dengue em
cloroplastos de alface e avaliação do seu potencial diagnóstico
para detecção de anticorpos IgG contra os quatro sorotipos
da Dengue**

Franciele Roberta Maldaner

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Co-orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão

Colaboradora: Dra. Flávia Barreto dos Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília, 2013

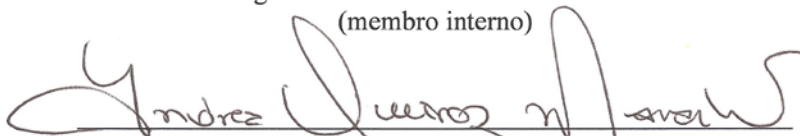
Tese de autoria de Franciele Roberta Maldaner, intitulada “Expressão de antígeno tetra-epitopo do vírus Dengue em cloroplastos de alface e avaliação do seu potencial diagnóstico para detecção de anticorpos IgG contra os quatro sorotipos da Dengue”, apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, em 12 de março de 2013, aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:



Dr. Tatsuya Nagata
Patologia Molecular/Universidade de Brasília
(Orientador)



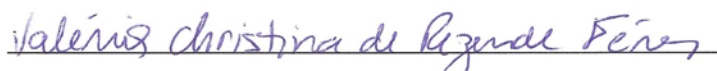
Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Patologia Molecular/Universidade de Brasília
(membro interno)



Dra. Andrea Queiroz Maranhão
Patologia Molecular/Universidade de Brasília
(membro interno)



Dr. Nicolau Brito da Cunha
Embrapa- Cenargen
(membro externo)



Dra. Valéria Christina de Rezende Féres
Faculdade de Farmácia /Universidade Federal de Goiás
(membro externo)

Dra. Paula Andreia Silva
Ciências Genômicas e Biotecnologia/Universidade Católica de Brasília
(suplente)

Brasília, 2013

Dedicatória

A minha família que é a raiz do meu ser, ao meu marido meu grande companheiro e amor, vocês foram meus maiores incentivadores...

Aos grupos de pesquisa da UnB, Embrapa/ Cenargen e Fiocruz-RJ, convivemos e trabalhamos juntos por quatro anos, vocês sabem bem o significado desta conquista...

Agradecimentos

Meus agradecimentos são a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho:

A minha família:

Vocês sempre fizeram com que eu entendesse a importância do estudo em minha vida, sempre apoiando e ajudando no que puderam. Hoje a realização desse sonho também é de vocês, muito obrigada, amo vocês.

Ao meu marido:

Querido, você sempre me apoiou, incentivou, compreendeu e muitas vezes me consolou nos momentos de dificuldade... Você foi a pessoa que acompanhou de perto todas as dificuldades e alegrias dos objetivos alcançados, muitas vezes mesmo sem entender do que se tratava... Muito obrigada por todo o amor, companheirismo e paciência, você tornou a realização desse trabalho mais fácil, te amo.

Aos meus orientadores:

Ao Dr. Tatsuya Nagata que me acolheu desde o mestrado e sempre acreditou no meu potencial para a concretização desse trabalho, sabemos que houve dificuldades, mas conseguimos superar todas e colhemos bons resultados; obrigada pela certa autonomia na decisão dos meus experimentos isso me fez crescer muito... Agradeço pela confiança.

Ao Dr. Francisco Aragão que foi além de um co-orientador, ajudando a desenvolver esse trabalho, sua parceria e orientação foram cruciais.

A Dra. Flávia dos Santos, que orientou a parte sorológica do trabalho; sua colaboração foi fundamental na reta final do trabalho, sem ela não teríamos como avaliar o antígeno e finalizar a pesquisa.

A vocês três preciso dizer que foram além de orientadores, realmente me senti muito bem acolhida por vocês três e seus grupos. Se hoje tenho certeza que amo fazer pesquisa, mesmo com todas as barreiras e dificuldades, grande parte disso se deve a vocês. Obrigada pelos conhecimentos ministrados, pela confiança, paciência, incentivo e certa autonomia que permitiram que eu aprendesse com erros e acertos. Hoje sei que quero seguir e crescer na área de pesquisa, por toda a orientação, conhecimentos ministrados, companheirismo e amizade, muito obrigada.

Aos colegas dos grupos de pesquisa da UnB, Embrapa e Fiocruz:

Sem dúvida nenhuma o companheirismo, amizade e cumplicidade de muitos de vocês facilitaram muito a jornada de trabalho! Tive a sorte de trabalhar com três grupos, dos quais não tenho como dizer em qual me senti mais à vontade... Dividimos as alegrias de um experimento que deu certo e a frustração de outro que deu errado... Sei que muitos torceram por mim, e alguns como a Raquel, a Daniele e a Monique ajudaram diretamente na execução dos experimentos, um agradecimento especial a vocês. A todos os colegas do laboratório de virologia da UnB, do LTG da Embrapa e do laboratório de Flavivírus da Fiocruz, obrigada por tudo. Thaís um obrigada especial a você por toda ajuda com a tese, e pelas suas palavras de incentivo que vieram na hora certa e me tranquilizaram muito.

Preciso agradecer também aos meus primeiros orientadores, José Marcus Sócrates Teixeira, e Lidia Maria Pinto Lima, que ajudaram a despertar em mim o primeiro interesse e empolgação pela pesquisa, hoje grandes amigos; é muito bom e gratificante ver o entusiasmo de vocês com o meu progresso.

Finalizando, agradeço ao Departamento de Patologia Molecular da UnB pela oportunidade de cursar o doutorado, ao CNPq pelo auxílio financeiro e a banca avaliadora que aceitou fazer parte da finalização desse trabalho.

*“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis,
é preciso buscar o que só pode ser
alcançado por meio dos maiores
esforços”.*
Albert Einstein

*"Pesquisar é ver o que outros viram, e
pensar o que nenhum outro pensou."
(Albert Szent-Gyorgyi)*

RESUMO

A Dengue hoje está presente em mais de 100 países, causando aproximadamente 100 milhões de casos da doença. O diagnóstico laboratorial é de fundamental importância, devido a semelhança de sintomas confundidos com outras doenças como a Febre amarela, Sarampo, Rubéola e Influenza. Técnicas sorológicas como o ELISA são amplamente empregadas para o diagnóstico, entretanto, devido ao uso de extrato bruto viral como fonte de antígeno, ocorrem problemas de reações cruzadas, variação de qualidade e alto custo de produção. Objetivando a diminuição destes problemas com ensaios convencionais de ELISA, antígenos virais recombinantes têm sido produzidos e utilizados em ensaios diagnósticos. Neste trabalho utilizou-se o sistema de transplastomia em alface para a produção de um antígeno recombinante tetra-epitopo, o que permitiu o emprego do extrato bruto proteico de cloroplastos, sem purificação, na detecção sorológica de anticorpos IgG contra os 4 sorotipos da Dengue. O antígeno tetra-epitopo desenvolvido, compreende a região de epítomos que vai do aminoácido 34 ao 57, entre os domínios I/II da proteína do envelope do vírus. O antígeno é composto pelos sorotipos na ordem 4-3-2-1 unidos por *linker* de 5 glicinas. Na região C terminal adicionou-se cauda de hexa-histidina com o intuito de facilitar a purificação. O ELISA para detecção de IgG, apresentou uma sensibilidade geral de 71%, e especificidade de 100% para soros onde não havia sido determinado a fase e tipo de infecção. Houve diferença de sensibilidade dentre os sorotipos, que foi estimada em 91.6%, 86.6%, 75.0%, e 18,2% para os sorotipos de DENV-1-4, respectivamente. Não observou-se reação cruzada com soros positivos para Febre amarela, Rubéola e Sarampo. Na avaliação com soros pareados, o ELISA revelou uma sensibilidade maior na fase convalescente do que na aguda da doença, tanto para infecções primárias quanto secundárias. A sensibilidade geral para os dois perfis de infecções desconsiderando a fase da doença (aguda ou convalescente), revelou uma sensibilidade geral de 89% para as infecções primárias, e 96% para as infecções secundárias. Quanto à planta transplastômica, esta ainda apresenta um perfil de transformação heteroplásmico. Almeja-se a obtenção de uma planta homoplásmica que provavelmente será obtida através da seleção em meio seletivo.

Palavras-chave: Dengue, planta transplastômica, especificidade, sensibilidade, infecção primária e secundária, fase aguda e convalescente.

ABSTRACT

Currently Dengue occurs in more than 100 countries causing about 100 million cases of Dengue disease per year. Laboratory diagnosis is crucial, because of the similarity of symptoms confused with other diseases such as Yellow Fever, Measles, Rubella and Influenza. Serological techniques as ELISA are widely used for the diagnosis; however, due to the use of crude extract as the viral antigen source, problems may occur as cross-reactions, variation in quality and high production costs. Aiming to decrease these problems with conventional ELISA kits, recombinant viral antigens have been produced and used in diagnostic kits. In this study lettuce transplastomic system was used to produce a recombinant tetra-epitope antigen, which allowed the use of crude protein extract from chloroplasts, without purification, for serological detection of IgG antibodies against the four Dengue serotypes. The tetra-epitope antigen developed, comprising the epitope region of position 34-57 amino acid, which is located between domains I / II of the virus envelope protein. The antigen is composed of serotypes in the following order 4-3-2-1 joined by 5 glycines linkers. In the C terminal region, a hexa-histidine tail was added for purification. The ELISA for detection of IgG in patients' sera, showed an overall sensitivity of 71% and specificity of 100% using sera which had not been determined the phase and type of infection. There was a difference in sensitivity between the serotypes that was estimated around 91.6%, 86.6%, 75.0%, and 18,2%, for DENV 1-4 serotypes, respectively. No cross-reaction was observed with positive sera for Yellow Fever, Rubella and Measles. In evaluation with paired sera, the ELISA showed greater sensitivity in convalescent than in acute phase of disease development for both, primary and secondary infections. The overall sensitivity for the two profiles infections not considering the disease phase (acute or convalescent), revealed 89% for primary infections, and 96% for secondary infections. As for the transplastomic plant, it still has a heteroplasmic transformation profile. Probably the homoplasmic plant may be obtained by selection on selective medium.

Key-words: Dengue, transplastomic plant, specificity, sensitivity, primary and secondary infection, acute and convalescent phase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.0. Sorotipos de DENV circulantes no Brasil por UF em Janeiro de 2012.	17
Figura 1.1. Microscopia eletrônica de DENV.	20
Figura 1.2. Representação do genoma de RNA do vírus Dengue com suas 10 proteínas.	21
Figura 1.3. Proteína de envelope do vírus Dengue.	23
Figura 1.4. Domínios I, II e III da proteína E, e peptídeo de fusão entre os domínios I e II.	33
Figura 3.1. Estratégia de subclonagem do cassete entre NotI e Sall, resultando no pBluescript-NS.	38
Figura 3.2. Etapa de subclonagem do cassete exemplificando a construção contendo o Gene1 E-DI/II de antígeno tetra-epitopo no pRL1001, resultando pRL1001-Gene1 (cE-DI/IIp).	39
Figura 3.3. Placa para bombardeamento contendo folhas de alface com a face adaxial voltada para cima em torno da zona de tiro.	40
Figura 3.4. Esquematização dos iniciadores utilizados na amplificação por PCR.	42
Figura 4.1. Sequencia e modelagem do tetra-epitopo cE-DI/IIp.	48
Figura 4.2. Folha gerada pelo calo transformado com o gene tetra-epitopo.	49
Figura 4.3. Planta transplastômica em meio de enraizamento.	50
Figura 4.4. Eletroforese de gel de agarose apresentando amplificado de aproximadamente 866pb correspondente ao gene tetra-epitopo.	50
Figura 4.5. Eletroforese de gel de agarose mostrando fragmentos amplificados por PCR de plantas de 4ª passagem.	51
Figura 4.6. <i>Western blotting</i> com a proteína alvo marcada com HisTag.	52
Figura 4.7. Avaliação da expressão da protein tetra-epitopo em plantas da F1 de 2ª e 4ª passagem pela técnica de <i>Western blotting</i> com anti-HisTag.	52
Figura 4.8. DOT ELISA de plantas de 3ª passagem utilizando o anticorpo anti-HisTag.	53
Figura 4.9. Figura representando a placa de ELISA com o ensaio onde pré-definiu-se a concentração inicial de antígeno utilizado no ensaio.	54
Figura 4.10. ELISA para pré-padronização da concentração de antígeno e conjugado adotados para padronização das demais variáveis do ensaio.	55

Figura 4.11. ELISA utilizando como solução padrão soro normal de cabra na concentração de 3,5%.	56
Figura 4.12. ELISA utilizando soro normal de cabra como solução padrão com variação dos tempos de incubação das diferentes etapas do ensaio.	57
Figura 4.13. ELISA utilizando soro fetal bovino a 6%.	58
Figura 4.14. ELISA utilizando soro fetal bovino como solução padrão.	58
Figura 4.15. utilizando soro normal de cabra a 10% como solução padrão.	59
Figura 4.16. ELISA avaliando o efeito da diluição em soros de título alto.	60
Figura 4.17. ELISA avaliando o uso de extrato bruto proteico de cloroplasto de planta transformada expressando o antígeno tetra-epitopo e de alface não transformada.	61
Figura 4.18. Representação da placa de ELISA demonstrando os poços sensibilizados com o extrato bruto contendo o antígeno cE-DI/IIp.	63
Figura 4.19. ODs dos soros positivos e negativos para Dengue em seus diferentes subgrupos.	65
Tabela 1: Etapas do ensaio ELISA utilizando soro fetal bovino a 12% como solução padrão e bloqueadora.	58
Tabela 2: Etapas do ensaio ELISA utilizando soro normal de cabra a 10% como solução padrão e bloqueadora na avaliação de soros diluídos 1:20; 1:40 e 1:60.	60
Tabela 3. REC-IgG-ELISA usando extrato bruto de cloroplasto de alface contendo o antígeno recombinante tetra-epitopo da Dengue.	64
Tabela 4. ELISA com os soros pareados dos sorotipos 1-4 de DENV, nas fases aguda e convalescente, para infecção primária e secundária.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µl	Micrograma
µl	Microlitro
BSA	Bovine serum albumin
CDC	Centers for Disease Control and prevention
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DENV	Vírus Dengue
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou Ensaio Imuno-enzimático
F1	Primeira filiação
g	Velocidade de sedimentação gravitacional
g	Gramma
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Horas
HisTag	Cauda de hexa-histidina
IgG	Imunoglobulina G
JEV	Vírus da encefalite Japonesa
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
MAC-ELISA	Ensaio Imuno-enzimático para captura de IgM
ml	Militros
mM	Milimolar
MS	Meio Murashigue-Skoog
ng	Nanogramas
Ni-NTA	Cromatografia por coluna de níquel
NS	Proteína Não estrutural
°C	Graus Celsius
OD	Densidade Óptica
ORF	Leitura de fase aberta
pb	Pares de base
PBS	Tampão de fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Concentração de íon hidrogênio livre
prM	Precursor da proteína de membrana
Proteína C	Proteína do core ou cerne
Proteína E	Proteína do Envelope
Proteína M	Proteína de membrana
REC- IgG ELISA	ELISA para detecção de IgG com antígeno recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa – Reação em cadeia da polimerase
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio -Gel de eletroforese de poli(acrilamida
SHN	Soro Humano Normal
T-DNA	DNA de transferência
UF	Unidade da Federação
UTR	Região não traduzida
VLP	Virus-like particles

WHO
WNV
YFV

Organização Mundial da Saúde
Vírus da Febre do Nilo Oeste
Vírus da Febre amarela

Sumário

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1- Introdução	14
1.1 Origem e aspectos epidemiológicos do Dengue	14
1.2 A doença Dengue	16
1.2.1 Classificação da Dengue	16
1.2.2 Aspectos clínicos e imunopatogênese	16
1.3 O vírus Dengue	17
1.3.2 Genoma	17
1.3.3 Proteína C (<i>core</i> ou <i>cerne</i>)	19
1.3.4 Proteína associada à membrana (M)	20
1.3.5 Proteína do Envelope (E)	20
1.3.6 Proteína não estrutural NS1	21
1.3.7 Proteína não-estrutural NS2a	22
1.3.8 Proteína não estrutural NS2b	22
1.3.9 Proteína não estrutural NS3	22
1.3.10 Proteína não estrutural NS4a	22
1.3.11 Proteína não estrutural NS4b	23
1.3.12 Proteína não estrutural NS5	23
1.4 Diagnóstico laboratorial da Dengue	23
1.4.1 Parâmetros para a validação de um teste sorológico	25
1.5 Uso de plantas transgênicas na produção de biofármacos	25
1.5.1 Transformação genética nuclear	26
1.5.2 Transformação nuclear transiente pelo uso de vetor viral vegetal	27
1.5.3 Transformação cloroplasmática	28
1.6 Justificativa do trabalho	31
2-Objetivo e Metas	33
3-Materiais e métodos	34
3.1 Seleção do peptídeo recombinante e elaboração do modelo	34
3.2 Predição da estrutura proteica e análise estrutural dos epitopos	34
3.3 Transformação de cloroplastos de alfaca	35
3.3.1 Subclonagem da construção em pRL1001 e confirmação da sequência nucleotídica	36
3.3.2 Transformação dos cloroplastos de alfaca	37
3.3.3 Regeneração das plantas	38
3.4 Análise do DNA cloroplasmático por PCR	39
3.4.1 Extração de DNA para análise por PCR	39

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação de transgene	39
3.5 Extração de proteína total, purificação dos peptídeos expressos e análise por <i>Western blotting</i> e <i>DOT ELISA</i>	40
3.6 Padronização do ensaio de ELISA utilizando peptídeo tetra-epitopo purificado	41
3.6.1 Avaliação da antigenicidade do peptídeo tetra-epitopo extrato bruto	42
3.6.2 Amostras de soros utilizados na avaliação da antigenicidade do peptídeo tetra-epitopo em extrato bruto	43
3.6.3 Soros pareados utilizados na avaliação da antigenicidade do peptídeo em extrato bruto	44
3.7 Cálculo para determinação da sensibilidade, especificidade e eficiência do ensaio de ELISA para os 4 sorotipos.	44
4-Resultados	46
4.1 Desenho da proteína recombinante tetra-epitopo (cE-DI/IIp)	46
4.2 Bombardeamento e regeneração da planta de alface transformada	
4.3 Análise da integração gênica por PCR	48
4.4 Análise da proteína cE-DI/IIp expressa em alface por <i>Western blotting</i>	49
4.5 Avaliação da proteína cE-DI/IIp por ELISA	51
4.5.1 REC- ELISA IgG com soros pareados	65
5-Discussão	68
6-Conclusão	75
7- Perspectivas	76
8- Referências bibliográficas	77
9-Anexos	84

1- Introdução

1.1. Origem e aspectos epidemiológicos do vírus Dengue

Acredita-se que o primeiro registro de epidemia causadas pelo vírus Dengue (DENV) tenham ocorrido entre os anos de 1779 e 1788 no Cairo (Egito), Jacarta (Indonésia), Servilha e Filadélfia onde foi descrita uma doença similar a Dengue que foi denominada febre quebra ossos (Henchal e Putnak 1990). O primeiro isolamento de DENV ocorreu na década de 40 por Kimura sendo a estirpe isolada denominada *Mochizuki* (Shu e Huang 2004). No ano de 1945, Sabin e Schlesinger isolaram uma cepa denominada *Hawaii* e no mesmo ano Sabin observou que um vírus isolado por ele em Nova Guiné tinha características antigênicas distintas da cepa *Hawaii*, por isso considerou como um sorotipo distinto, denominando-os respectivamente como sorotipos 1 e 2 (Shu e Huang 2004). Os sorotipos 3 e 4 foram isolados na epidemia de Dengue hemorrágica no sudeste asiático em 1956, definindo-se a partir daí, que o vírus causador da dengue é composto por 4 sorotipos denominados: Dengue-1, Dengue-2, Dengue-3 e Dengue-4, (Chilton 1977) pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*.

A denominação *Flavivirus* vem do latim, *flavus* que significa amarelo e originou-se devido a icterícia ocasionada pelo vírus da Febre amarela (Kuhn et al. 2002). Já a denominação atual da doença é de origem espanhola, e significa melindre, manha, devido ao estado de prostração e moleza, sintomas clássicos da doença (BRASIL 2010). Os maiores picos epidêmicos do DENV ocorreram nos Estados Unidos em 1922, na Austrália em 1925-1926, em 1942 na Grécia e no Japão em 1942-1945. A epidemia de Dengue nos EUA em 1922 afetou cerca de 1 a 2 milhões de pessoas. No sudeste asiático onde existem os quatro sorotipos do DENV circulantes epidemias de Dengue são responsáveis por centenas de milhões de casos da doença a cada ano (Henchal e Putnak 1990).

A forma clínica mais grave da doença, a Dengue hemorrágica, surgiu logo após a segunda guerra mundial, quando uma nova doença associada ao DENV surgiu em áreas endemicamente infestadas pelo *Aedes aegypti*, do sudeste da Ásia. Esta tinha sintomas mais acentuados que a febre clássica do DENV e acometia principalmente crianças (Holmes e Twiddy 2003). O primeiro surto de Dengue hemorrágica documentado ocorreu na Manila (Filipinas) em 1953/1954 e foi seguido por uma epidemia em Bangkok (Tailândia) em 1958 (Holmes e Twiddy 2003). A febre hemorrágica da Dengue permaneceu no sudeste da Ásia exclusivamente até 1960, quando se tornou endêmica também na América Central e do Sul

(Kuhn, et al. 2002). Atualmente a Dengue está presente em mais de 100 países, abrangendo Américas, sudeste da Ásia, Pacífico ocidental e mediterrâneo oriental e principalmente nas áreas rurais da África (WHO 2011).

A Dengue no Brasil teve início com a introdução do mosquito vetor do vírus, *Aedes aegypti*, que ocorreu juntamente com o tráfico de escravos oriundos da África (Miagostovich, et al. 2002), a partir de quando tiveram início epidemias expressivas no Rio de Janeiro (1846, 1922 e 1923), São Paulo (1851, 1853 e 1916) e Curitiba (1917) (Miagostovich, et al. 2002). Em 1955, devido à campanha iniciada por Oswaldo Cruz em 1904, houve a erradicação do mosquito transmissor do vírus *Aedes aegypti*, contudo em 1981 a doença voltou a acometer o país quando surtos de DENV-1 e DENV-4 ocorreram na região Norte, em Roraima. Em seguida em 1986, um surto de grandes proporções causado por DENV-1 ocorreu na região metropolitana do Rio de Janeiro e dispersou-se para as regiões Nordeste e Centro-Oeste do Brasil (Figueiredo 2000). Em 1990, um novo surto ocorreu no Rio de Janeiro, onde houve a introdução de DENV-2 (Chambers, et al. 1990). Após 28 anos sem registro do sorotipo 4 em território brasileiro, em 2010, este foi identificado em Roraima (Melo 2012). Desde 2010, como observado na figura 01, tem-se os 4 sorotipos do DENV circulantes no Brasil.

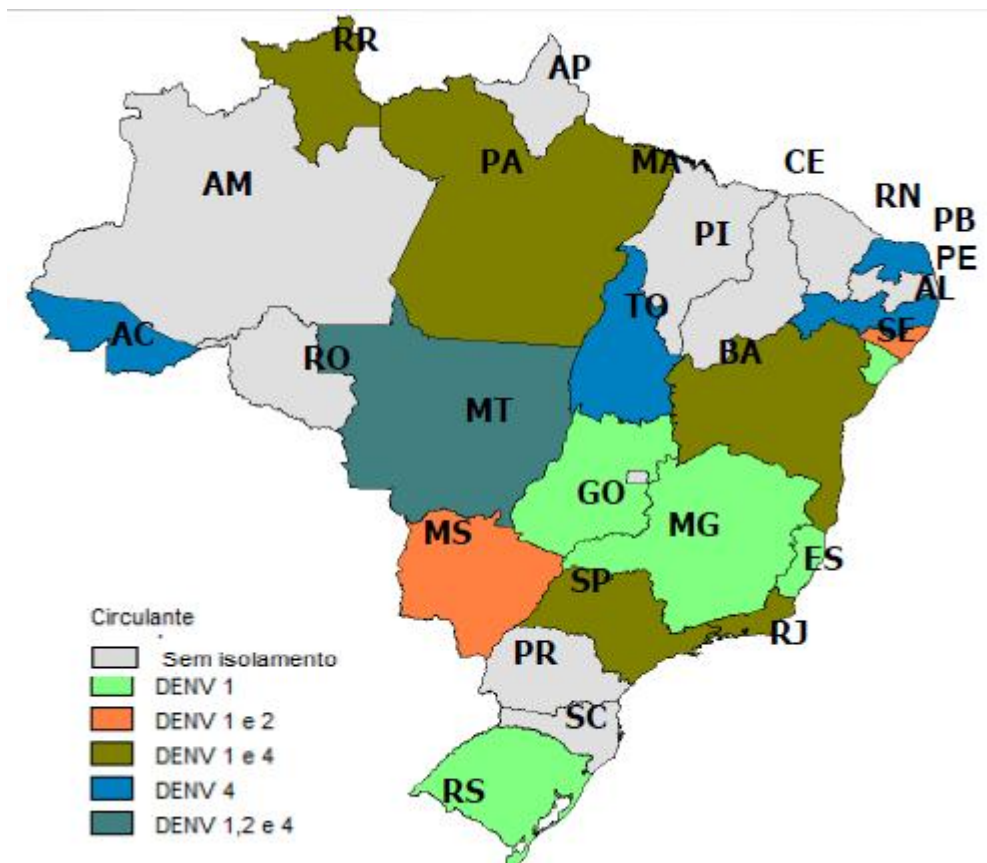


Figura 1.0 - Sorotipos de DENV circulantes no Brasil por UF em Janeiro de 2012. Fonte: http://www.dengue.org.br/dengue_mapas.html, acessado em setembro de 2012.

1.2 A doença Dengue

1.2.1 Classificação da Dengue

No ano de 2009, a Organização mundial da saúde (WHO 2009), decidiu rever os critérios de classificação da Dengue adotados desde 1997. A classificação de 1997 dividia os sintomas clínicos da doença em febre indiferenciada, febre da Dengue e febre hemorrágica da Dengue (WHO 2009), entretanto, existiam casos com sintomas clínicos considerados graves que não se encaixavam nos critérios de classificação da Dengue hemorrágica, que seria a forma grave da doença. A proposta de classificação de 2009 e que possivelmente será adotada, divide à Dengue em forma grave e forma não grave. A forma não grave abrange um conjunto de sintomas com ou sem sinais de alerta, que incluem dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluídos, sangramento da mucosa, letargia, aumento hepático e rápida queda das plaquetas. A forma grave caracteriza-se principalmente pelo grave extravasamento plasmático seguido de choque, com sangramento e danos a órgãos como fígado, pulmão e coração (WHO 2009).

1.2.2 Aspectos clínicos e imunopatogênese

Logo após o hospedeiro ser picado por um mosquito virulífero, o DENV é transmitido e disseminado para órgãos como fígado, baço, nódulos linfáticos e medula óssea, podendo atingir coração, pulmão e trato gastrintestinal (dos Santos, et al. 2004). A infecção primária por qualquer um dos 4 sorotipos geralmente ocorre na forma não grave da doença (AnandaRao, et al. 2005), e pode ainda ser assintomática. Após a infecção primária por um dado sorotipo, normalmente não ocorre reinfecção pelo mesmo sorotipo, de forma que uma infecção secundária deve ser causada por um sorotipo distinto do causador da infecção primária (Wu, et al. 2003).

Uma infecção secundária ou infecções sequenciais por mais de um sorotipo do DENV podem apresentar sintomas mais severos (Chen, et al. 2007), que podem levar a forma grave da doença, principalmente porque os anticorpos produzidos numa infecção primária não

conferem proteção cruzada para os demais sorotipos (Kuhn, et al. 2002; Chen et al. 2003; Wu, et al. 2003).

Provavelmente a resposta imunológica característica da Dengue hemorrágica ocorra inicialmente com o recrutamento de monócitos, macrófagos e células dendríticas como resposta ao complexo viral (Chen et al. 2003; Wu et al. 2003). Essas células constituem o principal sítio de replicação viral e devido a sua destruição, novos imunocomplexos são liberados e esse é provavelmente o fator responsável pelo aumento da intensidade da resposta imunológica. Durante a infecção após a destruição das células imunológicas ocorre a liberação de citocinas e quimiocinas, com consequente ativação do sistema complemento e ativação de células B de memória (Chen et al. 2007). A liberação de citocinas e quimiocinas pode desencadear o extravasamento de plasma, seguido por coagulação intravascular, diminuição do volume sanguíneo e choque hipovolêmico (dos Santos et al. 2004).

Na reinfecção por um segundo sorotipo do DENV os anticorpos produzidos contra o sorotipo que infectou primariamente, não neutralizam todos os vírus (dos Santos et al. 2004), ocorre então uma reação fraca devido à inespecificidade da reação cruzada, ou ainda formam-se baixos títulos de anticorpos que são insuficientes para combater a infecção (Wu et al. 2003; Chen et al. 2007). A severidade do quadro clínico depende ainda do sorotipo de DENV infectante, do grau de viremia e do histórico genético do hospedeiro (Chen et al. 2007).

1.3 O vírus Dengue

1.3.1 Genoma

O vírion do DENV apresenta morfologia esférica variando de 40-60 nm de diâmetro (Fig 1.1). O nucleocapsídeo apresenta aproximadamente 30nm de diâmetro (Kurane 2007) sendo coberto por um envelope lipídico que apresenta aproximadamente 10 nm de profundidade (Henchal e Putnak 1990). Este envelope lipídico no vírion maduro, é composto por um camada bilipídica formada por duas proteínas associadas, as proteínas E e M (Kurane 2007) (Fig 1.3).

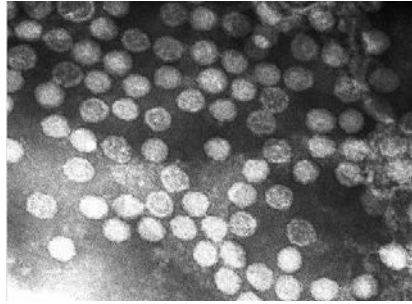


Figura 1.1: Microscopia eletrônica de DENV- 2. Fonte: Fiocruz

Como os demais *Flavivirus* os DENV apresentam genoma de RNA fita simples positiva, de aproximadamente 10.700 nucleotídeos (Kuhn et al. 2002) com uma fase de leitura aberta (*Open Reading Frame-ORF*) que codifica um precursor poliproteico de cerca de 3400 resíduos de aminoácidos. O RNA viral apresenta CAP na região 5' terminal e na região 3' não há a presença de cauda poli-A (Henchal e Putnak 1990). O vírion é composto por três proteínas estruturais importantes: A proteína C que compõe o *core* ou cerne (100 aminoácidos de extensão), a proteína M de membrana (75 aminoácidos de extensão) e a proteína E constituinte do envelope (495 aminoácidos de extensão) (Kuhn et al. 2002). O vírus apresenta ainda sete proteínas não estruturais denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Kurane 2007). Os vírus em estado imaturo localizam-se no espaço intracelular e estes possuem como característica a presença da proteína prM (estado imaturo da proteína M), precursora da proteína M de membrana. Os genes que codificam as proteínas estruturais do DENV estão localizados na extremidade 5', do genoma e compõe aproximadamente um quarto da capacidade codificante do RNA viral. A ordenação dos genes codificantes das proteínas estruturais a partir do terminal 5' é C, prM, E (Henchal e Putnak 1990) (Fig 1.2).

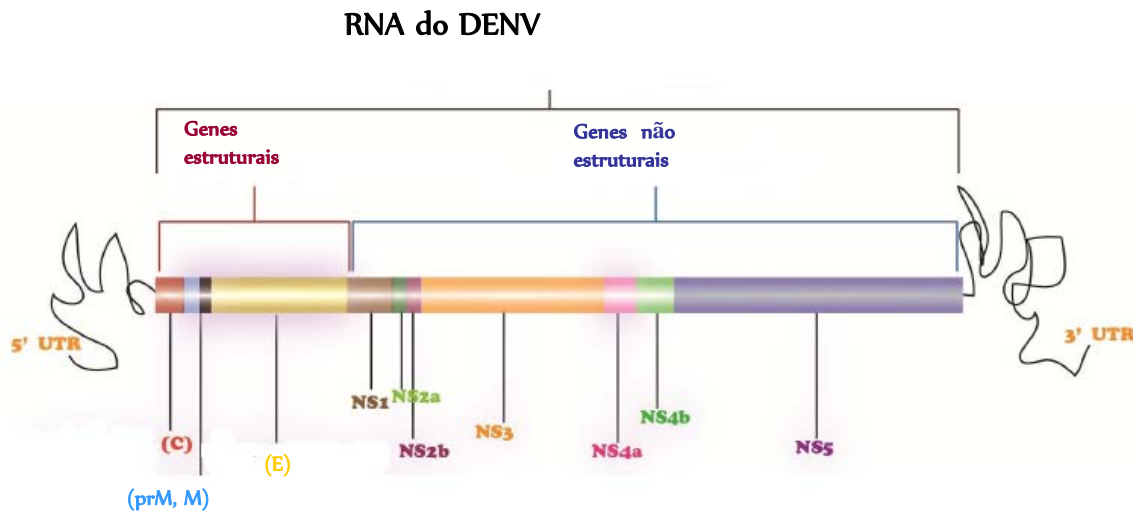


Figura 1.2: Representação do genoma de RNA do vírus Dengue com suas 10 proteínas. No sentido 5'-3': 5' UTR: região não traduzida 5'; C: proteína estrutural do core; prM e M: proteínas de membrana em seu estado imaturo prM e Maduro M; E: proteína de envelope; NS1 proteína não estrutural NS1; NS2a proteína não estrutural NS2a; NS2b proteína não estrutural NS2b; NS3 proteína não estrutural NS3; NS4a proteína não estrutural NS4a; NS5 proteína não estrutural NS5; 3' UTR: região não traduzida 3'. Adaptado de Idrees e Ashfaq 2012.

O precursor proteico codificado pelo genoma e representado na figura 1.2 é um polipeptídeo único e longo. Uma vez traduzida a poliproteína é clivada em componentes proteicos pela ação de proteases virais e celulares. O nucleocapsídeo parcialmente montado oriundo do retículo endoplasmático, apresenta-se como um envelope que contém uma membrana lipídica formada pelas glicoproteínas E e prM. As partículas imaturas são então transportadas pela via secretora celular, onde a protease celular furina cliva prM, liberando o peptídeo “pr” para a formação de vírions maduros (Li et al. 2008).

1.3.3 Proteína C (*core* ou *cerne*)

Durante o processo de tradução o primeiro polipeptídeo a ser sintetizado é a proteína C de peso molecular de aproximadamente 13,5 kDa. Esta é uma proteína rica em arginina (cerca de 25% de sua composição), o que possibilita sua interação com o RNA viral devido ao caráter básico. Os aminoácidos que compõe a região carboxi-terminal desta proteína apresentam caráter hidrofóbico, provavelmente agindo como sinal para o precursor prM. O precursor prM posteriormente é clivado em seu domínio N-terminal por provável sinalização da célula hospedeira. A clivagem do domínio hidrofóbico da proteína C ocorre provavelmente

por uma protease codificada pelo vírus antes da maturação viral ser completada (Vasilakis et al. 2008).

1.3.4 Proteína associada à membrana (M)

A proteína associada à membrana (M), em sua forma clivada do peptídeo “pr” é uma glicoproteína que atua como uma parte do nucleocapsídeo e associa-se a proteína de envelope para formar os vírions maduros (Idrees e Ashfaq 2012). Na forma imatura do vírus encontra-se associada ao peptídeo “pr”. A clivagem proteolítica específica do precursor prM (27-31kDa) ocorre no passo final de montagem do vírion dentro do complexo de Golgi, por ação da protease furina (Vasilakis et al. 2008). Após essa clivagem completa-se o processo de maturação viral com a formação da proteína M de 8kDa (Henchal e Putnak 1990) e liberação do peptídeo “pr”. Por meio de estudo de cristalografia de Raio X, constatou-se que o peptídeo “pr” encontra-se estendido linearmente sobre a superfície da proteína E de envelope (Li et al. 2008).

O processo de maturação viral é necessário para manter a estabilidade do vírus durante a transferência do mesmo para nova célula, o peptídeo “pr” protege vírions imaturos da fusão prematura com a membrana hospedeira, pois em pH neutro a ação da furina celular é impossibilitada, uma vez que nessa situação o sítio da furina localizado no domínio II da proteína E, onde está fusionada a proteína M (ou prM no estado imaturo) fica inacessível a esta protease e a clivagem ocorre apenas em pH ácido. Com a clivagem do peptídeo “pr” e diminuição do pH, a estrutura da proteína E é alterada de trímero prM-E para o dímero M-E e caracteriza o estado maduro do vírion (Li et al. 2008).

1.3.5 Proteína do Envelope (E)

A proteína de envelope (E), a última proteína estrutural a ser traduzida, é constituída por um domínio solúvel, uma região tronco ou central e um domínio transmembrana (Li et al. 2008). Apresenta-se em diferentes estados oligoméricos: como um trímero composto por prM-E em partículas imaturas, como um dímero M-E em partículas maduras e novamente como um trímero quando fusionada com a célula hospedeira (Li et al. 2008).

Estudos realizados por métodos imunológicos de cristalografia de raio X da porção extra membrana dimérica da proteína E de diferentes *Flavivirus* incluindo Dengue, identificaram três domínios antigênicos distintos (domínios I, II e III) compondo a proteína E (Kuhn et al.

2002; Volk et al. 2007; Li et al. 2008), sendo o domínio I estrutural, o II de dimerização e responsável pela ligação entre os domínios I e III, e o III o domínio de ligação a receptores celulares (Idrees e Ashfaq 2012). A proteína E encontra-se arranjada em dímeros na superfície do vírus e o domínio III projeta-se salientemente na superfície viral (Kuhn et al. 2002; Volk et al. 2007). As interações entre as cinco subunidades do domínio III formariam poros na superfície do vírion onde receptores de anticorpos poderiam se ligar. Após sua ligação na célula e encapsulação endossomal, a baixa de pH induziria uma mudança estrutural expondo os peptídeos fundidos no domínio II, logo após esse evento vírus e endossomo se fundem e o RNA viral é liberado no citoplasma celular (Volk et al. 2007).

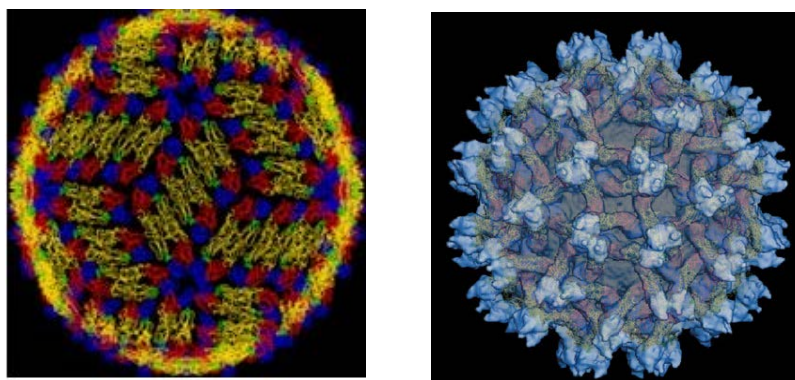


Figura1.3: Proteína de envelope do vírus Dengue. Em vermelho domínio I, em amarelo domínio II e em azul domínio III. Fonte: <http://www.purdue.edu/UNS/html4ever/020307.Kuhn.dengue.html>

A proteína E é glicosilada e desempenha papel fundamental na ligação a receptores celulares e fusão com a membrana celular. Essa proteína contém a maioria dos epítomos reconhecíveis por anticorpos neutralizantes (Hiramatsu et al. 1996; Kurane 2007; Vasilakis et al. 2008), o que gera um aumento na produção de anticorpos e desencadeia memória imunológica (Vasilakis et al. 2008). Como já citado, a proteína E contém epítomos específicos do DENV e também inespecíficos comuns aos demais *Flavivírus* e, por apresentar uma função primordial na indução da imunidade protetora, tem sido uma das proteínas de *Flavivírus* mais estudada nos últimos anos (Hiramatsu et al. 1996; Kurane 2007).

1.3.6 Proteína não estrutural NS1

A proteína não estrutural NS1 (46kDa) é transportada na superfície de células servindo como alvo de anticorpos durante a infecção (Idrees e Ashfaq 2012). Sua síntese ocorre no retículo endoplasmático como uma glicoproteína monomérica e hidrofílica, porém, logo é processada em um dímero hidrofóbico e segue pelo retículo endoplasmático em direção à

membrana celular, podendo ser secretada para o meio extracelular (Henchal e Putnak 1990). É detectada no soro, do primeiro ao nono dia de infecção (Idrees e Ashfaq 2012) e domínios antigênicos foram definidos nos seus terminais N e C (Chambers et al. 1990).

1.3.7 Proteína não-estrutural NS2a

A proteína NS2a é a principal proteína envolvida nos processos de replicação e montagem viral. Durante a infecção age ainda como inibidor do promotor de transcrição de interferon- β , funcionando como antagonista do mesmo. Outra importante função desta proteína é sua autoclivagem do C terminal de NS1, e sua provável função de sítio de reconhecimento para outras proteases celulares que clivam essa junção NS1/NS2a (Idrees e Ashfaq 2012).

1.3.8 Proteína não estrutural NS2b

A proteína NS2b, age como cofator para a serino-protease de NS2b/NS3. Ela é requerida para a clivagem de NS2a/NS2b, e NS2b/NS3. É uma proteína hidrofóbica em sua maior constituição, entretanto, apresenta um domínio hidrofílico circundado por regiões hidrofóbicas, essencial para sua atividade de protease (Idrees e Ashfaq 2012).

1.3.9 Proteína não estrutural NS3

NS3 é a segunda maior proteína não estrutural, apresenta importante atividade de serino-protease no seu terminal N e de NTPase, RNA trifosfatase e helicase, no terminal C. Está envolvida no processamento da poliproteína e replicação do RNA viral, (Vasilakis et al. 2008).

1.3.10 Proteína não estrutural NS4a

NS4a forma um dos componentes que mantém a ligação do complexo de replicação viral à célula. Apresenta no terminal C uma região hidrofílica que serve como sinal para o translocação de NS4b ao lúmen do retículo endoplasmático. Apresenta ainda funções na regulação da replicação e rearranjo de membrana (Idrees e Ashfaq 2012).

1.3.11 Proteína não estrutural NS4b

NS4b regula a replicação do RNA interagindo com NS3. Acredita-se também que possa estar envolvida no bloqueio da sinalização de interferon atuando como inibidor (Vasilakis et al. 2008; Idrees e Ashfaq 2012).

1.3.12 Proteína não estrutural NS5

NS5 possui atividades de RNA-polimerase dependente de RNA (Vasilakis et al. 2008). Apresenta domínio metil-transferase no final do terminal N e um domínio polimerase no terminal C (Idrees e Ashfaq 2012).

1.3.13 Ancoramento e replicação

A ligação do DENV aos seus receptores celulares é mediada pela proteína de envelope (E). Em células de mamíferos os diferentes sorotipos de DENV ligam-se principalmente a receptores de heparina sulfato e manose. Após o ancoramento inicial aos receptores na superfície da célula hospedeira, a partícula viral é fusionada a vesículas ácidas dos lisossomos por endocitose, também mediada por receptores. A partícula viral é então desencapsulada e o RNA liberado na célula hospedeira, quando imediatamente inicia-se a síntese das proteínas virais. Assim, que as proteínas virais essenciais são produzidas, o RNA viral é copiado gerando fitas negativas que são transcritas gerando novas fitas RNA positivas e logo após a infecção, progênes virais são produzidas e liberadas (Idrees e Ashfaq 2012).

1.4 Diagnóstico laboratorial da Dengue

Devido ao fato da Dengue ser uma doença de sintomas genéricos que são facilmente confundidos com um amplo grupo de outras doenças como influenza, enterovirose, sarampo, rubéola, parvovirose, eritema infeccioso, mononucleose infecciosa, hepatites virais, hantavirose e outras flavivirose como a Febre amarela (BRASIL 2007; Melo 2012), o diagnóstico preciso é indispensável para a conduta clínica adequada dos pacientes, evitando assim, o agravamento dos sintomas e evolução do quadro para Dengue hemorrágica (Shu e Huang 2004). Atualmente o diagnóstico laboratorial da Dengue tem sido feito principalmente por testes sorológicos como o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que pode ser empregado na captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA), IgG (IgG-ELISA), ou ainda por ELISA de captura de antígeno NS1 (Lima Mda et al. 2010), bem como por técnicas moleculares como RT-PCR convencional, PCR em tempo real (Fry et al. 2011), além da

técnica de isolamento viral (dos Santos et al. 2004). Como as técnicas moleculares requerem equipamentos especializados, padronização de protocolo e técnicos bem treinados para a realização do ensaio (Fry et al. 2011), o custo deste tipo de detecção torna-se elevado e muitas vezes inviável nos países em desenvolvimento onde a Dengue é endêmica.

No Brasil, o método diagnóstico mais adotado para a Dengue é o teste de ELISA, amplamente utilizado pela vigilância epidemiológica, por ser bastante sensível e de fácil manuseio. Porém este, muitas vezes, apresenta problemas de reações cruzadas com outros *Flavivirus* (Kao et al. 2005; Gomes 2011). Os problemas de reação cruzada, geralmente devem-se a natureza de produção do antígeno usado como insumo na produção do kit de ELISA. A maioria dos ensaios de ELISA comercializados hoje utiliza como fonte de antígeno vírus atenuado produzido em cérebro de camundongo, cultura de células, ou antígeno recombinante produzido em *Escherichia coli* ou outras culturas celulares que necessitam de purificação para o uso diagnóstico (Cuzzubbo et al. 2001; dos Santos et al. 2004; Batra et al. 2011). No caso do uso de vírus atenuado ou antígenos que mimetizam toda a partícula viral, o risco de resultado falso positivo devido a reações cruzadas é considerável (Cuzzubbo et al. 2001; Anandarao, et al. 2006).

O uso de proteínas virais recombinantes representa uma alternativa mais viável economicamente e mais segura em questões de risco biológico (Anandarao et al. 2006; Kurane 2007). No caso do DENV, acredita-se que epítopos da proteína do envelope viral sejam alvos importantes para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos eficientes e vacinas (Goncalvez et al. 2004; Anandarao et al. 2006; Gromowski e Barrett 2007; Lisova et al. 2007).

Nos laboratórios de saúde pública do Brasil hoje, além do ensaio confeccionado pelo laboratório do Instituto Evandro Chagas, PA, utiliza-se no diagnóstico da Dengue o ELISA da *PanBio Diagnostics* produzido na Austrália, o que encarece o diagnóstico principalmente pelas taxas de importação (Hunsperger, 2009). Devido à importância da Dengue no cenário nacional, existe uma demanda urgente por um ensaio diagnóstico nacional barato de boa sensibilidade e especificidade, que garanta o diagnóstico mais próximo ao preciso possível da Dengue, que além de auxiliar na conduta clínica, dará valores reais de prevalência, permitindo uma estimativa correta da doença no país. Com este objetivo, desenvolvemos um ensaio de ELISA que utiliza um antígeno recombinante tetra-epitopo, produzido pela técnica de transplastomia em alface. Este apresentou potencial para detectar os 4 sorotipos da Dengue com diferenças na sensibilidade dentre os sorotipos.

1.4.1 Parâmetros para a validação de um teste sorológico

Os testes sorológicos em desenvolvimento devem ter parâmetros como sensibilidade, especificidade e eficiência avaliados de forma comparativa com um teste de referência. Estes parâmetros permitem dar dados reais e característicos do teste, independente da prevalência da doença na população, sendo que essa avaliação determina a validade intrínseca do teste (Ferreira e Ávila 2001). A sensibilidade do teste é determinada pela probabilidade de pacientes com infecção (previamente confirmada por um teste de referência) terem um resultado positivo com o teste em avaliação. Já a especificidade é a probabilidade de pacientes sem infecção terem um resultado negativo usando o teste em avaliação (Banoo et al. 2010). Outras duas importantes medidas do desempenho do teste são os valores dos verdadeiros positivos, que é a probabilidade dos positivos pelo teste estarem realmente infectados, e dos verdadeiros negativos que são negativos pelo teste e realmente não estarem infectados (Banoo et al. 2010). A eficiência por sua vez, mede a relação entre o somatório dos verdadeiros resultados positivos e verdadeiros resultados negativos com a população estudada (Ferreira e Ávila 2001).

O teste pode ainda ser utilizado para a detecção da real situação da população em relação à doença, onde o desempenho do teste é avaliado em uma dada população, neste caso, avalia-se a validade extrínseca, determinada por parâmetros como reprodutibilidade, acurácia e precisão (Ferreira e Ávila 2001). A reprodutibilidade avalia a obtenção de resultados iguais para a mesma amostra de um mesmo material biológico. Essa avaliação pode ser “intra” teste, quando a repetição do teste ocorre ao mesmo tempo, por ensaio em replicata do mesmo material, ou “inter” teste quando refere-se a aplicação da mesma amostra em testes realizados em dias diferentes e em diferentes laboratórios (Ferreira e Ávila 2001). A acurácia ou exatidão é uma medida geral do desempenho do teste, definida como o percentual de indivíduos os quais, ambos o teste em avaliação quanto o teste de referência obtiveram o mesmo resultado (paciente infectado ou não infectado concordante nos dois testes) (Banoo et al. 2010). A precisão por sua vez, é o parâmetro que determina existir concordância dos resultados quando um mesmo teste é feito várias vezes, medindo, portanto, o erro accidental do método (Ferreira e Ávila 2001). Em nosso ensaio avaliamos a sensibilidade, especificidade, e a reprodutibilidade “intra” teste.

1.5 Uso de plantas transgênicas na produção de biofármacos

A transformação genética é uma ferramenta valiosa da biotecnologia (Malabadi et al. 2011). O uso de plantas transgênicas constitui um sistema barato e seguro de produção de proteínas e que permite a produção em larga escala e conforme a demanda. Por serem organismos eucarióticos as plantas podem expressar proteínas complexas e processá-las pós-traducionalmente de forma similar às células animais, exceto por algumas diferenças no perfil de glicosilação (Scotti et al. 2012). A transformação genética de plantas se dá pela transferência de um gene de interesse dentro do genoma nuclear de forma estável ou transiente, ou para o genoma de uma organela como o cloroplasto (Malabadi et al. 2011; Scotti et al. 2012).

Na produção de biofármacos como insumos diagnósticos, vacinais e anticorpos, a grande vantagem de se utilizar plantas, reside na segurança de produção da proteína alvo que é livre de contaminantes e patógenos animais (Rybicki 2009; Scotti et al. 2012).

1.5.1 Transformação genética nuclear

A transferência de genes para diferentes espécies vegetais é possível pela manipulação de células vegetais por métodos de transformação direta ou indireta. O método indireto é aquele no qual utiliza-se um vetor plasmidial contendo T-DNA (DNA de transferência) do *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes* (Chilton 1977). Entretanto, algumas dicotiledôneas e a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas são pouco suscetíveis a infecção por essa bactéria, e sendo assim, esse método pode não ser tão eficiente (Potrykus 1990). Os métodos de transferência direta utilizam-se de processos físicos ou químicos que modificam paredes e/ou membranas celulares, permitindo a introdução de genes que dispensa o uso de vetores plasmidiais em *Agrobacterium*, ou seja, de agroinfecção. Destes os que resultam em maior eficiência de transformação são a eletroporação de protoplastos, a transformação por polietilenoglicol, e a aceleração de micropartículas por biobalística (Fisk e Dandekar 2005).

Destas, a técnica de biobalística é a mais utilizada para a transformação direta, seja na transformação nuclear ou de plastídios. A biobalística utiliza microprojéteis para introduzir ácidos nucleicos e outras moléculas em células e tecidos *in vivo* e foi descrita pela primeira vez por Sanford (1987). Para o uso da técnica, alguns sistemas com capacidade de acelerar microprojéteis de 0,2 a 4µm de diâmetro foram desenvolvidos, dentre eles os sistemas que utilizam gás hélio sob alta pressão em câmara de vácuo (Sanford 1987). Uma onda de choque causada pela liberação de alta pressão de gás hélio faz com que as partículas penetrem na parede e membrana celular, o DNA é então dissociado e integra-se ao genoma da planta

(Brasileiro e Carneiro 1998). Nesse método, o DNA alvo é introduzido pelo sistema de bombardeamento junto com genes seletivos, que na maioria das vezes são genes de resistência a herbicida ou antibiótico. As células que receberam DNA permanecem viáveis no meio seletivo, possibilitando a integração do gene alvo no genoma do hospedeiro (Brasileiro e Carneiro 1998).

Uma grande vantagem em se integrar o transgene no DNA nuclear está na possibilidade de aumentar a quantidade de produção de proteína alvo, como vacina, por exemplo, que pode ser estocada em sementes transgênicas, e ainda ser expressa nos frutos e em outras partes comestíveis da planta, possibilitando o consumo *in natura* sem que haja necessidade de extração e processamento do antígeno. Entretanto, esse tipo de transgenia na maioria das vezes, produz baixa concentração de proteína alvo (menos de 1% do total de proteína solúvel), e a expressão pode variar de planta para planta, de geração para geração, provavelmente em virtude de silenciamento gênico, ocasionado pelo mecanismo de RNA interferente, ou ainda devido a efeitos de posição ocasionados na inserção do gene alvo no genoma que pode interferir no genótipo (Daniell et al. 2009). Alguns antígenos candidatos a vacina como o antígeno de superfície da hepatite B (Thanavala et al. 2005; Daniell et al. 2009), *rotavirus* (Li et al. 2006), e a subunidade B da toxina da cólera (Jiang et al. 2007; Nochi et al. 2007), foram produzidos via transgenia nuclear, entretanto, os níveis de expressão foram baixos.

1.5.2 Transformação nuclear transiente pelo uso de vetor viral vegetal

O uso de vetores virais para expressão transiente de proteínas em plantas oferece como principal vantagem elevados níveis de replicação viral e conseqüentemente altos níveis de expressão de proteína em curto intervalo de tempo. Devido à natureza da infecção viral, o nível máximo de expressão de proteína exógena ocorre geralmente entre uma ou duas semanas após a infecção. Um vírus é definido como um vetor gênico viral viável, quando apresenta grande habilidade em infectar eficientemente a planta hospedeira (Scholthof, Scholthof et al. 1996).

Um método muito utilizado para expressão transiente de proteínas em plantas com o uso de vetor viral é a inoculação mecânica via *Agrobacterium*, onde o clone viral infeccioso de DNA ou cDNA é introduzido no núcleo da célula hospedeira e integrado ao DNA cromossomal por intermédio do plasmídeo *Agrobacterium* T-DNA (Scholthof, Scholthof et al. 1996). Dentre os vários vetores virais de plantas, destacamos o *Tobacco mosaic virus* (TMV) e o *Potato virus X* (PVX).

Várias proteínas terapêuticas humanas e animais tem sido expressas com sucesso usando TMV como vetor, dentre elas o domínio III da proteína E de DENV sorotipo 2 (Saejung et al. 2007). O uso do PVX como vetor viral também tem sido usado em diversas ocasiões, principalmente por permitir uma fácil avaliação do hospedeiro frente a infecção viral e por apresentar relativa estabilidade e fácil transmissão mecânica, além de alto nível de replicação viral (Scholthof, Scholthof et al. 1996).

1.5.3 Transformação cloroplasmática

O DNA cloroplasmático compõem-se por cromossomo circular, com replicação independente da replicação do genoma nuclear, que torna-se poliplóide durante a maturação celular (Taiz e Zeiger 2004). Cada cloroplasto é composto por um sistema de membranas denominado tilacóide e a um conjunto de tilacóides denomina-se grana. No estroma do cloroplasto há regiões denominadas nucleóides onde encontram-se várias cópias do genoma do cloroplasto, mantidas agrupadas por proteínas. Na divisão celular durante a diferenciação, quando somente um nucleóide é transferido para uma célula filha, a presença de cópias de genoma no nucleóide facilita a transformação cloroplasmática (Carrer 1998). Outro ponto importante é que em uma célula foliar estão presentes aproximadamente 100 cloroplastos, o que significa que há aproximadamente 10.000 cópias do genoma por célula de folha (Svab e Maliga 1993). Essas características dos cloroplastos os tornam alvo biotecnológico para expressão de proteínas recombinantes, como por exemplo, biofarmacos (Kanamoto et al. 2006).

Os cloroplastos podem ser herdados maternalmente, paternalmente ou de ambos os parentais, entretanto, na maioria das espécies de plantas angiospermas, os plastídios são herdados maternalmente, pois o DNA plastidial é eliminado das células germinativas masculinas em diferentes pontos do desenvolvimento destas células, o que garante uma perda desse fluxo gênico pelo pólen (Daniell et al. 2005; Svab e Maliga 2007). Em estudo realizado por Svab e Maliga (2007) constatou-se que a transmissão de pólen transgênico a plantas não transgênicas é rara, e que quando ocorre é na proporção de 1: 10.000, demonstrando assim outro ponto positivo deste sistema de expressão, pois o controle da dispersão do transgene é facilitado por esta característica. O fato da alfaca ser uma planta autógama facilita ainda mais esse controle.

A transformação de cloroplastos traz inúmeras vantagens frente à transformação nuclear e transiente, como um alto nível de expressão do transgene (De Cosa et al. 2001; Shimizu et al. 2008), a transformação e distribuição dentro do genoma do cloroplasto de mais

de um gene em um único evento de transformação (Daniell e Dhingra 2002; Shimizu et al. 2008), ausência de silenciamento gênico (Shimizu et al. 2008), ausência de efeito de posição devido à integração sítio-específica do transgene (Shimizu et al. 2008) e ausência de efeito pleiotrópico, uma vez que os transgenes expressos estão localizados dentro dos cloroplastos (Shimizu et al. 2008).

Quando bombardeia-se uma célula foliar, apenas uma ou poucas cópias do genoma são transformadas, e assim uma seleção de cloroplastos contendo apenas o genoma transgênico se faz necessária, até que esse genoma inicialmente heteroplásmico (estão presentes cópias transformadas e não transformadas do genoma), torne-se homoplásmico (todas as cópias do genoma cloroplasmático transformadas) (Svab e Maliga 1993).

Uma desvantagem desse sistema de expressão de proteína frente à transformação genética nuclear seria a ausência de glicosilação, entretanto, esse fato pode ser contornado pela adição de peptídeo sinal ao transgene, de forma que o direcione ao retículo endoplasmático, onde a glicosilação pode ocorrer (Daniell et al. 2009).

A transformação do genoma de plastídio oferece diversas vantagens sob a transformação nuclear convencional, pois cerca de 10 000 cópias do genoma do cloroplasto podem estar presentes por célula foliar, o que possibilita que até 40% do total de proteína solúvel seja de proteína heteróloga (Kanamoto et al. 2006).

Em 2006, Kanamoto et al., otimizaram um sistema de transformação de plastídios em alface, cultivar *Cisco*, sugerindo esse cultivar como bastante viável para expressão heteróloga. As vantagens do uso de alface frente às demais plantas utilizadas para expressão proteica deve-se as características da planta, pois em alface a expressão proteica ocorre nas folhas e não há produção de toxinas (Kanamoto et al. 2006), além disso, os níveis de expressão de proteína em cloroplastos de alface e tempo de regeneração são semelhantes aos do tabaco (Daniell et al. 2009), muito utilizado para este tipo de expressão. No caso do tabaco, o alto nível de toxinas e outros alcaloides tóxicos dificultam o seu uso para expressão de proteínas com finalidade farmacêutica e consumo de vacinas *in natura*.

Em outras plantas, a produção de GFP em plastídios de tubérculos (batata), frutos (tomate) e raiz (cenoura), foi estimada com níveis 100 vezes menores do que em folhas (Kanamoto et al. 2006).

Em alface, algumas proteínas terapêuticas foram produzidas com sucesso via transformação cloroplasmática. Recentemente, uma vacina dupla contra a cólera e malária foi produzida via expressão cloroplasmática em alface e está em avaliação da imunogenicidade (Davoodi-Semiromi et al. 2010). A subunidade B da toxina cólera do antígeno *Vibrio*

cholerae expressa fusionada ao antígeno-1 da membrana apical do antígeno da malária e também a proteína de superfície-1 do merozoito, foi produzida em cloroplastos de alface e fumo em quantidade superior ao produzido em plastídios de tubérculos como cenoura (Rosales-Mendoza et al. 2008; Kim et al. 2009) e batata (Arakawa et al. 1997). Em cloroplastos de alface a produção foi de 7,3 e 6,1% e nos plastídios de cenoura e de batata 0,02% e 0,48%, respectivamente. Os antígenos expressos em cloroplasto desenvolveram imunidade em ratos, quando estes foram imunizados oralmente (100% de imunidade) e subcutaneamente (89% de imunidade) (Kim et al. 2009). Esse foi o primeiro antígeno produzido em cloroplasto de alface com promissor potencial vacinal e demonstra a viabilidade da utilização de cloroplastos de alface para esta finalidade.

Em relação ao vírus Dengue, uma VLP do sorotipo 3 foi produzida em cloroplastos de alface e apresentou capacidade de montagem e dobramentos corretos da proteína prM e envelope (Kanagaraj et al. 2011). Sua antigenicidade não foi avaliada com soro de paciente. O presente estudo produziu com sucesso e boa antigenicidade um antígeno tetra-epitopo para diagnóstico sorológico dos 4 sorotipos da Dengue. O sistema de transplastomia em alface foi o método de escolha, pois objetivou-se a produção do antígeno para kit diagnóstico por um sistema inovador, barato e de fácil escalabilidade de produção.

1.6 Justificativa do trabalho

O diagnóstico da Dengue baseado na detecção de anticorpos específicos às proteínas virais do DENV é de grande uso devido à praticidade e agilidade do teste. Entretanto, os antígenos utilizados na grande maioria dos testes sorológicos empregados para o diagnóstico da Dengue, sejam eles para detecção de IgG ou de IgM, utilizam antígenos (partículas virais integras) preparados pela injeção no cérebro de camundongos ou em cultura de células *in vitro*.

Essa forma de obtenção de antígeno traz como principal desvantagem a possibilidade de reação cruzada com demais *Flavivírus*, além de representar um risco de contaminação, devido à exposição do manipulador ao vírus infeccioso (Cuzzubbo et al. 2001; Anandarao et al. 2006).

O uso de proteínas virais recombinantes representa uma alternativa mais viável economicamente e mais segura em questões de risco biológico (Anandarao et al. 2006; Kurane 2007). No caso do DENV, acredita-se que epítomos da proteína do envelope viral sejam os alvos para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos eficientes e vacinas (Wu et al. 2003). No caso dos *Flavivírus*, estudos apontam que a maioria dos anticorpos neutralizantes reconhece epítomos no domínio III da proteína E. Anticorpos comuns entre *Flavivírus* que causam reação cruzada foram observados localizados predominantemente no domínio II, próximo ou dentro do peptídeo de fusão com domínio I que é altamente conservado (Fig. 1.4) (Modis et al. 2003; Crill e Chang 2004; Goncalvez et al. 2004), entretanto, outros estudos apontam epítomos essa região como alvo de anticorpos específicos a Dengue (Beasley e Aaskov 2001; Roehrig et al. 1990; Roehrig et al. 1998).

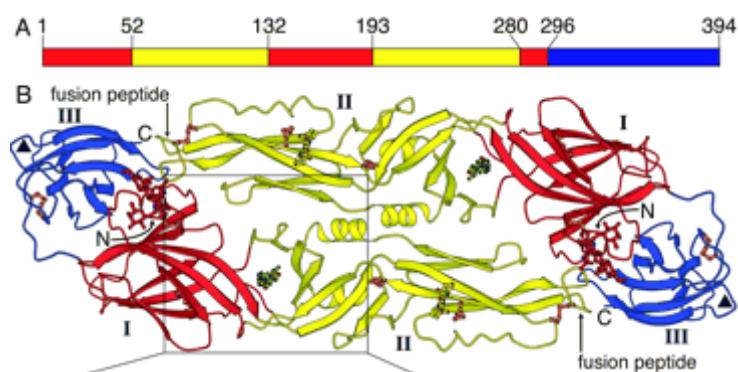


Figura 1.4: Domínios I, II e III da proteína E, e peptídeo de fusão entre os domínios I e II (indicado por seta). Em vermelho domínio I, em amarelo domínio II e em azul domínio III. Fonte: <http://www.pnas.org/content/100/12/6986/F1.expansion.html> em MODIS et al. 2003.

Com o objetivo de desenvolver um ensaio diagnóstico com nova estratégia em termos de composição e produção do antígeno, produziu-se em cloroplastos de alface um antígeno tetra-

epitopo para a detecção sorológica da Dengue. Este abrange parte de uma região entre os domínios I e II da proteína de envelope (aa 34-57), ainda não explorada para esta finalidade. Com o sistema de expressão de proteína utilizado (transplastomia em alface), objetivou-se uma produção barata e de boa escalabilidade para um antígeno que poderá servir como insumo para a montagem de um ensaio diagnóstico sorológico da Dengue. Com a produção deste ensaio em grande escala, o Brasil que é um país endêmico para a Dengue diminuirá o ônus de importação de alguns kits diagnósticos nesse formato.

2- Objetivo e Metas

Este trabalho objetivou a construção, expressão e avaliação da antigenicidade de uma proteína recombinante tetra-epitopo com finalidade diagnóstica sorológica da Dengue. Para tal, as seguintes metas foram seguidas:

- Desenho e síntese de gene do antígeno tetra-epitopo com otimização de códons para cloroplasto de alface;
- Clonagem do gene no plasmídeo pRL1001 para transformação de cloroplasto de alface;
- Produção da proteína em cloroplasto de alface (alface transplastômica) e avaliação da mesma frente à antigenicidade contra a cauda de histidina pelo ensaio de *Western Blotting*;
- Avaliação do uso potencial como reagente diagnóstico sorológico (ELISA) para detecção de anticorpos IgG;
- Seleção de planta transformante homoplásmica, para aumentar a eficiência de produção do antígeno para o desenvolvimento de um kit diagnóstico.

3- Materiais e métodos

3.1 Seleção do peptídeo recombinante e elaboração do modelo

Baseado em dados de mapeamento de epitopos descritos na literatura (Roehrig et al. 1990; Falconar 1999; Beasley 2001) e com o intuito de desenvolver um antígeno ainda não explorado para finalidade diagnóstica, escolheu-se uma região que engloba parte dos domínios I e II da proteína de envelope do DENV. A mesma região foi selecionada para os 4 sorotipos do vírus e esta abrangeu os aminoácidos da posição 34-57 (24 aa), que caracteriza-se por uma região de junção com a membrana plasmática (em resultados, Fig. 4.1A). As sequências de epitopos dos sorotipos 1-4 foram obtidas pelo Genbank (número de acesso AFI71647, BAD69799, CAR92196 e AAG45435, respectivamente) comparadas e alinhadas usando o Software CLUSTAL W (Thompson et al. 1994).

O peptídeo tetra-epitopo (denominado como cE-DI/IIp) foi desenhado abrangendo as quatro sequências de epitopos na ordem 4-3-2-1, sendo que cada uma das sequências está unida por *linker* de 5 glicinas com exceção das sequências dos sorotipos 1 e 2 entre os quais não há *linker*, objetivando assim garantir a complexidade necessária para a composição da estrutura terciária (em resultados, Fig. 4.1B e C). Ao terminal C do peptídeo adicionou-se uma cauda de hexa-histidina (HisTag) com o intuito de facilitar a purificação. A sequência gênica sintética foi feita com otimização de códons para cloroplastos de alface, objetivando obter o nível máximo de tradução da proteína. Não houve adição de qualquer peptídeo de exportação para fora do cloroplasto, pois com o mesmo retido a extração seria facilitada pelo isolamento dos cloroplastos.

3.2 Predição da estrutura proteica e análise estrutural dos epitopos

Inicialmente o software *Bioinfo Meta Server* (Ginalski et al. 2003) foi usado para indicar um modelo específico pela técnica de *threading*. Os melhores escores dos algoritmo 3D Jury (J Score: 35.75 e R-score 8.04), sugeriram a estrutura PDB da estrutura da proteína de envelope de DENV-2 (Modis et al. 2003) como molde para o alinhamento, devido a alta identidade estrutural com o peptídeo cE-DI/IIp, o qual compreende aminoácidos dos domínio I/II. Essa proteína foi então utilizada como molde para a construção do modelo.

O modelo tridimensional do peptídeo foi construído utilizando o programa Modeller v.9.8 (Eswar et al. 2006), através da sobreposição de coordenadas atômicas de acordo com o alinhamento estrutural produzido. Para tal, as sequências a serem modeladas foram carregadas

e sobrepostas em concordância com a estrutura de alinhamento produzida anteriormente. A geometria, estereoquímica, e distribuição de energia no modelo final, dobramento e características de exposição a solventes foram avaliados utilizando o programa PROSA II, sendo que a avaliação adicional da qualidade estereoquímica, foi realizada com o programa PROCHECK (Wiederstein e Sippl 2007).

Em adição, o RMSD (*root-mean-square deviation*) foi calculado pela sobreposição dos Ca e cadeia principal no molde através do servidor 3DSS (*3-dimensional Structural Superposition*) (Sumathi et al. 2006). A estrutura do peptídeo foi visualizada e analisada no programa *Delano Scientific's PYMOL* (DeLano 2002) (<http://pymol.sourceforge.net/>). Os parâmetros físico químicos como hidrofobicidade e hidrofiliabilidade foram avaliados pelo *GRAVY, ProtParam* (Wilkins et al. 1999).

3.3 Transformação de cloroplastos de alface

O vetor de transformação de cloroplasto de alface pRL1001 foi concedido pelo Dr. Hirosuke Kanamoto (*Research Institute of Innovative Technology for the Earth, RITE, Japão*) (Kanamoto et al. 2006). O vetor pRL1001 contém a região inter-gênica *rbcL-accD* de plastídios de alface que funciona como a região alvo para a recombinação homóloga do transgene com o cloroplasto de alface. O *cassete* contém ainda o gene *aadA* que confere resistência a espectinomicina, e que está sob o controle do promotor do operon ribossomal 16S *LsPrn* e terminador do gene *psbA* de alface. Esse *cassete*, está incorporado dentro do vetor pRL 1001 flanqueado pelos sítios de NotI e SalI. Dentro dessa região, em seguida ao *cassete accD*, e entre os sítios de SphI e XbaI está o *cassete* que contém GFP sob o controle das sequências regulatórias de tabaco, o qual foi trocado pelo gene de interesse.

Para a clonagem do gene neste vetor, o mesmo exigiu um vetor de clonagem intermediário que foi perdido. Este vetor intermediário tornou-se necessário devido à inexistência de um sítio múltiplo de clonagem contendo sítios de restrição adequados, pois os sítios que eram necessários para a clonagem do gene (SphI e XbaI, que flanqueiam *gfp*), encontram-se também em outra parte do vetor. Para solucionar esse problema, foi construído um vetor intermediário utilizando o “*backbone*” do vetor pBluescript SKII+. O vetor pRL1001 foi então digerido com as enzimas de restrição NotI e SalI, produzindo um fragmento contendo a região com os genes de *aadA* (resistência a espectinomicina), promotor e terminador de cloroplasto (Fig. 3.1). O fragmento foi transferido dentro do vetor pBluescript SK II+ (pBluescript-NS ou pBS-NS), o gene GFP [inserido como espaçador entre SphI e XbaI (na

figura não é mostrado)] foi retirado, e o gene do antígeno tetra-epitopo inserido nesta região, entre os sítios de SphI e XbaI (Fig 3.1).

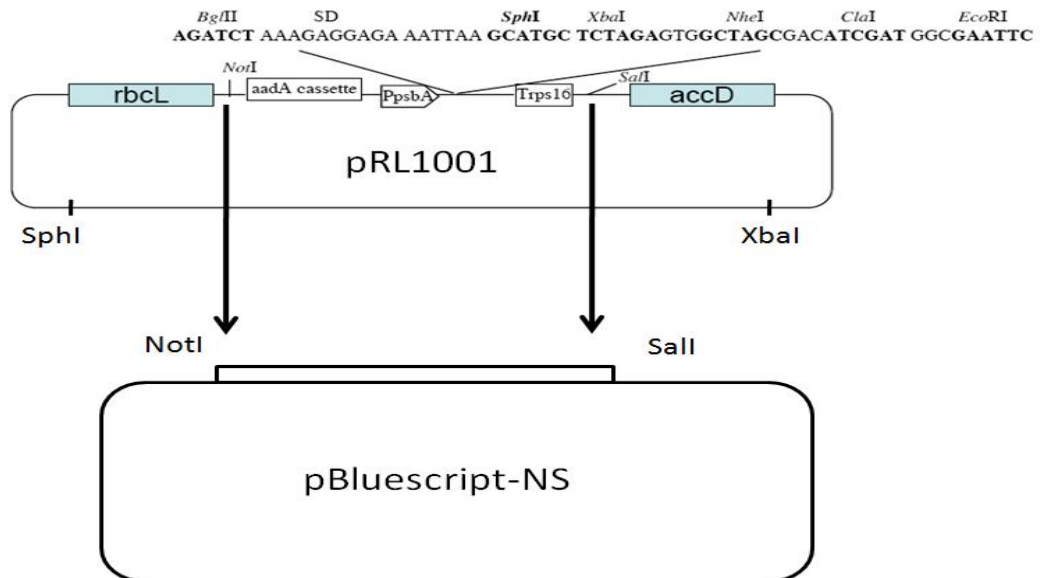


Figura 3.1: Estratégia de subclonagem do cassete entre NotI e Sall, resultando pBluescript-NS. O vetor pRL1001 original possui o gene de GFP no sítio entre SphI e XbaI. aadA cassette = Gene de resistência para espectinomicina, PpsbA = promotor, Trps16 = Terminador, rbcL e accD = regiões idênticas ao DNA de cloroplasto de alface.

3.3.1 Subclonagem da construção em pRL1001 e confirmação da sequência nucleotídica

Para a extração dos plasmídeos foi utilizado o Kit de purificação “Wizard Miniprep” (Promega) conforme recomendado pelo fabricante e a confirmação da clonagem realizou-se com a análise da sequência de nucleotídeos por sequenciamento. Após a confirmação da construção, o cassete foi inserido no “backbone” do pRL1001 (contendo duas regiões idênticas ao DNA de cloroplasto, rbcL e accD) resultando no vetor pRL1001+ o gene *cE-D/II* (figura 3.2), que foi usado para bombardeamento em alface pela técnica de biobalística.

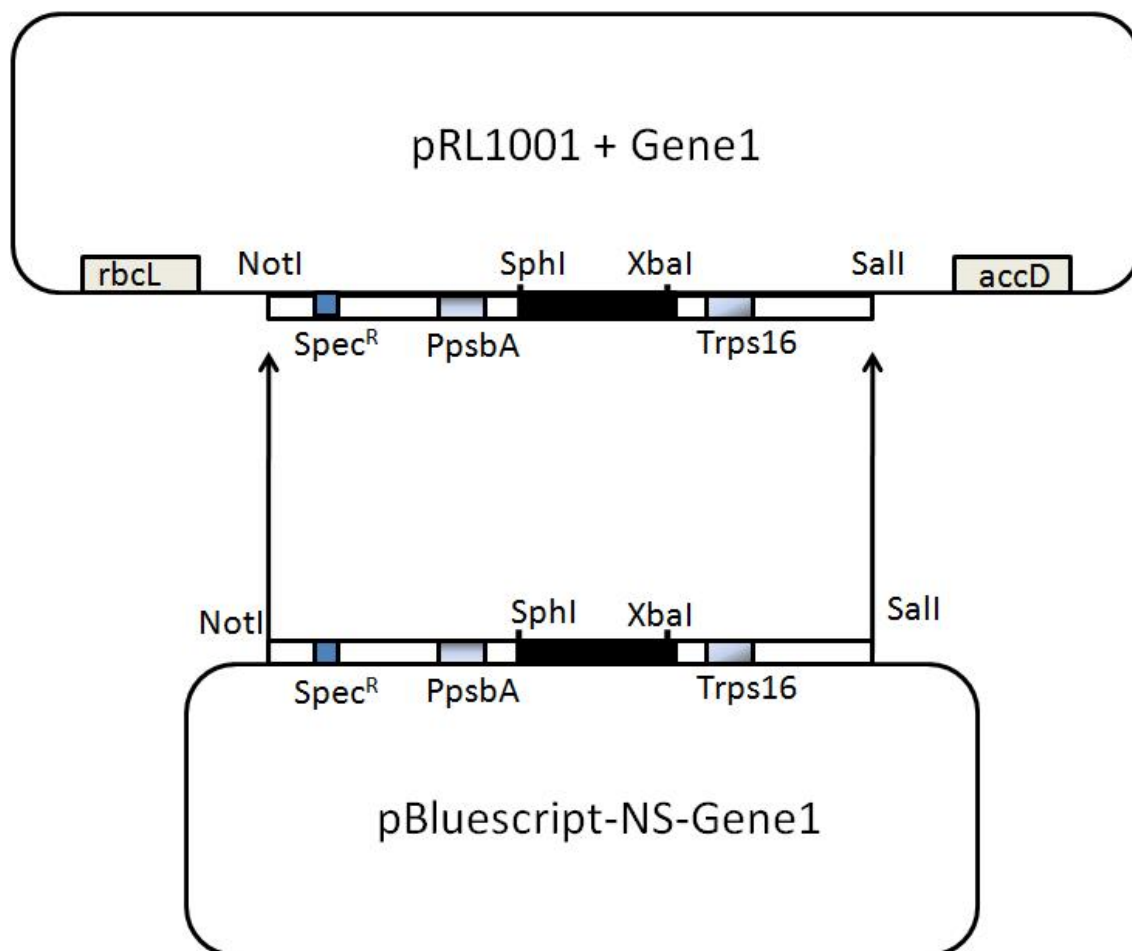


Figura 3.2: Etapa de subclonagem do cassete exemplificando a construção contendo o Gene1 cE-DI/IIp do antígeno tetra-epitopo no pRL1001, resultando pRL1001-Gene1 (E-DI/II). Spec^R= Gene de resistência para espectinomicina, PpsbA = promotor, Trps16 = Terminador, rbcL e accD = regiões idênticas de DNA de cloroplasto de alface.

3.3.2 Transformação dos cloroplastos de alface

O protocolo de transformação utilizado baseou-se principalmente nos trabalhos de Kanamoto et al. (2006) e Brasileiro e Carneiro (1998). As variedades de alface utilizadas para bombardeio foram cvs. *Verônica* e *Cisco*. Sementes e mudas de alface foram mantidas assepticamente no meio Murashigue-Skoog (Wilkins et al. 1999) a 25°C (16 horas de foto período /dia) em um Fitotron. Antes da germinação, 0,1 grama de sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1%.

Para o bombardeamento, folhas cotiledonares (uma semana após o plantio) ou folhas verdadeiras (3 semanas após o plantio) foram utilizadas (Fig. 3.3). Partículas de tungstênio recobertas com a construção específica de DNA foram introduzidas via bombardeamento em pedaços de folhas de alface na face adaxial utilizando “*Biolistic Particle Delivery System*” na Embrapa-CENARGEN, a 1200 psi.

O bombardeamento foi executado em 8 placas para cada construção (uma construção continha o gene tetra-epitopo e a outra continha o GFP do vetor original que foi utilizado como controle positivo da transformação) semanalmente, até obter-se a planta transformada (total de 16 placas por vez). A construção tetra-epitopo a qual denominamos pRL-DEN4-1, e o controle de pRL1001 contendo GFP foram bombardeados separadamente. Ao todo foram executados 3 procedimentos de bombardeio para que fosse obtida uma planta transformante contendo o gene *cE-DI/IIp*. Quanto à construção original contendo GFP que foi utilizada como controle positivo de transformação, ao obter-se e confirmar a transgenia por PCR da planta transformada com o gene *cE-DI/IIp*, essa construção não foi mais utilizada para bombardeamento, e a planta transplastômica resultante dessa tentativa de transformação não foi obtida.



Figura 3.3: Placa para bombardeamento contendo folhas de alface com a face adaxial voltada para cima em torno da zona de tiro.

3.3.3 Regeneração das plantas

O protocolo de regeneração de planta utilizado foi o descrito por (Kanamoto et al. 2006). Dois dias após o bombardeamento, as folhas bombardeadas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 4mm x 4 mm e a face adaxial foi colocada diretamente em contato com meio MS seletivo contendo espectinomicina (50µg/mL), benzilaminopurina (0,1µg/mL), ácido naftalenoacético (0,1 µg/mL), 0,2% (w/v) de ágar e Polivinilpirrolidona- PVP (500 µg/mL). Os fragmentos de folha bombardeada foram incubados no Fitotron por aproximadamente 45 dias. O calo regenerado, originado quando a transformação ocorreu, foi então transferido para frascos contendo ½ da concentração de meio MS com fito-hormônios para que houvesse o enraizamento. Após o enraizamento, a planta foi transferida primeiramente para um vaso contendo vermiculita com 50% de terra e posteriormente para um vaso contendo terra preparada com a adubação adequada. A planta em terra foi mantida em casa de vegetação autorizada para manutenção de plantas transgênicas pela CTNBio. As

sementes desta planta foram semeadas em terra para posterior extração de proteínas e colheita das sementes.

3.4 Análise do DNA cloroplasmático por reação em cadeia da polimerase-PCR

3.4.1 Extração de DNA para análise por PCR

A extração de DNA foi feita a partir de um pedaço de folha de aproximadamente 0,1 grama, e o protocolo de extração baseou-se em Doyle e Doyle (1987). A amostra foi então macerada com bastões autoclavados. Adicionou-se então 400µl de tampão CTAB 2x (1,4 M de cloreto de sódio, 100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 20 mM de ácido etilenodiamino triacetico- EDTA, 25mM de brometo de cetil-trimetilamônio CTAB, 2% de polivinilpirrolidona-PVP), e manteve-se a suspensão em agitador a 60°C por 20 minutos. Adicionou-se então 400µl de clorofórmio, homogeneizou-se e centrifugou-se a 14000 x g por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi então precipitado por isopropanol, o precipitado lavado, seco e ressuspensão em 20µl de água Milli-Q. Procedeu-se então a PCR.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação de transgene

Para a detecção do gene tetra-epitopo na planta transformada por biobalística, utilizou-se um conjunto de iniciadores específicos. O iniciador *sense* (senso: 5'-CTA GTG TGC TTG GGA GTC-3') anela no sitio de iniciação do gene tetra-epitopo e o iniciador Reverso (Reverso: 5'-CAA TAG ATG AAT AGT CAT TCG ACG-3'), anela-se na região que codifica o gene *accD* no genoma do cloroplasto amplificando produto de aproximadamente 830pb, quando este estiver íntegro (Fig. 3.4 a). Os fragmentos amplificados da PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1%. Para a reação de PCR o protocolo utilizado baseou-se em Bonfim et al. (2007). Uma vez confirmada a transgenia, um pedaço da folha da planta foi mantido em meio seletivo por 5 passagens sucessivas para eliminar possíveis cloroplastos não transformados e obter-se uma planta homoplásmica.

Adicionalmente plantas das passagens em meio seletivo foram analisadas por outro par de iniciadores que anelam nas regiões *RbcL* (senso: 5'- CAG GCA ATG GAT ACT TTG GA -3') e *AccD* (reverso: 5'- CAA TAG ATG AAT AGT CAT TCG ACG -3') (este é o mesmo iniciador reverso utilizado na amplificação da planta mãe) do genoma de cloroplasto, com estes iniciadores é possível verificar qualitativamente a presença de genoma cloroplasmático transformado e não transformado. O produto esperado na amplificação de genoma transformado (quando há presença do transgene tetra-epitopo) é de aproximadamente

2758pb, e na planta não transformada é de 539pb. A presença dos dois perfis de banda indica que a planta é heteroplásmica (Fig. 3.4 b e c).

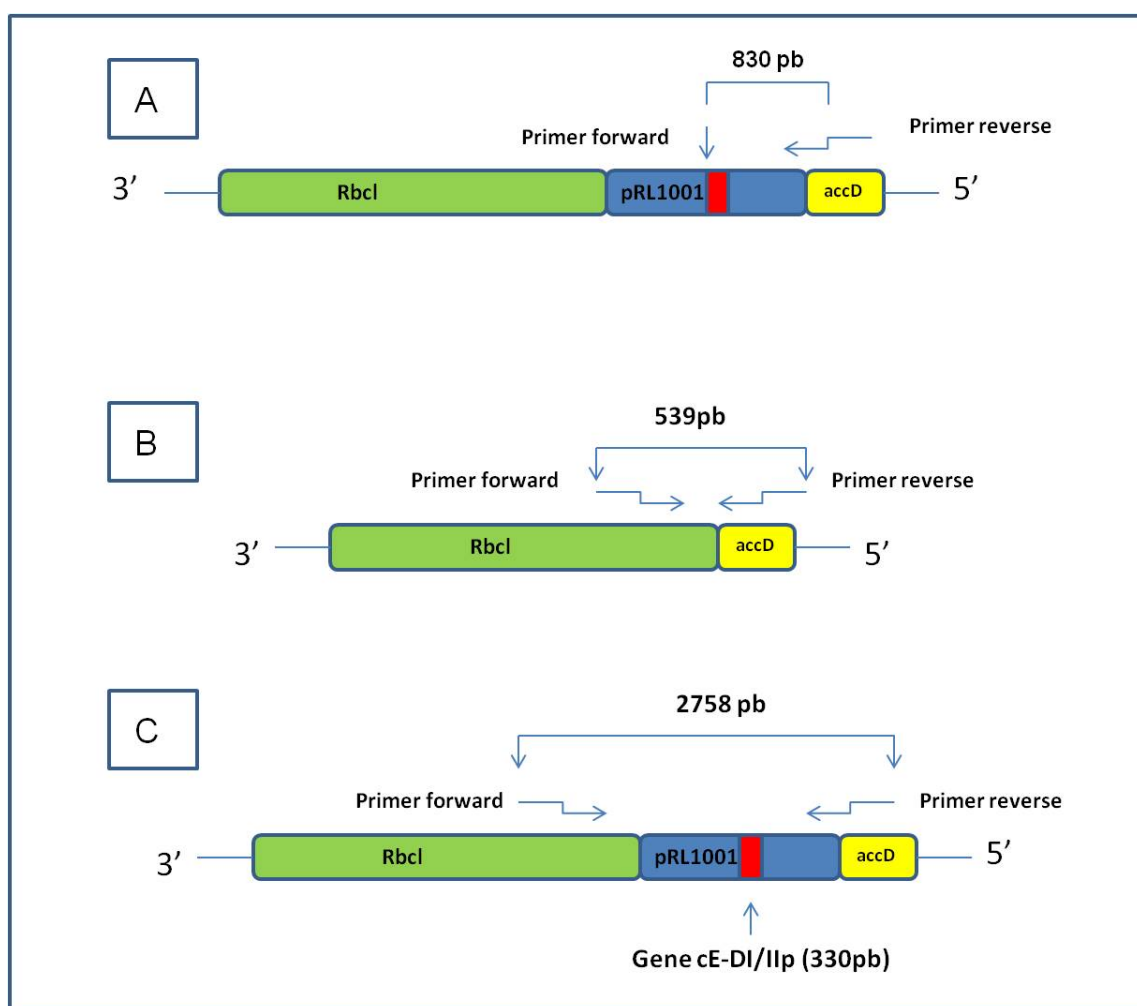


Figura 3.4: Esquematização dos iniciadores utilizados na amplificação por PCR. A) figura representando o par de iniciadores que anelam no sítio de clonagem do gene tetra epitopo (senso) e na região *accD* (reverso) do genoma do cloroplasto em planta transformada, amplificando 830 pb. B) segundo conjunto de *iniciadores* que anelam no genoma do cloroplasto nas regiões *Rbcl* (senso) e *accD* (reverso) em planta não transformada amplificando 539pb. C) o mesmo conjunto de *iniciadores* anelando em genoma de planta transformada, amplificando 2758pb.

3.5 Extração de proteína total, purificação dos peptídeos expressos e análise por *Western blotting* e DOT ELISA

A fração de proteínas totais para o ensaio de ELISA foi extraída das amostras de folha de alface transplastômica com tampão de sacarose a 0,5M. Após a maceração, o macerado foi coado em gaze e centrifugado a 50 x g por 10 min. O sobrenadante contendo os cloroplastos foi recuperado e centrifugado novamente a 1000 x g por 12 minutos. O precipitado de cloroplasto foi ressuspensionado com PBS 1x contendo Triton-X a uma concentração final de

1%, e então centrifugado a 1000 x g. Para cada 200 gramas de folha fresca, adicionou-se 8mL de 1x PBS pH 7.4 acrescido de sacarose a 0.5M. Os volumes resultantes desse macerado foram coados e colocados em tubos de 50 ml. Após as centrifugações o precipitado resultante (pellet) obtido a partir do volume de 50 ml em cada tubo, foi ressuspensão em 2mL de 1x PBS pH 7.4 com 1% de Triton X e incubado em gelo até a clarificação visível do precipitado, que sugeriu a lise dos cloroplastos e liberação do extrato proteico. Esse sobrenadante clarificado contendo o extrato bruto proteico foi utilizado nos ensaios de ELISA e *Western blotting* ou purificado em coluna de Ni-NTA.

Para eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e *Western blotting* com anticorpos anti HisTag, para as plantas: mãe, de primeira e 2ª passagem, da F1 de 2ª e 4ª passagem, macerou-se cerca de 0,3 gramas de folha em PBS 1x, acrescentou-se tampão desnaturante contendo β -mercaptoetanol e ferveu-se por 5 minutos. Após manter em gelo por 3 minutos, centrifugou-se e foram corridos 20 μ l em SDS-PAGE a 12%.

Plantas da F1 de 3ª passagem foram analisadas por DOT-ELISA usando o mesmo anticorpo HisTag utilizado para o *Western blotting*. Os protocolos de eletroforese, *Western blotting* e DOT-ELISA utilizados foram baseados em Sambrook e Russel (2001), sendo que para o DOT-ELISA utilizou-se precipitado de extrato bruto de cloroplastos oriundo de 0,3 gramas de folha, extraído com a mesma metodologia do extrato bruto utilizado no ensaio de ELISA (porém com menor volume de tampão) e ressuspensão em 100 μ l de PBS 1x acrescido de Triton a 1%. A membrana foi então sensibilizada com 10 μ l dessa extração.

A purificação dos peptídeos foi feita em coluna de Ni-NTA para purificação de proteínas contendo HisTag segundo instruções do fabricante GE Life sciences.

3.6 Padronização do ensaio de ELISA utilizando peptídeo tetra-epitopo purificado

A técnica de ELISA indireta foi utilizada para avaliar a reatividade do peptídeo tetra-epitopo contra soros positivos dos sorotipos 1, 2, 3 e 4 do DENV. Para a padronização do bloqueador da placa de ELISA e solução padrão, testou-se diferentes concentrações de leite, BSA e soro normal de cabra, bem como diferentes concentrações de antígeno e número de lavagens dos poços da placa. Os tempos de incubação das diferentes etapas do ensaio foi outro fator variável que precisou ser padronizado.

Primeiramente as placas de ELISA foram sensibilizadas por 14-16 horas e mantidas a 4°C em câmara úmida, utilizando a concentração de antígeno de 3 ou 5 μ g de proteína purificada por poço, ou ainda utilizando extrato bruto de alface.

No dia seguinte procedeu-se o bloqueio da placa com leite desnatado diluído em PBS 1x, onde foi dissolvido BSA e adicionou-se Tween 20 na concentração de 0,05% final. A concentração de leite variou de 2,5% a 5%, e a de BSA variou de 1,5 a 4%, testou-se também como bloqueio soro normal de cabra a 3,5% e a 10% e soro fetal bovino nas concentrações de 3,5 a 12%. Essas foram as soluções testadas para bloqueio de reação inespecífica sendo solução padrão para todas as etapas do ensaio (na solução padrão, foram diluídos os soros testados e o anticorpo conjugado, essa mesma solução também é usada na etapa de bloqueio, ou seja é a solução padrão para todas as etapas do ELISA, exceto para as etapas de lavagem e revelação). Testou-se os tempos de 1 e 2 horas para bloqueio de reação inespecífica sempre na temperatura de 37°C em câmara úmida.

Para avaliar a reatividade dos anticorpos IgG no soro de paciente contra o peptídeo, e a presença de fundo na leitura do ensaio que poderia sugerir uma reação positiva inexistente (falso positivo), utilizou-se em poços controle no lugar de soro positivo ou negativo para a Dengue, soro humano normal-SHN (soro tratado para ser livre de anticorpos) e Tampão fosfato (PBS 1x).

Os soros foram diluídos sempre em solução padrão, onde testou-se soro de pacientes positivos ou negativos para Dengue, positivos para Febre amarela, Sarampo e Rubéola, além de usar como controle de fundo PBS 1x e SHN. Alguns soros foram utilizados em diluições variadas (1:20; 1:40 e 1:60) com o intuito de identificar a diluição em que pudesse ser avaliado o potencial do antígeno para diagnóstico.

As amostras de soros positivas para infecção por DENV utilizadas foram do banco de soros de *Flavivirus* da Fiocruz-RJ. Estas foram previamente confirmadas como positivas para DENV por teste sorológico, isolamento viral ou RT-PCR para os sorotipos 1, 2, 3 e 4 de DENV. O sorotipo 4 foi testado em nosso ensaio apenas após padronização devido a carência de soro. A diluição do soro tanto dos casos negativos quanto dos positivos para infecção por DENV testada foi de 1:20, 1:40 e 1:60. Tomou-se ainda o cuidado de testar soros com títulos altos e baixos para concentração de IgG anti-DENV.

O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG humano SIGMA conjugado a peroxidase produzido em cabra, testado nas concentrações de 1:1000, 1:1500 e 1:2000 diluído em solução padrão. O substrato utilizado na revelação do ensaio foi o peróxido de hidrogênio. A leitura da absorbância a 405nm foi realizada em leitor de ELISA.

3.6.1 Avaliação da antigenicidade do peptídeo tetra-epitopo em extrato bruto

Placas para ELISA de 96 poços foram lavadas cinco vezes com 200µl de PBS 1x, pH 7.4 contendo 1% de Tween 20 (esse foi o tampão de lavagem padronizado para o ensaio). Os poços das placas foram sensibilizados com 40µl de extrato bruto proteico de cloroplasto de alface contendo o peptídeo tetra-epitopo, diluído ou em 60µl de tampão bicarbonato/carbonato pH 9.6 ou em 60µl de tampão PBS 1x pH 7.4. Após incubação de 2 horas a 37 °C ou por 16 horas a 4°C em câmara úmida, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem e bloqueadas com 100µl de soro normal de cabra a 10% em PBS 1x, pH 7.4 (essa foi a solução padrão utilizada em todas as etapas do ensaio anterior), e incubadas a 37°C por 1 hora. Para a captura de IgG no soro, um total de 100µl de solução padrão com soro positivo ou negativo para a Dengue diluído 1:40 foi incubado a 37°C por 45 minutos.

Procederam-se 5 lavagens e adicionou-se 90µl de anti- IgG humano conjugado a peroxidase produzido em cabra (SIGMA-ALDRICH), diluído em solução padrão na concentração 1:1500. Uma nova incubação de 45 minutos a 37°C foi realizada e as placas lavadas novamente por cinco vezes, quando então adicionou-se 90µl do substrato peróxido de hidrogênio. Realizou-se uma nova incubação de 20 minutos a temperatura ambiente quando então a densidade óptica (OD) foi medida a 405nm.

Cada amostra de soro foi testada em duplicata e como controle negativo de fundo e inespecificidade da amostra proteica, extrato proteico de alface não transformada foi utilizado para sensibilizar uma placa e a mesma metodologia de ensaio padronizada para o antígeno tetra-epitopo foi empregada. O valor do ponto de corte da OD foi determinado sobre a média de 3 derivações standard dos soros controle negativos, adicionada ao desvio padrão multiplicado por 3 vezes.

3.6.2 Amostras de soros utilizados na avaliação da antigenicidade do peptídeo tetra-epitopo em extrato bruto de alface

Um total de 80 soros foram avaliados para a detecção de IgG contra DENV, dos quais 53 eram positivos para algum dos 4 sorotipos e 27 eram negativos. Os soros positivos para Dengue dos quatro diferentes sorotipos bem como os não sorotipados utilizados no teste, foram oriundos de epidemias que ocorreram de 1998 a 2011. Para avaliar a possibilidade de reação cruzada e a especificidade do antígeno, soros positivos para Febre amarela, e de indivíduos saudáveis vacinados e não vacinados recentemente contra a Febre amarela também foram analisados. Com exceção dos indivíduos saudáveis, todos os demais soros foram recebidos no laboratório de *Flavivirus* (Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz-RJ) com suspeita de febre da Dengue, em concordância com os critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO

2009). Os casos confirmados como Dengue foram positivos por isolamento viral, detecção do RNA por RT-PCR, e/ou detecção de anticorpos IgM por MAC-ELISA. Os soros negativos foram considerados negativos para todas as metodologias descritas acima.

3.6.3 Soros pareados utilizados na avaliação da antigenicidade do peptídeo em extrato bruto de alface

Para o estudo da antigenicidade do peptídeo em extrato bruto utilizando soros pareados (soro do mesmo paciente colhido na fase aguda e novamente na fase convalescente da doença), todos os soros positivos ou negativos seguiram os mesmos critérios de confirmação de positividade para Dengue ou não positividade (soros negativos), dos demais soros utilizados neste trabalho.

No total 362 amostras, 181 soros pareados foram avaliados, dos quais 39 pareados (78 soros) pertenciam ao sorotipo 1, 29 pares (58 soros) ao sorotipo 2, e 44 pares (88 soros) ao sorotipo 3. Para o sorotipo 4 haviam disponíveis apenas 2 soros pareados de infecção primária (4 amostras), então testou-se juntamente mais 12 soros do sorotipo 4 não pareados. Adicionalmente foram avaliados 47 soros pareados (94 amostras) positivos para a Dengue e não sorotipados. Avaliou-se ainda 20 soros pareados negativos para Dengue (40 amostras), porém com sintomas de Dengue, 10 soros negativos para a Dengue, e positivos para Rubéola e 10 soros negativos para Dengue e positivos para Sarampo, sendo que os soros positivos para Rubéola e Sarampo não tinham amostras pareadas. A amostragem para cada sorotipo variou conforme a disponibilidade de amostras no banco de soros.

Na análise de amostras pareadas consideraram-se como na fase convalescente os soros coletados aproximadamente 14 dias (média de 13-18 dias) após o início dos sintomas. A fase aguda foi considerada na coleta de 3 até 7 dias (média de 5 dias) após o início dos sintomas. Dos 253 soros positivos para Dengue analisados, 116 eram de infecções primárias e 103 de infecções secundárias. A titulação de anticorpos IgG e determinação do tipo de infecção (primária ou secundária) das amostras utilizadas no painel de pareados, foi realizada com ensaio de IgG-ELISA de referencia recomendado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e utilizado na rotina diagnóstica do laboratório da Fiocruz-RJ como contraprova de casos duvidosos, conforme descrito por Miagostovich et al, (1999). A titulação é feita pela diluição seriada em placa, começando em 1:40 e terminando em 1/655.360.

3.7 Cálculo para determinação da sensibilidade, especificidade e eficiência do ensaio de ELISA para os 4 sorotipos.

Os cálculos de sensibilidade, especificidade, e valores de verdadeiros negativos e positivos foram calculados da seguinte forma:

Sensibilidade: $TP / (TP + FN) \times 100\%$;

Especificidade: $TN / (TN + FP) \times 100\%$;

Onde:

TP= número de positivos verdadeiros

FP= número de falsos positivos

FN= número de falso negativo

TN= número de negativos verdadeiro

4-Resultados

4.1 Desenho da proteína recombinante tetra-epitopo (cE-DI/IIp)

Com o intuito de estimar a possibilidade de reação cruzada dos quatro sorotipos de DENV selecionados com outros *Flavivirus*, como o vírus da Febre amarela (YFV), Vírus da Encefalite Japonesa (JEV), e Vírus do Oeste do Nilo (WNV), analisou-se por alinhamento múltiplo as sequências de aminoácidos da proteína de envelope (Fig. 4.1A) e não foi observada similaridade suficiente para que houvesse sugestivo de reação cruzada.

A análise de modelagem sugeriu que a organização das sequências de aminoácidos escolhida na ordem DENV-4/DENV-3/DENV-2/DENV-1 (Fig. 4.1B), a princípio com o intuito de melhor exposição dos sorotipos 2 e 3 que eram de maior prevalência no Brasil no momento da síntese do gene, apresentou-se adequada uma vez que os aminoácidos presentes nas cadeias laterais dos quatro sorotipos apresentaram-se expostos no modelo (Fig. 4.1C). A exposição dos epitopos provavelmente ocorreu devido aos *linkers* de glicina existentes entre os sorotipos 4 e 3; e 3 e 2, o que possibilitaria ao peptídeo uma grande flexibilidade, expondo os epitopos conforme desejado (Fig 4.1C). Provavelmente devido a ausência de *linker* entre os sorotipos 2 e 1, o peptídeo apresenta-se predominantemente em estrutura *coil* como podemos observar na figura 4.1C.

A	
DEN-1	MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLC 60
DEN-2	MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYC 60
DEN-3	MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLC 60
DEN-4	MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGSCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLR TYC 60
JEV	FNCLGMGNRDFIEGASGATWVDLVLEGDSCVTIMANDKPTLDVRMINIEASQLAEVRSYC 60
WNV	FNCLGMSNRDFLEGVSGATWVDLVLEGDSCVTIMSKDKPTIDVKMMNMEANLAEVRSYC 60
YFV-17DD	AHCIGITDRDFIEGVHGGTWSATLEQDKCVTVMAPDKPSLDISLETVAIDRPAEARKVC 60

B

NH2-MAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLR GGGGG MAKNKPTLDIELQKTEATQLATLR
GGGGG MAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRMAKNKPTLDIELLKTEVTNPAVLRHHHHHH-
COOH

C

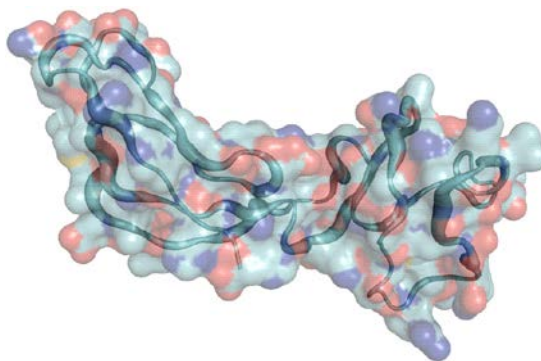


Figura 4.1: Sequencia e modelagem do tetra-epitopo cE-DI/IIp. **A:** alinhamento múltiplo de sequencia da proteína de envelope dos quatro sorotipos dos DENV, com a sequencia que abrange o peptídeo tetra-epitopo marcada em vermelho para os 4 sorotipos dos DENV e em azul para os *Flavivirus* da encefalite Japonesa (JEV), Nilo do Oeste (WNV) e Febre amarela (YFV). O peptídeo tetra-epitopo abrange os aminoácidos nas posições de aa 34-57. **B:** Representação da sequencia de aminoácidos que compõe o peptídeo tetra-epitopo com sorotipos 4 e 3; e 3 e 2; fusionados por *linkers* de penta-glicina, entre os sorotipos 2 e 1, não há *linker*. **C:** Modelo tri-dimensional gerado pelo Pymol 3-D model.

4.2 Bombardeamento e regeneração da planta de alface transformada

Após confirmação por sequenciamento, o clone contendo o gene tetra-epitopo e a construção original contendo GFP foram utilizados para bombardeamento pela técnica de biobalística, conforme previamente descrito na metodologia.

Decorridos 50 dias do bombardeamento, observou-se o brotamento de calo e o aparecimento de folha (Fig. 4.2), oriundo de transformação com a construção contendo o gene tetra-epitopo.



Figura 4.2: Folha gerada pelo calo transformado com o gene tetra-epitopo.

Com 78 dias o calo, já com formação de folha foi transferido para o meio de cultura de tecido de plantas MS ½ com fito-hormônios para enraizamento (Fig. 4.3).



Figura 4.3: Planta transplastômica em meio de enraizamento

Após 25 dias, a planta com raízes foi transferida para uma mistura 1:1 de terra/vermiculita para que houvesse o fortalecimento das raízes, quando então com 8 dias a planta enraizada foi transferida para um vaso com terra.

4.3 Análise da integração gênica por PCR

Após a obtenção de uma planta que regenerou a partir de um calo transformado em meio seletivo (contendo espectinomicina), utilizou-se a técnica de PCR para confirmar a integração gênica do tetra-epitopo dentro do genoma do cloroplasto. Para tal, conforme já descrito na metodologia fez-se o uso de iniciadores que anelam flanqueando o gene tetra-epitopo e o reverso que anela na região *accD* no genoma do cloroplasto. O resultado da PCR revelou a amplificação de fragmentos de DNA do tamanho esperado de 866pb, como podemos observar na Fig. 4.4.

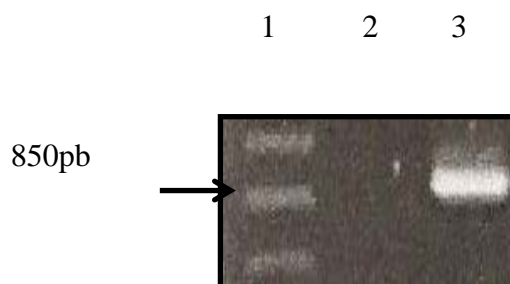


Figura 4.4: Eletroforese de gel de agarose apresentando amplificado de aproximadamente 866pb correspondente ao gene tetra-epitopo. No poço 1 marcador de tamanho de DNA com a seta indicando o tamanho de 850pb. No poço 2, alfaca não transformada. No poço 3, alfaca transplastômica.

As plantas obtidas pela triagem em meio seletivo a partir da segunda passagem foram submetidas a PCR, onde o transgene foi detectado por um par de iniciadores que anelam no genoma do cloroplasto, permitindo a detecção de genoma transformado ou não e a condição

de mistura de cloroplastos transformados e não transformados na mesma planta (heteroplasma).

Até a seleção de 4ª passagem, conforme demonstrado na Fig. 4.5, ainda não havia sido obtida uma planta homoplásmica, visto que observa-se a presença de mais de 2 padrões de produtos amplificados por PCR na mesma amostra. Dois dos padrões apresentados na figura 4.5 apontam heterogeneidade de genoma do cloroplasto na mesma planta (padrão heteroplásmico), uma vez que o fragmento de DNA amplificado com tamanho de 539pb mostra a amplificação da região entre iniciadores, oriundo de genoma de cloroplasto selvagem. Caso alguma das plantas examinadas fossem homoplásmicas, observaria-se o tamanho esperado de 2758pb apenas, sem o fragmento de 539pb.

Como as plantas de 4ª passagem em meio seletivo ainda apresentam-se com mistura de cloroplastos transformados e não transformados (poços 4, 5, 7, 8, 9, 10 da figura 4.5), a seleção por meio seletivo continuará até obter-se uma planta homoplásmica.

A planta do poço 6, não amplificou fragmento de DNA de 2758pb devido a causa não conhecida. Esta linhagem de planta foi descartada pela ausência de amplificação de fragmentos de tamanho esperado.

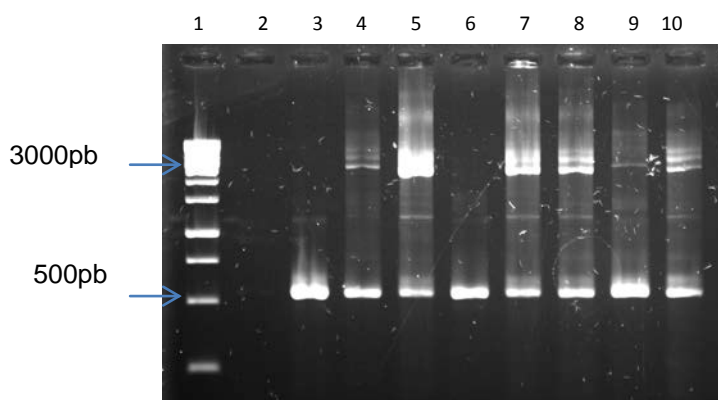


Figura 4.5: Eletroforese de gel de agarose mostrando fragmentos amplificados por PCR de plantas de 4ª passagem. No poço 1 marcador 1 kb DNA ladder, 2: poço controle sem DNA na reação de amplificação; 3 amplificado de planta não transformada; 4 -10 amplificado de plantas de 4ª passagem.

4.4 Análise da proteína cE-DI/Ip expressa em alface por *Western blotting*

Após confirmação da transgenia por PCR (Fig. 4.5), a presença do peptídeo tetra-epitopo foi confirmada por *Western blotting*. A amostra foi preparada pela separação parcial de cloroplastos por centrifugação, descrita anteriormente na metodologia. Na Fig. 4.6 é possível observar os sinais da proteína cE-DI/Ip marcados por *Western blotting* com anticorpo anti-HisTag, usando a planta originalmente transformada além de uma planta de

primeira e outra de 2ª passagem obtidas por meio seletivo (descrito na metodologia), em tamanho esperado de aproximadamente 12 kDa.

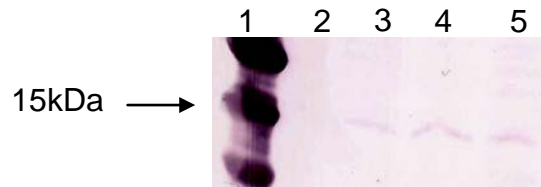


Figura 4.6: *Western blotting* com a proteína alvo marcada com HisTag. O tamanho esperado é aproximado de 12 kDa (poços 3, 4 e 5). 1- Marcador de proteína; 2- planta não transformada; 3- planta originalmente transformada; 4- planta de primeira passagem; 5- planta de segunda passagem. A seta indica o tamanho de 15kDa.

Outro *Western blotting* foi realizado para avaliar a expressão em plantas da F1 obtidas a partir da 2ª e 4ª passagem em meio seletivo (Fig. 4.7), assim como foi feito para a planta originalmente transformada e a F1 de primeira e 2ª passagem (Fig.4.6).

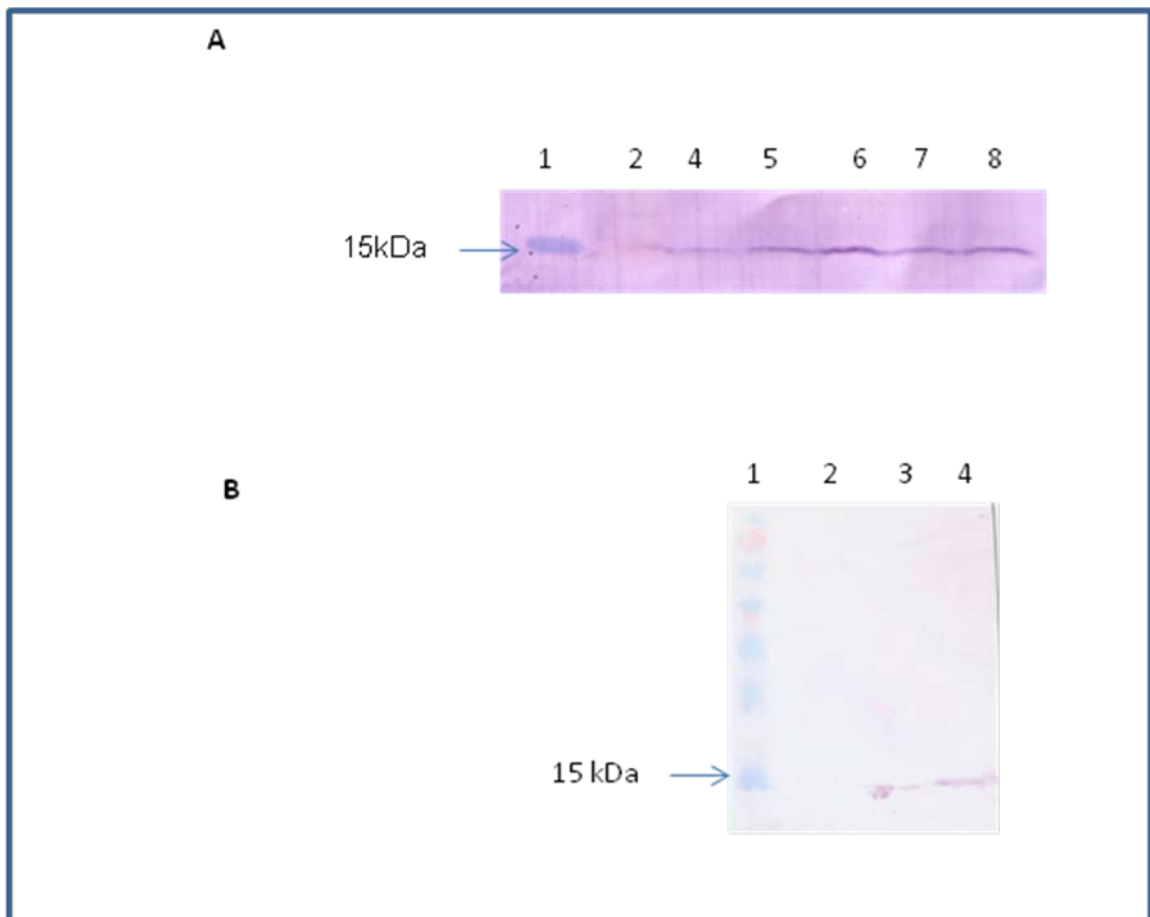


Figura 4.7: Avaliação da expressão da proteína tetra-epitopo em plantas da F1 de 2ª e 4ª passagem pela técnica de *Western blotting* com anti-HisTag. A) 1- Marcador de proteína; 2- planta não transformada; 3-7: plantas da F1 de 2ª passagem; B) 1- Marcador de proteína, 2- planta não transformada; 3 e 4- plantas da F1 de 4ª passagem. A seta indica o tamanho de 15kDa.

Conforme observado nas Fig. 4.6 e 4.7, a proteína recombinante tetra-epitopo cE-DI/Ip apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 12 kDa conforme estimado segundo predição proteica realizada no banco de dados *ExPASy proteomics tools- compute pI/mW*. A reação com anticorpos específicos à cauda de 6 histidinas e o tamanho calculado de 12,2 kDa, indicam que a proteína expressa é a cE-DI/Ip esperada. A segunda filiação (F2), também foi avaliada por *Western blotting*, e seus dados também nos sugerem que a transgenia é estável (dados não apresentados). As plantas da F1 de segunda passagem testadas por *Western blotting* (Fig. 4.7) foram as plantas das quais extraiu-se proteína total utilizada para os ensaios de ELISA com extrato bruto de proteína total de cloroplasto.

A expressão da proteína cE-DI/Ip nas plantas de 3ª passagem foi avaliada por DOT-ELISA, onde pareceu haver uma diferença na quantidade de proteína alvo expressa nas diferentes plantas. Para esse ensaio, sensibilizamos a membrana de nitrocelulose com 10µl de extrato bruto extraído por maceração e lise com Triton-X a 1% (Fig. 4.8).

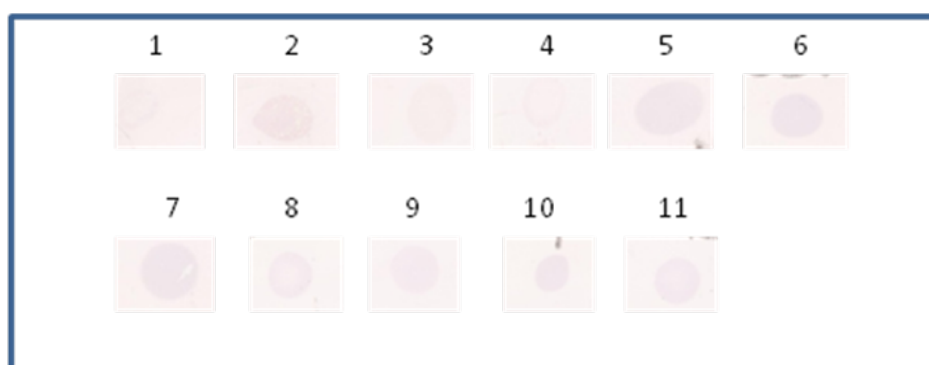


Figura 4.8: DOT ELISA de plantas de 3ª passagem utilizando o anticorpo anti-HisTag. 1: extrato bruto de planta não transformada (controle negativo do ensaio); 2-11- extrato bruto de plantas da F1 de 3ª passagem.

4.5 Avaliação da proteína cE-DI/Ip por ELISA

Conforme descrito na metodologia, para padronização do ensaio ELISA, precisou-se otimizar as concentrações ideais de antígeno, soro de paciente e anticorpo secundário, condição de bloqueador e os respectivos tempos para cada uma das incubações das variadas etapas do ensaio, bem como o número de lavagem dos poços.

A primeira tentativa de otimização do ensaio foi estimar qual a concentração de antígeno que seria necessária para capturar anticorpos IgG do soro. Para tal, foram testadas as concentrações de 3 e 5µg do peptídeo cE-DI/Ip purificado em coluna de Ni-NTA por poço (esta purificação foi oriunda de extração de um *pool* de plantas F1 de segunda passagem). Nesse primeiro ensaio, a solução padrão utilizada foi leite desnatado a 5% acrescido de BSA

3% diluídos em PBS 1x. Com essas duas variáveis pré-estabelecidas montou-se uma placa onde sensibilizou-se duas linhas com 3 μ g e outras duas com 5 μ g e conduziu-se o ensaio de ELISA com os soros negativos e positivos para a Dengue na diluição 1:20, tendo o cuidado de utilizar nesse pré-ensaio soros com títulos altos de anticorpos. Em uma das linhas sensibilizada com 3 μ g e em outra com 5 μ g (linhas B e D na Fig. 4.9) utilizou-se o anticorpo secundário diluído 1:1000 e nas outras duas restantes (de 3 e 5 μ g) testou-se a diluição 1:1500 (linhas F e H na Fig. 4.9). Realizou-se 3 lavagens com PBS acrescido de Tween a 1% a cada etapa, os tempos de incubação foram de 2 horas para bloqueio, incubado em câmara úmida e mantido em estufa a 37°C. O tempo de incubação dos soros foi de 90 minutos e do anticorpo conjugado a incubação foi de 60 minutos, em câmara úmida a 37°C. A leitura da placa foi feita com 10 minutos na OD de 405nm. No total testou-se separadamente, um soro positivo para os cada um dos sorotipos 1, 2 e 3, um soro negativo, e soro humano normal (Fig. 4.9 e 4.10).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	Conjugado	1:1000			
C												
D		5 μ g	5 μ g	5 μ g	5 μ g	5 μ g	5 μ g	Conjugado	1:1000			
E												
F		3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	Conjugado	1:1500			
G												
H		5 μ g	5 μ g	5 μ g	5 μ g	5 μ g	5 μ g	Conjugado	1:1500			

Figura 4.9: Figura representando a placa de ELISA com o ensaio onde pré-definiu-se a concentração inicial de antígeno utilizado no ensaio. As linhas horizontais B e F foram sensibilizadas (representado pela parte colorida) com 3 μ de antígeno, as linhas D e H com 5 μ g de antígeno. Nas linhas B e D utilizamos conjugado na concentração de 1:1000, e nas linhas F e H, na concentração 1:1500. Utilizou-se apenas um soro com título de anticorpos alto para cada sorotipo (indicado em cores diferentes acima do esquema da placa), onde coluna 2 (apenas poços coloridos em vermelho) está representado incubação com PBS 1x; coluna 3, (em verde) soro humano normal; coluna 4, (em laranja) soro negativo para a Dengue; coluna 5 (em azul) soro positivo para o sorotipo 1 da Dengue; coluna 6, (em rosa), soro positivo para o sorotipo 2 da Dengue, e coluna 7, (em amarelo) soro positivo para o sorotipo 3 da Dengue, os poços em branco não foram utilizados no ensaio e permaneceram vazios.

Neste ensaio observou-se que a concentração de conjugado 1:1000, indiferentemente da concentração de antígeno utilizada na sensibilização, não era adequada devido as reações aparentemente positivas semelhantes para as amostras positivas e os controles, principalmente controle negativo (CN na Fig. 4.10 A e B). Utilizando conjugado 1:1500 e 3 μ g de antígeno observou-se uma reação fraca em todos os poços, sem contraste considerável entre os soros positivos e negativos para Dengue (Fig. 4.10C). Na concentração de conjugado 1:1500 com concentração de antígeno 5 μ g, o soro negativo aparentemente apresentou reação um pouco mais fraca do que os soros positivos para Dengue, entretanto ainda havia reação indicativa de reação de fundo, pois nos poços onde incubamos PBS 1x e soro humano normal a OD ainda foi considerável (Fig. 4.10D), demonstrando problemas de bloqueio ou lavagem.

Como haviam outras variáveis a serem padronizadas e ainda não havia sido identificada a etapa do ensaio problemática, optou-se por utilizar a concentração de antígeno de 5 μ g e de conjugado 1:1500, além de variar o tipo de solução padrão (bloqueadores), número de lavagens e tempos de incubação.

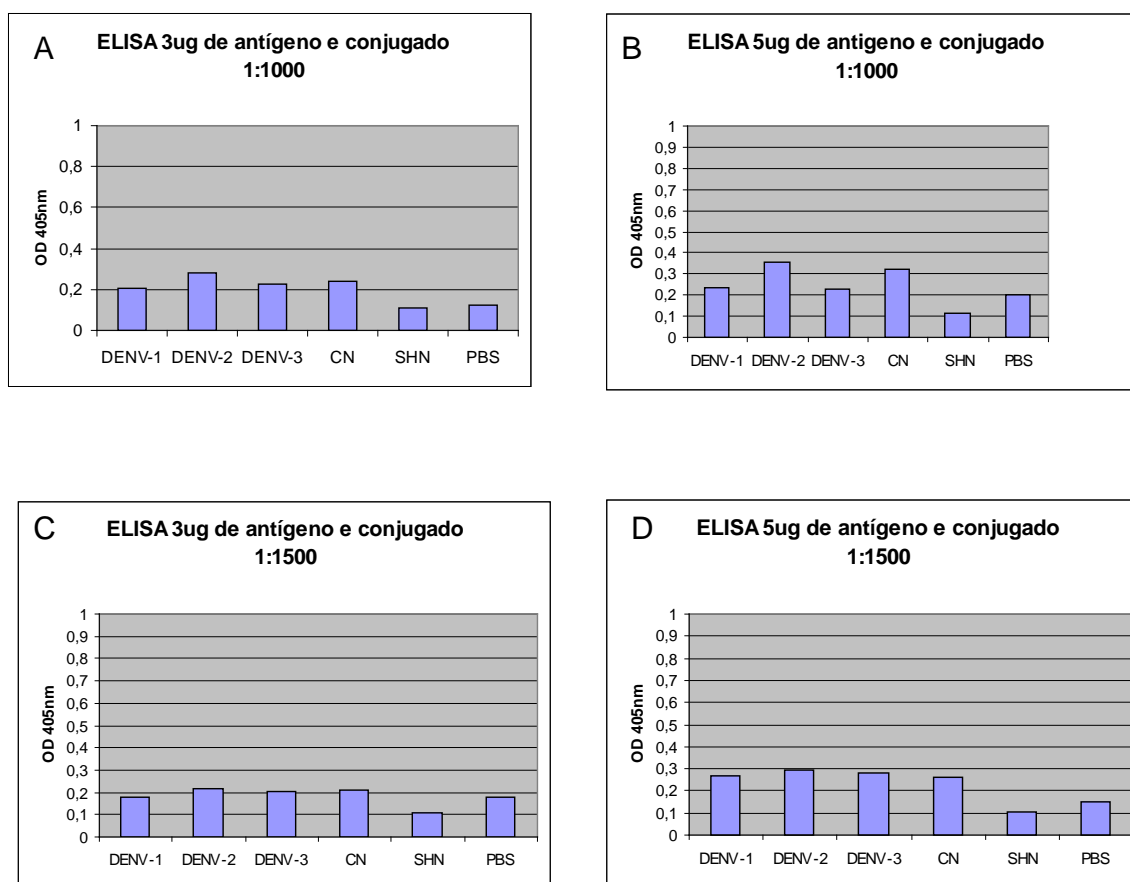


Figura 4.10: ELISA para pré-padronização da concentração de antígeno e conjugado adotados para padronização das demais variáveis do ensaio. A) ELISA utilizando 3 μ g de antígeno por poço e anticorpo conjugado diluído 1:1000. B) ELISA utilizando 5 μ g de antígeno por poço e anticorpo conjugado diluído

1:1000. C) ELISA utilizando 3 μ g de antígeno por poço e anticorpo conjugado diluído 1:1500. D) ELISA utilizando 5 μ g de antígeno por poço e anticorpo conjugado diluído 1:1500. No Eixo Y observa-se os valores de absorbância a 405nm e no eixo x os diferentes soros positivos para Dengue sorotipos 1, 2 e 3 (DENV-1, DENV-2, DENV-3) e negativo (CN) além de soro humano normal (SHN) e Tampão fosfato 1x (PBS).

No próximo ensaio (Fig. 4.11), utilizou-se como bloqueador e solução padrão, leite desnatado a 3% acrescido de BSA a 1,5%, com o intuito de aumentar a reação dos soros positivos e assim o contraste com os soros negativos. Como os valores de absorbâncias foram maiores, mas ainda semelhantes para os soros positivos, negativos e controles descartou-se essa concentração de solução padrão.

Testou-se soro normal de cabra a 3,5%, como solução bloqueadora e padrão mantendo todas as outras etapas conforme pré-estabelecido no ensaio anterior. Não houve diferenças significativas no cenário geral do ensaio, com pouco contraste entre soro negativo e positivo, entretanto nos poços controle (SHN e PBS) aparentemente houve pouca reação sugestiva de fundo (Fig. 4.11).

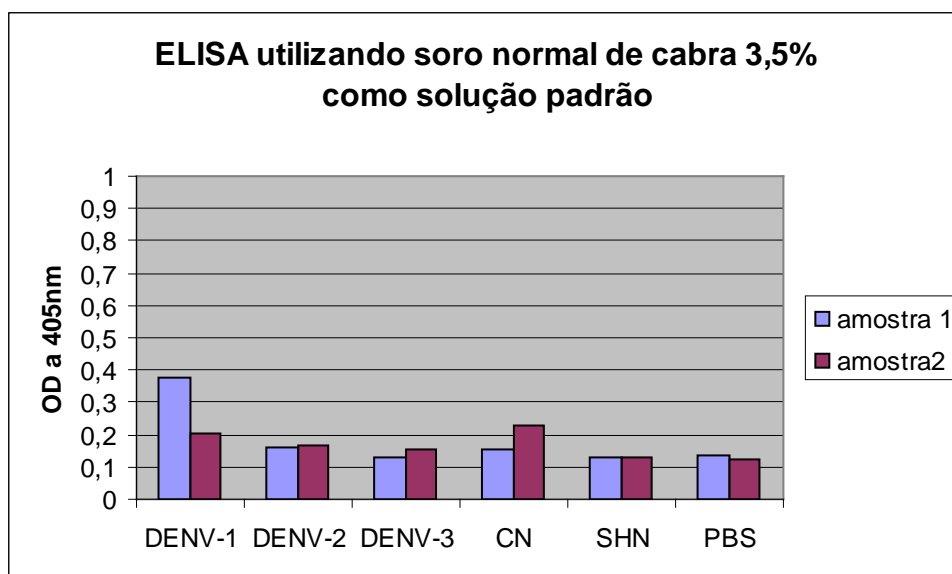


Figura 4.11: ELISA utilizando como solução padrão soro normal de cabra na concentração de 3,5%. Neste ensaio utilizou-se 2 amostras de cada tipo de soro. No Eixo Y observa-se os valores de absorbância a 405nm e no eixo X os diferentes soros positivos para dengue sorotipos 1, 2 e 3 (DENV-1, DENV-2, DENV-3) e soro negativo (CN) além de soro humano normal (SHN) e Tampão fosfato 1x (PBS).

Optou-se por diminuir o tempo de bloqueio para 1 hora e voltou-se a ter resultado de fundo nos poços com SHN e PBS. A diminuição do tempo de incubação do conjugado para 40 minutos não trouxe mudanças significativas nos valores. Fez-se a alteração do tempo de incubação para 1 hora em todas as etapas (bloqueio, captura e conjugado). Com essa modificação diminuíram as reações de fundo com PBS e SHN, porém os valores de soros positivos e negativos para Dengue apresentaram ODs semelhantes, com alguns negativos apresentando valores de OD maiores que os soros positivos (Fig. 4.12).

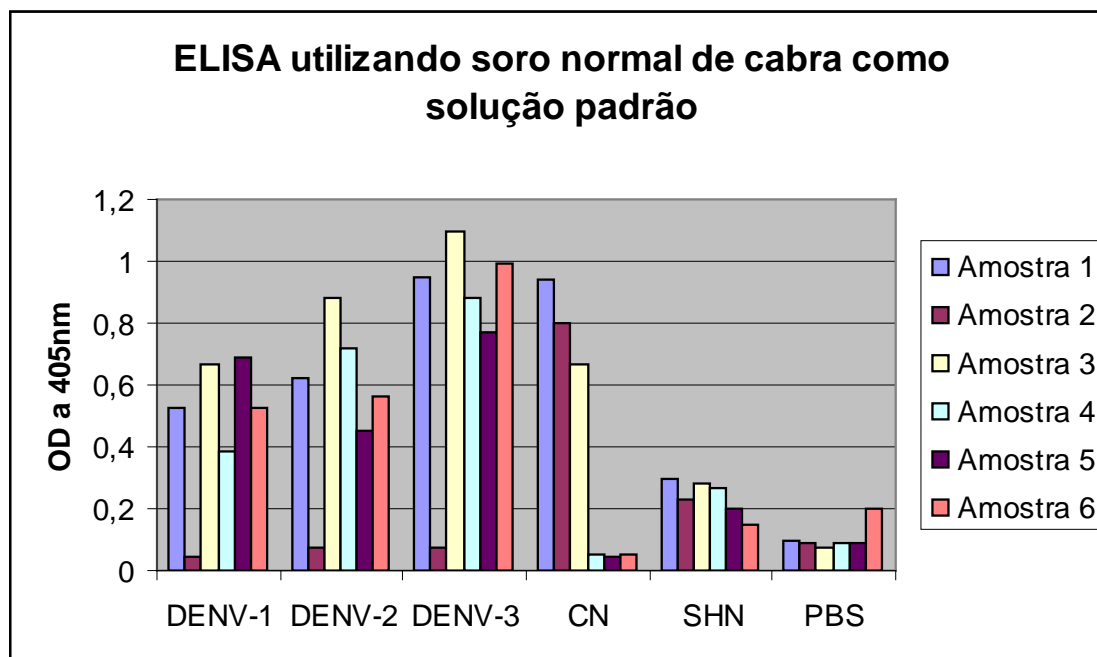


Figura 4.12: ELISA utilizando soro normal de cabra como solução padrão com variação dos tempos de incubação das diferentes etapas do ensaio (1 hora para cada etapa). Nesse ensaio foram utilizadas 6 amostras distintas de cada tipo de soro. No Eixo Y observam-se os valores de absorvância a 405nm e no eixo X os diferentes soros positivos para os sorotipos 1-3 de Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3) e negativo (CN) além de soro humano normal (SHN) e Tampão fosfato 1x (PBS).

Na próxima tentativa de padronização usou-se soro fetal bovino como bloqueador e solução padrão, onde foram testadas as concentrações de 6% e a de 12% (Fig. 4.13 e 4.14). No ensaio 4.13, com soro fetal bovino a 6% obteve-se valores altos de absorvância para vários soros, com soros negativos apresentando valores semelhantes aos positivos para Dengue. Um dos poços contendo apenas PBS apresentou um valor muito alto, provavelmente por alguma sujeira ou problema de lavagem do mesmo (Fig. 4.13). O tempo de incubação foi de 1 hora para cada etapa do ensaio.

Realizou-se um novo ensaio (Fig. 4.14) com soro fetal bovino a 12% como bloqueador e solução padrão, as condições do ensaio estão descritas na tabela 1.

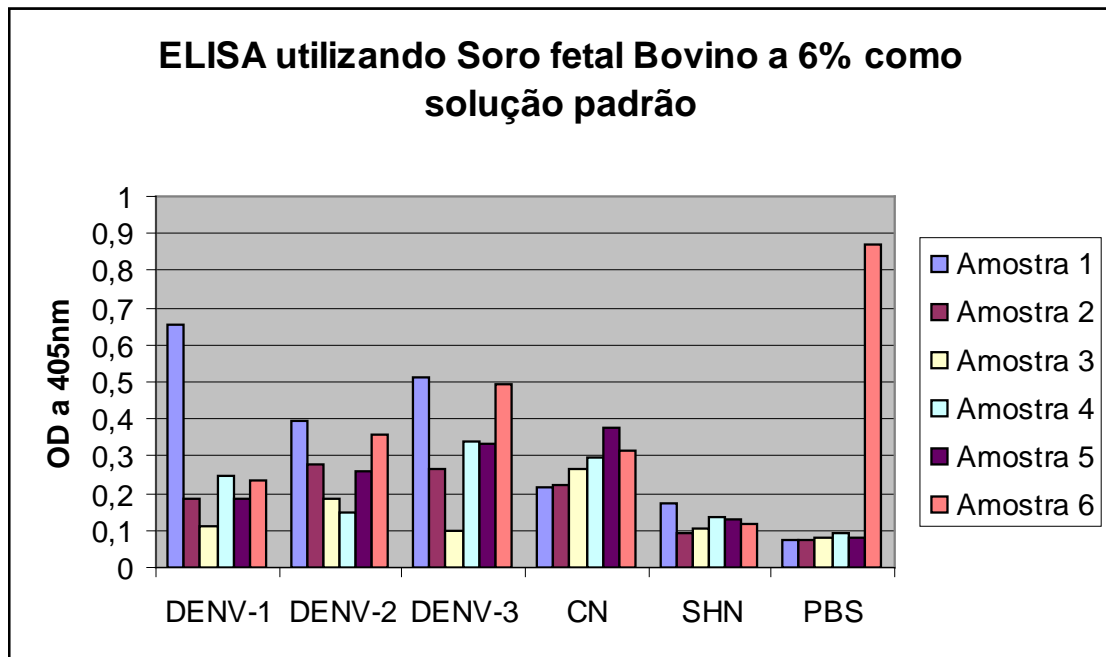


Figura 4.13: ELISA utilizando soro fetal bovino a 6%. Nesse ensaio foram utilizadas 6 amostras distintas de cada tipo de soro. No Eixo Y observam-se os valores de absorvância a 405nm e no eixo X os diferentes soros positivos para Dengue sorotipos 1, 2 e 3 (DENV-1, DENV-2, DENV-3) e negativo (CN) além de soro humano normal (SHN) e Tampão fosfato 1x (PBS). Utilizou-se o tempo de 1 hora de incubação para cada etapa do ensaio.

Tabela 1: Etapas do ensaio ELISA utilizando soro fetal bovino a 12% como solução padrão e bloqueadora.

Étapas	Tempos
Lavagem	3 vezes com PBS 1x +Tween 1%, seguida de 3 com PBS 1x
Soro fetal bovino 12%	60 min
Soro (1:20)	50 min
Conjugado	50 min
leitura	20 -40 min

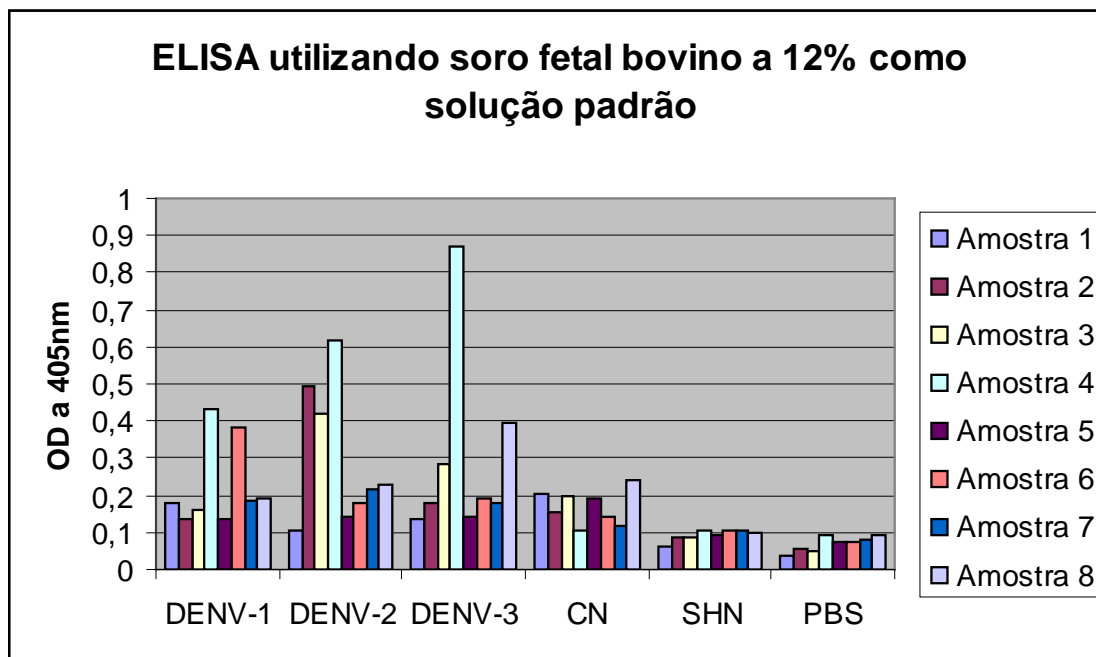


Figura 4.14: ELISA utilizando soro fetal bovino como solução padrão. Nesse ensaio foram utilizadas 8 amostras distintas de cada tipo de soro. No Eixo Y observou-se os valores de absorvância a 405nm e no eixo x os diferentes soros positivos para os sorotipos 1, 2 e 3 de Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3) e negativo (CN) além de soro humano normal (SHN) e Tampão fosfato 1x (PBS). Utilizou-se o tempo de incubação de 1 hora para bloqueio e 50 minutos de incubação nas demais etapas dos ensaios.

Uma nova tentativa de padronização utilizando soro normal de cabra foi feita incluindo as modificações feitas no protocolo do ensaio utilizado soro fetal bovino a 12%, descrito anteriormente. Neste novo ensaio (Fig. 4.15), utilizou-se como solução padrão e bloqueio soro normal de cabra a 10% (Fig. 4.15). Com esse novo ensaio obteve-se os melhores resultados de todos os ensaios com diferentes soluções padrão, pois houve uma redução na reação sugestiva de fundo. Optou-se por definir o soro normal de cabra a 10% como solução padrão.

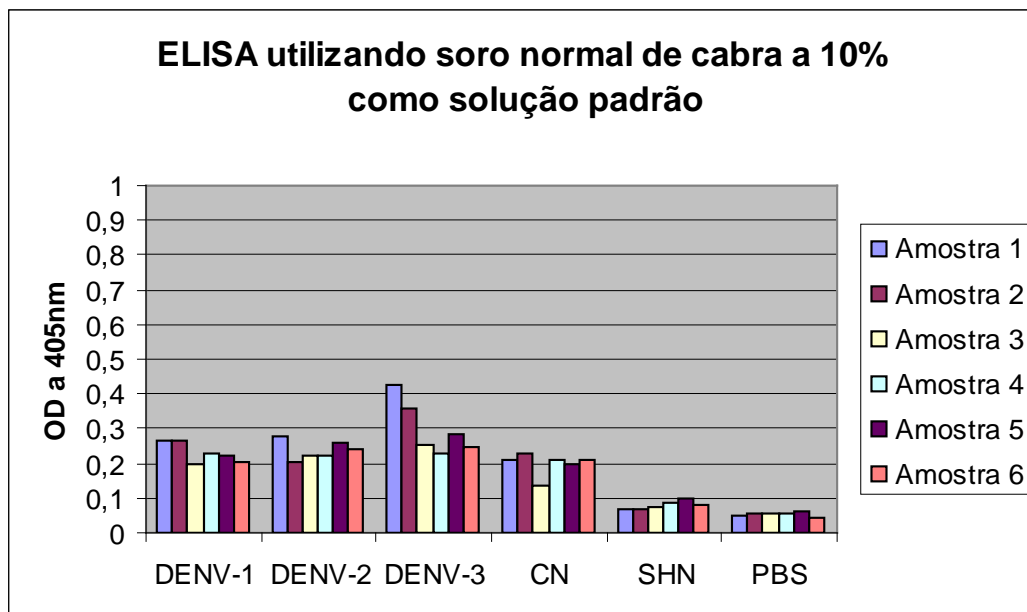


Figura 4.15: ELISA utilizando soro normal de cabra a 10% como solução padrão. Nesse ensaio foram utilizadas 6 amostras distintas de cada soro. No Eixo Y observam-se os valores de absorvância a 405nm e no eixo x os diferentes soros positivos para os sorotipos 1, 2 e 3 de Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3) e negativo (CN) além de soro humano normal (SHN) e Tampão fosfato 1x (PBS). Utilizou-se o tempo de incubação de 1 hora para bloqueio e 50 minutos de incubação nas demais etapas dos ensaios.

Apesar desse ensaio ter sido o mais próximo do esperado, as leituras de absorvância dos soros negativos ainda estavam muito próximas dos valores dos soros positivos, por este motivo resolveu-se avaliar diferentes concentrações de soro e alterar alguns tempos de incubação. Testou-se soros diluídos 1:20, 1:40 e 1:60 de forma a verificar qual a diluição ideal para a detecção de soros que tivessem títulos altos ou baixos de IgG. Observou-se que soros de título alto dos sorotipos 1 e 2 apresentaram OD um pouco maiores diluídos 1:40 e 1:60 do que quando diluídos 1:20 (Fig. 4.16). As etapas desse ensaio estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Etapas do ensaio ELISA utilizando soro normal de cabra a 10% como solução padrão e bloqueadora na avaliação de soros diluídos 1:20; 1:40 e 1:60.

Etapas	Tempos
Lavagem antes de sensibilizar	6 vezes com PBS 1x +Tween 1%;
Soro normal de cabra a 10%	60 min
Soro	45 min
Conjugado	45 min
Leitura	20 min

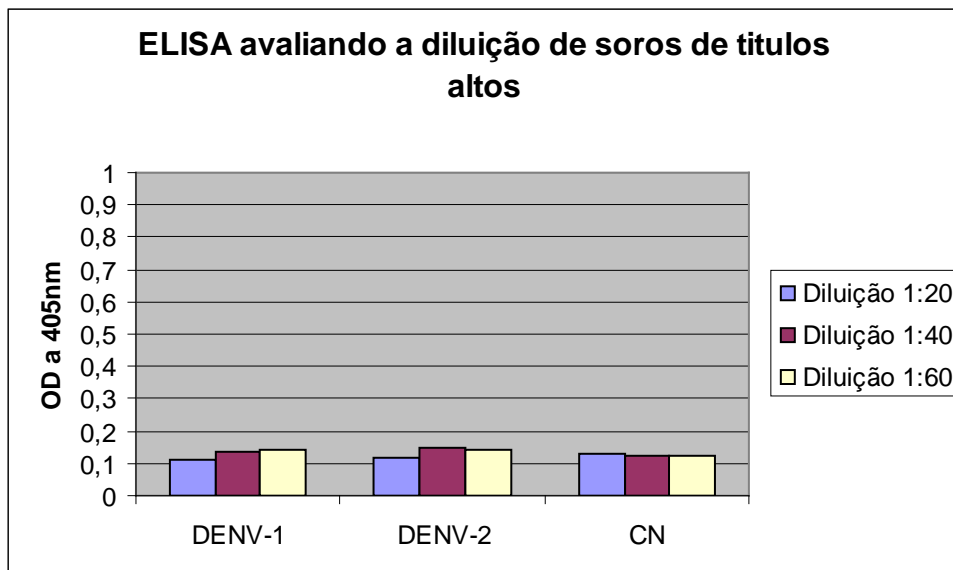


Figura 4.16: ELISA avaliando o efeito da diluição em soros de título alto. No Eixo Y observam-se os valores de absorvância a 405nm e no eixo X os diferentes soros positivos para os sorotipos 1 e 2 de Dengue (DENV-1, DENV-2,) e negativo (CN). Utilizou-se o tempo de incubação de 1 hora para bloqueio e 45 minutos de incubação nas demais etapas dos ensaios, além de 6 lavagens a cada etapa e antes de sensibilizar os poços da placa.

Como aparentemente houve diferença entre as diluições quando avaliou-se os sorotipos 1 e 2, que apresentaram valores de OD mais baixos na diluição 1:20 e semelhantes nas diluições 1:40 e 1:60, e como aparentemente não houve diferença para o soro negativo, decidiu-se adotar a diluição 1:40 como padrão para os próximos ensaios. As novas modificações inseridas neste último ensaio (lavagem antes da sensibilização e diminuição dos tempos de incubação para 45 minutos dos soros e do conjugado) também foram mantidas.

Até então, utilizou-se para a padronização do ensaio a proteína cE-DI/Iip purificada em coluna de Ni-NTA. Com o intuito de tornar o ensaio mais barato e menos trabalhoso, testou-se também o uso do extrato bruto de alface transplastômica (F1 de segunda passagem) como antígeno do DENV. Para tal, realizou-se um ELISA com o soro de DENV-2 o mesmo utilizado no ensaio de diluição dos soros de títulos altos (Tabela 2). Nesse teste sensibilizou-se com o extrato bruto de alface transformada, um poço contendo 40µl e outro contendo 80µl individualmente, com o intuito de estimar se algum desses volumes teriam a concentração mínima de antígeno capaz de detectar significativamente os anticorpos IgG específicos a Dengue. Não foi observada diferença tão significativa na leitura, pois com 40µl a OD do soro na diluição 1:40 foi de 0,140 e com 80µl 0,146, optou-se por usar o volume de 40µl de extrato bruto proteico nos próximos ensaios.

No próximo ensaio sensibilizamos poços com o extrato bruto de um *pool* de plantas de segunda passagem (F1) e também com extrato bruto de alface não transformada (Fig. 4.17).

As etapas do ensaio foram as mesmas definidas no ensaio anterior (tabela 2). Neste ensaio, foram incluídos além dos soros negativos para a Dengue que apresentavam sintomas de Dengue, soros normais sem sintomas de infecção, ou seja, que não apresentavam sintomas de Dengue e que foram negativos por todas as metodologias de detecção descritas na secção materiais e métodos. Todas as amostras, positivas e negativas para qualquer um dos sorotipos da Dengue testados, soros negativos com sintomas de Dengue e soros negativos sem sintomas, foram testados em duplicata para o extrato bruto transformado e para o extrato de alface não transformada (Fig. 4.17), no total testou-se 3 placas. Utilizou-se na sensibilização 40µl de extrato bruto proteico de alface transformada ou não transformada.

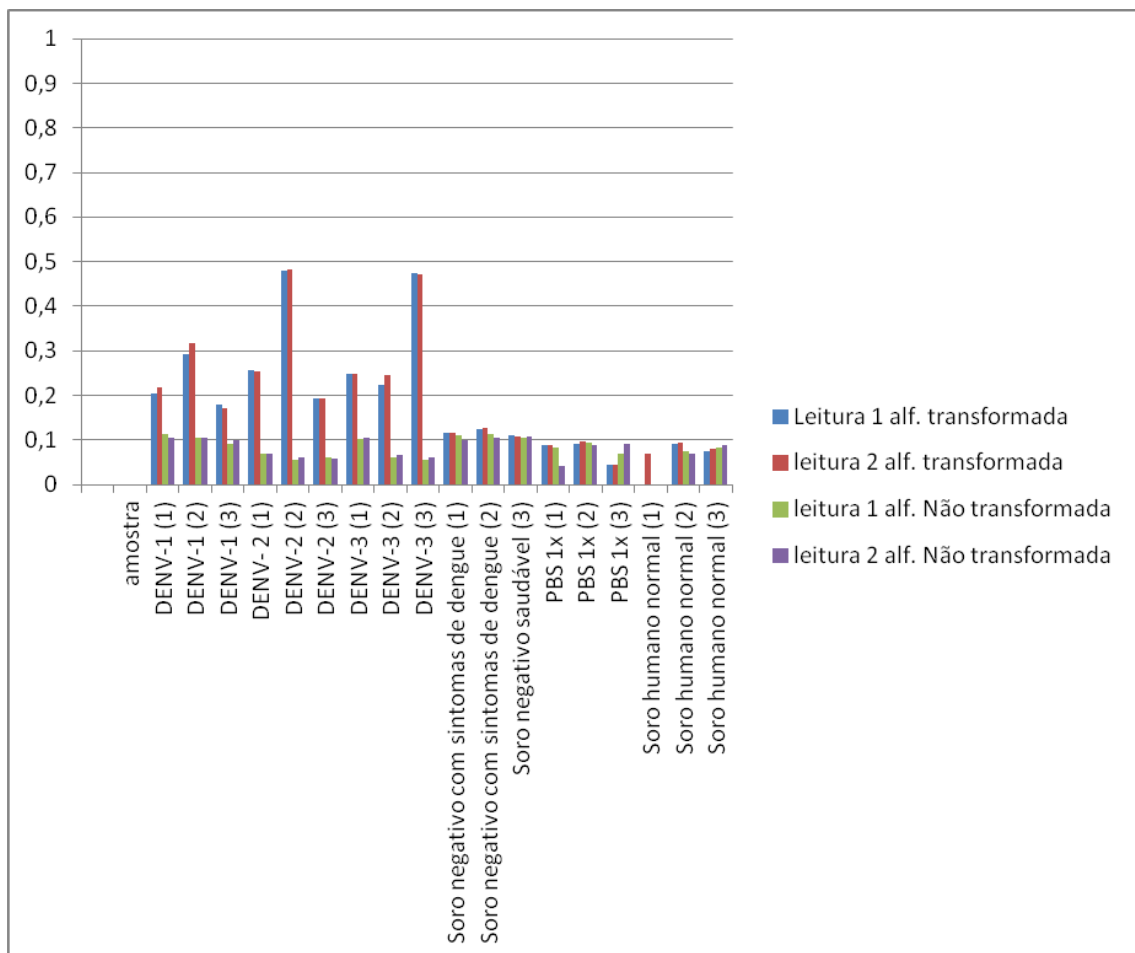


Figura 4.17: ELISA avaliando o uso de extrato bruto proteico de cloroplasto de planta transformada expressando o antígeno tetra-epitopo e de alface não transformada. As leituras estão em duplicata, demonstrando a reprodutibilidade do teste e ausência de interferência do extrato de alface não transformada na detecção.

Os dados da Fig. 4.17 nos permitiram definir o protocolo e o uso de extrato bruto de alface transformada adotado nesse ensaio como padrão, pois há uma diferença entre as absorbâncias dos soros positivos e negativos com ausência ou pouca reação de fundo nos

poços controle contendo SHN e PBS 1x, além disso, os dados obtidos em duplicata parecem ser reproduzíveis. Baseado nesses dados utilizou-se esta padronização para os demais ensaios.

A próxima avaliação consistiu em verificar se diferenças de pH no tampão utilizado na sensibilização faria alguma diferença nos valores de absorbância, poços foram sensibilizados onde os 40µl de extrato bruto foram diluídos em 60µl de PBS 1 x, pH 7.4, como realizado até então em todos os ensaios, ou em tampão alcalino (carbonato/ bicarbonato) de pH 9.6, que é solução de sensibilização em alguns ensaios diagnósticos para Dengue. Não observou-se variação significativa nas ODs de 2 soros da Dengue para cada um dos sorotipos 1, 2 e 3, então por praticidade optou-se por sensibilizar com PBS 1x.

Os ensaios feitos após padronizar todas as variáveis foram sempre realizados com controle de fundo para cada poço contendo amostra de soro positivo ou não, conforme esquematizado na Fig. 4.18, onde os poços verdes foram sensibilizados com antígeno (extrato bruto) e os em branco não. Conduziu-se o ensaio de forma que os soros positivos de DENV1-4, soros negativos, positivos para a Febre amarela e negativos para a Dengue vacinados contra Febre amarela, fossem distribuídos na placa aleatoriamente. Cada soro foi incubado individualmente em um poço sensibilizado com o extrato bruto e simultaneamente no poço acima sem sensibilização nenhuma com antígeno, ao invés de sensibilizar com o extrato bruto colocamos nos poços não sensibilizados apenas PBS 1x.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 4.18: Representação da placa de ELISA demonstrando os poços sensibilizados com o extrato bruto contendo o antígeno cE-DI/IIp. Em verde e os não sensibilizados contendo PBS 1x, nos poços em branco.

Os poços da linha horizontal acima dos poços verdes foram os controles de fundo dos poços abaixo, assim sendo: a linha A é controle da linha B, e assim sucessivamente. As colunas 1 e 12 não foram utilizadas no ensaio.

Caso algum poço controle de fundo apresentasse sinal de reação, os poços adjacentes não eram considerados para leitura. Abaixo seguem os resultados que foram considerados para estimar o ponto de corte do ensaio, bem como a avaliação do potencial antigênico do peptídeo cE-DI/IIp em extrato bruto.

Nesta etapa do ensaio, um total de 80 soros foi testado, 53 positivos e 27 negativos para a Dengue. Os 27 soros negativos para a Dengue e que foram utilizados para estipular o ponto de corte, eram compostos por 5 indivíduos negativos e que não apresentaram sintomas de febre ou qualquer outro semelhante à Dengue, 3 casos confirmados de Febre amarela e 3 soros de indivíduos recentemente vacinados contra Febre amarela. A maioria dos soros negativos (16 no total) eram de pacientes negativos para a Dengue e que apresentavam sintomas consistentes com a Dengue segundo os critérios de classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO 2009).

O ponto de corte foi estimado pela média da absorbância dos 27 soros negativos adicionada ao desvio padrão multiplicado por 3 vezes, o que garantiu um intervalo de confiança de 99% e o valor para o ponto de corte foi 0,136. Dos 53 soros positivos, 12 pertenciam ao sorotipo 1, 15 ao sorotipo 2, 12 ao sorotipo 3 e 11 ao sorotipo 4. Com base neste ensaio a sensibilidade geral foi de 71,7%, com variação de sensibilidade dentre os quatro sorotipos e a especificidade do teste foi de 100% (Tabela 3), pois não houve falsos positivos.

Como observado na Tabela 1, os dados preliminares demonstram uma sensibilidade de 91,6%. 86,6% 75,0%, e 18,2% para os sorotipos 1, 2, 3 e 4 da Dengue, respectivamente, o que significa uma sensibilidade geral de 71,7%. A distribuição das absorbâncias dos diferentes sorotipos desse ensaio pode ser avaliada na Fig. 4.19.

Tabela 3: REC-IgG-ELISA usando extrato bruto de cloroplasto de alface contendo o antígeno recombinante tetra-epitopo da Dengue.

Grupo* ^a	Nº de soro positivo/ total testado ^b (%)	
	Negativo* ^b	Positivo
A (casos de DENV-1; <i>n</i> = 12)	1/12 (8,3)	11/12 (91,6)
B (casos de DENV-2; <i>n</i> = 15)	2/15 (13,3)	13/15 (86,6)
C (casos de DENV-3; <i>n</i> = 12)	3/12 (25,0)	9/12 (75,0)
D (casos de DENV-4; <i>n</i> = 11)	9/11 (81,8)	2/11 (18,2)
E (casos de DENV, sorotipo não identificado; <i>n</i> = 3)	0/3	3/3 (100)
Total dos grupos A-E; <i>n</i> = 53	15/53 (28,3)	38/53 (71,7)
F (indivíduos saudáveis; <i>n</i> = 05)	05/05 (100)	00/05
G (casos de febre amarela; <i>n</i> = 03)	03/03 (100)	00/03
H (indivíduos saudáveis vacinados contra febre amarela; <i>n</i> = 03)	03/03 (100)	00/03
I (casos DENV negativos com sintomas de dengue; <i>n</i> = 16)	16/16 (100)	00/16
Total dos grupos F-I; <i>n</i> = 27	27/27 (100)	00/27

*a) grupo de cada tipo de soro, *b) valores absolutos e percentuais de resultados positivos e negativos.

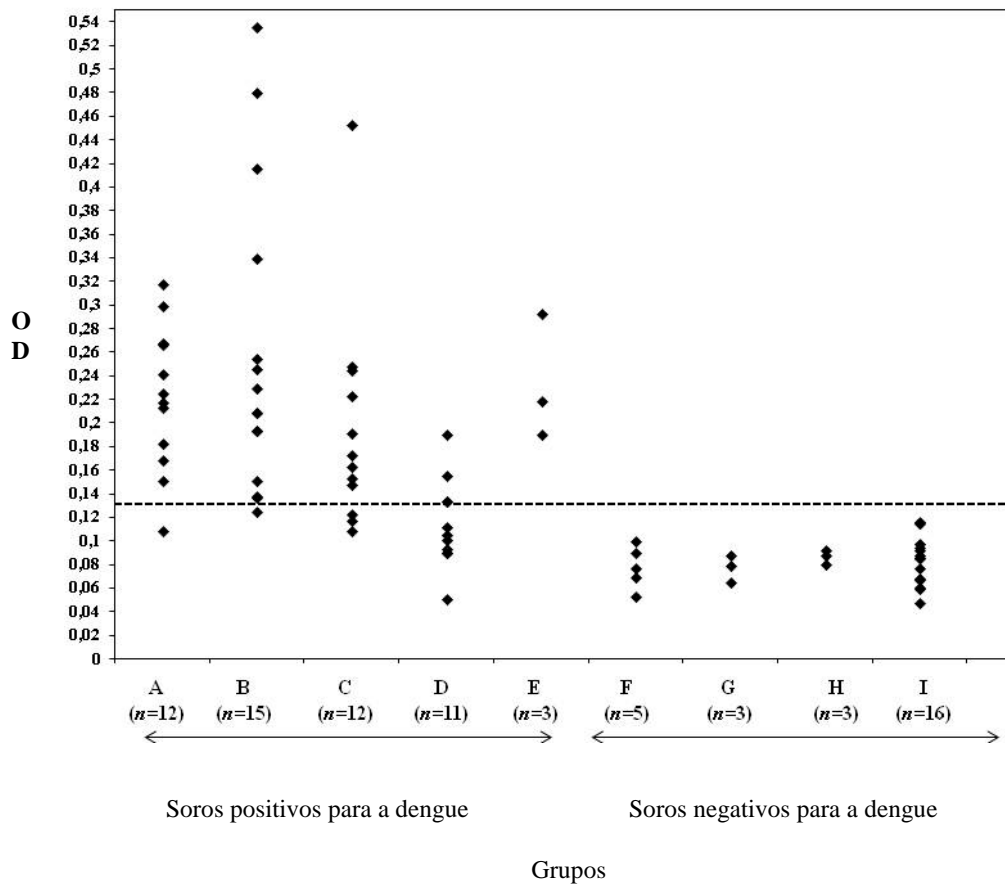


Figura 4.19: ODs dos soros positivos e negativos para Dengue em seus diferentes subgrupos. A-E: casos positivos para Dengue. A: soros positivos para DENV-1; B: soros positivos para DENV-2; C: soros positivos para DENV-3; D: soros positivos para DENV-4; E: soros positivos para Dengue não sorotipados; F-I: soros negativos para Dengue. F: indivíduos saudáveis sem sintomas de Dengue; G: indivíduos positivos para Febre amarela; H: indivíduos saudáveis vacinados contra a febre amarela; I: Dengue negativo com sintomas de Dengue. A linha pontilhada indica o ponto de corte na OD 0,136.

A Figura 4.19, permite a visualização das absorvâncias para todos os grupos positivos e negativos para a Dengue, onde constatou-se valores maiores de OD para alguns soros do sorotipo 2 da Dengue. Um soro de DENV-4 apresentou OD semelhante ao ponto de corte e foi considerado negativo, o mesmo foi feito para um soro do sorotipo 2. Não foi observada reação cruzada com os soros positivos para Febre amarela e vacinados contra a Febre amarela, conforme esperado. Os soros negativos mantêm-se abaixo do ponto de corte demonstrando a ausência de falso positivo (Ferreira e Ávila 2001). Conforme esses dados, a sensibilidade geral desse ensaio foi estimada em 71,7% e a especificidade em 100%.

4.5.1 REC- ELISA IgG com soros pareados

Para avaliar se o antígeno comporta-se da mesma forma no estudo de infecções primárias e secundárias e se o período da infecção faz diferença na detecção de IgG, fez-se um estudo de soros pareados para os sorotipos 1, 2, 3, e parcialmente para o sorotipo 4, devido a indisponibilidade de soros pareados para o mesmo. Soros onde o sorotipo não foi identificado também foram utilizados nessa avaliação.

Houve diferenças de positivities para fase aguda e convalescente da infecção entre as infecções primária e secundária, sendo que o percentual de positividade geral na fase aguda da infecção foi de 30.33% (27/89) para infecções primárias e 50% (42/84) para as infecções agudas secundárias (Tabela 2). Dentre os sorotipos observamos que na fase aguda dos casos de infecção primária 34,48% (10/29) dos DENV-1; nenhum (0/10) dos DENV-2; 42,85% (12/28) dos DENV-3; 44,49% (4/9) dos DENV-4 e 7,69% (1/13) dos casos de DENV não sorotipados obtiveram ODs com valores positivos. Dos casos de infecção secundária, 20% (2/10) dos DENV-1; 22,2% (4/18) dos DENV-2 e 50% (8/16) dos DENV-3 foram positivos na fase aguda. Todos os DENV-4 analisados para infecção aguda na fase secundária (n=5) foram positivos, não havia disponíveis soros da fase convalescente em infecção secundária para este sorotipo. Para os casos de infecção secundária os percentuais de positividade foram de 50% e 96, 2% para as infecções aguda e convalescente, respectivamente.

Tabela 4: ELISA com os soros pareados dos sorotipos 1 a 4 de DENV, nas fases aguda e convalescente, para infecção primária e secundária.

Sorotipo	Infecção primária				Infecção secundária			
	Aguda		Convalescente		Aguda		Convalescente	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
DENV-1	10/29 (34,48%)	19/29 (65,51%)	26/29 (89,65%)	3/29 (0,0%)	2/10 (20%)	8/10 (80%)	10/10 (100%)	0/10 (0,0%)
DENV-2	0/10 (0,0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	0/10 (0,0%)	4/18 (22,22%)	14/18 (77,77%)	18/18 (100%)	0/18 (0,0%)
DENV-3	12/28 (42,85%)	16/28 (57,14%)	25/28 (89,28%)	3/28 (0,0%)	8/16 (50%)	8/16 (50%)	16/16 (100%)	0/16 (0,0%)
DENV-4 (pareados)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	*	*	*	*
DENV-4 (não pareados)	4/7 (57,14%)	3/7 (42,85%)	*	*	5/5 (100%)	0/5 (0%)	*	*
DENV- NS	1/13 (7,69%)	12/13 (92,30%)	6/13 (46,15%)	7/13 (53,84%)	23/34 (67,64%)	11/34 (32,35%)	31/34 (91,17%)	3/34 (8,82%)
TOTAL	27/89 (30,33%)	62/89 (69,66%)	67/82 (81,70%)	15/82 (18,29%)	42/84 (50,0%)	42/84 (50,0%)	76/79 (96,20%)	3/79 (3,79%)

DENV-1-3 representa os sorotipos de 1-3 do DENV, POS e NEG o número de amostras positivas e negativas respectivamente, para os diferentes sorotipos. Entre parênteses o percentual para cada sorotipo e total nos dois perfis de infecção. * sorotipo não testado

Os valores de absorvância dos diferentes sorotipos foram maiores na fase convalescente do que na aguda tanto nos casos de infecção primária (Tabela 3 em anexo) quanto secundária (Tabela 4 em anexo). Os soros utilizados na avaliação do painel de soros pareados apresentavam títulos variados de anticorpos, como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4 (em anexo), onde foram analisados sorotipo, título de anticorpos, resposta imune primária ou secundária. O tipo viral foi identificado por isolamento viral ou PCR.

Conforme recomendado pelo manual de diagnóstico e manejo clínico da Dengue, (BRASIL 2007), realizou-se juntamente com o painel a avaliação da existência de reação cruzada do antígeno tetra-epitopo com soros IgG positivos para Sarampo e Rubéola, e conforme observado na Tabela 7 (em anexo), possivelmente inexistente cruzada com IgGs para essas viroses, pois a especificidade nesse ensaio foi de 100%.

5-Discussão

Este trabalho visou o desenvolvimento de um antígeno que servisse como insumo para detecção sorológica da Dengue no formato ELISA. O formato ELISA foi o escolhido devido as características do ensaio como grande sensibilidade, fácil manuseio e a possibilidade do teste de um grande número de amostras ao mesmo tempo (Peeling, Artsob et al. 2010). Para tal, testou-se o potencial antigênico de uma região da proteína E do vírus Dengue, ainda não explorada para finalidade diagnóstica, expressa em cloroplastos de alface.

Como a grande maioria dos trabalhos que usam a proteína de envelope (E) do DENV utiliza o domínio III para finalidade diagnóstica, devido a ampla descrição deste domínio como o maior portador de epitopos do envelope e motivo pelo qual o mesmo foi amplamente explorado para finalidade diagnóstica (Roehrig et al. 1998; Goncalvez, Purcell et al. 2004; Gromowski e Barrett 2007; Lisova et al. 2007; Saejung et al. 2007; van der Schaar et al. 2009; Martinez et al. 2010), optou-se pela utilização de uma região da proteína do envelope do DENV ainda pouco explorada, entre os domínios I e II da proteína E, porém descrita com potencial imunogênico. Dados da literatura apontam alguns aminoácidos isolados, localizados nos domínios I e II como possíveis alvos de anticorpos neutralizantes específicos para a Dengue, como E 35-50 (Beasley e Aaskov 2001), E 1-55 e E 50-57 (Roehrig et al. 1990). Entretanto, até então, nenhum desses possíveis alvos foram explorados como insumo diagnóstico, portanto o presente estudo optou por estudar esse potencial abrangendo uma região que engloba alguns desses aminoácidos descritos como epitopos, entre os domínios I e II da proteína E, aa 34-57.

A região de junção dos domínios I e II foi escolhida baseada em estudo de mapeamento de epitopos e com base na análise de alinhamento múltiplo de aminoácidos da proteína E entre os quatro sorotipos do DENV e outros *Flavivirus*, como vírus da Febre amarela, vírus da Febre do Oeste do Nilo e encefalite Japonesa, como demonstrado na figura 4.1A. Com o alinhamento das sequencias verificou-se que apesar de haverem alguns aminoácidos idênticos, a maioria destes era distinta entre os sorotipos de DENV e os demais *Flavivirus* analisados. A análise da modelagem proteica mostrou os epitopos dos 4 sorotipos bem expostos em uma estrutura *coil*, o que provavelmente garantiu grande flexibilidade ao antígeno.

Os resultados da PCR da planta mãe (Fig. 4.4) confirmaram a inserção gênica e a transformação do genoma cloroplasmático da planta de alface. Pelo fato do iniciador senso ser específico ao gene, não há amplificação na planta controle não transformada. Verificou-se também a transmissão do transgene a plantas F1 de quarta passagem como observado na Fig. 4.5, (PCR da F1 de 4ª passagem) com a amplificação de gene alvo por PCR com 2758 pb. A planta do poço 6 da Fig. 4.5, aparentemente apresentou produto amplificado como uma planta não transformada. Esse padrão de amplificação pode ter ocorrido devido a baixa presença de genoma cloroplasmático transformado, uma vez que a degradação e diminuição do DNA cloroplasmático é um evento comum durante o desenvolvimento da planta e maturação da folha (Rowan e Benedich, 2009). No caso das plantas analisadas, as mesmas encontravam-se com as folhas maduras e talvez já pudessem apresentar o declínio do DNA cloroplasmático, o que poderia diluir o número de cópias transformadas presentes na extração. É conhecido que quanto mais adiantado o estágio de maturidade da folha e quanto mais próxima à fase de senescência, maior é a diminuição de DNA cloroplasmático devido à degradação que pode até mesmo esgotar todo o DNA do cloroplasto quando a planta estiver na fase de senescência (Rowan e Benedich, 2009).

Os demais fragmentos com tamanho distinto do esperado podem ter ocorrido por amplificação inespecífica, até mesmo de DNA genômico, como no caso da banda inespecífica visualizada no genoma selvagem (poço 1 da Fig. 4.5) e nos demais poços.

O *Western blotting* mostrou a expressão do peptídeo cE-DI/Iip em de plantas da F1 de 2ª e da 4ª passagem (Fig. 4.7A, B). O DOT ELISA de plantas de 3ª passagem também demonstra a expressão do peptídeo cE-DI/Iip, entretanto parece haver uma diferença de expressão entre as diferentes plantas analisadas (Fig. 4.8). Essa diferença no padrão de expressão pode ser advinda do caráter heteroplásmico, onde uma planta pode ter mais cloroplastos não transformados que a outra (Maliga 2004), ou devido a fatores abióticos que interferem na expressão de proteína da planta (Feller et al. 2008). Em caso de estresse abiótico, que incluem carência luminosa, fatores nutricionais e até mesmo calor, as proteínas expressas no cloroplasto, incluindo a rubisco, são degradadas e os aminoácidos oriundos deste catabolismo redistribuídos dentro da planta via floema para serem utilizados na síntese de proteínas em outras partes da planta (Feller et al. 2008), de forma a acelerar o processo de senescência, onde proteínas e DNA cloroplasmáticos são reduzidos (Rowan e Benedich, 2009). O estudo do ponto ótimo de expressão proteica, com a otimização de variáveis abióticas, ainda precisa ser analisado para este trabalho, de forma a otimizar o sistema de produção do antígeno.

Apesar da comprovação da transmissão do transgene para as diferentes afiliações e sua expressão em plantas F1, uma planta homoplásmica ainda não foi obtida, mesmo depois de 4 passagens em meio seletivo. Atualmente o esforço para obter uma planta homoplásmica continua, mas aparentemente o *Southern blotting* mostra heterogenicidade de genoma de cloroplasto da planta (dados não mostrados). O vetor utilizado para a transformação de cloroplastos foi o pRL1001, o qual apresentou a produção de GFP em alface *cv. Cisco* com aproximadamente 36% de proteína alvo em relação à fração de proteína cloroplasmática total solúvel, quando a mesma era homoplásmica (Kanamoto, et al. 2006).

A importância de se obter a planta homoplásmica está no aumento da expressão de proteína recombinante em plastídios, entretanto, tecnicamente a substituição de todos os genomas selvagens presentes nos cloroplastos de uma célula, por genomas geneticamente transformados torna-se difícil (Maliga 2004; Anil Day e Goldschmidt-Clermont 2011) devido principalmente ao escape de genomas não transformados que usufruem da resistência em meio seletivo, produzida pelos cloroplastos que contêm o genoma transformado e conferem uma certa “resistência cruzada”, ao agente seletivo (Maliga 2004). Conforme Maliga (2004), as plantas transplastômicas regeneradas a partir de folhas pós-bombardeamento são sempre quimeras de cloroplastos geneticamente transformados e não transformados, e a obtenção da condição homoplásmica depende da seleção da progênie que pode ser tanto através das sementes, uma vez que os transplastomas estão presentes na camada de células que contribui para a linha germinativa maternal, quanto por regeneração em meio seletivo.

Kanamoto et al. (2006) obtiveram uma planta homoplásmica utilizando esse mesmo vetor de transformação na 2ª passagem em meio seletivo, todavia é desconhecido o motivo de ainda não haver uma planta homoplásmica. Sabe-se que dois tipos de heteroplasma podem ocorrer: o primeiro contém plastídios com genomas transformados e não transformados na mesma célula; o segundo contém cópias transformadas e não transformadas do genoma plastidial no mesmo cloroplasto. Quando ocorre a primeira forma de heteroplasma esta facilmente desaparece sob pressão de seleção, já na segunda forma, a heteroplasma é dificultada de ser eliminada devido a poucas cópias do gene de resistência serem suficientes para conferir resistência a organela inteira (Bock 2001). Talvez o segundo tipo de heteroplasma possa estar ocorrendo nas plantas analisadas, motivo pelo qual há dificuldade na obtenção de planta homoplásmica, entretanto, durante as rodadas de seleção os fenótipos selvagens tendem a desaparecer e pode-se chegar à planta homoplásmica (Bock 2001).

Atualmente a seleção de 5ª passagem utilizando o quádruplo de antibiótico (200µg/mL ao invés de 50µg/mL) que é recomendado no início da seleção da planta transformada, esta

sendo realizada, esperando com esta, diminuir o escape de cloroplastos contendo genoma não transformado. Apenas pela avaliação por *Southern blotting* será possível determinar a condição ou não de homoplasma, pois para a amplificação por PCR não separou-se totalmente o DNA cloroplasmático. Sabe-se que mesmo isolando o DNA cloroplasmático, genomas selvagens residuais não integrados ao genoma do cloroplasto podem estar presentes associados ao genoma nuclear, o que poderia resultar em amplificadas que sugestionem a presença de quimeras de genoma de cloroplasto selvagem e geneticamente transformado (Kanamoto et al. 2006). Esses dois perfis de DNA podem ser facilmente amplificados por PCR, dando um resultado equivocado. Portanto na análise por PCR, apenas confirmou-se a presença do gene tetra-epitopo, mas não pode-se estimar a quantidade de cópias de genoma cloroplasmático transformado e não transformado.

Testando em um protocolo ELISA padrão a variação da concentração de antígeno purificado (3 ou 5 μg), não obteve-se reação suficiente que demonstrasse o contraste de absorbância entre amostras positivas e negativas, apesar da concentração de 5 μg de antígeno apresentar reatividade mais alta do que a de 3 μg (Fig. 4.10). A combinação de 5 μg de antígeno com diluição de anticorpo secundário 1:1000 mostrou uma melhor reatividade, entretanto, a alta reação do soro negativo foi observada. A tentativa de minimizar foi feita com aumento na diluição do conjugado, diluindo-se em 1:1500.

As trocas de soluções padrão e bloqueadoras conjuntamente com alterações nos tempos de incubação das variadas etapas do ensaio diminuíram as reações inespecíficas utilizando o antígeno purificado, principalmente quando utilizou-se o soro de cabra a 10%, provavelmente pelo fato do anticorpo secundário ser produzido em cabra. Entretanto, quando utilizou-se extrato bruto de alface contendo o antígeno tetra-epitopo sem purificar (Fig. 4.17), houve uma melhor diferenciação de amostras positivas e negativas com bom contraste.

O uso do extrato bruto com melhor resultado do que o purificado não está claro, entretanto poderia haver uma maior concentração de antígeno, superior a 5 μg no extrato bruto, uma vez que não foi estimado o percentual do peptídeo tetra-epitopo na fração total de proteínas, este fator poderia fazer a diferença na detecção, ou ainda o extrato bruto no poço da placa de ELISA poderia funcionar com certo bloqueio de reação inespecífica, pelo fato de ser oriundo de planta.

Como o antígeno é produzido em planta espera-se uma redução na probabilidade de reações inespecíficas quando comparado a antígenos preparados pelos sistemas de expressão em bactéria ou culturas de células (Cuzzubbo et al. 2001; dos Santos, Miagostovich et al. 2004; Batra et al. 2011), onde há necessidade de purificação para uso do antígeno, caso

contrário, o soro humano pode reagir com proteínas do hospedeiro (principalmente de bactéria) gerando resultado falso positivo (Cuzzubbo et al. 2001; dos Santos et al. 2004; Batra, Nemani et al. 2011; Lossl e Waheed 2011). A necessidade de uma estrutura laboratorial equipada com o mínimo de aparelhos como fermentadores, autoclaves e estufas para a produção de proteínas em culturas de células bem como a possibilidade de contaminação dessas culturas, são fatores que elevam o custo da produção de proteínas em culturas celulares. Já a produção de proteínas recombinantes em planta em larga escala não requer tal infra-estrutura (Rozales-Mendonza, Soria-Guerra et al. 2010). A produção de alface transplastômica, por exemplo, pode ser feita pelo plantio em solo, ou pelo sistema de hidroponia e sua escala de produção pode ser ajustada conforme a demanda por antígeno (Kanamoto et al. 2006).

Neste trabalho, devido à compartimentalização do antígeno tetra-epitopo dentro do cloroplasto, não são exigidos equipamentos sofisticados para a extração do mesmo, pois apenas com dois passos de centrifugação para o isolamento parcial dos cloroplastos e lise com Triton X a 1%, já é viável a sensibilização da placa com o extrato bruto lisado de cloroplasto, pois provou-se ser possível a detecção sorológica sem a necessidade de purificação do antígeno, o que gera uma produção menos onerosa.

Realizou-se ainda o ensaio no qual foi definido o ponto de corte, a especificidade e a sensibilidade geral para cada um dos 4 sorotipos. Conforme observado na tabela 1 e na Fig. 4.19, os dados preliminares demonstram uma sensibilidade de 91.6%, 86.6%, 75.0%, e 18,2% para os sorotipos 1, 2, 3 e 4 de Dengue respectivamente. Com exceção do sorotipo 4, esses dados de sensibilidade podem ser considerados satisfatórios quando comparado a ensaios já presentes no mercado. No caso do sorotipo 4 a escassez de dados sobre a sua detecção por IgG-ELISA (Peeling, Artsob et al. 2010) torna difícil a comparação de sensibilidades para este sorotipo.

De acordo com Peeling et al. (2010) a avaliação de dois ensaios diagnósticos presentes no mercado e que utilizam como fonte de antígeno, antígeno recombinante dos 4 sorotipos de DENV, para a detecção de IgG e IgM, apresentou uma sensibilidade geral de 77.8% e 60.9% respectivamente, que é considerada aceitável para regiões onde a Dengue é endêmica. Para esses dois ensaios diagnósticos a especificidade de 90.6% e 90% também foi considerada satisfatória (Peeling et al. 2010). Nesse ensaio quando foram avaliados soros onde não levou-se em conta a fase da infecção (aguda ou convalescente) e tipo de infecção (primária ou secundária) obteve-se a especificidade de 100%. A aparente ausência de reação cruzada com

soros positivos para a Febre amarela, Sarampo e Rubéola demonstra mais um ponto favorável ao uso do antígeno cE-DI/IIp para confecção de um ensaio diagnóstico viável.

Os resultados de boa sensibilidade e especificidade deste antígeno para os sorotipos 1, 2 e 3, provavelmente se devem pelas características do sistema de expressão que é livre de contaminantes animais e bacterianos, associado ao fato de terem sido usadas apenas regiões de epitopos, o que facilitaria o reconhecimento por anticorpos específicos e diminui a probabilidade de reações cruzadas com demais *Flavivirus*, uma vez que a maioria das regiões de epitopos comuns às demais viroses são eliminadas do antígeno (Anandarao et al. 2006).

Desconhece-se a causa para a baixa sensibilidade apresentada pelo sorotipo 4, contudo, apesar do modelo *in silico* ter demonstrado uma boa exposição dos epitopos, *in vivo* a estrutura poderia assumir diferentes conformações devido a alta flexibilidade conferida pela estrutura *coil*, de forma que os epitopos do sorotipo 4 poderiam não estar com exposição suficiente para a ligação de anticorpos. Talvez o uso da sequência do peptídeo repetida seria uma boa estratégia para aumentar a imunogenicidade do antígeno (Matsui et al. 2010).

Na avaliação das infecções primária e secundária observou-se que para ambas, a sensibilidade geral foi melhor para a fase convalescente da doença, 81,70% (67/82) e 96,20% (76/79), contra 30,3% (27/89) e 50% (76/79) na fase aguda, respectivamente. Esse resultado de maior sensibilidade na fase convalescente para detecção de anticorpos IgG está dentro do esperado, pois a produção de IgG na fase aguda da infecção é baixa e em casos de infecção primária, aumenta nas semanas que seguem a infecção e continua aumentando nos meses seguintes, de forma que no caso de uma infecção secundária esse título já é detectável no início da infecção (Peeling et al. 2010).

Os resultados tanto para o painel de soros quanto para o primeiro ensaio após a padronização onde definiu-se o ponto de corte do ensaio, de sensibilidade e especificidade preliminares, demonstram o grande potencial do antígeno para diagnóstico quando comparado a resultados descritos pelo fabricante para os ensaios de ELISA da Panbio-Austrália, amplamente adotado para detecção sorológica da Dengue no Brasil e aos dados obtidos por Peeling et al. 2010, já cometados anteriormente. Para os ensaios de IgG-ELISA, *Dengue IgG Capture ELISA* (Panbio) e *Dengue IgG Indirect ELISA* (Panbio), a detecção de IgG é relatada apenas para infecções secundárias dos quatro sorotipos da Dengue e os ensaios não são recomendados para infecção primária. Esses dois ensaios apresentam uma sensibilidade geral para detecção de IgG de 96,3% e 97,9%, a especificidade dos 2 ensaios relatada pelo fabricante é de 100%.

O primeiro ensaio, *Dengue IgG Capture ELISA* (Panbio), na auto-avaliação analisou 54 casos de infecções secundárias obtendo uma sensibilidade de 96,3%, a análise de 35 casos de infecções primárias revelou uma sensibilidade geral de 91,4%. O segundo ensaio, *Dengue IgG Indirect ELISA* (Panbio), analisou 94 amostras positivas para infecção secundária obtendo uma sensibilidade de 97,9%, a análise de 100 amostras de região endêmica, assim como realizado no primeiro ensaio do presente trabalho, (não discriminando o tipo de infecção como primária ou secundária) revelou uma sensibilidade de 62%. Ambos os ensaios recomendam a detecção de IgM por outro ensaio simultaneamente a detecção de IgG. Vale ressaltar que ainda não foi avaliada a antigenicidade do antígeno tetra-epitopo para detecção de IgM.

Na análise dos casos falsos negativos para as infecções primárias considerando como resultado positivo qualquer uma das coletas de soro com resultado positivo (fase aguda ou convalescente), independente da outra fase ser negativa, foi possível estimar que a sensibilidade geral é de 89%. Realizando a análise individual das amostras falso negativas para as infecções primárias, detecta-se 5/10 falsos negativos com título de IgG no soro igual a 20, que é considerado negativo pelo protocolo do CDC (Miagostovich et al. 1999) adotado como contra-prova em caso de resultado duvidoso pela Fiocruz-RJ. Desconsiderando essas 5 amostras com título de IgG negativo [DENV-3 (28); DENV-4 (1); DENV-4 (4); DENV-4 (5); DENV-NS (5)- tabela 4 em anexo], a sensibilidade encontrada é de 93,5%.

O ideal para o diagnóstico sorológico da Dengue por ELISA, seria a detecção de IgM e IgG simultaneamente, aumentando desta forma a sensibilidade do ensaio (Miagostovich et al. 1999). Em perspectivas futuras, o antígeno tetra-epitopo poderá ser testado para esta finalidade almejando um aumento na sensibilidade geral do ensaio.

6-Conclusão:

- ✓ O antígeno tetra-epitopo recombinante do vírus Dengue foi expresso compartimentalizado em cloroplastos de alface transplastômica e seu uso como antígeno para detecção de anticorpos IgG foi possível a partir do lisado de extrato bruto de cloroplastos.
- ✓ A confirmação da expressão proteica em plantas da F1 por *Western blotting* e ELISA-IgG demonstra transmissão do transgene para esta filiação.
- ✓ A análise do DNA cloroplasmático por PCR sugere que as plantas ainda apresentam um perfil de transformação heteroplásmico. Almeja-se a obtenção de uma planta homoplásmica que provavelmente será obtida através da seleção que continua sendo feita em meio seletivo.
- ✓ O ELISA para detecção de IgG em soros de paciente apresentou uma sensibilidade geral de 71% e especificidade de 100%, em soros nos quais não havia sido determinada a fase e tipo de infecção. Houve diferença de sensibilidade dentre os sorotipos e não observou-se reação cruzada com soros positivos para Febre amarela, Rubéola e Sarampo.
- ✓ Na avaliação com soros pareados, o ELISA revelou uma sensibilidade maior na fase convalescente do que na fase aguda da doença, tanto para infecções primárias (81%) quanto secundárias (96%), o que nos leva a inferir que a fase da coleta interfere na habilidade do antígeno para detectar anticorpos IgG. A sensibilidade geral para os dois perfis de infecções desconsiderando a fase da doença (aguda ou convalescente) revelou uma sensibilidade geral de 89% para as infecções primárias, já para as infecções secundárias não há diferença, pois as três amostras negativas são para as duas fases da infecção, de forma que a sensibilidade permaneceu em 96%.
- ✓ Os resultados demonstram o potencial de uso desse antígeno tetra-epitopo da Dengue, expresso pelo sistema de transplastomia em alface, para insumo diagnóstico na detecção sorológica de anticorpos IgG.

7- Perspectivas

- ✓ A otimização do sistema de expressão pela obtenção de uma planta homoplásmica se faz necessário para obtenção de uma maior quantidade de proteína alvo expressa, aumentando assim a viabilidade de uso desse sistema para a produção do antígeno.
- ✓ A partir da planta homoplásmica pretende-se estimar o percentual de proteína alvo produzido dentro da fração total de proteína cloroplasmática e o volume mínimo de extrato bruto necessário para detecção sorológica, com o intuito de estimar o custo real de produção do antígeno para a confecção de um ensaio diagnóstico. Para tal, um estudo econômico será feito desde o plantio até a montagem final do ensaio de ELISA.
- ✓ Avaliação do antígeno tetra-epitopo para detecção de anticorpos IgM, também poderá ser realizada.

8- Referências bibliográficas

- AnandaRao, R., S. Swaminathan, et al. (2005). "A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent." Protein Expr Purif **41**(1): 136-147.
- Anandarao, R., S. Swaminathan, et al. (2006). "Recombinant multiepitope protein for early detection of dengue infections." Clin Vaccine Immunol **13**(1): 59-67.
- Anandarao, R., S. Swaminathan, et al. (2005). "The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides." Virus Res **112**(1-2): 60-68.
- Anil Day and M. Goldschmidt-Clermont (2011). "The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal." Plant Biotechnology Journal **9**: 540-553.
- Aragão, F. B., L. ; Brasileiro, A. C. M. ; Ribeiro, S. G. ; Smith, F. D. ; Sanford, J. C. ; Faria, J C ; Rech, E. L . (1996). "Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris*) co-transformed via particle bombardment." Theoretical e Applied Genetics **93**: 142-150.
- Arakawa T, M. J. Chong DK, et al. (1997). "Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants." Transgenic Research **6**: 403–413.
- Banoo, S., D. Bell, et al. (2010). "Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles." Nat Rev Microbiol **8**(12 Suppl): S17-29.
- Batra, G., S. K. Nemani, et al. (2011). "Evaluation of envelope domain III-based single chimeric tetravalent antigen e monovalent antigen mixtures for the detection of anti-dengue antibodies in human sera." BMC Infect Dis **11**: 64.
- Bock, R. (2001). "Transgenic Plastids in Basic Research e Plant Biotechnology." Journal Molecular Biology **312**: 425-438.
- Beasley DW and A. JG (2001). "Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies." Virology **279**: 447-458.
- Beasley, D. W. e J. G. Aaskov (2001). "Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies." Virology **279**(2): 447-458.
- Bonfim, K., J. C. Faria, et al. (2007). "RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*)." Molecular Plant-microbe interactions **20**: 717-726.
- BRASIL (2007). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue : diagnóstico e manejo clínico – Adulto e Criança / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 3. ed.– Brasília : Ministério da Saúde, 2007. 28 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)
- BRASIL (2010). Tópicos de Saúde – Dengue. M. d. Saúde. Brasília, 2010.

- Brasileiro, A. C. M. e V. T. C. Carneiro (1998). Manual de transformação genética de plantas. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Carrer, H. (1998). "Transformação de Cloroplastos." Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento v 5: 54-56.
- Chambers, T. J., C. S. Hahn, et al. (1990). "Flavivirus genome organization, expression, e replication." Annu Rev Microbiol 44: 649-688.
- Chen, W. J., H. R. Wu, et al. (2003). "E/NS1 modifications of dengue 2 virus after serial passages in mammalian and/or mosquito cells." Intervirology 46(5): 289-295.
- Chen, Y. C., H. N. Huang, et al. (2007). "Generation and characterization of monoclonal antibodies against dengue virus type 1 for epitope mapping and serological detection by epitope-based peptide antigens." Clin Vaccine Immunol 14(4): 404-411.
- Chilton, M. D. (1977). " Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis." Cell v.11: p.263-271.
- Crill, W. D. and G. J. Chang (2004). "Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes." J Virol 78(24): 13975-13986.
- Cuzzubbo, A. J., T. P. Endy, et al. (2001). "Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay." Clin Diagn Lab Immunol 8(6): 1150-1155.
- Daniell, H. and A. Dhingra (2002). "Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology." Curr Opin Biotechnol 13(2): 136-141.
- Daniell, H., S. Kumar, et al. (2005). "Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops." Trends Biotechnol 23(5): 238-245.
- Daniell, H., N. D. Singh, et al. (2009). "Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals." Trends Plant Sci 14(12): 669-679.
- Davoodi-Semiromi, A., M. Schreiber, et al. (2010). "Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery." Plant Biotechnol J 8(2): 223-242.
- De Cosa, B., W. Moar, et al. (2001). "Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals." Nat Biotechnol 19(1): 71-74.
- DeLano, W. (2002). "The PyMOL molecular graphics system". Disponível em: <http://www.pymol.org/>
- dos Santos, F. B., M. P. Miagostovich, et al. (2004). "Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response." Am J Trop Med Hyg 71(2): 144-152.

- Doyle, J. L. D. J. J. (1987). "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. ." Phytochemistry Bull **19**: 11-15.
- Falconar, A. K. (1999). " Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins." Arch Virol **144**: 2313-2330.
- Feller, U. Anders, I. Demirevska, K (2008). "Degradation of Rubisco and other chloroplast proteins under abiotic stress." Gen. Appl. Plant Physiology **35**: 5-18.
- Ferreira, A. W. and S. d. L. Ávila (2001). Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ª edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara.
- Figueiredo, L. T. (2000). "The Brazilian flaviviruses." Microbes Infect **2**(13): 1643-1649.
- Fisk, H. J. and A. M. Dandekar (2005). "Electroporation: introduction and expression of transgenes in plant protoplasts." Methods Mol Biol **286**: 79-90.
- Fry, S. R., M. Meyer, et al. (2011). "The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): 1199.
- Ginalski, K., A. Elofsson, et al. (2003). "3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions." Bioinformatics **19**(8): 1015-1018.
- Gomes, A. L. d. V. (2011). Expressão de genes relacionados com a indução da resposta imune inata da dengue: implicações no prognóstico Departamento de saúde pública. RECIFE Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz: 121.
- Goncalvez, A. P., R. H. Purcell, et al. (2004). "Epitope determinants of a chimpanzee Fab antibody that efficiently cross-neutralizes dengue type 1 and type 2 viruses map to inside and in close proximity to fusion loop of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein." J Virol **78**(23): 12919-12928.
- Gray, M. W. (1993). "Origin and evolution of organelle genomes." Curr Opin Genet Dev **3**(6): 884-890.
- Gromowski, G. D. and A. D. Barrett (2007). "Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus." Virology **366**(2): 349-360.
- Henchal, E. A. and J. R. Putnak (1990). "The dengue viruses." Clin Microbiol Rev **3**(4): 376-396.
- Hiramatsu, K., M. Tadano, et al. (1996). "Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence." Virology **224**(2): 437-445.

- Holmes, E. C. and S. S. Twiddy (2003). "The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus." Infect Genet Evol **3**(1): 19-28.
- Hunsperger, E. (2009.). "Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests." Emergent Infectious Diseases v. **15**: p. 436-440.
- Idrees, S. and U. A. Ashfaq (2012). "A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan." Genet Vaccines Ther **10**(1): 6.
- Jiang, X. L., Z. M. He, et al. (2007). "Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice." Transgenic Res **16**(2): 169-175.
- Kanagaraj, A. P., D. Verma, et al. (2011). "Expression of dengue-3 premembrane and envelope polyprotein in lettuce chloroplasts." Plant Mol Biol **76**(3-5): 323-333.
- Kanamoto, H., A. Yamashita, et al. (2006). "Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids." Transgenic Res **15**(2): 205-217.
- Kao, C. L. and e. al. (2005). "Laboratory Diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. ." Journal of Microbiology, Immunology and Infection v. **38**: p. 5 – 16.
- Kim YS, Kim MY, et al. (2009). "Expression and assembly of cholera toxin B subunit (CTB) in transgenic carrot (*Daucus carota* L.)." Molecular Biotechnology **41**: 8-14.
- Kuhn, R. J., W. Zhang, et al. (2002). "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." Cell **108**(5): 717-725.
- Kuno, G., I. Gomez, et al. (1987). "Detecting artificial anti-Dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay." Am J Trop Med Hyg **36**(1): 153-159.
- Kurane, I. (2007). "Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **30**(5-6): 329-340.
- Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, et al. (1992). "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction." J Clin Microbiol **30**(3): 545-551.
- Li, J. T., L. Fei, et al. (2006). "Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations." Virology **356**(1-2): 171-178.
- Li, L., S. M. Lok, et al. (2008). "The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation." Science **319**(5871): 1830-1834.
- Lima Mda, R., R. M. Nogueira, et al. (2010). "Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil." PLoS Negl Trop Dis **4**(7): e738.

- Lisova, O., F. Hardy, et al. (2007). "Mapping to completeness and transplanted of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus." J Gen Virol **88**(Pt 9): 2387-2397.
- Lossl, A. G. and M. T. Waheed (2011). "Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes." Plant Biotechnol J **9**(5): 527-539.
- Malabadi, R. B., A. Ganguly, et al. (2011). "Overview of plant-derived vaccine antigens: Dengue virus." J Pharm Pharm Sci **14**(3): 400-413.
- Maliga, P. (2004). "Plastid Transformation in Higher Plants." Annu. Rev. Plant Biol. **55**: 289-313.
- Martinez, C. A., E. Topal, et al. (2010). "Exploring different strategies to express Dengue virus envelope protein in a plant system." Biotechnol Lett **32**(6): 867-875.
- Matsui, T., E. Takita, et al. (2010). "Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease." Transgenic Res **20**(4):735-48.
- Melo, K. M. S. d. (2012). Desenvolvimento e validação de insumos para diagnóstico de infecções pelo vírus da dengue. Departamento de Saúde Pública. Recife, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. **Dissertação de mestrado**. 178p.
- Miagostovich, M. P., F. B. dos Santos, et al. (2002). "Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001." Braz J Med Biol Res **35**(8): 869-872.
- Miagostovich, M. P., R. M. R. Nogueira, et al. (1999). "Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis." Journal of clinical virology **14**(3): 183-189.
- Modis, Y., S. Ogata, et al. (2003). "A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 6986-6991.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." Physiologia Plantarum **15**: 473-497.
- Nochi, T., H. Takagi, et al. (2007). "Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(26): 10986-10991.
- Panbio Dengue IgG Capture ELISA. Disponível em:
<http://panbiodengue.com/product/dengue-igg-capture-elisa>.
- Panbio Dengue IgG Indirect ELISA. Disponível em:
<http://panbiodengue.com/product/dengue-igg-indirect-elisa>.
- Peeling, R. W., H. Artsob, et al. (2010). "Evaluation of diagnostic tests: dengue." Nat Rev Microbiol **8** (12 Suppl): S30-38.

- Potrykus, I. (1990). "Gene transfer methods for plants and cell cultures." Ciba Found Symp **154**: 198-208; discussion 208-112.
- Roehrig JT, Johnson AJ, et al. (1990). "Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation." Virology **177**: 668-675.
- Roehrig, J. T., R. A. Bolin, et al. (1998). "Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica." Virology **246**(2): 317-328.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, et al. (2008). "Ingestion of transgenic carrots expressing the Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge." Plant Cell research **27**: 79-84.
- Rowan, B. A. and Benedich, A. J (2009). " The loss of DNA from chloroplasts as leaves mature: fact or artefact? Journal of Experimental Botany **60** (11):3005-3010
- Rybicki, E. P. (2009). "Plant-produced vaccines: promise and reality." Drug Discov Today **14**(1-2): 16-24.
- Saejung, W., K. Fujiyama, et al. (2007). "Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system." Vaccine **25**(36): 6646-6654.
- Sanford, J. C. (1987). "The Biolistic Process." Trends in Biotechnology v **6**: 299-302.
- Scholthof, H. B., K. B. Scholthof, et al. (1996). "Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants." Annu Rev Phytopathol **34**: 299-323.
- Scotti, N., M. M. Rigano, et al. (2012). "Production of foreign proteins using plastid transformation." Biotechnol Adv **30**(2): 387-397.
- Shimizu, M., M. Goto, et al. (2008). "Selectable tolerance to herbicides by mutated acetolactate synthase genes integrated into the chloroplast genome of tobacco." Plant Physiol **147**(4): 1976-1983.
- Shu, P. Y. and J. H. Huang (2004). "Current advances in dengue diagnosis." Clin Diagn Lab Immunol **11**(4): 642-650.
- Sumathi, K., P. Ananthalakshmi, et al. (2006). "3dSS: 3D structural superposition." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W128-132.
- Svab, Z. and P. Maliga (1993). "High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 913-917.
- Svab, Z. and P. Maliga (2007). "Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(17): 7003-7008.
- Taiz, L. and E. Zeiger (2004). Fisiologia Vegetal, Artmed.

- Thanavala, Y., M. Mahoney, et al. (2005). "Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3378-3382.
- Thompson JD, H. DG, et al. (1994). "improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acid Research **22**: 4673-4680.
- Vasilakis, N., E. B. Fokam, et al. (2008). "Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 2 strains." Virology **377**(2): 296-307.
- Volk, D. E., Y. C. Lee, et al. (2007). "Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus." Virology **364**(1): 147-154.
- WHO, World Health Organization. (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. Geneva. WHO World Health Organization, (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. N. edition. Geneva. disponível em:
http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf.
- WHO, World Health Organization, (2009). "Fact sheet No 117, Dengue and dengue haemorrhagic fever".
- WHO, World Health Organization. (2011). "Impact of Dengue." Geneva. disponível em:
<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>
- Wiederstein, M. and M. J. Sippl (2007). "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W407-410.
- Wilkins, M. R., E. Gasteiger, et al. (1999). "Protein identification and analysis tools in the ExPASy server." Methods Mol Biol **112**: 531-552.
- Wu, H. C., M. Y. Jung, et al. (2003). "Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen." J Gen Virol **84**(Pt 10): 2771-2779.

9-Anexos

Tabela 4: REC- ELISA IgG avaliando o comportamento do peptídeo cE-DI/Iip com soros pareados de diferentes titulações nas fases aguda e convalescente em casos de infecções primárias. A titulação foi feita para anticorpos IgG, utilizando ensaio de ELISA IgG standard do CDC. É considerado positivo o título de IgG a partir de 40. Neg significa resultado negativo e Pos resultado positivo. IgM ELISA indica resultado obtido por ELISA para detecção de anticorpos IgM, IgG ELISA alface é o resultado obtido no ensaio com o extrato bruto de alface contendo o peptídeo cE-DI/Iip. Onde há * significa que o ensaio relativo a esse campo na tabela não foi realizado.

Resposta imune primária						
sorotipo	Titulação		IgM ELISA		IgG ELISA Alface	
	aguda	convalescente	aguda	convalescente	aguda	convalescente
DENV-1 (1)	20	163840	neg	pos	neg (0,131)	pos (0,326)
DENV-1 (2)	20	160	neg	pos	neg (0,057)	pos (0,399)
DENV-1 (3)	20	2560	neg	pos	neg (0,132)	pos (0,450)
DENV-1 (4)	20	640	neg	pos	neg (0,059)	pos (0,322)
DENV-1 (5)	20	40	pos	pos	pos (0,416)	pos (0,230)
DENV-1 (6)	40	163840	neg	pos	neg (0,100)	pos (0,615)
DENV-1 (7)	20	160	neg	pos	neg (0,13)	pos (0,426)
DENV-1 (8)	20	160	neg	pos	neg (0,082)	pos (0,791)
DENV-1 (9)	20	160	neg	pos	pos (0,384)	pos (0,301)
DENV-1 (10)	20	10240	neg	pos	pos (0,321)	pos (0,899)
DENV-1 (11)	20	640	neg	pos	pos (0,231)	pos (0,436)
DENV-1 (12)	20	40960	neg	pos	neg (0,059)	pos (0,508)
DENV-1 (13)	20	40	pos	pos	pos (0,416)	pos (0,237)
DENV-1	20	160	neg	pos	neg (0,130)	pos (0,426)

(14)						
DENV-1	20	640	neg	pos	neg (0,082)	pos (0,791)
(15)						
DENV-1	20	20	pos	pos	neg (0,113)	neg (0,113)
(16)						
DENV-1	20	2560	neg	pos	neg (0,132)	pos (0,450)
(17)						
DENV-1	20	160	neg	pos	neg (0,057)	pos (0,399)
(18)						
DENV-1	20	40960	neg	pos	neg (0,059)	pos (0,508)
(19)						
DENV-1	20	640	neg	pos	pos (0,365)	pos (0,459)
(20)						
DENV-1	20	10240	neg	pos	neg (0,092)	neg (0,100)
(21)						
DENV-1	40	163840	neg	pos	neg (0,100)	pos (0,615)
(22)						
DENV-1	20	2560	neg	pos	pos (0,187)	pos (0,256)
(23)						
DENV-1	20	2560	neg	pos	neg (0,098)	neg (0,119)
(24)						
DENV-1	20	640	neg	pos	pos (0,231)	pos (0,436)
(25)						
DENV-1	20	160	neg	pos	neg (0,055)	pos (0,322)
(26)						
DENV-1	20	10240	neg	pos	pos (0,321)	pos (0,899)
(27)						
DENV-1	20	160	neg	pos	pos (0,384)	pos (0,301)
(28)						
DENV-1	20	163840	neg	pos	neg (0,131)	pos (0,326)
(29)						
DENV-2	20	40	neg	pos	neg (0,090)	pos (0,631)
(1)						
DENV-2	20	10240	neg	pos	neg (0,112)	pos (0,518)
(2)						
DENV-2	20	640	neg	pos	neg (0,096)	pos (0,609)
(3)						
DENV-2	160	40960	neg	pos	neg (0,127)	pos (0,419)
(4)						

DENV-2 (5)	20	2560	neg	pos	neg (0,091)	pos (0,489)
DENV-2 (6)	20	640	neg	pos	neg (0,096)	pos (0,609)
DENV-2 (7)	20	40	neg	pos	neg (0,090)	pos (0,631)
DENV-2 (8)	20	10240	neg	pos	neg (0,112)	pos (0,518)
DENV-2 (9)	20	2560	neg	pos	neg (0,091)	pos (0,489)
DENV-2 (10)	160	40960	neg	pos	neg (0,127)	pos (0,419)
DENV-3 (1)	20	40960	neg	pos	neg (0,061)	pos (0,959)
DENV-3 (2)	20	2560	neg	pos	neg (0,085)	pos (0,613)
DENV-3 (3)	20	640	neg	pos	neg (0,115)	pos (0,155)
DENV-3 (4)	20	160	neg	pos	pos (0,155)	pos (0,485)
DENV-3 (5)	20	10240	neg	pos	neg (0,135)	pos (0,252)
DENV-3 (6)	40	10240	neg	pos	pos (0,145)	pos (0,536)
DENV-3 (7)	20	10240	neg	pos	pos (0,139)	pos (0,558)
DENV-3 (8)	20	40960	neg	pos	pos (0,178)	pos (0,534)
DENV-3 (9)	20	10240	neg	pos	neg (0,073)	pos (0,592)
DENV-3 (10)	20	40960	neg	pos	pos (0,151)	pos (0,177)
DENV-3 (11)	20	10240	neg	pos	pos (0,248)	pos (0,150)
DENV-3 (12)	20	40	neg	pos	neg (0,125)	neg (0,125)
DENV-3	20	40960	neg	pos	neg (0,061)	pos (0,959)

(13)						
DENV-3 (14)	20	10240	neg	pos	pos (0,248)	pos (0,150)
DENV-3 (15)	40	40960	neg	neg	neg (0,123)	pos (0,194)
DENV-3 (16)	20	10140	neg	pos	pos (0,139)	pos (0,558)
DENV-3 (17)	20	40960	neg	*	pos (0,151)	pos (0,177)
DENV-3 (17)	20	160	neg	pos	pos (0,155)	pos (0,485)
DENV-3 (18)	20	40	neg	pos	neg (0,083)	neg (0,121)
DENV-3 (19)	20	40960	neg	pos	pos (0,178)	pos (0,534)
DENV-3 (20)	20	40960	neg	*	neg (0,124)	pos (0,364)
DENV-3 (21)	20	640	neg	pos	neg (0,114)	pos (0,158)
DENV-3 (22)	20	2560	neg	pos	neg (0,085)	pos (0,613)
DENV-3 (23)	20	640	neg	pos	neg (0,115)	pos (0,155)
DENV-3 (24)	20	40	neg	pos	neg (0,110)	pos (0,252)
DENV-3 (25)	20	10240	pos	pos	neg (0,135)	pos (0,252)
DENV-3 (26)	20	10240	neg	pos	neg (0,073)	pos (0,592)
DENV-3 (27)	40	10240	neg	pos	pos (0,145)	pos (0,536)
DENV-3 (28)	20	20	neg	pos	neg (0,111)	neg (0,129)
DENV-4(1)	20	*	neg	*	neg (0,125)	*
DENV-4(2)	20	*	pos	*	pos (0,961)	*
DENV-4(3)	40	*	neg	*	neg (0,128)	*

DENV-4(4)	160	*	neg	*	neg (0,105)	*
DENV-4(5)	160	*	neg	*	neg (0,092)	*
DENV-4(5)	160	*	*	*	pos (0,182)	*
DENV-4(4)	20	20	neg	neg	neg (0,127)	neg (0,106)
DENV-4(5)	20	*	*	*	neg (0,112)	*
DENV-4(6)	40	*	*	*	pos (0,659)	*
DENV-4(7)	160	*	neg	neg	neg (0,115)	*
DENV-4(8)	40	*	pos	*	pos (0,259)	*
DENV-4(9)	40	160	pos	pos	neg (0,111)	neg (0,129)
DENV NS(1)	160	160	pos	neg	neg (0,128)	pos (0,199)
DENV NS(2)	20	2560	neg	neg	neg (0,105)	pos (0,329)
DENV NS(3)	40	160	pos	pos	neg (0,098)	neg (0,119)
DENV NS(4)	*	2560	pos	pos	pos (0,198)	pos (0,214)
DENV NS(5)	20	20	pos	pos	neg (0,106)	neg (0,119)
DENV NS(6)	20	40	pos	pos	neg (0,099)	pos (0,145)
DENV NS(7)	20	40960	neg	pos	neg (0,112)	neg (0,115)
DENV NS(8)	20	640	pos	pos	neg (0,114)	pos (0,365)
DENV NS(9)	20	640	pos	pos	neg (0,092)	neg (0,100)
DENV NS(10)	20	160	pos	pos	neg (0,088)	pos (0,192)
DENV NS	20	2560	pos	pos	neg (0,098)	neg (0,114)

(11)						
DENV NS (12)	40	10240	neg	pos	neg (0,087)	neg (0,135)
DENV NS (13)	20	20	pos	pos	neg (0,110)	neg (0,122)
DENV NS (13)	20	2560	neg	pos	neg (0,114)	pos (0,158)

Tabela 5: REC- ELISA IgG avaliando o comportamento do peptídeo cE-DI/Iip com soros pareados de diferentes titulações nas fases aguda e convalescente em casos de infecções secundárias. A titulação foi feita para anticorpos IgG, utilizando ensaio de ELISA IgG standard do CDC . É considerado positivo o título de IgG a partir de 40. Neg significa resultado negativo e pos resultado positivo. IgM ELISA indica resultado obtido por ELISA para detecção de anticorpos IgM, IgG ELISA alface é o resultado obtido no ensaio com extrato bruto de alface contendo o peptídeo cE-DI/Iip. Onde há * significa que o ensaio relativo a esse campo na tabela não foi realizado.

Resposta imune secundária						
sorotipo	Titulação		IgM ELISA		IgG ELISA Alface	
	aguda	convalescente	aguda	convalescente	aguda	convalescente
DENV-1 (1)	160	40960	neg	pos	neg (0,131)	pos (0,599)
DENV-1 (2)	640	40960	neg	pos	neg (0,094)	pos (0,562)
DENV-1 (3)	160	40960	neg	pos	pos (0,221)	pos (0,473)
DENV-1 (4)	160	163840	neg	pos	neg (0,095)	pos (0,438)
DENV-1 (5)	2560	163840	neg	pos	neg (0,081)	pos (0,615)
DENV-1 (6)	160	163840	neg	pos	neg (0,095)	pos (0,438)
DENV-1 (7)	160	40960	neg	pos	pos (0,221)	pos (0,473)
DENV-1 (8)	640	40960	neg	pos	neg (0,094)	pos (0,562)
DENV-1 (9)	160	40960	neg	pos	neg (0,131)	pos (0,599)
DENV-1 (10)	2560	163840	neg	pos	neg (0,081)	pos (0,615)
DENV-2 (1)	640	163840	neg	pos	neg (0,128)	pos (0,630)
DENV-2 (2)	640	163840	neg	pos	pos (0,154)	pos (0,401)
DENV-2 (3)	640	163840	neg	pos	neg (0,078)	pos (0,393)
DENV-2	160	40960	neg	pos	pos (0,178)	pos (0,171)

(4)						
DENV-2 (5)	10240	163840	neg	pos	neg (0,057)	pos (0,330)
DENV-2 (6)	2560	40960	pos	pos	neg (0,081)	pos (0,542)
DENV- 2(7)	640	163840	neg	pos	neg (0,055)	pos (0,845)
DENV-2 (8)	160	40960	neg	pos	neg (0,135)	pos (0,540)
DENV-2 (9)	640	40960	pos	pos	neg (0,102)	pos (0,958)
DENV-2 (10)	160	40960	neg	pos	pos (0,178)	pos (0,171)
DENV-2 (11)	10240	163840	pos	pos	neg (0,057)	pos (0,330)
DENV-2 (12)	640	163840	neg	pos	neg (0,128)	pos (0,630)
DENV-2 (13)	640	163840	neg	pos	neg (0,124)	pos (0,199)
DENV-2 (14)	160	40960	neg	pos	neg (0,135)	pos (0,540)
DENV-2 (15)	640	163840	neg	pos	neg (0,078)	pos (0,393)
DENV-2 (16)	640	163840	pos	pos	neg (0,102)	pos (0,958)
DENV-2 (17)	640	163840	neg	pos	neg (0,055)	pos (0,845)
DENV-2 (18)	640	163840	neg	pos	pos (0,154)	pos (0,401)
DENV-2 (19)	2560	40960	pos	pos	neg (0,081)	pos (0,542)
DENV-3 (1)	160	163840	neg	pos	pos (0,297)	pos (0,306)
DENV-3 (2)	2560	40960	neg	pos	neg (0,055)	pos (0,446)
DENV-3 (3)	160	163840	neg	pos	pos (0,149)	pos (0,423)
DENV-3	640	163840	neg	pos	pos (0,170)	pos (0,785)

(4)						
DENV-3	640	163840	neg	pos	neg (0,114)	pos (0,508)
(5)						
DENV-3	640	163840	neg	pos	neg (0,114)	pos (0,508)
(6)						
DENV-3	160	40960	neg	*	pos (0,159)	pos 0,198)
(7)						
DENV-3	160	163840	neg	pos	pos (0,297)	pos (0,306)
(8)						
DENV-3	640	163840	neg	pos	neg (0,070)	pos (0, 785)
(9)						
DENV-3	640	10240	neg	neg	neg (0,119)	pos (0,297)
(10)						
DENV-3	640	40960	neg	neg	pos (0,265)	pos (0,398)
(11)						
DENV-3	640	640	neg	pos	neg(0,099)	pos (0,145)
(12)						
DENV-3	160	163840	neg	pos	pos (0,429)	pos (0,632)
(13)						
DENV-3	160	163840	neg	pos	pos (0,149)	pos (0,423)
(13)						
DENV-3	2560	40960	pos	pos	neg (0,055)	pos (0,446)
(14)						
DENV-3	640	40960	neg	pos	neg (0,135)	pos (0,145)
(15)						
DENV-3	640	655840	neg	pos	pos (0,187)	pos (0,256)
(16)						
DENV-4	2560	*	*	*	pos (0,166)	*
(1)						
DENV-4	640	*	*	*	pos (0,164)	*
(2)						
DENV-4	2560	*	*	*	pos (0,398)	*
(3)						
DENV-4	640	*	*	*	pos (0,199)	*
(4)						
DENV-4	2560	*	*	*	pos (0,145)	*
(5)						
DENV-NS (1)	2560	2560	neg	pos	pos (0,142)	pos (0,185)

DENV-NS (2)	10240	10240	pos	neg	neg (0,123)	neg (0,124)
DENV-NS (3)	40960	40960	pos	pos	pos (0,265)	pos (0,398)
DENV-NS (4)	40960	40960	pos	pos	pos (0,138)	pos (0,199)
DENV-NS (5)	10240	40960	pos	pos	pos (0,164)	pos (0,199)
DENV-NS (6)	163840	163840	pos	neg	pos (0,365)	pos (0,459)
DENV-NS (7)	10240	10240	pos	pos	neg (0,135)	pos (0,145)
DENV-NS (8)	40960	40960	pos	pos	pos (0,158)	pos (0,987)
DENV-NS (9)	640	2650	neg	neg	pos (0,452)	pos (0,759)
DENV-NS (10)	163840	163840	pos	pos	neg (0,127)	pos (0,436)
DENV-NS (11)	160	40960	neg	neg	pos (0,199)	pos (0,214)
DENV-NS (12)	163840	163840	neg	pos	neg (0,136)	pos (0,196)
DENV-NS (13)	163840	163840	pos	pos	pos (0,142)	pos (0,185)
DENV-NS (14)	10240	40960	pos	pos	pos (0,369)	pos (0,578)
DENV-NS (15)	10240	10240	pos	pos	neg (0,083)	neg (0,103)
DENV-NS (16)	40960	10240	pos	neg	neg (0,103)	neg (0,109)
DENV-NS (17)	10240	40960	neg	neg	pos (0,429)	pos (0,632)
DENV-NS (18)	10240	40960	neg	pos	pos (0,452)	pos (0,759)
DENV-NS (19)	10240	40960	pos	pos	pos (0,183)	pos (0,193)
DENV-NS (20)	10240	40960	neg	pos	neg (0,125)	pos (0,452)
DENV-	10240	40960	pos	*	pos (0,156)	pos (0,987)

NS (21)						
DENV-NS (22)	10240	40960	pos	pos	pos (0,164)	pos (0,379)
DENV-NS (23)	163840	163840	pos	pos	neg (0,136)	pos (0,196)
DENV-NS (24)	40960	2560	pos	neg	pos (0,163)	pos (0,195)
DENV-NS (25)	10240	40960	pos	pos	pos (0,150)	pos (0,252)
DENV-NS (26)	163840	163840	neg	pos	pos (0,268)	pos (0,459)
DENV-NS (27)	160	40960	pos	pos	neg (0,124)	pos (0,269)
DENV-NS (28)	40960	40960	pos	pos	pos (0,182)	pos (0,199)
DENV-NS (28)	10240	10240	pos	neg	neg (0,099)	pos (0,145)
DENV-NS (29)	2560	40960	neg	neg	pos (0,166)	pos (0,457)
DENV-NS (30)	655360	655360	pos	pos	pos (0,257)	pos (0,436)
DENV-NS (31)	640	40960	pos	pos	neg (0,128)	pos (0,129)
DENV-NS (32)	163840	40960	pos	pos	pos (0,325)	pos (0,329)
DENV-NS (33)	640	2560	pos	pos	pos (0,158)	pos (1,987)
DENV-NS (34)	40960	640	pos	neg	pos (0,325)	pos (0,329)

Tabela 6: REC- ELISA IgG avaliando o comportamento do peptídeo cE-DI/Iip com soros pareados de diferentes titulações nas fases aguda e convalescente em soros negativos apresentando sintomas condizentes com a dengue. A titulação foi feita para anticorpos IgG, utilizando ensaio de ELISA IgG standard do CDC . É considerado positivo o título de IgG a partir de 40. Neg significa resultado negativo e Pos resultado positivo. IgM ELISA indica resultado obtido por ELISA para detecção de anticorpos IgM, IgG ELISA alface é o resultado obtido no ensaio com o extrato bruto de alface contendo o peptídeo cE-DI/Iip.

Soros pareados negativos para a Dengue						
amostra	Titulação		IgM ELISA		IgG ELISA Alface	
	aguda	convalescente	aguda	convalescente	aguda	convalescente
Neg (1)	20	20	neg	neg	neg (0,108)	neg (0,107)
Neg (2)	20	20	neg	neg	neg (0,112)	neg (0,125)
Neg (3)	20	20	neg	neg	neg (0,087)	neg (0,115)
Neg (4)	20	20	neg	neg	neg (0,118)	neg (0,128)
Neg (5)	20	40	neg	neg	neg (0,103)	pos (0,159)
Neg (6)	20	20	neg	neg	neg (0,111)	neg (0,129)
Neg (7)	20	20	neg	neg	neg (0,108)	pos (0,452)
Neg (8)	20	20	neg	neg	neg (0,099)	neg (0,114)
Neg (9)	20	20	neg	neg	neg (0,114)	neg (0,118)
Neg (10)	20	20	neg	neg	neg (0,104)	neg (0,109)
Neg (11)	40	40	neg	neg	neg (0,114)	pos (0,365)
Neg (12)	20	20	neg	neg	neg (0,122)	neg (0,125)
Neg (13)	640	640	neg	neg	neg (0,119)	neg (0,114)
Neg (14)	20	20	neg	neg	neg (0,114)	pos (0,379)
Neg (15)	20	20	neg	neg	neg (0,088)	neg (0,102)
Neg (16)	20	20	neg	neg	neg (0,083)	neg (0,121)
Neg (17)	20	20	neg	neg	neg (0,099)	neg (0,121)

Tabela 7: REC- ELISA IgG avaliando o comportamento do peptídeo cE-DI/Iip com soros positivos para sarampo ou rubéola e suas titulações de IgG. A titulação foi feita para anticorpos IgG, utilizando ensaio de ELISA IgG standard do CDC . É considerado positivo o título de IgG a partir de 40. Neg significa resultado negativo e Pos resultado positivo. IgM ELISA indica resultado obtido por ELISA para detecção de anticorpos IgM contra o DENV, IgG ELISA alface é o resultado obtido no ensaio com o peptídeo cE-DI/Iip para IgG.

Tipo viral	Título IgG	IgM ELISA	IgG ELISA alface (OD)
sarampo (1)	20	neg	neg (0,119)
sarampo (2)	20	neg	neg (0,056)
sarampo (3)	20	neg	neg (0,111)
sarampo (4)	20	neg	neg (0,114)
sarampo (5)	20	neg	neg (0,076)
sarampo (6)	20	neg	neg (0,126)
sarampo (7)	20	neg	neg (0,084)
sarampo (8)	20	neg	neg (0,098)
sarampo (9)	20	neg	neg (0,026)
sarampo (10)	20	neg	neg (0,037)
rubéola (1)	20	neg	neg (0,054)
rubéola (2)	20	neg	neg (0,113)
rubéola (3)	20	neg	neg (0,119)
rubéola (4)	20	neg	neg (0,122)
rubéola (5)	20	neg	neg (0,032)
rubéola (6)	20	neg	neg (0,065)
rubéola (7)	20	neg	neg (0,111)
rubéola (8)	20	neg	neg (0,121)
rubéola (9)	20	neg	neg (0,114)
rubéola (10)	20	neg	neg (0,098)

Dengue virus tetra-epitope peptide expressed in lettuce chloroplasts for potential use in dengue diagnosis

Franciele Roberta Maldaner · Francisco José Lima Aragão ·
Flávia Barreto dos Santos · Octavio Luiz Franco · Monique da Rocha Queiroz Lima ·
Renato de Oliveira Resende · Raquel Medeiros Vasques · Tatsuya Nagata

Received: 24 January 2013 / Revised: 4 April 2013 / Accepted: 8 April 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract *Dengue virus* causes about 100 million cases of dengue disease per year in the world. Laboratory diagnosis is done mainly by serological techniques, which in many cases use crude virus extracts that may cause cross-reactions to other flaviviruses. These undesirable cross-reactions can be reduced or eliminated by using recombinant proteins based on restricted epitopes. Aiming to decrease flaviviral cross-reactions and non-specific interactions in dengue serological assays, a plant expression system was chosen for recombinant antigen production as a reliable and inexpensive dengue diagnostic tool. In the present report, the lettuce plastid transformation system was applied to achieve efficient and stable tetra-epitope peptide antigen production,

and its reactivity was evaluated. For this purpose, one putative epitope at positions 34 to 57 of E protein within the junction site of domains I and II of dengue virus (DENV) 1 to 4 serotypes linked by glycine linkers was expressed in lettuce chloroplasts. The potential immunoreactivity for the four DENV serotypes was evaluated using sera from patients of positive and negative dengue cases. Results indicated an overall sensitivity of 71.7 % and specificity of 100 %. No cross-reactions with the sera of yellow fever-positive or healthy individuals vaccinated against yellow fever were observed. This novel approach may provide an alternative system for the large-scale production of dengue recombinant antigens useful for serodiagnosis.

Keywords *Dengue virus* · Tetra-epitope antigen · Transplastomic plant · Dengue diagnostic

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-013-4918-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. R. Maldaner · T. Nagata
Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília,
70910-900 Brasília, Federal District, Brazil

F. J. L. Aragão (✉)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte,
70770-900 Brasília, Federal District, Brazil
e-mail: francisco.aragao@embrapa.br

F. B. dos Santos · M. da Rocha Queiroz Lima
Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, 21040-360 Rio
de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

O. L. Franco · R. M. Vasques
Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro
de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de
Brasília, SGAN Quadra 916, Módulo B, Av. W5 Norte,
70790-160 Brasília, Federal District, Brazil

R. de Oliveira Resende · T. Nagata (✉)
Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília,
70910-970 Brasília, Federal District, Brazil
e-mail: tatsuya@unb.br

Introduction

Dengue virus (DENV) is an enveloped positive-strand RNA virus in the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*, which causes one of the most prevalent arthropod-borne human diseases worldwide. About 100 million cases of *dengue* disease are registered every year. The infection causes sub-clinical, mild dengue fever or can cause a more severe form as dengue hemorrhagic fever or dengue shock syndrome (WHO 2009).

DENV consists of four antigenically distinct serotypes, known as 1 to 4. The incidence of each DENV serotype changes frequently. The genome sequence divergence among the four serotypes is greater than 30 % (Beaumier et al. 2008; Kanagaraj et al. 2011). Currently, dengue diagnosis is mainly performed by serological tests such as IgM antibody capture (MAC)-ELISA, IgG-ELISA, and NS1 antigen capture ELISA (Lima Mda et al. 2010) and/or

60 molecular techniques (conventional reverse-transcription
 61 (RT)-PCR and real time RT-PCR) (Fry et al. 2011).
 62 However, molecular techniques require more specialized
 63 equipment, the standardization of protocols, and well-
 64 trained handlers to perform the assay (Fry et al. 2011),
 65 which are more expensive and difficult to manage in devel-
 66 oping countries where dengue is endemic. The most com-
 67 mon protocols used are MAC-ELISA and IgG-ELISA,
 68 which detect DENV-specific IgM and IgG antibodies in
 69 patients' sera (Lima Mda et al. 2010), but these protocols
 70 require the DENV antigen, and, in many cases, the antigen is
 71 produced by live DENV injection into the brain of suckling
 72 mice. The use of crude extract of virus represents a potential
 73 risk to manipulators due to exposure to infectious viral
 74 preparations. In addition, the viral antigens produced by this
 75 process may cause cross-reaction with antibodies of other
 76 flaviviruses due to common epitopes present in virions
 77 (Anandarao et al. 2006; Cuzzubbo et al. 2001). One viable
 78 alternative method to produce an antigen that reduces cross-
 79 reaction is the expression of recombinant viral proteins
 80 based on restricted epitopes, which is inexpensive and safer
 81 in bio-security terms (Anandarao et al. 2006; Kurane 2007).

82 Since dengue is endemic in Brazil, an efficient and inex-
 83 pensive diagnostic kit that is easy to produce and handle is
 84 always requested. In this situation, a plant protein expres-
 85 sion system presents an alternative and attractive tool for
 86 recombinant protein production, including antigens.
 87 Transgenic plants have been used as they can constitute a
 88 low-cost approach, and the recombinant protein produced
 89 may be used at low purity in some cases; furthermore,
 90 protein production is easy to scale up according to demand
 91 (Lossl and Waheed 2011). One domain from DENV enve-
 92 lope protein (domain III) has already been expressed in
 93 *Nicotiana* plants, with a fusion of hepatitis B core protein,
 94 and this showed good immunogenicity and potential use for
 95 DENV vaccine or diagnostic reagent (Kim et al. 2010;
 96 Martinez et al. 2010), demonstrating the viability of the
 97 plant system to express DENV antigens. These two studies
 98 used plant viral vector systems to produce the DENV anti-
 99 gen, while in the present work, the chloroplast transforma-
 100 tion system was chosen.

101 Due to some characteristics of chloroplast DNA transfor-
 102 mation (transplastomic), this system is more advantageous
 103 than plant nuclear genome transformation. Many therapeutic
 104 proteins have been expressed in transgenic plants via the
 105 nuclear genome (Lim et al. 2011). However, nuclear trans-
 106 formants often present a low expression level of recombi-
 107 nant protein because of gene silencing (RNA interference)
 108 ability in the plant host and integrations in inappropriate loci
 109 (Daniell et al. 2002; Lim et al. 2011). Chloroplast genetic
 110 engineering has almost all the advantages of a bioreactor,
 111 escaping from plant gene silencing, although posttransla-
 112 tional modification is not ideal for some proteins due to

113 the prokaryotic nature of the chloroplast. The chloroplast
 114 expression system still possesses good ecological character-
 115 ization since, in many cases, gene flow via pollen is not
 116 observed (Lossl and Waheed 2011). During the last decade,
 117 the plastid transformation system has been well established
 118 and optimized. Viral and bacterial antigens have been
 119 expressed in plastids, and the initial immunological studies
 120 showed promising results in animal models (Lossl and
 121 Waheed 2011).

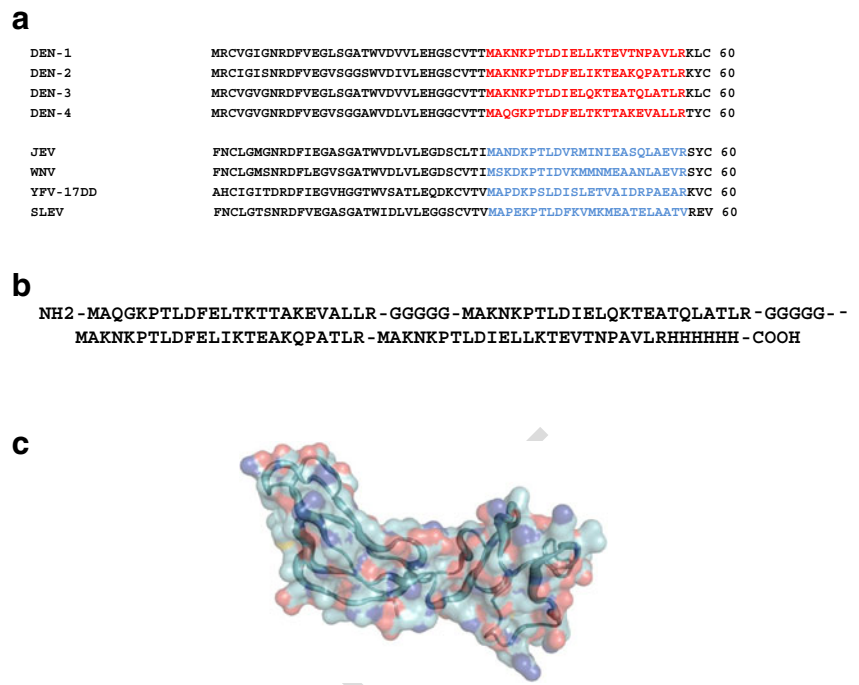
122 Lettuce (*Lactuca sativa* L.) was chosen as the plant host,
 123 because it is a commercially important crop and can be
 124 cultivated in indoor hydroculture systems; furthermore, it
 125 has already shown high potential for expression of heterol-
 126 ogous proteins in its chloroplasts. Recent reports showed the
 127 utilities of lettuce plastid expression systems producing
 128 therapeutic proteins (Lim et al. 2011), vaccines (Davoodi-
 129 Semiromi et al. 2010; Lossl and Waheed 2011), and DENV
 130 VLPs (Kanagaraj et al. 2011). In the present report, we used
 131 the lettuce plastid transformation system, which showed
 132 itself to be an efficient protein expression system. With this
 133 system, tetra-epitope peptide for potential use as antigen in
 134 diagnostic assays was successfully produced. The reactivity
 135 of this antigen to patients' sera was also evaluated.

136 Materials and methods

137 Recombinant peptide selection and design

138 The same epitope region of the E protein gene on DENV 1
 139 to 4 serotypes covering a portion of domains I and II at the
 140 34–57 position (24 aa) from E protein (a junction site),
 141 which was deduced from the literature on epitope mapping
 142 (Beasley and Askov 2001; Falconar 1999; Roehrig et al.
 143 1990), was selected for multiepitope protein expression
 144 (Fig. 1a). All putative epitope sequences were obtained
 145 aligning DENV 1 to 4 amino acid sequences (GenBank
 146 accession numbers: DENV 1—AF226685; DENV 2—
 147 AAA17499; DENV 3—AY679147; and DENV 4—
 148 NP_073286, respectively), which were conserved in most
 149 isolates worldwide in each serotype. The tetra-epitope pep-
 150 tide (named cE-DI/IIp) was designed comprising four
 151 DENV epitopes (ordered as DENV-4, -3, -2, and -1
 152 sequences) joined by penta-glycine linkers between epit-
 153 opes -4, -3, and -2, and linked directly between -2 and -
 154 1 for the extended tertiary structure in C-terminal re-
 155 gion. The hexa-histidine tail (HisTag) was added at the
 156 C-terminal of the tetra-epitope as a reference tag
 157 (Figs. 1b and 2). The codon usage was optimized for
 158 lettuce chloroplasts to obtain better translation efficien-
 159 cy. For convenient purification of tetra-epitope peptide
 160 as chloroplast compartment, no addressing or exporting
 161 peptide was added onto the peptide.

Fig. 1 Amino acid sequence analysis of flavivirus epitope (a) and tetra-epitope peptide (b, c). **a** Multiple alignment of epitope region of domains I/II junction site: *DEN-1* to 4; dengue virus serotypes 1 to 4; *JEV*, Japanese encephalitis virus; *WNV*, West Nile virus; *YFV*, yellow fever virus (17DD =vaccine strain in Brazil); *SLEV*, St. Louis encephalitis virus. **b** Amino acid sequence of tetra-epitope with glycine linker and hexa-histidine tail. **c** Model of tetra-epitope peptide compiled by PyMOL 3D model



162 Protein structure prediction and epitope structural analysis

163 The Bioinfo Meta Server software (Ginalski et al. 2003) was

164 initially used to indicate a specific template for the tech-

165 nique of threading. The best scores from the algorithm 3D

166 Jury (J Score 35.75 and R-score 8.04) suggest the PDB

167 structure (code 1oke) of crystal structure of the DENV-2

168 envelope protein (Modis et al. 2003) due to the high struc-

169 tural identity to the cE-DI/IIp peptide, which comprised

170 amino acid residues from domains I/II.

171 Three hundred theoretical tridimensional peptide struc-

172 tures were constructed using Modeller v. 9.8 for each pep-

173 tide (Sali and Blundell 1993; Eswar et al. 2006). The final

174 peptide model, i.e., geometry, stereochemistry, and energy

175 distributions in the model, was evaluated using PROSA II to

176 analyze packing and solvent exposure characteristics and

177 PROCHECK for additional analysis of stereochemical qual-

178 ity (Wiederstein and Sippl 2007) being DOPE and GA341

179 utilized for model selection. In addition, RMSD was calcu-

180 lated by overlap of C α traces and backbones onto the

181 template structure through the program 3DSS (Sumathi et

al. 2006). The peptide structures were visualized and ana-

lyzed on Delano Scientific's PyMOL (DeLano 2002) ([http://](http://pymol.sourceforge.net/)

pymol.sourceforge.net/). In order to calculate the grand av-

erage of hydrophobicity, known as GRAVY, ProtParam was

used, which is a tool that allows the analysis of various

physical-chemical parameters for a given amino acid se-

quence (Wilkins et al. 1999).

Lettuce plastid transformation

The transformation vector used for lettuce chloroplast was

based on the pRL1001, described by Kanamoto et al.

(2006). The pRL1001 vector consists of the lettuce plastid

rbcl-accD intergenic region as a targeting site for homolo-

gous recombination, an *aadA* cassette (tobacco *rrn* promoter-

aadA-tobacco *psbA* terminator) and a GFP expression cassette

(tobacco *psbA* promoter-*gfp*-tobacco *rps16* terminator). The

gfp was replaced by the DENV tetra-epitope gene cE-DI/II

between the SphI and XbaI enzyme restriction sites to gener-

ate the vector pRL-DEN4-1, which was used for the transfor-

mation of lettuce (cv. Veronica) chloroplasts according to

Kanamoto et al. (2006). Basically, lettuce plants were asepti-

cally cultured on Murashige and Skoog (Wilkins et al. 1999)

medium containing 3 % (wt/vol) sucrose and 0.6 % (wt/vol)

agar under long-day conditions (16/8 h light/dark) at 25 °C.

For particle bombardment, young leaves of 3-4 week-old

lettuces were harvested and used. Pieces of leaves were incu-

bated for 1 day on regeneration media [Murashige and Skoog

(MS) medium supplemented with 3 % (wt/vol) sucrose,

0.1 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP), 0.1 mg/L alpha-

naphthaleneacetic acid, 0.6 % agar (wt/vol), pH 5.8] with

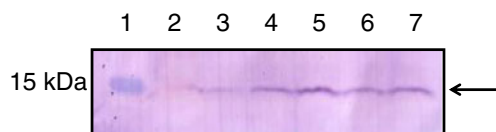


Fig. 2 Western blot analysis using anti-HisTag antibody. The arrow indicates the molecular mass of 14.8 kDa. Lane 1, benchmark pre-stained protein ladder (Invitrogen). Lane 2, crude extract from non-transformed lettuce plant. Lanes 3-7, crude extract from transformed lettuce leaves from T1 progeny

- 211 the adaxial side region directed upwards. The bombardment
212 was conducted as previously described by Aragão et al.
213 (1996). Bombarded leaves were kept for 2 days in the regen-
214 eration media, cut into pieces of 4 mm×4 mm, and placed
215 with the adaxial side down on the regeneration media contain-
216 ing 100 mg/L of spectinomycin and 500 mg/L polyvinylpyr-
217 rolidone. The backbone of pRL provides spectinomycin
218 resistance for the transformed cells. Spectinomycin-resistant
219 shoots were obtained 90 days after bombardment and were
220 screened by PCR for the presence of the cE-DI/II gene, and,
221 after confirming the positivity, a leaf piece of this shoot was
222 subjected to three rounds of selection on spectinomycin selec-
223 tion medium to eliminate non-recombinant chloroplast DNA.
224 Regenerating shoots were transferred into a sterile box con-
225 taining the BAP phytohormone-free half-MS medium includ-
226 ing 50 mg/L of spectinomycin for rooting. Plantlets were
227 acclimatized and allowed to set seeds. Potential transplastomic
228 plants were cultivated under long-day conditions (16/8 h
229 light/dark) in a greenhouse.
- 230 Analyses of gene integration by PCR
- 231 Chloroplast DNA was extracted according to Doyle (1987),
232 using CTAB buffer. Primers annealing the initiation site of the
233 multiepitope gene (forward: 5'-CTAGTGTGCTTGGGATC-
234 3') and the coding regions of accD gene (reverse: 5'-
235 CAATAGATGAATAGTCATTCGACG-3') were used for
236 the confirmation of transgene integration. The amplified
237 DNA fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis.
- 238 Chloroplast and tetra-epitope extraction
- 239 Chloroplasts from 200 g of leaves were isolated by macera-
240 tion in 8 mL of 1× PBS pH 7.4 with 0.5 M sucrose, filtered
241 in cotton, and followed by two steps of centrifugation, one
242 at 50×g for 12 min separating supernatant, and the other at
243 1,000×g for 10 min to obtain a chloroplast pellet. For
244 protein extraction, a pellet from 50 mL of filtered macera-
245 tion was resuspended in 2 mL of 1× PBS pH 7.4 with 1 %
246 Triton X. After 15 min on ice, the clarification indicated the
247 chloroplasts' lysis, and the light green supernatant was
248 recovered for Western blot and ELISA assays. Then, the
249 cE-DI/II epitope was purified using Ni-NTA purification
250 system (Invitrogen) according to the manufacture's
251 instruction.
- 252 Western blot analysis
- 253 Chloroplast proteins from 0.1 g of leaf was macerated with
254 100 μL of PBS pH 7.2 containing 1 % Triton X. After
255 15 min on ice, the lysate (10 μL) were separated by 12 %
256 SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane.
257 The membrane was incubated in a blocking step with 4 %
skim milk in 1× PBS pH 7.2 for 30 min with agitation. After
three washes (3 min each) with 1× PBS pH 7.2 containing
0.1 % Tween 20, the membrane was incubated with a
commercially available murine anti-HisTag monoclonal anti-
body (1:5,000 dilution, Sigma-Aldrich) diluted in PBS-
skim milk for 60 min. After three times of washing steps,
the membrane was incubated with anti-mouse polyclonal
IgG-alkaline phosphate conjugate (1:1,000 dilution,
Sigma-Aldrich) for 60 min. The blotted membrane was
washed three times and developed in NBT/BCIP substrate
solution for 15 min at room temperature.
- In-house IgG-ELISA for detection of anti-DENV IgG
antibodies
- In this study, the sera of 80 patients from DENV positive
cases ($n=53$) and non-dengue cases ($n=27$) were analyzed
in an in-house IgG-ELISA for detection of anti-DENV IgG
antibodies using the DENV recombinant tetra-epitope pro-
tein produced in lettuce as antigen source. The tests included
DENV-1 to 4 positive sera as well as positive DENV cases
not serotyped from epidemics in the years 1998 to 2011. For
the cross-reactivity and specificity studies, yellow fever-
positive sera in convalescent phase and healthy individuals'
sera with or without vaccinations against yellow fever were
also analyzed. All sera were received at the Flavivirus
Laboratory (Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Brazil) as den-
gue fever suspect from patients with febrile illness consis-
tent with dengue according to WHO criteria (WHO 2009).
The DENV infection was further confirmed by virus isola-
tion, detection of DENV RNA by RT-PCR, (Lanciotti et al.
1992) and/or detection by MAC-ELISA. The negative sera
were considered as negatives by all the methods described
above. Briefly, 96-well ELISA plates were washed five
times with 200 μL of 1× PBS pH7.4 containing 1 % of
Tween 20 (wash buffer). Each microwell was coated with
5 μg of purified protein diluted in 60 μL of PBS pH 7.4
buffer, for standers protocol, or with 60 μL of cE-DI/II
peptide crude extract diluted in carbonate/bicarbonate buffer
pH 9.6 or PBS pH 7.4 and incubated at 37 °C for 2 h or at
4 °C overnight. Then plates were washed five times with
wash buffer and blocked in 10 % normal goat serum in 1×
PBS pH 7.4 (standard solution) for 1 h at 37 °C. One
hundred microliters of DENV positive or negative sera
diluted in the standard solution were incubated at 37 °C
for 45 min for IgG capture. After five washes (with wash
buffer), 90 μL of goat anti-human IgG peroxidase conjugate
(Sigma-Aldrich) diluted 1:1,500 was added. After 45 min at
37 °C, the plates were washed five times again and 90 μL of
peroxidase substrate solution was added. Plates were incu-
bated for 20–40 min at room temperature, and the optical
density (OD) was measured at 405 nm. Each serum sample
was tested in duplicate. As a negative control, proteins

309	isolated from non-transformed lettuce were used to coat the	In-house IgG-ELISA using recombinant DENV tetra-epitope	352
310	plates. The cutoff OD value for seropositivity was set above	peptide	353
311	the mean OD plus three standard derivations of the negative	Aiming to access the potential use of the recombinant	354
312	control sera. The calculations of sensitivity, specificity, ef-	DENV tetra-epitope peptide in dengue diagnosis, we stan-	355
313	ficiency, negative, and positive predicted values were cal-	dardized an in-house IgG-ELISA protocol using purified	356
314	culated as follows: sensitivity: $TP/TP + FN \times 100 \%$;	tetra-epitope (data not shown). After standardizing protocol,	357
315	specificity: $TN/TN + FP \times 100 \%$; efficiency: $TP + TN/TP$	the crude lettuce chloroplast from the plants of the second	358
316	$+ FP + FN + TN$, where TP is the number of true positive;	round selection by spectinomycin was used for antigen	359
317	FP, the number of false-positive; FN, the number of false	coating ELISA. For coating onto ELISA plate, two different	360
318	negative; and TN, the number of true negative.	buffers, $1 \times$ PBS pH 7.4 (the same used in extraction without	361
319	Accession number	Triton X) and a carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6 were	362
320	This tetra-epitope gene sequence was deposited in the	compared. No significant differences were observed in ei-	363
321	EMBL/DDBJ/GenBank databases with the accession num-	ther buffer system (data not shown), so for further study,	364
322	ber of AB779692.	only phosphate buffer was used for antigen coating. The	365
323	Results	minimum volume of lettuce extract to detect DENV IgG	366
324	Design of tetra-epitope DENV recombinant protein (cE-DI/Ip)	antibodies in DENV positive sera was determined as $40 \mu\text{L}$	367
325	By the multiple alignment of amino acid sequences of	diluted in $1 \times$ PBS pH 7.4 or in a carbonate/bicarbonate	368
326	envelope protein of four serotypes of DENV and other	buffer pH 9.6. There were no positive reactions in negative	369
327	common flaviviruses [<i>yellow fever virus</i> (YFV), <i>Japanese</i>	controls using crude extract of non-transformed lettuce with	370
328	<i>encephalitis virus</i> (JEV), <i>West Nile virus</i> (WNV), and <i>St.</i>	dengue positive and negative sera (Table 1). A total of 80	371
329	<i>Louis encephalitis virus</i> (SLEV)], the region chosen for	human sera (53 DENV cases and 27 negative cases) were	372
330	epitope expression (Fig. 1a) was variable among these	used to evaluate the potential use of DENV tetra-epitope	373
331	viruses except one conserved motif KP[TS][LI]D observed	antigen. In this analysis, an overall sensitivity of 71.7 % and	374
332	with them (Fig. 1a). The order of amino acid sequences of	specificity of 100 % (Table 2) were obtained. The assay	375
333	each epitope was DENV-4/DENV3/DENV2/DENV1	efficiency was 0.86. Preliminary results observed in Table 2	376
334	(Fig. 1b). The extended coil structures were predicted in C	and in Fig. 3 indicated the differences between serotype	377
335	terminus (Fig. 1c), and all epitopes seemed to be exposed.	sensitivities. A higher sensitivity was observed in DENV-1	378
336	Analyses of gene integration	cases (91.6 % [11/12]), while sensitivities of 86.6 % (13/15)	379
337	To confirm the gene integration for lettuce chloroplast	and 75 % (9/12) were observed for DENV-2 and DENV-3	380
338	DNA, PCR was performed using a forward primer which	cases, respectively. The lowest sensitivity was observed in	381
339	anneals the flanking region of the gene and a reverse primer	DENV-4 cases (18.2 % [2/11], Table 2). All three dengue	382
340	which anneals the <i>accD</i> coding region in chloroplast ge-	confirmed cases from non-identified infecting serotypes	383
341	nome. As expected, the fragment of 866 bp was observed	were positive by IgG-ELISA using the tetra-epitope recom-	384
342	only in transplastomic lettuce DNA (Fig. S1).	binant peptide (group E) (Table 2, Fig. 3). The cutoff value	385
343	Protein expression analysis	was set at 0.136 and DENV-2 showed the highest OD values	386
344	To confirm the peptide expression, Western blot analysis	for some sera (Fig. 3). As expected, there were no cross-	387
345	was performed using anti-HisTag antibody to detect DENV	reactions with yellow fever (group G) or healthy individuals	388
346	tetra-peptide with hexa-histidine in the C terminus. A crude	vaccinated against yellow fever (group H) or false-positive	389
347	chloroplast extract of transformed lettuce leaves from T1	(groups F–I).	390
348	progeny from the second round selection was analyzed	Discussion	391
349	(Fig. 2). The Western blot analysis (Fig. 2) showed the	Nowadays, many rapid tests for dengue immunochromato-	392
350	expression of the target protein in an expected size of	graphic diagnosis have been developed and have become	393
351	approximately 12.1 kDa.	commercially available. However, the ELISA format still	394
		presents advantages over other methods due to its ease in	395
		handling a large number of samples and its relatively high	396
		sensitivity in detection of dengue (Peeling et al. 2010).	397
		Aiming to develop an inexpensive serological diagnostic	398
		tool for dengue in an ELISA format, with good sensitivity	399
		and specificity and ease of large-scale kit production, the	400

Table 1 ELISA IgG using chloroplast protein crude extract from transformed and non-transformed lettuce

Sample ^a	Transformed lettuce		Non-transformed lettuce	
	Absorbance 1	Absorbance 2	Absorbance 1	Absorbance 2
DENV-1 (1)	0.205	0.217	0.112	0.104
DENV-1 (2)	0.291	0.317	0.106	0.104
DENV-1 (3)	0.18	0.17	0.091	0.099
DENV- 2 (1)	0.256	0.254	0.068	0.07
DENV-2 (2)	0.48	0.482	0.055	0.061
DENV-2 (3)	0.194	0.193	0.062	0.057
DENV-3 (1)	0.249	0.248	0.102	0.105
DENV-3 (2)	0.223	0.244	0.062	0.067
DENV-3 (3)	0.475	0.472	0.055	0.061
Negative serum with dengue symptoms (1)	0.116	0.116	0.111	0.098
Negative serum with dengue symptoms (2)	0.125	0.126	0.114	0.106
Health serum (1)	0.110	0.107	0.105	0.108
PBS 1× (1)	0.088	0.089	0.084	0.042
PBS 1× (2)	0.092	0.096	0.093	0.089
PBS 1× (3)	0.043	0.045	0.069	0.091

^aThe same sample was tested from each extract in duplicate (absorbance 1 and 2). The number in parentheses indicated the sample number. PBS 1× signifies the use of phosphate buffer instead of serum incubation

lettuce chloroplast protein expression system was chosen. Due to the compartmentalization of expressed protein in lettuce chloroplasts, two simple centrifugation steps, followed by chloroplast lyses in phosphate buffer containing 1 % Triton X, are enough for antigen preparation, since other proteins from chloroplast do not show any cross-reactivity to human sera. We produced a tetra-epitope recombinant antigen which was able to detect IgG antibodies against the four DENV serotypes of DENV with an overall sensitivity of 71.7 % and specificity of 100 % without the need for heavy-duty purification steps, which can reduce the production costs of the diagnostic test. Many commercially available ELISA kits use attenuated virus or recombinant virus protein produced in *Escherichia coli* or other cell

cultures as their antigen source, which need fine purification for diagnostic use (Batra et al. 2011; Cuzzubbo et al. 2001; dos Santos et al. 2004). Otherwise, human sera may cross-react to host proteins, resulting in false-positive.

The overall sensitivity and specificity observed in our analysis for the detection of anti-DENV IgG can be considered as satisfactory when compared to other commercial kits. According to Peeling et al (2010) in an Evaluation of Diagnostics series, two kits that use DENV 1–4 recombinant antigen for the detection of IgM and IgG showed overall sensitivities of 77.8 and 60.9 % with specificities of 90.6 and 90 %, respectively.

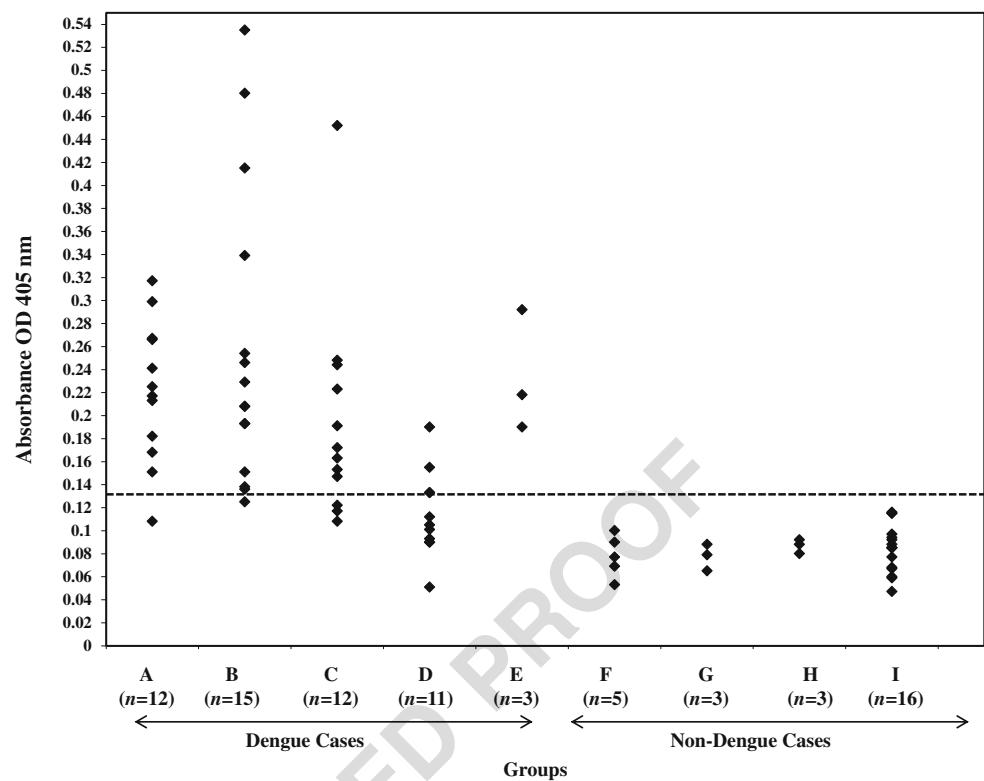
Transplastomic lettuce production can be done by planting the seed in soil or in a hydroponic system in confined

Table 2 IgG-ELISA by using crude lettuce extract from DENV tetra-epitope peptide from E domains I/II for the diagnosis of dengue serotypes 1–4

Group ^a	No. of positive sera/total tested (%)	
	Negative	Positive
A (DENV-1 cases, n=12)	1/12 (8.3)	11/12 (91.6)
B (DENV-2 cases, n=15)	2/15 (13.3)	13/15 (86.6)
C (DENV-3 cases, n=12)	3/12 (25.0)	9/12 (75.0)
D (DENV-4 cases, n=11)	9/11 (81.8)	2/11 (18.2)
E (DENV cases, serotype not identified; n=3)	0/3	3/3 (100)
Total for groups A–E, n=53	15/53 (28.3)	38/53 (71.7)
F (healthy individuals, n=05)	05/05 (100)	00/05
G (yellow fever cases, n=03)	03/03 (100)	00/03
H (healthy individuals vaccinated against yellow fever, n=03)	03/03 (100)	00/03
I (negative dengue cases presenting dengue fever symptoms, n=16)	16/16 (100)	00/16
Total for groups F–I, n=27	27/27 (100)	00/27

^aA–E, groups of DENV positive sera classified (or not) by serotypes; F–I, groups of DENV negative sera

Fig. 3 IgG antibody response to DENV tetra-epitope produced in lettuce chloroplasts determined by in-house IgG-ELISA. The *A* group, positive DENV-1 cases; *B* group, positive DENV-2 cases; *C* group, positive DENV-3 cases; *D* group, positive DENV-4 cases; *E* group, DENV cases, serotype not identified; *F* group, healthy individuals; *G* group, yellow fever cases; *H* group, healthy individuals vaccinated against yellow fever; *I* group, negative dengue cases presenting dengue fever symptoms



spaces and scaling up according to demand (Kanamoto et al. 2006), not requiring sophisticated infrastructure. The only laboratory equipment required for the production of the antigen is one middle-speed centrifuge for chloroplast precipitation, demonstrating the real potential of this system to produce DENV antigen inexpensively.

The epitope gene selected for four serotypes (which was the same position in E protein) is a rather unusual choice for DENV antigen. Most of the recombinant antigens for dengue detection targeting E protein use domain III (Batra et al. 2011; Martinez et al. 2010; Saejung et al. 2007), which is described as the most immunogenic epitope carrier of the envelope (Batra et al. 2011; Goncalvez et al. 2004; Gromowski and Barrett 2007; Lisova et al. 2007; Roehrig et al. 1998; van der Schaar et al. 2009). Our antigen covers the border region of epitopes of domains I and II of the four DENV serotypes. Despite already being described in the literature (Beasley and Aaskov 2001; Falconar 1999; Lai et al. 2007; Roehrig et al. 1990), these epitopes have not yet been used as a diagnostic tool. Lai et al. (2007) demonstrated the importance of epitopes located in domain I of DENV-4, since they neutralized viral infection by DENV-4 in vitro and conferred protection against infection with the same serotype in mice and Rhesus. In our study, the epitope position 34–57 aa showed good antigenicity, confirming the potential use of domains I and II as a diagnostic tool without cross-reaction with yellow fever, an endemic and important disease in Brazil (Table 2, Fig. 3). As observed in Fig. 1a, the amino acid analyses revealed significant

divergences among DENV, STEV, YFV, JEV, and WNV except KP[TS][LI]D motif. Due to the absence of JEV and WNV and very low incidence of SLEV in Brazil (Mondini et al. 2007; Rodrigues et al. 2010), the cross-reactivity tests against these viruses have not been assessed yet.

Although the in silico model demonstrated that epitopes were exposed, in vivo conformation may assume different forms due to high structural flexibility. In this view, extended coil structures were predicted in C terminus (Fig. 1c). Despite the template shows a beta sheet conformation, a random coil conformation was observed here. This fact could be explained by the absence of non-covalent forces observed in the template complex structure that probably maintains such secondary structure. Moreover, the model analyses showed that most amino acids present in side chains would be exposed due to high flexibility of glycine linkers, giving this peptide theoretically exposed to the outside (Fig. 1c). This could be evaluated by high b-factors, represented by larger diameter ribbon structures, especially found in glycine-rich regions of three-dimensional structural modeling (Fig. 1c).

However, serotype 4 might not be exposed enough to bind antibodies, which could explain the low efficiency of DENV-4 diagnostics compared to the other serotypes. The lower sensitivity of tetra-epitope for DENV-4 remained unclear.

Some commercial kits based on ELISA protocol, which were evaluated by Peeling et al. (2010), had a mean specificity of around 80–90 %, while the diagnostic system developed in this study showed the specificity of 100 %. This high specificity is probably due to the minimal cross-

487 reactive proteins to human antibodies in lettuce crude pro-
488 teins. This is a remarkable advantage against bacterial sys-
489 tems of recombinant protein expression.

490 Although our data are preliminary and the validation of
491 the kit is still ongoing, the low-cost diagnostic tools devel-
492 oped in this study can contribute to all public and private
493 health-care centers in Brazil, more precisely diagnosing
494 dengue cases in this country.

495
496 **Acknowledgments** We thank Dr. Hirosuke Kanamoto (Research
497 Institute of Innovative Technology for the Earth, Japan) for pro-
498 viding plasmid pRL1001. We also thank to Dr. Rita Maria
499 Nogueira (Flavivirus Laboratory, IOC/Fiocruz, Brazil) for provid-
500 ing the samples. The work was funded by the Fundação de Apoio
501 à Pesquisa do Distrito Federal (Brazil) for a research grant and by
502 the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecno-
503 lógico” (CNPq, Brazil) for the DSc scholarship to the first author.

References

- 506 Anandarao R, Swaminathan S, Khanna N (2005) The identification of
507 immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid
508 and NS4a proteins using pin-bound peptides. *Virus Res* 112:60–
509 68. doi:10.1016/j.virusres.2005.03.022
- 510 Anandarao R, Swaminathan S, Fernando S, Jana AM, Khanna N
511 (2006) Recombinant multiepitope protein for early detection of
512 dengue infections. *Clin Vaccine Immunol* 13:59–67
- 513 Aragão FJL, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC,
514 Faria JC, Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in trans-
515 genic bean (*Phaseolus vulgaris*) co-transformed via particle bom-
516 bardment. *Theor Appl Genet* 93:142–150. doi:10.1007/
517 BF00225739
- 518 Batra G, Nemani SK, Tyagi P, Swaminathan S, Khanna N (2011)
519 Evaluation of envelope domain III-based single chimeric tetra-
520 valent antigen and monovalent antigen mixtures for the detection of
521 anti-dengue antibodies in human sera. *BMC Infect Dis* 11:64
- 522 Beasley DW, Aaskov JG (2001) Epitopes on the dengue 1 virus
523 envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal
524 antibodies. *Virology* 279:447–458
- 525 Beaumier CM, Mathew A, Bashyam HS, Rothman AL (2008) Cross-
526 reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to
527 heterologous secondary dengue virus infections in mice in a
528 sequence-specific manner. *J Infect Dis* 197:608–617
- 529 Cuzzubbo AJ, Endy TP, Nisalak A, Kalayanarooj S, Vaughn DW,
530 Ogata SA, Clements DE, Devine PL (2001) Use of recombinant
531 envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus in-
532 fection in an immunochromatographic assay. *Clin Diagn Lab*
533 *Immunol* 8:1150–1155
- 534 Daniell H, Khan MS, Allison L (2002) Milestones in chloroplast
535 genetic engineering: an environmentally friendly era in biotech-
536 nology. *Trends Plant Sci* 7:84–91
- 537 Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, Verma D, Singh ND,
538 Banks RK, Chakrabarti D, Daniell H (2010) Chloroplast-derived
539 vaccine antigens confer dual immunity against cholera and ma-
540 laria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol J* 8:223–242
- 541 DeLano W (2002) The PyMOL molecular graphics system. Version
542 1.2r3pre. LLC, Schrödinger
- 543 dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RM, Schatzmayr HG,
544 Riley LW, Harris E (2004) Analysis of recombinant dengue virus
545 polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral
546 immune response. *AmJ Trop Med Hyg* 71:144–152
- dos Santos FB, Nogueira RM, Lima MR, De Simone TS, Schatzmayr
547 HG, Lemes EM, Harris E, Miagostovich MP (2007) Recombinant
548 polypeptide antigen-based immunoglobulin G enzyme-linked im-
549 munosorbent assay for serodiagnosis of dengue. *Clin Vaccine*
550 *Immunol* 14:641–643
- 551 Doyle JLDJJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small
552 quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- 553 Esvar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D,
554 Shen MY, Pieper U, Sali A (2006) Comparative protein structure
555 modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 5:*
556 *Unit 5 6* doi:10.1002/0471250953.bi0506s15
- 557 Falconar AK (1999) Identification of an epitope on the dengue virus
558 membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal
559 antibodies: design of an improved epitope sequence based on
560 common determinants present in both envelope (E and M) pro-
561 teins. *Arch Virol* 144:2313–2330
- 562 Fry SR, Meyer M, Semple MG, Simmons CP, Sekaran SD, Huang JX,
563 McElnea C, Huang CY, Valks A, Young PR, Cooper MA (2011)
564 The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is signifi-
565 cantly enhanced by using a combined antigen and antibody test-
566 ing approach. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1199. doi:10.1371/
567 journal.pntd.0001199PNTD-D-10-00128
- 568 Ginalski K, Elofsson A, Fischer D, Rychlewski L (2003) 3D-Jury: a
569 simple approach to improve protein structure predictions.
570 *Bioinformatics* 19:1015–1018
- 571 Goncalvez AP, Purcell RH, Lai CJ (2004) Epitope determinants of a
572 chimpanzee Fab antibody that efficiently cross-neutralizes dengue
573 type 1 and type 2 viruses map to inside and in close proximity to
574 fusion loop of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *J*
575 *Virology* 78:12919–12928
- 576 Gromowski GD, Barrett AD (2007) Characterization of an antigenic
577 site that contains a dominant, type-specific neutralization deter-
578 minant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2
579 virus. *Virology* 366:349–360
- 580 Kanagaraj AP, Verma D, Daniell H (2011) Expression of dengue-3
581 premembrane and envelope polyprotein in lettuce chloroplasts.
582 *Plant Mol Biol* 76:323–333
- 583 Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M,
584 Yokota A, Tomizawa K (2006) Efficient and stable transformation
585 of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res*
586 *15:205–217*
- 587 Kim TG, Kim MY, Yang MS (2010) Cholera toxin B subunit-domain
588 III of dengue virus envelope glycoprotein E fusion protein pro-
589 duction in transgenic plants. *Protein Expr Purif* 74(2):236–241
- 590 Kurane I (2007) Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on
591 immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol* 30:329–340
- 592 Lai CJ, Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Donau O, Engle RE, Purcell
593 RH (2007) Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus
594 type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody and protection against
595 DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys by passively
596 transferred humanized antibody. *J Virol* 81:12766–12774
- 597 Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV (1992)
598 Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical sam-
599 ples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J*
600 *Clin Microbiol* 30:545–551
- 601 Lim S, Ashida H, Watanabe R, Inai K, Kim YS, Mukougawa K,
602 Fukuda H, Tomizawa K, Ushiyama K, Asao H, Tamoi M,
603 Masutani H, Shigeoka S, Yodoi J, Yokota A (2011) Production
604 of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce
605 chloroplasts. *Plant Mol Biol* 76:335–344
- 606 Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB (2010)
607 Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen
608 capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl*
609 *Trop Dis* 4:e738
- 610 Lisova O, Hardy F, Petit V, Bedouelle H (2007) Mapping to complete-
611 ness and transplantation of a group-specific, discontinuous,
612

- 613 neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus. *J* 642
 614 *Gen Virol* 88:2387–2397 643
- 615 Lossl AG, Waheed MT (2011) Chloroplast-derived vaccines against 644
 616 human diseases: achievements, challenges and scopes. *Plant* 645
 617 *Biotechnol J* 9:527–539 646
- 618 Martinez CA, Topal E, Giulietti AM, Talou JR, Mason H (2010) 647
 619 Exploring different strategies to express Dengue virus envelope 648
 620 protein in a plant system. *Biotechnol Lett* 32:867–875 649
- 621 Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2003) A ligand-binding 650
 622 pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci* 651
 623 *U S A* 100:6986–6991. doi:10.1073/pnas.08321931000832193100 652
- 624 Mondini A, Cardeal ILS, Lázaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, 653
 625 Maia IL, Franco C, Góngora DVN, Góngora-Rubio F, Cabrera 654
 626 EMS, Figueiredo LTM, Fonseca FG, Bronzoni RVM, 655
 627 Chiaravalloti-Neto F, Nogueira ML (2007) Saint Louis encephal- 656
 628 itis virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13:176–178 657
- 629 Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, Enria 658
 630 DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Hunsperger E, 659
 631 Kliks S, Margolis HS, Nathanson CM, Nguyen VC, Rizzo N, 660
 632 Vazquez S, Yoksan S (2010) Evaluation of diagnostic tests: dengue. 661
 633 *Nat Rev Microbiol* 8:S30–S37. doi:10.1038/nrmicro2459 662
- 634 Rodrigues S, Nunes MRT, Casseb SMM, Prazeres ASC, Rodrigues 663
 635 DSG, Silva MO, Cruz ACR, Tavares-Neto JCT, Vasconcelos PFC 664
 636 (2010) Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus 665
 637 in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. *J Gen* 666
 638 *Virol* 91:2420–2427 667
- 639 Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Bolin RA, Chu MC (1990) 668
 640 Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides 669
 641 identify antigenic conformation. *Virology* 177:668–675 670
 671
- Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG (1998) Monoclonal antibody map- 642
 ping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. 643
Virology 246:317–328 644
- Saejung W, Fujiyama K, Takasaki T, Ito M, Hori K, Malasit P, 645
 Watanabe Y, Kurane I, Seki T (2007) Production of dengue 2 646
 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. 647
Vaccine 25:6646–6654 648
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modeling by satisfac- 649
 tion of spatial restraints. *J Mol Biol* 234:779–815 650
- Sumathi K, Ananthalakshmi P, Roshan MN, Sekar K (2006) 3dSS: 3D 651
 structural superposition. *Nucleic Acids Res* 34:W128–W132. 652
 doi:10.1093/nar/gkl036 653
- van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM (2009) Role of antibodies in 654
 controlling dengue virus infection. *Immunobiology* 214:613–629 655
- WHO (2009) Fact sheet no 117, dengue and dengue haemorrhagic 656
 fever. World Health Organization, Geneva 657
- Wiederstein M, Sippl MJ (2007) ProSA-web: interactive web service 658
 for the recognition of errors in three-dimensional structures of 659
 proteins. *Nucleic Acids Res* 35:W407–W410. doi:10.1093/nar/ 660
 gkm290 661
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, 662
 Appel RD, Hochstrasser DF (1999) Protein identification and 663
 analysis tools in the ExpASY server. *Methods Mol Biol* 664
 112:531–552 665
- Wu HC, Jung MY, Chiu CY, Chao TT, Lai SC, Jan JT, Shiao MF 666
 (2003) Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype- 667
 specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal 668
 serum samples using an epitope-based peptide antigen. *J Gen* 669
Virol 84:2771–2779 670