

## PRODUÇÃO DE POLIPEPTÍDIO QUIMÉRICO DO VÍRUS DA DENGUE EM PLANTA PARA DESENVOLVIMENTO DE KIT DE DIAGNÓSTICO DE BAIXO CUSTO

*(Production of dengue virus chemical polypeptide in plant  
for development of kit of low cost diagnosis)*

Gerusa de Freitas Sousa DUARTE\*; Lívia Érika Carlos MARQUES; Ana Cláudia Marinho da SILVA; Ilana Carneiro Lisboa MAGALHÃES; Mario Alberto Maestre HERAZO; Maria Izabel Florindo GUEDES

Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde/Ciências Biológicas. Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP:60.740-000.

\*E-mail: [gerusa.duarte@aluno.uece.br](mailto:gerusa.duarte@aluno.uece.br)

### RESUMO

A dengue é um problema grave para a saúde pública no Brasil e vários fatores agravam a situação, um deles é que a dengue pode ser confundida com outras doenças infecciosas. Este trabalho teve como objetivo a produção de um polipeptídeo quimérico do vírus da dengue para a produção de um kit de imunodiagnóstico de baixo custo. Foi usada a proteína E do envelope viral do domínio III, fusionada ao Polipeptídeo Elastina-Like (ELP), a expressão foi feita em *N. benthamiana*. Os resultados do Western blotting mostraram que a fusão com a cauda de ELP foi melhor expressa do que a não fusionada. O teste de ELISA apresentou diferença significativa nas médias de absorbância entre pacientes positivos e negativos para dengue e de diferenciar pacientes com dengue positivo e de zika positivo, cujo os resultados de absorbâncias se equipararam aos resultados de pacientes negativos.

**Palavras-chave:** Dengue, imunodiagnóstico, ELISA.

### SUMMARY

Dengue is a serious problem for public health in Brazil and several factors aggravate the situation, one of which is that dengue can be mistaken for other infectious diseases. This work aimed at the production of a chimeric dengue virus polypeptide for the production of a low cost immunodiagnostic kit. Domain E viral envelope protein E, fused to the Elastin-Like Polypeptide (ELP), was used in *N. benthamiana*. Western blotting results showed that fusion with the ELP tail was better expressed than the non-fused. The ELISA test showed a significant difference in the absorbance means between positive and negative patients for dengue and to differentiate patients with dengue positive and positive zika, whose absorbance results were similar to the results of negative patients.

**Key words:** Dengue, immunodiagnosis, ELISA.

### INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa causada por arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* que se apresenta na forma de 4 sorotipos: DENV-1, DENV-

\*Endereço para correspondência:  
[gerusa.duarte@aluno.uece.br](mailto:gerusa.duarte@aluno.uece.br)

2, DENV-3 e DENV-4. Tal doença atinge milhões de pessoas em todo o mundo principalmente pela inexistência de medicamentos antivirais e apesar existir uma vacina licenciada em alguns países desenvolvida por Sanofi Pasteur denominada Dengvaxia, a mesma não mostrou eficácia contra os quatro sorotipos (DENV 1,2,3 e 4) (KIM *et al.*,2018). Os sintomas iniciais da dengue são muito semelhantes com outros flavivírus como o vírus Zika e o vírus da febre amarela, onde faz-se necessário existir um teste de diagnóstico diferencial rápido, preciso e de baixo custo para detecção desses patógenos (ARAUJO, 2009). Proteínas recombinantes podem ser utilizadas como antígenos para fabricação de kits de diagnóstico. Geralmente bactérias são utilizadas para a produção dessas proteínas, por sua manutenção simples e de baixo custo, mas o sistema de expressão procarioto carece de modificações pós-traducionais que são estritamente eucarióticas, tais como, glicosilação e ligação dissulfeto (LIU, 2015).

Culturas de células de mamíferos podem fornecer estas modificações, no entanto, elas exigem utilização de componentes de meios mais caros e podem carregar patógenos de animais. Por esses fatores, é preferível o uso de plantas como biorreator para produção de proteínas recombinantes, pois além de ser um sistema de produção eucarioto, capaz de realizar modificações pós-traducionais, não transporta patógenos humanos e animais. A *Nicotiana benthamiana* tornou-se a planta favorita para a produção de proteínas recombinantes por vários benefícios distintos, incluindo uma grande quantidade de biomassa foliar, transformação simples e estabeleceu métodos de expressão transitória atualmente utilizados comercialmente (LIU, 2015). Além disso, com a adição de fusões proteicas às proteínas de interesse pode aumentar os níveis de acumulação das proteínas recombinantes, uma dessas caudas é a Polipeptídeo Elastina-Like (ELP) (CONLEY, 2009).

A proteína E é o principal componente da estrutura viral DENV, sendo um importante alvo das respostas de anticorpos contra DENV. A indução de anticorpos neutralizantes tem sido considerada o principal objetivo na produção de vacina contra dengue. Dentre as funções da proteína E, ela se liga aos receptores celulares e medeia a fusão entre o envelope viral e membrana celular durante a entrada viral. O domínio III da proteína E além de ser mais variável, portanto, que diferencia os sorotipos, consiste de uma dobra do tipo imunoglobulina e é o domínio de ligação ao receptor proposto (MARTIN; HERMIDA, 2016).

Em razão disso, esse trabalho teve como objetivo a produção de uma poliproteína quimérica do domínio III do envelope e sua utilização como antígeno no desenvolvimento de um kit de diagnóstico de baixo custo para dengue capaz diferenciar a doença de outros flavivírus.

## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram obtidas as sequências do domínio III da proteína E do DENV no National Center for Biotechnology Information (NCBI) a partir da utilização dos genomas do vírus. Foram utilizadas as sequências do domínio III da proteína E dos sorotipos DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4, onde se encontram as regiões mais variáveis de cada sorotipo.

\*Endereço para correspondência:  
[gerusa.duarte@aluno.uece.br](mailto:gerusa.duarte@aluno.uece.br)

Posteriormente as sequências gênicas foram enviadas a uma empresa para sintetizar quimicamente o polipeptídeo quimérico contendo DEIII dos quatro sorotipos do DENV.

A sequência codificadora da EDIII1-4 recombinante foi clonada em dois vetores pCamGate para expressão transiente em *N. benthamiana*, seguindo a metodologia descrita por Pereira *et al.* (2014). Ambos os vetores pCamGate foram direcionados ao retículo endoplasmático (ER), sendo um dele capaz de adicionar uma calda de elastina (ELP) a proteína de interesse.

Para a expressão da proteína foi realizada a agroinfiltração, com uma cultura de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com plasmídeo contendo o DNA de interesse, a cultura é injetada nas folhas de plantas com o uso de uma seringa na parte inferior da folha, então, a partir de 4-5 dias as proteínas recombinantes são produzidas. Dessa forma, a expressão transiente é capaz de produzir grandes quantidades de proteínas em um curto período.

Após a recuperação do material vegetal contendo a sequência codificadora do EDIII14 recombinante do DENV foi realizada extração das proteínas totais solúveis. Foram usados tubos de 2 ml para coletar alguns discos das folhas e as amostras foram congeladas usando nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

As proteínas totais solúveis foram extraídas do tecido utilizando o tampão de extração de proteica (TEP) contendo tampão fosfato gelado (PBS), pH 7,4 com 0,1% de Tween-20, 2% polivinilpirrolidona (PVPP), 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 100 mM ascorbato de sódio, 1mM fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) e 1 µg/mL de leupeptina. A extração de proteínas a partir de uma planta controle infiltrada com p19 como um controle negativo foi também realizada sob condições semelhantes e a concentração de proteína total solúvel (TSP) foi determinada pelo ensaio de Bradford utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

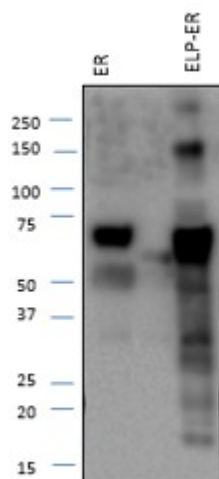
A análise das proteínas expressas transitoriamente em *N. benthamiana* foi realizada a partir do extrato de proteínas totais das folhas por meio de técnicas como eletroforese, Western blotting e enzyme-linked immunoassay ELISA.

O extrato de proteínas totais solúveis das folhas foi caracterizado por gel de poliacrilamida SDS- PAGE 12% sob condições não reduzidas, posteriormente, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose para o imunoblot, utilizando o anticorpo primário anti-c-Myc (1:2500). Amostras de soros de 23 pacientes (15 pacientes positivos para dengue, 6 negativos e 2 pacientes positivos para Zika) foram fornecidas no Laboratório Nacional de Saúde Pública – LACEN Ceará para realização de ensaio de ELISA indireto. Inicialmente, as placas de 95 poços foram sensibilizadas com 5 mg do extrato bruto de proteínas totais de plantas infiltradas e não infiltradas diluídos em 100 mL de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) por poço, incubados overnight a 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-Tween (0,05%) e incubadas por uma hora a 37 °C com os soros de pacientes na diluição de 1:100. As placas foram então lavadas incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG humano 1:5000, para finalizar foram reveladas com TMB e lidas no comprimento de onda de 450 nm.

\*Endereço para correspondência:  
[gerusa.duarte@aluno.uece.br](mailto:gerusa.duarte@aluno.uece.br)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína foi expressa com sucesso em sistema vegetal, o Western blotting mostrou que os níveis de expressão da proteína quimérica do vírus dengue foram maiores quando a proteína foi fusionada com a cauda de elastina (ELP). Pois segundo estudos, quando fusionada a ELP, ocorre um aumento nos níveis de expressão (CONLEY, 2009).



**Figura 1:** Análise por meio de Western blotting.

**Obs.:** Em condições reduzidas de quimera EDIII1-4 direcionada o retículo endoplasmático (ER) com e sem a fusão a cauda de elastina (ELP) em *N. benthamiana* (4 dias após a infecção) e detectada com anticorpo anti-c-Myc. O tecido infiltrado com p19 foi usado como controle negativo.

Para avaliar o potencial da proteína quimérica EDIII1-4::ELP no desenvolvimento de kits de imunodiagnóstico, um ensaio de ELISA indireto foi realizado com a sensibilização das placas de ELISA com 5 µg do extrato bruto de proteínas totais de plantas infiltradas e não infiltradas. Nesse ensaio foram utilizados soros de pacientes positivos e negativos para dengue confirmados previamente pelo LACEN Ceará. As proteínas também foram avaliadas contra o soro de pacientes positivos para Zika vírus. Os resultados mostraram que o extrato bruto de proteínas totais contendo o EDIII1-4 recombinante produzido em planta foi reconhecido pelo soro de pacientes positivos para dengue e não foi reconhecido pelo soro de pacientes negativos ou até mesmo paciente positivos para o vírus Zika. Tais resultados foram confirmados pela diferença significativa nas médias de absorvância entre pacientes positivos e negativos para dengue, além disso, as médias de absorvâncias de paciente com Zika se equipararam aos resultados dos pacientes negativos, ou seja, a utilização do antígeno do vírus dengue recombinante evitou a reação cruzada com o vírus Zika.

## CONCLUSÕES

Além do seu potencial para facilitar a purificação a elastina aumentou os níveis de expressão da proteína recombinante em quantidade suficientes para serem utilizadas para o desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da dengue. Apesar dos resultados

\*Endereço para correspondência:  
[gerusa.duarte@aluno.uece.br](mailto:gerusa.duarte@aluno.uece.br)

serem preliminares, com este trabalho foi dado um passo importantíssimo para o desenvolvimento de um kit de diagnóstico de baixo custo em formato ELISA capaz de diferenciar pacientes com dengue de pacientes infectados pelo Zika vírus.

A dengue vem sendo um problema grave para a saúde pública no Brasil e vários fatores agravam a situação, um deles é que a dengue pode ser confundida com outras doenças infecciosas, considerando essa problemática, decidimos investir no desenvolvimento de antígenos recombinantes visando a produção de um kit de imunodiagnóstico para dengue no formato ELISA. O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho, embora ainda preliminares, indica que os antígenos recombinantes dos quatro sorotipos de DENV poderão ser utilizados.

## REFERÊNCIAS

LIU, Kira. Purification of Recombinant Proteins in Plants Using Small-Molecule Dependent Inteins Fused to ELP or HFBI. 2015. 76p. Dissertação (Mestrado) – University Of Western Ontario, Ontario, 2015.

ARAÚJO, M.R.T. Expressão de proteínas recombinantes de vírus do gênero Flavivirus: Aplicação no desenvolvimento de kits de diagnóstico e em estratégias antivirais. 2009. 173p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CONLEY, A.J. et al. Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. *Biotechnology and bioengineering*, Canada, v.103, n.3, p.562-573, 2009.

PEREIRA, E.O., Kolotilin, I., Conley, A.J.; Menassa, R. Production and characterization of in planta transiently produced polygalacturanase from *Aspergillus niger* and its fusions with hydrophobin or ELP tags. *BMC Biotechnol*, v.14, p.1–11, 2014.

KIM, M.Y. et al. Plant-expressed Fc-fusion protein tetravalent dengue vaccine with inherent adjuvant properties. *Liverpool, Plant Biotechnology Journal*, v.16, p.1283–1294, 2009.

MARTIN, J.; HERMIDA, L. Dengue vaccine: an update on recombinant subunit strategies. – Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), Havana, 2016.