



Anna Maria Gouvea
de Souza Melero
(Organizadora)

Premissas da Iniciação Científica 4

Atena
Editora

2019

Anna Maria Gouvea de Souza Melero
(Organizadora)

Premissas da Iniciação Científica

4

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Geraldo Alves

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

P925 Premissas da iniciação científica 4 [recurso eletrônico] /
Organizadora Anna Maria Gouvea de Souza Melero. – Ponta
Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (Premissas da Iniciação
Científica; v. 4)

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-85-7247-111-4
DOI 10.22533/at.ed.114191102

1. Ciência – Brasil. 2. Pesquisa – Metodologia. I. Melero, Anna
Maria Gouvea de Souza. II. Série.

CDD 001.42

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de
responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos
autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra “Premissas da Iniciação científica” aborda diferentes maneiras em que o conhecimento pode ser aplicado, e que outrora era exclusivamente uma transmissão oral de informação e atualmente se faz presente na busca e aplicação do conhecimento.

A facilidade em obter conhecimento, aliado com as iniciativas de universidades e instituições privadas e públicas em receber novas ideias fez com que maneiras inovadoras de introduzir a educação pudessem ser colocadas em prática, melhorando processos, gerando conhecimento específico e incentivando profissionais em formação para o mercado de trabalho.

Estudos voltados para o conhecimento da nossa realidade, visando a solução de problemas de áreas distintas passou a ser um dos principais desafios das universidades, utilizando a iniciação científica como um importantes recurso para a formação dos nossos estudantes, principalmente pelo ambiente interdisciplinar em que os projetos são desenvolvidos.

O conhecimento por ser uma ferramenta preciosa precisa ser bem trabalhado, e quando colocado em prática e principalmente avaliado, indivíduos de áreas distintas se unem para desenvolver projetos que resultem em soluções inteligentes, sustentáveis, financeiramente viáveis e muitas vezes inovadoras.

Nos volumes dessa obra é possível observar como a iniciação científica foi capaz de auxiliar o desenvolvimento de ideias que beneficiam a humanidade de maneira eficaz, seja no âmbito médico, legislativo e até ambiental. Uma ideia colocada em pratica pode fazer toda a diferença.

É dentro desta perspectiva que a iniciação científica, apresentada pela inserção de artigos científicos interdisciplinares, em que projetos de pesquisas, estudos relacionados com a sociedade, o direito colocado em prática e a informática ainda mais acessível deixa de ser algo do campo das ideias e passa a ser um instrumento valioso para aprimorar novos profissionais, bem como para estimular a formação de futuros pesquisadores.

Anna Maria G. Melero

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO CAPSÍDEO E NS3 DO ZIKA VÍRUS EM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	
<i>Maria Lorena Bonfim Lima</i>	
<i>Ilana Carneiro Lisboa Magalhães</i>	
<i>Mario Alberto Maestre Herazo</i>	
<i>Lívia Érika Carlos Marques</i>	
<i>Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean</i>	
<i>Maria Izabel Florindo Guedes</i>	
DOI 10.22533/at.ed.1141911021	
CAPÍTULO 2	9
FREQUÊNCIA DO USO DE ANDADORES INFANTIS NA CIDADE DE CURITIBA	
<i>Eliane Mara Cesário Pereira Maluf</i>	
<i>Paula Campos Seabra</i>	
<i>Letícia Regina Metzger</i>	
DOI 10.22533/at.ed.1141911022	
CAPÍTULO 3	23
HEURÍSTICA PARA ROTEAMENTO DE VEÍCULOS UTILIZANDO INFORMAÇÕES DE TRÁFEGO EM TEMPO REAL, APLICADO AO SERVIÇO DE ATENDIMENTO MÓVEL DE URGÊNCIA – SAMU	
<i>Roberval Gonçalves Moreira Filho</i>	
<i>Ísis Natália Chagas Costa Paiva</i>	
<i>Francisco Chagas de Lima Júnior</i>	
<i>Carlos Heitor Pereira Liberalino</i>	
DOI 10.22533/at.ed.1141911023	
CAPÍTULO 4	28
ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE DE AGROTÓXICO UTILIZANDO O BIOENSAIO <i>ALLIUM CEPA</i> E O IMPACTO NA SAÚDE DO PRODUTOR RURAL	
<i>Angela Rafaela Bezerra da Silva</i>	
<i>Thaísa Ályla Almeida e Sousa</i>	
<i>Regina Célia Pereira Marques</i>	
DOI 10.22533/at.ed.1141911024	
CAPÍTULO 5	38
LEVANTAMENTO ETNOBOTÂNICO DAS PLANTAS MEDICINAIS USADAS POR PACIENTES DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE NA CIDADE DE ANÁPOLIS/GO, COM ÊNFASE NO BIOMA CERRADO	
<i>Eduardo Rosa da Silva</i>	
<i>Andréia Juliana Rodrigues Caldeira</i>	
<i>Danila Noronha Gonçalves</i>	
<i>Morganna da Silva Oliveira</i>	
DOI 10.22533/at.ed.1141911025	
CAPÍTULO 6	47
MORTALIDADE MATERNA NO BRASIL: UMA REVISÃO DE LITERATURA	
<i>Shamia Beatriz Andrade Nogueira</i>	
<i>Maralina Gomes da Silva</i>	
<i>Maria Luziene de Sousa Gomes</i>	
<i>Danielly de Carvalho Xavier</i>	
<i>Iolanda Gonçalves de Alencar Figueiredo</i>	
DOI 10.22533/at.ed.1141911026	

CAPÍTULO 7 54

O IMPACTO DA EDUCAÇÃO PERMANENTE EM SUPORTE BÁSICO DE PARADA CARDIORRESPIRATÓRIA A PROFISSIONAIS DE DUAS EQUIPES DE SAÚDE DA FAMÍLIA NO MUNICÍPIO DE ARAGUARI/MG

Andréia Gonçalves Dos Santos
Cleidiney Alves E Silva
Jéssica De Carvalho Antunes Barreira
Marislene Pulsena Da Cunha Nunes
Rosana De Cássia Oliveira

DOI 10.22533/at.ed.1141911027

CAPÍTULO 8 62

O USO DO TEAM-BASED LEARNING COMO ESTRATÉGIA DE ENSINO DA POLÍTICA DE SAÚDE DO HOMEM NO CURSO DE ENFERMAGEM

Natália Ângela Oliveira Fontenele
Maria Aline Moreira Ximenes
Maria Girlane Sousa Albuquerque Brandão
Suzana Mara Cordeiro Eloia
Joselany Áfio Caetano
Lívia Moreira Barros

DOI 10.22533/at.ed.1141911028

CAPÍTULO 9 70

PARTO DOMICILIAR: BENEFÍCIOS E DESAFIOS DE UMA ASSISTÊNCIA HUMANIZADA

Nicole Oliveira Barbosa
Lorena da Silva Lima
Márcia Jaínne Campelo Chaves
Elane da Silva Barbosa
Amália Gonçalves Arruda

DOI 10.22533/at.ed.1141911029

CAPÍTULO 10 81

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA SÍFILIS CONGÊNITA NEONATAL EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE CURITIBA

Flávia Andolfato Coelho da Silva Faust
Bruce Negrello Nakata
Cristina Terumy Okamoto

DOI 10.22533/at.ed.11419110210

CAPÍTULO 11 91

PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO E CLÍNICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES HOSPITALIZADOS VÍTIMAS DE LESÕES NÃO INTENCIONAIS

Luciane Favero
Sonia Mara Casarotto Vieira
Anne Caroline de Oliveira
Rodrigo Napoli
Giovanna Batista Leite Veloso

DOI 10.22533/at.ed.11419110211

CAPÍTULO 12..... 104

PREVENÇÃO DE ACIDENTES EM CRIANÇAS: RECONHECENDO OS SINAIS DE RISCO DO RECÉM-NASCIDO EM UMA UNIDADE CANGURU

Daiana Rodrigues Cruz Lima
Fabiane do Amaral Gubert
Mariana cavacante Martins
Marielle Ribeiro Feitosa
Lidiane Nogueira Rebouças
Fortaleza - Ceará
Clarice da Silva Neves

DOI 10.22533/at.ed.11419110212

CAPÍTULO 13..... 109

PRODUÇÃO DE ASPARAGINASE BACTERIANA DE HELICOBACTER PYLORI, PROTEUS VULGARIS E WOLINELLA SUCCINOGENES EM SISTEMA DE EXPRESSÃO PROCARIOTO

Ilana Carneiro Lisboa Magalhães
Kalil Andrade Mubarak Romcy
Davi Almeida Freire
Lívia Érika Carlos Marques
Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean
Maria Izabel Florindo Guedes

DOI 10.22533/at.ed.11419110213

CAPÍTULO 14..... 117

TIPOS DE INTERVENÇÕES EDUCATIVAS UTILIZADAS PARA PROMOÇÃO DA SAÚDE EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

Nádyá dos Santos Moura
Caroliny Gonçalves Rodrigues Meireles
Bárbara Brandão Lopes
João Joadson Duarte Teixeira
Maria Vilani Cavalcante Guedes
Mônica Oliveira Batista Oriá

DOI 10.22533/at.ed.11419110214

CAPÍTULO 15..... 125

TRANSVERSALIDADE ENTRE AS POLÍTICAS DE SAÚDE MENTAL E SAÚDE DA MULHER: UMA NOVA ABORDAGEM DA PESQUISA EM ENFERMAGEM

Iandra Rodrigues da Silva
Daria Catarina Silva Santos
Aline Barros de Oliveira
Damiana Teixeira Gomes
Valquíria Farias Bezerra Barbosa
Silvana Cavalcanti dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.11419110215

CAPÍTULO 16..... 131

UM OLHAR SOBRE A SATISFAÇÃO PROFISSIONAL DOS FARMACÊUTICOS DA CIDADE DE ARAGUARI-MG

Laura Naves Oliveira
Paulo César aluno Batista
Leandro Pereira de Oliveira
Évora Mandim Ribeiro Naves

DOI 10.22533/at.ed.11419110216

CAPÍTULO 17 146

USO DE POLIPEPTÍDIO ELASTINA-LIKE PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DO VIRUS DENGUE EXPRESSA EM PLANTA

Livia Érika Carlos Marques

Kalil Andrade Mubarak Romcy

Ilana Carneiro Lisboa Magalhães

Maria Lorena Bonfim Lima

Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean

Maria Izabel Florindo Guedes

DOI 10.22533/at.ed.11419110217

CAPÍTULO 18 153

USO DE PRÓTESE DENTÁRIA E SUA RELAÇÃO COM LESÕES BUCAIS

Thiago Fernando de Araújo Silva

Fabianna da Conceição Dantas de Medeiros

Kleitton Alves Ferreira

Jamile Marinho Bezerra de Oliveira Moura

Isabela Pinheiro Cavalcanti Lima

Eduardo José Guerra Seabra

DOI 10.22533/at.ed.11419110218

SOBRE A ORGANIZADORA 161

USO DE POLIPEPTÍDIO ELASTINA-LIKE PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DENGUE EXPRESSA EM PLANTA

Livia Érika Carlos Marques

Universidade Estadual do Ceará (UECE)
Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)
Fortaleza – CE

Kalil Andrade Mubarak Romcy

Universidade Estadual do Ceará (UECE)
Centro de Ciências da Saúde (CCS)
Fortaleza – CE

Ilana Carneiro Lisboa Magalhães

Universidade Estadual do Ceará (UECE)
Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)
Fortaleza – CE

Maria Lorena Bonfim Lima

Universidade Federal do Ceará (UFC)
Departamento de Bioquímica
Fortaleza – CE

Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean

Universidade Estadual do Ceará (UECE)
Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)
Fortaleza – CE

Maria Izabel Florindo Guedes

Universidade Federal do Ceará (UECE)
Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)
Fortaleza – CE

RESUMO: O vírus dengue atinge boa parte da população mundial, principalmente pela falta de antivirais e de uma vacina efetiva contra os quatro sorotipos, o que torna o diagnóstico ainda mais importante. O sistema vegetal tem se mostrado

adequado para expressão de proteínas recombinantes que podem ser utilizadas como antígenos vacinais e de diagnóstico. Além disso, a adição de fusões às proteínas de interesse pode aumentar seus níveis de acumulação e facilitar a sua purificação. Este trabalho objetivou a purificação da proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus dengue fusionada ao polipeptídeo elastina-like (ELP), denominada NS1::ELP. Para tanto, após a expressão transiente da NS1 nas folhas de *Nicotiana benthamiana* foi realizada a purificação pelo método do ciclo de transição inversa (ITC) que dispensa o uso de procedimentos caros de purificação como cromatografia. A fusão à ELP permitiu a expressão da proteína em níveis elevados e a NS1::ELP foi purificada com sucesso utilizando ITC com 1,2 M de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ à 23 °C.

PALAVRAS-CHAVE: Purificação. NS1. *Nicotiana benthamiana*. Vírus dengue. Proteína recombinante.

ABSTRACT: Dengue virus affects a large part of the world population, mainly due to the lack of antivirals and an effective vaccine against the four serotypes, which makes the diagnosis even more important. The plant-based system has been shown to be suitable for the expression of recombinant proteins, which can be used as vaccine and diagnostic antigens. In addition, the fusions tags added to the proteins of interest

may increase their accumulation levels and facilitate their purification. This work aimed the purification of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) fused to elastin-like polypeptide (ELP) (NS1::ELP). After the transient expression of NS1 in *Nicotiana benthamiana* leaves, purification by the reverse transition cycle (ITC) was performed, avoiding the use of expensive purification methods such as chromatography. The ELP allowed expression of the protein at high levels and NS1::ELP was successfully purified using ITC with 1.2 M $\text{NH}_4 (\text{SO}_4)_2$ at 23 ° C.

KEYWORDS: Purification. NS1. *Nicotiana benthamiana*. Dengue virus, Recombinant protein.

1 | INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus dengue (DENV), que se apresenta, sob a forma de 4 sorotipos, (DENV 1,2,3 e 4) pertencentes à família Flaviviridae (FIGUEIREDO, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a incidência da dengue tem crescido dramaticamente por todo o globo, cerca de 2,5 bilhões de pessoas sob risco de contrair a doença (WHO, 2009). O vírus dengue possui genoma de RNA fita simples, cuja expressão codifica uma poliproteína que após processamento segmenta-se em três proteínas estruturais; capsídeo (C), proteína da membrana (M) e glicoproteína do envelope (E), e sete proteínas não estruturais; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (MODIS *et al.*, 2003).

Devido ao crescente aumento da incidência desta arbovirose nas Américas, o teste de diagnóstico de laboratório tornou-se ainda mais importante para confirmar a etiologia dessas doenças (CDC, 2016). Das diversas formas de diagnóstico da dengue, os testes sorológicos baseados na captura de anticorpos IgM (MAC)-ELISA, IgG-ELISA e captura de antígenos NS1-ELISA, são os de maior aplicabilidade prática, pois são menos laboriosos e de custo mais acessível, quando comparados aos métodos de isolamento viral ou detecção de ácidos nucleicos (PEELING *et al.*, 2010). Há uma enorme demanda por antígenos a serem utilizados como reagentes na fabricação de kits de diagnóstico bem como na formulação de vacinas. Todavia, uma vacina segura deve oferecer proteção contra os quatro sorotipos do vírus e isso tem sido um desafio para pesquisadores ao redor do mundo (GHOSH; DAR, 2015). A proteína NS1 merece especial destaque devido ao seu potencial imunogênico e propriedades que favorecem a detecção, sendo elegida como marcador biológico adequado para diagnóstico viral precoce (ZHANG *et al.*, 2014). Esta proteína pode permanecer nas células infectadas ou ser secretada, podendo ser detectada na corrente sanguínea desde o início da infecção (AMORIM *et al.*, 2013). O emprego de plantas para a expressão transiente de antígenos em larga escala apresenta-se de forma economicamente atrativa e de manuseio fácil, quando comparada às plataformas tradicionais, tendo como vantagem expressão rápida de altos níveis de acumulação de proteínas recombinantes

(KOMAROVA *et al.*, 2010; TSCHOFEN *et al.*, 2016).

A possibilidade de otimização da plataforma vegetal acresce ainda mais à utilidade desse sistema. A adição de fusões proteicas às proteínas de interesse, possibilitam a aplicação de métodos alternativos de purificação, o que facilita e reduz os custos do processo de obtenção de antígenos, dispensando o uso de cromatografia. (CHILKOTI; MEYER 1999). ELP é um polipeptídeo sintético composto por um motivo pentapeptídico repetitivo derivado da elastina: VPGXG, em que Xaa é qualquer aminoácido exceto prolina (URRY, 1992). Eles têm uma propriedade altamente útil, através de variações na temperatura podem passar por uma fase transição de inversa reversível (URRY, 1992) e essa característica pode ser transferida para a proteína a qual a ELP está fusionada melhorando a eficiência da purificação de proteínas recombinantes pelo um método chamado ciclo de transição inversa, em inglês, *inverse transition cycling* (ITC) (CHILKOTI; MEYER, 1999). Este método funciona elevando a temperatura acima da temperatura de transição do ELP (Tt) e / ou aumentando a concentração de sal, alterando a conformação do ELP e causando a agregação da proteína fusionada a ELP. Os agregados de ELP podem então ser isolados e solubilizados numa solução aquosa sob uma temperatura inferior à Tt. Uma outra vantagem é que a cauda de elastina (ELP) têm demonstrado grande potencial enquanto peptídeo de fusão, não somente no seu papel na purificação, mas também no aumento dos níveis de acumulação das proteínas recombinantes (CONLEY *et al.*, 2009). Pensando nisso, o presente estudo tem como objetivo a purificação da proteína NS1 do vírus dengue fusionada a ELP pelo método do ciclo de transição inversa.

2 | METODOLOGIA

Foi realizada uma busca de genomas do dengue vírus, depositados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), visando obter a sequência mais adequada para a expressão da proteína NS1. A espécie vegetal utilizada para a expressão heteróloga transiente foi a *N. benthamiana*. A sequência foi sintetizada e clonada no vetor pDONRTM (Invitrogen, Carlsbad, USA), e posteriormente subclonada em vetores de expressão binária pCamGate (PEREIRA *et al.*, 2014) utilizando *Technology® Gateway*, foram gerados dois cassetes de expressão, ambos com direcionamento ao retículo endoplasmático (ER), NS1 ER e outro NS1 fusionada a cauda elastina (NS1::ELP).

Uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* transportando a construção de expressão foi misturada com uma quantidade igual de cultura de *A. tumefaciens* contendo o supressor de silenciamento de genes pós-transcricional p19 (SILHAVY *et al.*, 2002) e co-infiltrada em folhas de *N. benthamiana*, com seis semanas de idade, através da parte inferior das folhas, utilizando uma seringa. As plantas infiltradas foram mantidas em condições controladas em câmara de crescimento durante 4 dias

a 22°C, com um 16 h de fotoperíodo. Para cada planta, três discos de folhas (7 mm de diâmetro) de tecido infiltrado foram recolhidos a partir de diferentes folhas de três plantas independentes para criar três replicatas biológicas. O tecido foi recolhido em tubos de 2 ml, contendo contas de cerâmica 2,3 milímetros e foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até à sua utilização.

Para a extração de proteínas, as amostras de tecido foram colocadas para homogeneização em blocos pré-arrefecidos no -80°C e foram homogeneizados duas vezes por 30 segundos usando um macerador *TissueLyser* (Qiagen). 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), 1mM 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 (Bradford, 1976).

Para a purificação proteica empregou-se a técnica ciclo de transição inversa com sulfato de amônio ($\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$). Após a extração proteínas totais, usando o tampão de extração TEP o extrato foi adicionado a tubos previamente pesados contendo diferentes concentrações de sulfato de amônio, testando-se, inicialmente, as concentrações de 0.4M, 0.6M, 0.8M e 1.0M à 23°C objetivando encontrar a concentração ideal para máxima recuperação das proteínas de interesse. O extrato bruto contendo sulfato de amônio foi homogeneizado cuidadosamente por inversão e incubado à 23°C. Em seguida efetuou-se uma centrifugação de 20000g à 23°C por 40 minutos, o sobrenadante 1 (S1) foi removido, o pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato (PBS) 1X (contendo 0,1% (v/v) de Tween-20) gelado para ressolubilizar as proteínas, posteriormente foi efetuada outra centrifugação de 20000g à 4°C por 10 minutos. Logo após, o sobrenadante contendo a proteína solubilizada (S2) foi coletado e o pellet remanescente foi recuperado em tampão PBS 1X gelado para análises. Uma segunda etapa de purificação foi realizada, onde, manteve-se a concentração de 1.0M e foi adicionada a concentração de 1.2M, ambas testadas sob diferentes temperaturas (23°C e 37°C).

Posteriormente à purificação, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (4% *stacking* gel e 10% *main* gel), seguida de transferência para membrana de PVDF, para análises de *Western blotting* das proteínas purificadas pelo método ITC.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A NS1 foi expressa com sucesso em sistema vegetal. O *Western blotting* revelou

acumulação de NS1 de aproximadamente 0,1% de proteína total solúvel, do inglês *total soluble protein* (TSP) no ER, mas quando essa proteína foi fusionada a ELP também endereçada ao ER apresentou níveis de acumulação maiores de 1,0 % de TSP. Constituindo-se de uma repetição pentapeptídica de aminoácidos, a capacidade da cauda de ELP afetar o rendimento proteico também decorre da quantidade de repetições da mesma na proteína fusionada, como apontado por Meyer et al. (20 que analisou os efeitos de ELPs com comprimento variando de 90 a 20 repetições. Porém cabe salientar que estudos prévios apontaram uma proporção inversa no rendimento e comprimento da cauda na expressão em *N. benthamiana* (CONLEY et al., 2009). Desta forma um intermediário com 30 repetições foi utilizado no presente trabalho, objetivando um tamanho adequado para viabilizar a purificação com o mínimo de perdas, se mostrou adequado para purificação das proteínas recombinantes do vírus dengue produzidas em planta. Tal escolha do número de repetições também corrobora com resultados da literatura (CONLEY et al., 2009).

As análises de purificação por TCI mostraram que a concentração de 0.4M e 0.6M de sal, testadas à 23°C, propiciaram um maior acúmulo de proteínas no sobrenadante 1 (S1). Desta forma, evidenciou-se que estas condições não são suficientes para induzir uma agregação completa da proteína fusionada à ELP, ou seja, ambas as concentrações de sal avaliadas não foram suficientes para precipitar as proteínas recombinantes. Com o aumento da concentração de sal para 0.8M e 1.0M, foi vista uma agregação quase que completa da proteína fusionada, com bandas fracas evidenciadas em S1. Porém, a maior parte das proteínas foram detectadas no pellet (P) na sua forma insolúvel.

Foram feitas novas análises de purificação da proteína NS1::ELP nas condições de 1.0M e 1.2M à 23°C e 37°C, visando o acúmulo de proteínas no sobrenadante 2, na sua forma solúvel. Os melhores resultados de recuperação de proteína recombinante testada foram obtidos na concentração de 1.2M de NH₄(SO₄)₂ à 23°C com aproximadamente 50% da NS1::ELP, recuperada na fração S2, em sua forma solúvel e a outra metade recuperada no pellet. Embora metade da proteína permaneceu no pellet, a partir dele foram realizadas sucessivas solubilizações com (PBS) 1X (contendo 0,1% (v/v) de Tween-20) e centrifugações onde foi possível recuperar aproximadamente 75% da proteína recombinante na sua forma solúvel. Entretanto, apesar da proteína na sua forma solúvel seja a desejável no desenvolvimento de testes de diagnóstico em formato ELISA, as proteínas que permaneceram insolúveis podem ser utilizadas em ensaios de imunização de camundongos, onde as macromoléculas, insolúveis ou agregadas geralmente são mais imunogênicas do que as pequenas e solúveis, porque as moléculas maiores e agregados de proteínas são mais prontamente fagocitadas e processadas.

Visto que a combinação das proteínas recombinantes com elastina pode reduzir os custos de purificação, dispensando o uso de cromatografia, após a confirmação da imunogenicidade da NS1::ELP na presença dos anticorpos dos soros dos pacientes

com dengue, análises de purificação foram realizadas a fim de escolher a melhor estratégia de obtenção dessa proteína. As condições ótimas para a purificação da proteína foram estabelecidas utilizando o ciclo de transição inversa, para obter a maior recuperação das proteínas fusionadas a ELP, onde foi possível obter níveis elevados, com a recuperação da proteína recombinante quase em sua totalidade, quando somadas as proteínas solúveis do segundo sobrenadante (S2) e as obtidas no pellet, na forma insolúvel. Diante dos resultados apresentados, a proteína NS1 do vírus dengue fusionada a ELP foi expressa em quantidade significativa, maior que 1% de proteína total solúvel e teve seu processamento e purificação facilitados pela adição da ELP e pelo método ITC. Tais, antígenos serão utilizados em um futuro próximo na formulação da uma vacina e no desenvolvimento de um ensaio de diagnóstico de baixo custo para dengue.

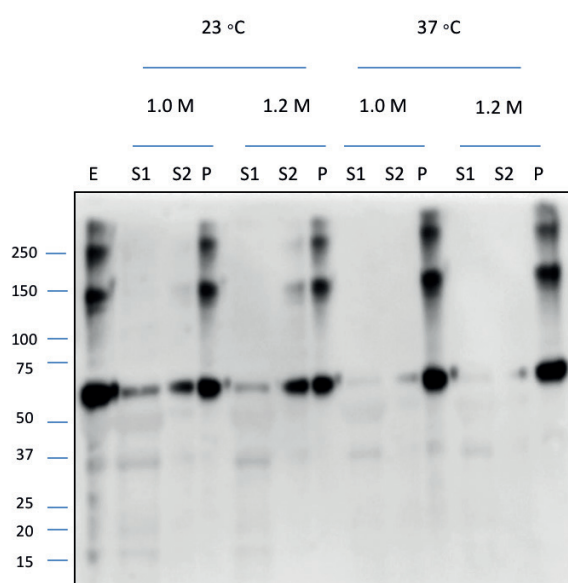


Figura 1 – Análise de *Western blot* do teste de purificação de NS1::ELP utilizando diferentes concentrações de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ à temperatura de 23°C e 37°C. Os melhores níveis de recuperação de proteína recombinante testada foram obtidos na concentração de 1.2M de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ à 23°C, onde a purificação por ciclo de transição inversa recuperou metade da proteína purificada (S2) na sua forma solúvel e a outra metade no pellet (P). E: extrato bruto, S1: sobrenadante 1, S2: sobrenadante 2, P: pellet.

4 | CONCLUSÃO

A tag polipeptídico elastina-like aumentou a acumulação da proteína recombinante no ER, bem como, facilitou a sua obtenção por método simples e barato de purificação. Assim, a adição da elastina a outras proteínas de aplicações clínicas e industriais considerando as vantagens da plataforma de produção vegetal é bastante promissora para obtenção de níveis desejáveis de proteínas recombinantes.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, J. H.; *et al.* The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. **Virus Research**, v. 181, p. 53-60, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories, **Memorandum, February 7, 2016**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/pdfs/denvchikvzika-testing-algorithm.pdf>> Acesso em 20 de janeiro de 2018.
- CHILKOTI, D. E & MEYER A. A.; Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. **Nature America**, v. 17, n. 4, p. 1112-1115, 1999.
- CONLEY, A. J.; *et al.* Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 562-573, 2009.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 45, n. 3, p. 30-38, 2012.
- GHOSH, A. & DAR, L. Dengue vaccines: challenges, development, current status and prospects. **Indian journal of medical microbiology**, v. 33, n. 1, p. 3-15, 2015.
- KOMAROVA, T. V.; *et al.* Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. **Expert Review of Vaccines, Russia**, v. 9, n. 8, p. 859-876, 2010.
- MEYER, D. E.; *et al.* Protein Purification by Fusion with an Environmentally Responsive Elastin-Like Polypeptide: Effect of Polypeptide Length on the Purification of Thioredoxin. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 4, p.720-728, 2001.
- MODIS Y.; *et al.* A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 6986–6991, 2003.
- PEELING, R. W.; *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature diagnostics**, v. 103, p. 30-38, 2010.
- PEREIRA, E. O.; *et al.* Production and characterization of in planta transiently produced polygalacturanase from *Aspergillus niger* and its fusions with hydrophobin or ELP tags. **BMC Biotechnology**, 14, p. 1–11, 2014.
- SILHAVY, Â.; *et al.* A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide doublestranded RNAs. **The EMBO Journal**, v. 21(12), p. 3070-80, 2002.
- TSCHOFEN, M.; *et al.* Plant Molecular Farming: Much More than Medicines. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 9, n. 1, p.271-294, 2016
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** -- New edition. Suíça, 2009. 160 p.
- URRY, D.W.; Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transitions. **Prog Biophys Mol Biol**, 57, 23–57, 1992.
- ZHANG, H.; *et al.* NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue infection: a meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p.57-66, 2014.

SOBRE A ORGANIZADORA

Anna Maria Gouvea de Souza Melero - Possui graduação em Tecnologia em Saúde (Projeto, Manutenção e Operação de Equipamentos Médico-Hospitalares), pela Faculdade de Tecnologia de Sorocaba (FATEC-SO), mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), doutoranda em Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Ouro Preto. Atualmente é Integrante do Grupo de Pesquisa em Materiais Lignocelulósicos (GPML) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) Campus Sorocaba e pesquisadora colaboradora do Laboratório de Biomateriais LABIOMAT, da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (Campus Sorocaba). Atua nas áreas de Polímeros, Biomateriais, Nanotecnologia, Nanotoxicologia, Mutagenicidade, Biotecnologia, Citopatologia e ensaios de biocompatibilidade e regeneração tecidual, além de conhecimento em Materiais Lignocelulósicos.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-111-4

