



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 Rafele 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

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

Ilana Carneiro Lisboa Magalhães

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

Kalil Andrade Mubarc Romcy

Universidade Estadual do Ceará
Centro de Ciências da Saúde - CCS
Fortaleza – CE

Davi Almeida Freire

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

Lívia Érika Carlos Marques

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

Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean

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

Maria Izabel Florindo Guedes

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

RESUMO: Asparaginase é uma enzima que catalisa a conversão de asparagina em aspartato e amônia. Essa enzima é usada no tratamento de cânceres como a leucemia linfática aguda

(ALL), cujas células perdem a capacidade de sintetizar asparagina nova, sofrendo apoptose quando os níveis de asparagina sanguínea sofrem rápida diminuição. Apesar do sucesso da quimioterapia, vários estudos apontam para alterações tardias em diversos órgãos e sistemas de pacientes com ALL, além de relatos de hipersensibilidade e inativação ao tratamento para a doença. A principal asparaginase utilizada nos tratamentos é proveniente do microrganismo *Erwinia chrysanthemi*. Diversas modificações foram feitas na estrutura dessa asparaginase com o intuito de reduzir sua imunogenicidade e/ou atividade glutaminásica, tornando-a mais eficiente e diminuindo, assim, os efeitos colaterais para os pacientes. Assim faz-se necessário pesquisas constantes para aprimoramento dos tratamentos existentes e formulação de medicamentos alternativos para a doença. Desta forma, neste estudo asparaginases de três microrganismos (*Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Wolinella succinogenes*) com sequências de aminoácidos conhecidas foram selecionadas com o objetivo de produzir asparaginase recombinante com características ideais, como a afinidade por asparagina próxima aos valores encontrados para a asparaginase produzida em *E. coli* e *E. chrysanthemi*, baixa afinidade por glutamina e meia vida adequada. As três asparaginases foram clonadas e expressas em *E. coli* BL21

(DE3) com sucesso e serão avaliadas por testes de atividade enzimática e citotoxicidade para o desenvolvimento de um biofármaco nacional com atividade enzimática eficaz.

PALAVRAS-CHAVE: Asparaginase. Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL). Expressão bacteriana.

ABSTRACT: Asparaginase is an enzyme that catalyzes the conversion of asparagine into aspartate and ammonia. This enzyme is used in the treatment of cancers such as acute lymphocytic leukemia (ALL), whose cells lose the ability to synthesize new asparagine, undergoing apoptosis when blood asparagine levels decrease rapidly. Despite the success of chemotherapy, several studies point to late alterations in various organs and systems of patients with ALL, as well as reports of hypersensitivity and inactivation of treatment for the disease. The main asparaginase used in the treatments comes from the microorganism *Erwinia chrysanthemi*. Several modifications were made in the structure of this asparaginase in order to reduce its immunogenicity and / or glutaminase activity, making it more efficient and thus reducing the side effects for the patients. Thus, constant research is needed to improve existing treatments and formulate alternative medicines for the disease. Therefore, in this study asparaginases of three microorganisms (*Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Wolinella succinogenes*) with known amino acid sequences were selected with the aim of producing recombinant asparaginase with ideal characteristics, such as asparagine affinity close to the values found for asparaginases produced in *E. coli* and *E. chrysanthemi*, low affinity for glutamine and adequate half-life. The three asparaginases were successfully cloned and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and will be evaluated by enzymatic activity and cytotoxicity tests for the development of a national biopharmaceutical with effective enzymatic activity.

KEYWORDS: Asparaginase. Acute Lymphocytic Leukemia (ALL). Bacterial Expression.

1 | INTRODUÇÃO

A leucemia é uma doença maligna que ocorre nos glóbulos brancos em decorrência do acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, ocupando a nona posição no ranking nacional de doenças (BRASIL, 2008). Essa doença possui duas fases, aguda e crônica. A fase aguda tem uma progressão rápida afetando a maioria das células que ainda não estão totalmente diferenciadas impedindo que elas realizem suas funções normais (ABRALE, 2016). A Leucemia Linfoblástica Aguda, em inglês *Acute Lymphoblastic Leukemia* (ALL) é uma doença que afeta principalmente crianças (INCA, 2015) e atualmente tem ocorrido enorme progresso em seu tratamento, com uma taxa de cura próxima a 80% (PUI; EVANS, 1998). O Brasil importa todos os medicamentos relacionados com a asparaginase e o tratamento da ALL, pois não possui uma produção nacional, ocasionando assim grandes gastos no orçamento público relacionados com a saúde. Uma produção do medicamento a nível nacional é necessária para enxugar

os gastos do governo, assim como diminuir a burocracia das importações e aumentar a disponibilidade do produto a ser utilizado pela a população. Grande parte das células tumorais leucocitárias não expressa uma enzima denominada asparagina sintetase, responsável pela síntese intracelular de asparagina, necessitando do fornecimento extracelular desse aminoácido para a realização de funções metabólicas, como por exemplo, a síntese de proteínas. Este fato não acontece com as células normais do corpo, pois elas expressam a asparagina sintetase que fornece a asparagina intracelular. Esta diferença entre as células normais e tumorais se tornou essencial para o tratamento da doença.

Em 1950 descobriu-se que a enzima asparaginase possui propriedades antitumorais, pois ao diminuir os níveis séricos e consequente corte de fornecimento extracelular de asparagina induziu a apoptose de alguns tipos de tumores. Como células normais possuem seu fornecimento intracelular de asparagina, por causa da ação da asparagina sintetase, elas não são afetadas pela atividade da asparaginase (AVRAMIS; TIWARI, 2006).

A Asparaginase é uma enzima tetraédrica que hidrolisa a L-asparagina e a L-glutamina em L-aspartato, L-glutamato e em amônia, diminuindo, assim, a disponibilidade desses aminoácidos e diminuindo a síntese de proteínas constitutivas e regulatórias fundamentais para as células tumorais (AVRAMIS, 2012). A expressão de enzimas recombinantes oriundas de bactérias possui diversas vantagens, dentre elas a capacidade de serem obtidas em grandes quantidades, em um espaço de tempo relativamente curto e com técnicas de biologia molecular estabelecidas que aumentam o seu rendimento (ANBU, 2015).

As asparaginases atualmente disponíveis comercialmente são de *E. coli* e *Erwinia* e as drogas originadas são Elspar®, Crasnitin® e Kidrolase® e Erwinase® (Duval *et al.*, 2002), para as quais os efeitos colaterais comumente relatados na literatura científica são problemas de pancreatites, disfunção hepática, hipersensibilidade, complicações no sistema nervoso central e hiperglicemia, que estão associados à queda de níveis séricos de glutamina, estruturalmente semelhante à asparagina e necessária às células saudáveis do corpo (ANDRADE *et al.*, 2014). Nesse contexto, buscam-se enzimas que possuam alta atividade contra o aminoácido asparagina (não essencial às células saudáveis), mas com baixa atividade contra glutamina (essencial às células sadias). Outro problema importante é a produção de anticorpos pelo paciente contra a asparaginase nativa de *E. coli*, o que neutraliza seus efeitos e a asparagina não sendo degradada retorna aos níveis séricos normais. Dessa forma, quando ocorrem esses casos são utilizados medicamentos de segunda linha, como a asparaginase de *Er. chrysanthemii* ou a forma peguilada da asparaginase de *E. coli*, ambos não reativos em primeiro momento contra anticorpos anti-asparaginase de *E. coli* (PIETERS *et al.*, 2011).

Segundo a ABIFINA (2013) – Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades, o Brasil ocupa um pequeno espaço frente

ao cenário mundial no que diz respeito à pesquisa tecnológica e produção industrial de biofármacos, aumentando, assim, a necessidade de pesquisas para a produção de enzimas terapêuticas, que são de grande interesse para a biotecnologia, indústria e medicina brasileira (DIVINO, 2015). Desde o florescimento da indústria farmacêutica, nos anos de 1980 e 1990, observou-se que a fabricação de enzimas bacterianas era economicamente favorável, pois estes microrganismos são mais simples, fáceis de manipulação e geneticamente mutáveis, reduzindo custos e aumentando a qualidade enzimática (DEMAIN, 2009). Com isso, observa-se que o sistema de produção procarioto pode suprir a alta demanda da produção de asparaginase e proporcionar ao país uma maior independência nas importações neste setor, que atualmente movimentam milhões de reais todos os anos.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a produção da enzima asparaginase recombinante proveniente de três bactérias distintas em sistema procarioto, a fim de obter uma asparaginase mais eficaz e de menor custo.

2 | METODOLOGIA

Para este estudo, foi realizada uma busca em bancos de dados de sequências e escolhidas três sequências de DNA de genes codificantes de asparaginases que apresentam alta afinidade por asparagina e baixa afinidade por glutamina. Os genes escolhidos foram de asparaginases de *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Wolinella succinogenes*. Os genes foram sintetizados quimicamente pela *Biobasic Inc*, Canadá, tiveram sequências de enzimas de restrição adicionadas *upstream* e *downstream* ao gene, o que permitiu inserir o gene da proteína de interesse em um vetor de expressão bacteriano. Estas etapas foram primeiramente realizadas *in silico*, para confirmação das clonagens.

Na primeira etapa, foram utilizadas células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B, aptas a receber o plasmídeo pUC 57 contendo os genes de interesse que codificam a asparaginase. As bactérias foram transformadas e os clones positivos foram confirmados após cultivo em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Posteriormente foi feita miniprep utilizando o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) para a retirada dos plasmídeos que em seguida foram submetidos a uma digestão utilizando as enzimas de restrição EcoRI e BamHI. O produto da digestão purificado foi utilizado para inserção no vetor de expressão pET28a. Após a ligação dos insertos no pET-28a, estes foram clonados em *E. coli* BL21 (DE3) para a expressão das proteínas recombinantes. Todas as etapas foram realizadas utilizando técnicas de biologia molecular padrão e os clones positivos foram confirmados por meio de PCR.

Os clones positivos foram crescidos em meio LB com canamicina como antibiótico seletivo a 37°C até atingir OD entre 0.4-0.6 a 600 nm, e induzidas com

IPTG por 3 horas. Após este procedimento, as células foram lisadas para a extração das proteínas. As proteínas foram confirmadas por meio de gel de acrilamida em SDS-PAGE 12% e *Western Blot* utilizando o anticorpo primário anti-histidina (1:3000) e anticorpo secundário anti-IgG mouse (1:5000).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enzima recombinante já tem sido estudada por diversos autores (WINK, 2009; CHOI *et al.*, 2006) como método de pesquisa para atender à crescente demanda por novos produtos farmacológicos. Dentre os diversos métodos de produção de proteínas recombinantes, mostra-se promissor o uso de bactérias para a produção de asparaginases usada no tratamento de leucemia aguda (ROTH, 2011, p. 38). Neste trabalho, três genes de asparaginases proveniente dos microrganismos *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Wolinella succinogenes* (*A. Hp*, *A. Pv* e *A. Ws*, respectivamente) foram eficientemente ligados em plasmídeo de expressão pET-28a e clonados em *E. Coli*. Os clones positivos foram confirmados por análise de PCR e gel de agarose a 1% (Figura 1). Todas as clonagens foram bem-sucedidas, onde os insertos gênicos que codificam a asparaginase da *A. Hp*, *A. Pv* e *A. Ws*. foram visualizados no tamanho esperado de 1205 pb, 1247 pb e 1205 pb, respectivamente.

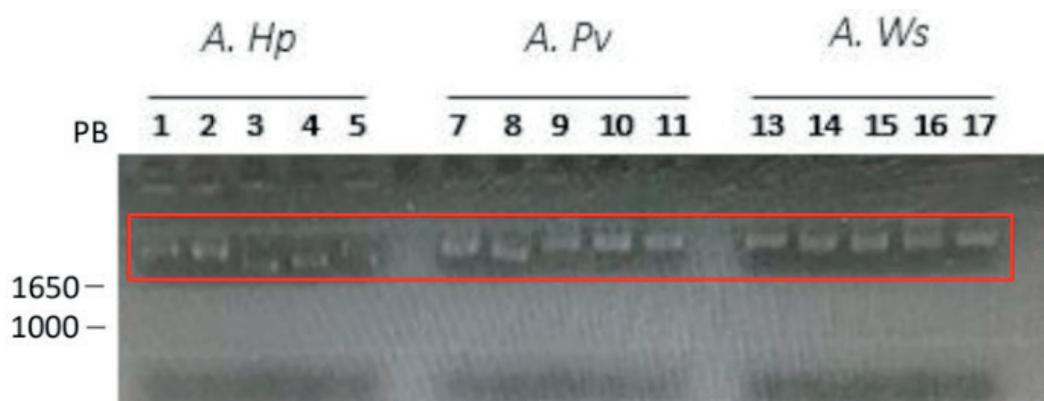


Figura 1 – Gel de Agarose 1% mostrando clonagem dos insertos *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Wolinella succinogenes* (*AHp*, *APv* e *AWs*, respectivamente) em pET-28a.

Foto do autor.

A análise da expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page a 12%) e *Western Blotting* das asparaginases *AHp*, *APv* e *AWs* recombinantes em *E. coli*, foi realizado a partir do crescimento e indução com IPTG de três culturas de bactérias individuais, cada uma contendo um gene de interesse. As amostras de proteína presentes no sobrenadante e no precipitado para cada inserto foram incluídas no gel. As mesmas quantidades de amostras foram utilizadas em cada poço. Foi utilizado como controle positivo uma asparaginase com purificação e atividade já conhecida e

como controle negativo, o produto da indução da bactéria sem os genes de interesse (Figura 2).

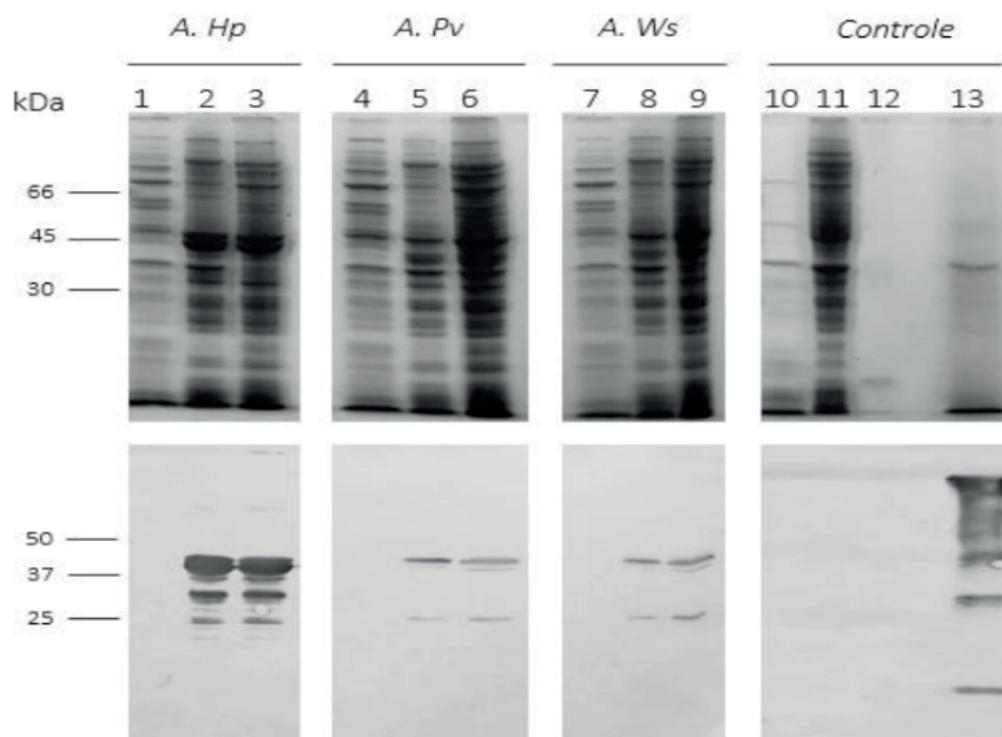


Figura 2 – Análise de SDS-Page e Western blot mostrando a expressão das asparaginases recombinantes de *A. Hp.*, *A. Pv.*, *A. Ws.* Gel de SDS-Page 12% (acima) e *Western blot* (abaixo) com a asparaginase expressas na fração solúvel (1), insolúvel (2) e solubilizadas (3) Controle negativo nos poços (10, 11 e 12) e controle positivo no poço 13.

Foto do autor.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos resultados da expressão de asparaginases de outras espécies bacterianas, como *Withania somnifera* no trabalho de Oza, et al. (2011) e de *Helicobacter pylori* realizado por Capelletti, et al. (2008), demonstrando assim o potencial da expressão destas biomoléculas recombinantes em *E.coli*. Embora futuras análises sejam necessárias para a confirmação das atividades enzimáticas, assim como testes comparativos com as enzimas disponíveis comercialmente, Parâmetros cinéticos e citotoxicidade também precisam ser analisados, aumentando assim, a segurança do produto.

Embora preliminares, os resultados aqui obtidos abrem as perspectivas de uma produção de uma asparagina recombinante no Brasil, o que poderia suprir a alta demanda pelo biofarmáco, tornar o custo da aquisição mais baixo e acabar com a dependência de importação.

4 | CONCLUSÃO

A asparaginase recombinante produzida neste trabalho, foi obtida a partir de sequências gênicas que apresentam alta afinidade por asparagina e baixa afinidade por

glutamina, portanto apresentam potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de um biofármaco eficaz contra ALL. A produção de produtos biológicos a nível nacional, reduziriam os gastos do governo com a importação, além de, facilitar o seu acesso à população que necessitam de tratamento de saúde.

REFERÊNCIAS

- ABRALE, Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. **O que é Leucemia**. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/doencas/leucemia>>. Acessado em: 09 ago. 2016.
- ANBU P.; GOPINATH S. C.; CHAULAGAIN B. P.; TANG T. H.; CITARTAN M. **Microbial Enzymes and their applications in Industries and Medicine 2014**. BioMed Research International. V. 2015 Article ID 816419, 3 pages.
- ANDRADE, A. F.; BORGES, K. S.; SILVEIRA, V. S. **Update on the use of L-Asparaginase in infants and adolescent patients with acute lymphoblastic leukemia**. Clinical Medicine Insights: Oncology, v. 8, p. 95-100, 2014.
- AVRAMIS, V. I. Asparaginases: **Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance**. Anticancer research, v. 32, n.7, p. 2423-2437, 2012.
- AVRAMIS, V. I.; TIWARI, P. N. **Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia**. International Journal of Nanomedicine, v. 1, n. 3, p. 241-254, 2006
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Leucemia Aguda**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344>. Acesso em 09 ago. 2008.
- CAPPELLETTI, D.; CHIARELLI, L. R.; PASQUETTO, M. V.; STIVALA, S.; VALENTINI, G.; SCOTTI, C. **Helicobacter pylori L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 377, issue 4, p. 1222-1226, dez. 2008.
- CHOI, J.; KEUM, K., LEE, S. **Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli**. Chemical Engineering Science, v. 61, n. 3, 876-885 (2006).
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms**. Biotechnology Advances, v. 27, n. 3, p.297-306, maio 2009. Elsevier BV.
- DIVINO, B. S. **Produção Biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de Saccharomyces cerevisiae em sistema de expressão heterólogo Pichia pastoris**. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- DUVAL, M.; et al. **Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial**. Blood, n. 99, p. 2734-2739, 2002.
- OZA, V. P.; PARMAR, P. P.; Patel, D. H.; Subramanian R. B. **Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from Withania somnifera L. for large scale production**. 3 Biotech, v.1, issue 1, p. 21-26, julho 2011.
- PIETERS, R.; et al. **L-Asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: A focus on Erwinia asparaginase**. Cancer, v. 117, n. 2, p. 238-249, 2011.

PUI, CH; EVANS, W. E. **Acute Lymphoblastic Leukemia**. The New England Journal of Medicine, v. 339, p. 605-615, Ago. 1998.

RICHA, J. K.; ZAIDI, Y. V.; POOJA, S. **L-Asparaginase: A Promising Enzyme for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia**. People's Journal of Scientific Research, v. 5, n. 1, p. 29-35, 2012.

ROTH, G. **Produção de L-Asparaginase II Recombinante de Erwinia Carotovora em cultivos de Escherichia Coli em batelada alimentada**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Biociências da Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WINK, P L. **Produção da enzima antileucêmica L-Asparaginase II a partir da clonagem do gene ErA de Erwinia carotovora supsp. atroseptica em Escherichia coli**. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Porto Alegre. 2009.

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

