

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

“PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE
DE *Fusarium proliferatum* DCFS10 EM SISTEMAS DE TECNOLOGIA
RECOMBINANTE DE *Komagataella phaffii* (syn. *Pichia pastoris*)”

SAMUEL LEITE CARDOSO

BRASÍLIA – DF

2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SAMUEL LEITE CARDOSO

“PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE
DE *Fusarium proliferatum* DCFS10 EM SISTEMAS DE TECNOLOGIA
RECOMBINANTE DE *Komagataella phaffii* (syn. *Pichia pastoris*)”

Tese apresentada como requisito para obtenção
do Título de Doutor, pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientadora:
Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães

Brasília

2023

Dedico este trabalho à toda a minha família, em especial ao meu pai, minha mãe e minha esposa por todo o incentivo, carinho e amor ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

À Deus, provedor de toda sabedoria, amor, cuidado e da vida.

À minha esposa, Jéssica Diniz, pela paciência, incentivo e amor durante todo o período do doutorado.

Aos meus pais e irmão, pelo incentivo, pela paciência e cuidado ao longo de todos os anos.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório: Paula Souza, Diegue Henrique, Renata Almeida, Marcela Medeiros, Joel Abreu, Ana Luísa Rodrigues, Marina Guimarães, Letícia Abrunhosa, Ana Letícia Ferreira, Artur Borges. Agradeço por todos os bons momentos que tivemos, pelo aprendizado compartilhado no dia a dia e pela amizade de todos.

Às técnicas, Patrícia e Júlia, por todo o empenho e dedicação na colaboração com todos os trabalhos do grupo.

Aos membros da banca avaliadora, pelo aceite e pela colaboração com o trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Produtos Naturais e Controle da Qualidade de Medicamentos pela recepção, ajuda e paciência durante esse período.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

À minha orientadora, Professora Pérola de Oliveira Magalhães. Agradeço toda paciência, toda a dedicação e atenção e formação profissional que obtive ao longo de mais de 10 anos de aprendizado. Agradeço o exemplo de profissional, pesquisadora e professora em que pude me espelhar para construir minha carreira e caráter. Obrigado por tudo.

RESUMO

A L-asparaginase é o principal componente terapêutico no combate à leucemia linfoblástica aguda. Essa enzima catalisa a reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em amônia e ácido aspártico e, a partir de uma diferença metabólica crucial, é capaz de exaurir os níveis extracelulares do aminoácido tornando inviável o crescimento das células tumorais. Disponível no tratamento de leucemia linfoblástica aguda desde a década de 60, a L-asparaginase é produzida atualmente por meio de tecnologia recombinante em sistemas de expressão de proteínas heterólogas de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, o que impacta diretamente no tratamento e no aparecimento de diversos efeitos adversos. Deste modo, a produção de L-asparaginase de organismos eucariotos poderia ser uma estratégia para diminuir os eventos adversos e aumentar a eficácia terapêutica do medicamento. Sendo assim o presente trabalho teve como objetivo principal a produção, purificação, e análise da citotoxicidade da L-asparaginase recombinante frente a linhagem celular de células neoplásicas Jurkat (ATTC TIB-152). Optou-se pela produção de proteínas heterólogas por *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) com a integração de uma sequência codificante para L-asparaginase do fungo *Fusarium proliferatum*, proveniente da biodiversidade brasileira (Bioma Cerrado). Paralelamente, um estudo *in silico* da sequência proteica foi realizado para obtenção de maiores informações da estrutura tridimensional da enzima. O RNA total fúngico foi primeiramente extraído e convertido em cDNA. Após verificação na literatura e estudo das sequências de L-asparaginase presentes em bases de dados, foi possível construir os *primers* para amplificação e reconhecimento da sequência codificadora de L-asparaginase desejada. A sequência codificadora foi clonada em vetor comercial pPICZαA e células de *E. coli* foram transformadas. Posteriormente à clonagem em *E. coli*, os vetores foram transformados em células de *Komagataella phaffii* X-33 (*Pichia pastoris* X-33). Foram obtidos 21 transformantes, os quais foram testados quanto à produção de L-asparaginase, sendo que a maior atividade enzimática encontrada intracelularmente foi expressa no transformante 9 (2,84 UI/g). Visando um processo de purificação, a enzima foi extraída com a

utilização de sonificador de ponteira e em seguida submetida à coluna de troca iônica DEAE FF 5 mL. Os resultados demonstram uma enzima parcialmente purificada que apresenta pH ótimo em torno de 7,0, temperatura ótima de 40 °C e K_m e V_{max} nos valores de 17,44 mM e 5,35 mM/s⁻¹, respectivamente. A análise *in silico* pôde prever estruturas monoméricas com certo grau de confiabilidade, além disso apresentou resíduos de aminoácidos conservados em diferentes posições, confirmando a importância desses resíduos na atividade catalítica da enzima. Com relação aos ensaios de viabilidade celular, a L-asparaginase produzida neste trabalho demonstrou alta eficácia frente às células neoplásicas testadas em 24 horas de tratamento. Foi possível confirmar a integração da sequência codificadora de L-asparaginase de *F. proliferatum* no DNA genômico de *K. phaffii* X-33, a produção de uma enzima funcional parcialmente purificada, estável em pH próximo ao fisiológico, com atividade citotóxica frente a células de linhagem Jurkat, com amplo potencial para aplicação terapêutica. Como perspectiva, destaca-se a necessidade de avaliar e otimizar as condições de cultivo para uma produção industrial.

Palavras-Chave: L-asparaginase, *Pichia pastoris*, proteínas heterólogas, leucemia linfoblástica aguda.

ABSTRACT

L-asparaginase is the main therapeutic component against acute lymphoblastic leukemia. This enzyme catalyzes the hydrolysis of the amino acid L-asparagine into ammonia and aspartic acid and, based on a crucial metabolic difference, is capable of examining the extracellular levels of the amino acid, making the growth of tumor cells unviable. Available in the treatment of acute lymphoblastic leukemia since the 1960s, L-asparaginase is currently produced through recombinant technology in heterologous protein expression systems from *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*, which directly impacts the treatment and the appearance of several adverse effects. Therefore, the production of L-asparaginase from eukaryotic organisms could be a strategy to reduce adverse events and increase the therapeutic efficacy of the drug. Therefore, the main objective of the present work was the production, purification, and analysis of the cytotoxicity of recombinant L-asparaginase against the Jurkat neoplastic cell line (ATTC TIB-152). We opted for the production of heterologous proteins by *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) with the integration of a coding sequence for L-asparaginase from the fungus *Fusarium proliferatum*, originating from Brazilian biodiversity (Cerrado Biome).

At the same time, an *in silico* study of the protein sequence was carried out to obtain more information on the three-dimensional structure of the enzyme. Fungal total RNA was first extracted and converted into cDNA. After checking the literature and studying the L-asparaginase sequences present in databases, it was possible to construct primers for amplification and recognition of the desired L-asparaginase coding sequence. The coding sequence was cloned into commercial vector pPICZ α A and *E. coli* cells were transformed. After cloning in *E. coli*, the vectors were transformed into *Komagataella phaffii* X-33 (*Pichia pastoris* X-33) cells.

21 transformants were obtained, which were tested for L-asparaginase production, with the highest enzymatic activity found intracellularly being expressed in transformant 9 (2.84 IU/g). Aiming for a purification process, the enzyme was extracted using a tip sonicator and then submitted to the DEAE FF 5 mL ion exchange column. The results demonstrate a partially purified enzyme

that has an optimum pH of around 7.0, an optimum temperature of 40 °C and Km and Vmax at values of 17.44 mM and 5.35 mM/s-1, respectively.

The in silico analysis was able to predict monomeric structures with a certain degree of reliability, in addition to presenting conserved amino acid residues in different positions, confirming the importance of these residues in the catalytic activity of the enzyme. Regarding cell viability assays, the L-asparaginase produced in this work demonstrated high efficacy against neoplastic cells tested within 24 hours of treatment. It was possible to confirm the integration of the L-asparaginase coding sequence from *F. proliferatum* into the genomic DNA of *K. phaffii* X-33, the production of a partially purified functional enzyme, stable at pH close to physiological, with cytotoxic activity against Jurkat lineage, with broad potential for therapeutic application. As a perspective, the need to evaluate and optimize cultivation conditions for industrial production stands out

Keywords: L-asparaginase, *Pichia pastoris*, heterologous proteins, acute lymphoblastic leukemia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOX1 – Álcool Oxidase 1

APS – Persulfato de amônio

ASNase – L-asparaginase

BMGY - Meio complexo tamponado contendo glicerol

BMMY - Meio complexo tamponado contendo metanol

DNA - Ácido desoxirribonucleico

HMW-SDS - Padrão de alto peso molecular

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Km – Constante de Michaelis-Menten

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

PDB – Banco de Dados de Proteínas

TAE – Tampão Tris-Acetado EDTA

TCA – Ácido Tricloroacético

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

V_{máx} – Velocidade máxima

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Taxas de mortalidade bruta por Leucemia na população brasileira, por idade, por 100.000 homens e mulheres, entre 2010 e 2018 (9)..... 19
- Figura 2: Mecanismo envolvendo a hidrólise do aminoácido L-asparagina catalisada pela L-asparaginase, adaptado. (24)..... 22
- Figura 3: Estrutura quaternária tetramérica de L-asparaginase I de *E. coli* (nativa) (26). Os fragmentos em azul, vermelho, amarelo e verde representam as subunidades da enzima para composição do tetrâmero. 23
- Figura 4: Principais mecanismos envolvidos no aparecimento de efeitos adversos utilizando L-asparaginase como tratamento para leucemia linfoblástica aguda..... 24
- Figura 5: Via de utilização de metanol em *P. pastoris*, adaptado (72). AOX: álcool oxidase, CAT: catalase, FLD: formaldeído desidrogenase, FGH: S-formilglutaciona hidrolase, FDH: formato desidrogenase, DAS: diidroxiacetona sintase, TPI: triosefosfato isomerase, DAK: diidroxiacetona quinase, FBA: frutose 1,6-bifosfato aldolase, FBP: frutose 1,6-bifosfatase, MFS: metilformato sintase; DHA: diidroxiacetona, GAP: gliceraldeído 3-fosfato, DHAP: diidroxiacetona fosfato, F1,6BP: frutose 1,6-bifosfato, F6P: frutose 6-fosfato, Pi : fosfato, Xu5P: xilulose 5-fosfato, GSH: glutationa, PYR: piruvato; PPP: via das pentoses fosfato, TCA: ciclo do ácido tricarboxílico. 29
- Figura 6: Esquema representativo dos vetores comerciais pPICZ (100). 33
- Figura 7: Esquema representativo dos vetores comerciais pPICZ α (100). 34
- Figura 8: Perfil eletroforético de cDNA em gel de agarose a 1% em TAE 1X. M corresponde ao padrão de DNA “ladder” 1 kb. A amostra F corresponde ao cDNA obtido a partir da amostra de RNA total obtida do fungo *F. proliferatum* (F)..... 52

Figura 9: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X para os produtos amplificados utilizando cDNA de <i>F. proliferatum</i> como molde, obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores (<i>primer</i>).....	53
Figura 10: Alinhamento da sequência do cDNA amplificado com sequência sugestiva de L-asparaginase de <i>F. proliferatum</i> disponível na base de dados Blast NCBI.....	56
Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x para os fragmentos decorrentes da purificação direta das reações de PCR realizadas com os pares de oligonucleotídeos iniciadores FusAsn-For1/ FusAsn-Rev1. (A) banda correspondente a 1300 pb.	57
Figura 12: Tradução "six frame" da enzima L-asparaginase obtida através da amplificação de fragmento de cDNA do fungo <i>F.proliferatum</i>	58
Figura 13: Vetor pPICZ α A utilizado para clonagem do cDNA da L-asparaginase e sua expressão em <i>P. pastoris</i>	59
Figura 14: Esquemas demonstrativos das sequências de nucleotídeos para construção no vetor pPICZ α A com o sítio de restrição XhoI.....	60
Figura 15: Confirmação do tamanho correto do vetor recombinante. 1- 5 Vetor recombinante, V- Vetor vazio, M- Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder ® (Invitrogen).....	61
Figura 16: Digestão e purificação do gene e do vetor. M – Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder® (Invitrogen), 1 – Vetor pPICZ α A antes da digestão e 2 – Vetor pPICZ α A após digestão e purificação.	61
Figura 17: Produto da PCR com os <i>primers</i> AOX 3' e 5' (FusAsn-For1/ FusAsn-Rev1) de ASP1 em pPICZ α A.	62
Figura 18: Curva de crescimento para os clones 4, 4.1, 8, 9 e 12.	65
Figura 19: Comparação da Atividade enzimática de L-asparaginase (ASNase) quantificada na Biomassa (UI/g) com o processo de rompimento celular por Sonicador de ponteira (UI/mL).	67

Figura 20: Perfil cromatográfico do extrato bruto da produção de L-asparaginase em coluna de troca iônica DEAF FF com tampão Tris-HCl 50 mM e fluxo de 0,5 mL/min. As linhas rosa, vermelha e azul representam a leitura em 214, 254 e 280 nm, respectivamente	68
Figura 21: SDS-PAGE de purificação de L-asparaginase da coluna DEAE. PM – marcador de peso molecular (Calibration Kit Low Molecular Weight For Electrophoresis® - Cytivia 17-0446-01); I – extrato bruto; II – Fração 6; III – Fração 7; IV – Fração 8.....	69
Figura 22: Efeito da temperatura na atividade de L-asparaginase recombinante de <i>F. Proliferatum</i> parcialmente purificada.....	71
Figura 23: Efeito do pH na atividade de L-asparaginase parcialmente purificada.	72
Figura 24: Gráfico de duplo recíproco para a hidrólise de L-asparagina pela enzima recombinante L-asparaginase de <i>F. proliferatum</i> produzida em sistema de produção heterólogo de <i>P. pastoris</i>	73
Figura 25: Predição por homologia da estrutura quaternária da L-asparaginase de <i>F. proliferatum</i>	75
Figura 26: Alinhamento da sequência de L-asparaginase com o modelo proposto pelo software SWISSMODEL-Expasy.....	75
Figura 27: Modelagem <i>ab initio</i> da estrutura tridimensional para a sequência de L-asparaginase de <i>F. proliferatum</i> . Os 107 aminoácidos iniciais da sequência encontram-se em tonalidade azulada.	77
Figura 28: Resíduos de aminoácidos conservados no sítio ativo da L-asparaginase modelada pela plataforma I-TASSER.	78
Figura 29: Modelo de estrutura tridimensional de L-asparaginase com a retirada dos 107 primeiros aminoácidos.....	79
Figura 30: DOPE-score normalizado para os resíduos de aminoácidos da possível estrutura de L-asparaginase.	80

Figura 31: Análise estrutural de resíduos conservados da região da dobradiça, sítio ativo e sítio catalítico.	81
Figura 32: Viabilidade das células Jurkat contra diferentes concentrações de L-asparaginase recombinante de <i>F. proliferatum</i> em comparação com a L-asparaginase padrão de <i>E. coli</i> (Sigma Aldrich – cod A3809).....	83
Figura 33: Avaliação morfológica de células da linhagem Jurkat (ATCC TIB-152) sob diferentes concentrações e amostras após o período de incubação de 24 horas. A e B – 0,0005 e 0,01 UI/mL de L-asparaginase de <i>F. prolieratun</i> ; C e D – Controle negativo e 0,01 UI/mL	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ensaio clínico para o tratamento de LLA em adolescente e adultos utilizando L-asparaginase como medicamento de referência para remissão da neoplasia (14).....	20
Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos sistemas de produção de proteínas heterólogas, adaptado de Gomes <i>et al.</i> 2016 (46).	25
Tabela 3: Linhagens de <i>P. pastoris</i> utilizadas para expressão heteróloga - atualizado e adaptado (74, 75).....	30
Tabela 4: Expressão de proteínas em <i>Pichia pastoris</i>	31
Tabela 5: <i>Primers</i> utilizados no estudo.	38
Tabela 6: Soluções utilizadas para o preparo de gel de poliacrilamida 12,5% para gel desnaturante com dodecil sulfato de sódio	47
Tabela 7: Atividades de L-asparaginase avaliadas nas biomassas dos clones produzidos em comparação a atividade da cepa selvagem X-33.	63

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1. LEUCEMIA.....	18
1.1.1. Leucemia Linfoide Aguda.....	19
1.2. L –ASPARAGINASE	21
1.3. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.....	25
1.3.1. <i>Komagataella phaffii</i>	27
1.3.1.1. Vetor pPICZ.....	33
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. OBJETIVO GERAL	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. PREPARO DE MEIO DE CULTIVO E SOLUÇÕES.....	35
3.2. CLONAGEM E EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE EM <i>K. phaffii</i> X-33 UTILIZANDO VETORES pPICZ α A.....	37
3.2.1. Desenho dos <i>primers</i>	37
3.2.2. Extração do RNA.....	38
3.2.3. Síntese do cDNA	39
3.2.4. Amplificação do cDNA	39
3.2.5. Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose.....	40
3.2.6. Transformação de vetores pPICZ α A em <i>E. coli</i>	40
3.2.7. Transformação de <i>Komagataella phaffii</i> (<i>Pichia pastoris</i>) por eletroporação	41
3.2.8. Confirmação da integração do vetor ao genoma da levedura	42
3.3. EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE EM <i>PICHIA PASTORIS</i> UTILIZANDO VETORES pPICZ α A.....	43

3.4. ENSAIO ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE.....	43
3.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	44
3.7. EXTRAÇÃO DA ENZIMA INTRACELULAR.....	45
3.8. CROMATOGRAFIA.....	45
3.9.1. Efeito da Temperatura na atividade enzimática.....	46
3.9.2. Efeito do pH na atividade enzimática.....	46
3.9.3. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	46
3.10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)...	47
3.10.1. Coloração com Azul de comassie	48
3.11. MODELAGEM ESTRUTURAL DA PROTEÍNA L-ASPARAGINASE <i>IN SILICO</i>	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. CLONAGEM E EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE EM <i>K. phaffii</i> UTILIZANDO VETORES pPICZ α A.....	51
4.1.1 Extração de RNA total	51
4.1.2. Síntese de cDNA	52
4.1.3. Amplificação do DNA genômico através de reações de PCR	53
4.1.4. Amplificação do cDNA genômico através de reações de PCR.....	54
4.1.5. Purificação dos produtos de PCR, sequenciamento direto e clonagem dos Produtos amplificados.....	57
4.3. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	60
4.4. PREPARO DO PLASMÍDEO PARA TRANSFORMAR A LEVEDURA	61
4.5. CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO VETOR AO GENOMA DA LEVEDURA	62
4.6. TRIAGEM DOS CLONES PARA A EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE.....	62
4.7. CURVA DE CRESCIMENTO	64

4.8.	EXTRAÇÃO DA ENZIMA INTRACELULAR.....	66
4.11.	MODELAGEM ESTRUTURAL DA PROTEÍNA L-ASPARAGINASE	74
4.12.	CITOTOXICIDADE.....	82
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. LEUCEMIA

As leucemias são desordens malignas provenientes de distúrbios genéticos envolvendo células sanguíneas. Essas doenças são caracterizadas pelo aumento da quantidade de células imaturas mielóides ou linfóides (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as leucemias de acordo com a origem da célula cancerígena, da velocidade de crescimento e de alguns marcadores tumorais encontrados (2). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) lista 12 tipos de leucemia, sendo a leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfocítica e aguda e leucemia linfocítica crônica, os quatro principais tipos (3).

As leucemias podem ser diagnosticadas em todas as faixas etárias, desde recém-nascidos a idosos, sendo a leucemia mielóide aguda mais comum em adultos e a leucemia linfoblástica aguda (LLA) em crianças (1). Sabe-se que fatores ambientais, genéticos e patológicos podem influenciar no aparecimento dessas neoplasias. Um estudo realizado pelo *The Cancer Genome Atlas Research Network* publicado em 2013 demonstrou pelo menos 23 genes mutados significativamente em células de leucemia mielóide aguda (4). Além disso, a exposição prolongada à radiação pode ser um fator significativo para o aparecimento de leucemias agudas (5).

O diagnóstico primário é realizado através de microscopia óptica, o resultado é obtido por meio da contagem de células anormais, imaturas, presentes na corrente sanguínea. Outros testes podem ser descritos, como exames imunológicos e colorações histoquímicas. A busca por marcadores genéticos das neoplasias também é um alvo para a identificação das leucemias (6). Fathullahzadeh e colaboradores (2016) estabeleceram uma relação na qual foi identificada uma diminuição da expressão de miRNA-192 em pacientes com leucemia linfocítica crônica, possibilitando a utilização do miRNA-192 como marcador precoce da doença (7). Fan e colaboradores (2015) demonstraram a possibilidade de correlação entre a ausência de miRNA-149 e o aparecimento de leucemia linfóide aguda pela supressão de apoptose que seria controlada por esse pequeno ácido ribonucleico (8). De acordo com o Instituto Nacional de

Câncer para o triênio de 2020-2022 a estimativa de novos casos de leucemia esperados no Brasil é de aproximadamente 6.000 casos por ano em homens e 5.000 casos em mulheres (3).

No Brasil, de 2010 a 2018, segundo o INCA, as leucemias tiveram baixa taxa de mortalidade em faixas etárias de 00 a 49 anos. A Figura 1 apresenta a taxa de mortalidade por faixa etária nas diferentes regiões do país. Destaca-se o aumento da mortalidade nas faixas etárias subsequentes a 50 anos. Em números absolutos, o total de mortes no mesmo período alcançou aproximadamente 32.000 habitantes, sendo 63% desta parcela acima de 50 anos.

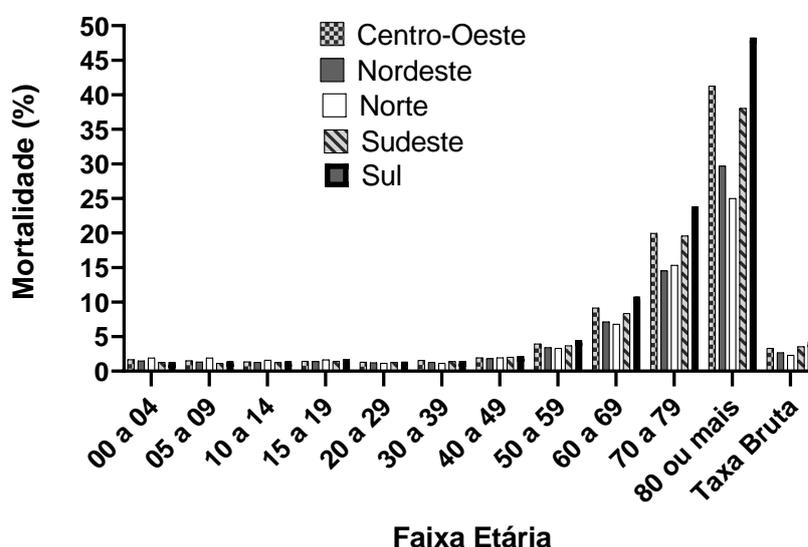


Figura 1: Taxas de mortalidade bruta por Leucemia na população brasileira, por idade, por 100.000 homens e mulheres, entre 2010 e 2018 (9).

1.1.1. Leucemia Linfóide Aguda

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer mais comum diagnosticado em crianças até 15 anos de idade, representando cerca de 25% das neoplasias presentes nessa faixa etária (10). Os sintomas mais comuns referentes a LLA incluem: astenia, palidez e cansaço. Além de serem bastante variáveis estão também relacionados aos distúrbios hematopoiéticos como anemias, trombocitopenia e neutropenia (11).

A terapia para remissão das células neoplásicas da LLA consiste em duas fases: 1) indução e remissão; 2) fase de intensificação ou consolidação. Na primeira fase busca-se eliminar 99% das células leucêmicas e restaurar o processo de renovação celular do sangue do paciente. Nessa etapa, o tratamento consiste no uso de glicocorticoides, vincristina e um agente antineoplásico, geralmente a L-asparaginase. Na fase de intensificação, depois de restaurado o processo de hematopoese, o tratamento continua com altas doses de L-asparaginase, e agentes antimetabólicos como o metotrexato e a mercaptopurina buscando a eliminação das células remanescentes (12).

Estudos recentes corroboram com a utilização de L-asparaginase no tratamento de LLA para aumento da taxa de sobrevida pediátrica em cerca de 5 anos. No entanto, ainda buscam-se novas informações a respeito da terapêutica em adultos para que se possa determinar os principais efeitos na população (13). Uma revisão publicada por Carobolante e colaboradores (2020) (Tabela 1) apresenta os ensaios clínicos onde a L-asparaginase foi utilizada para o tratamento de LLA, com respectivas taxas de remissão (14).

Tabela 1: Ensaios clínicos para o tratamento de LLA em adolescente e adultos utilizando L-asparaginase como medicamento de referência para remissão da neoplasia (14).

Ensaio	Idade	Taxa de Remissão completa (%)	de Medicamentos	Referência
GMALL 05/93, 07/03	15 - 35	Cerca de 90%, média dos estudos	PEG-asparaginase, dexametasona	(15)
DFCI 01-1756 DFCI 06-254	28 – 30	Cerca de 88%, média dos estudos	PEG-asparaginase	(16, 17)
PETHEM A HR11	38 - 60	86%	L-asparaginase ou PEG -asparaginase	(18)

PEG: polietilenoglicol; GMALL: *German Multicenter Group for Adult ALL*; DFCI: *Dana Farber Cancer Institute*; PETHEMA: *Programa Español de Tratamientos en Hematología*.

Analisando as recentes edições da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) que é o instrumento para orientação do uso de medicamentos e insumos no Sistema Único de Saúde, verifica-se a ausência da L-asparaginase a partir da 8ª edição em 2013 incluindo as edições atuais, o que pode representar um menor interesse do poder público na utilização deste medicamento para o tratamento de LLA. Deste modo, levando em consideração o consumo por importação da L-asparaginase, torna-se cada vez mais relevante a produção nacional deste fármaco bem como o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de doenças crônicas (19, 20).

1.2. L –ASPARAGINASE

L-asparaginase, L-asparagina amino hidrolase (EC. 3.5.1.1) (ASNase) é uma enzima que catalisa a reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em amônia e ácido aspártico (Figura 2). Em razão disto, essa enzima é usada como principal componente para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda, visto que, células cancerígenas de LLA utilizam L-asparagina exógena por expressarem baixos níveis de L-asparagina sintetase. A L-asparaginase esgota os níveis séricos desse aminoácido, impossibilitando o metabolismo das células anormais (21, 22). Avaliando células tumorais e alta necessidade de ativação das vias metabólicas, alguns aminoácidos considerados não essenciais (quando observa-se o cenário de células normais) tornam-se essenciais em células neoplásicas, permitindo uma privação metabólica gerada por medicamentos (23).

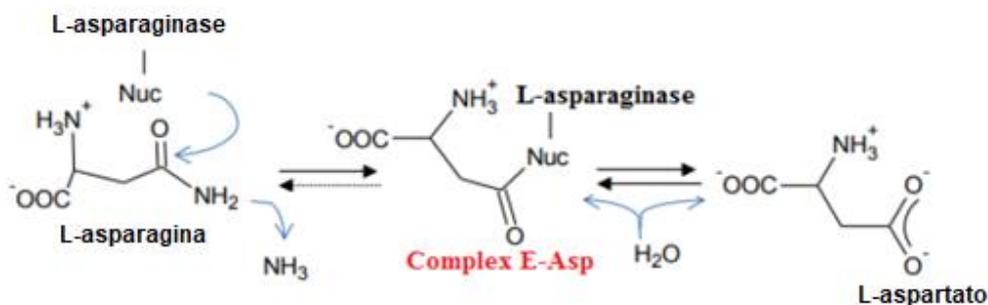


Figura 2: Mecanismo envolvendo a hidrólise do aminoácido L-asparagina catalisada pela L-asparaginase, adaptado. (24).

A L-asparaginase começou a ser utilizada no tratamento de LLA a partir de 1962, aproximadamente 10 anos depois da sua descoberta. A associação com corticoides e outros quimioterápicos é uma estratégia eficaz para a remissão das células tumorais. No entanto, o tratamento de LLA geralmente é associado ao transplante de medula óssea visando uma produção de células normais (14, 25).

A ASNase de *E. coli*, geralmente utilizada no tratamento de LLA, possui uma estrutura tridimensional apresentada como homotetrâmero com dois domínios e duas subunidades em cada domínio (Figura 3) (26). Pode ser encontrada na região citoplasmática ou no espaço periplasmático de fungos do gênero *Aspergillus* (27, 28), *Fusarium* (29), *Penicillium* (30), leveduras (31-33) e bactérias como *E.coli* e *E. chrysanthemi* (34-36). Existem dois tipos de L-asparaginase, a ANSase I e ANSase II, a primeira encontra-se prioritariamente no interior da célula e a segunda no espaço periplasmático. A ASNase II possui uma maior afinidade ao substrato L-asparagina quando comparada a enzima citoplasmática sendo a mais empregada na terapêutica. A ASNase do tipo I pode possuir uma maior afinidade pelo aminoácido L-glutamina, e a sua hidrólise pode acarretar efeitos adversos importantes. (26, 37).

Os diversos estudos clínicos exploram o tratamento com L-asparaginase produzidas por *E.coli* e *E. chrysanthemi*. Atualmente diversos protocolos têm sido aplicados em busca de uma terapêutica mais efetiva e confortável ao

paciente. O uso de PEG-ASNase possui como característica a diminuição dos efeitos imunológicos causados pela terapia antineoplásica. As doses de PEG-ASNase podem variar de 500 UI/m² até 2000 UI/m² a depender da fase de tratamento da doença (13).

Estruturalmente, a literatura destaca a produção e caracterização em diferentes organismos procariotos. O peso molecular descrito varia de 30 a 60 kDa por unidade monomérica, resultando em uma enzima com cerca de 120 – 240 KDa com atividade ótima em pH próximo de 7,0, apesar de muitos trabalhos apresentarem pH ótimo em 8,0 (38, 39) e temperatura ótima de conversão próxima dos 40 °C (40, 41).

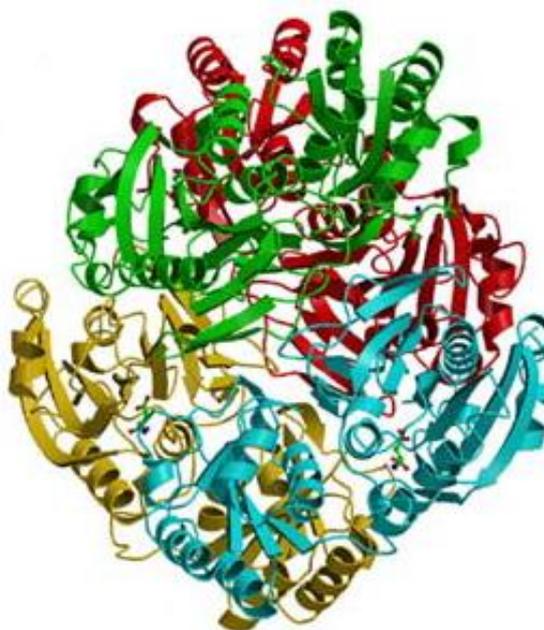


Figura 3: Estrutura quaternária tetramérica de L-asparaginase I de *E. coli* (nativa) (26). Os fragmentos em azul, vermelho, amarelo e verde representam as subunidades da enzima para composição do tetrâmero.

Clinicamente, as ASNases utilizadas para o tratamento de LLA são produzidas por meio do uso de tecnologia microbiana e incluem a produção em *E. coli* (Elspar®; Kidrolase®; Spectrila®); e *D. chrysanthemi* (Erwinase® and Rylaze®) o que pode gerar alguns efeitos adversos importantes, como reações alérgicas (42). Hepatotoxicidade e pancreatite aguda também são alterações comuns descritas na literatura, provavelmente relacionadas ao aumento da

concentração de amônia. Além disso, alterações bioquímicas como a redução dos níveis de glutamina são os efeitos mais comuns descritos. A glutamina possui estrutura semelhante à L-asparagina sendo o aminoácido não essencial mais abundante no organismo. A hidrólise de glutamina aumenta os níveis de amônia na circulação sistêmica gerando efeitos adversos importantes. Alterações na tireoide e redução dos níveis plasmáticos de antitrombina III e fibrinogênio também são descritos na literatura, o que pode acarretar em um aparecimento de sintomas relacionados à desregulação da hematopoese gerando acidentes hemorrágicos ou tromboembolismo (43, 44).

A utilização de ASNases procarióticas na terapêutica do tratamento da LLA pode desencadear efeitos adversos imunogênicos justificados pela origem bacteriana em cerca de 30 a 70 % dos pacientes. O desenvolvimento de hipersensibilidade à formulação pode ocorrer pela formação de anticorpos, gerando conseqüentemente a diminuição da eficácia do tratamento e do prognóstico pela depleção da L-asparaginase exógena (Figura 4). Sendo assim, a busca por diferentes fontes produtoras de ASNase se torna cada vez mais significativa para redução dos efeitos adversos e melhora da terapia antineoplásica (42).

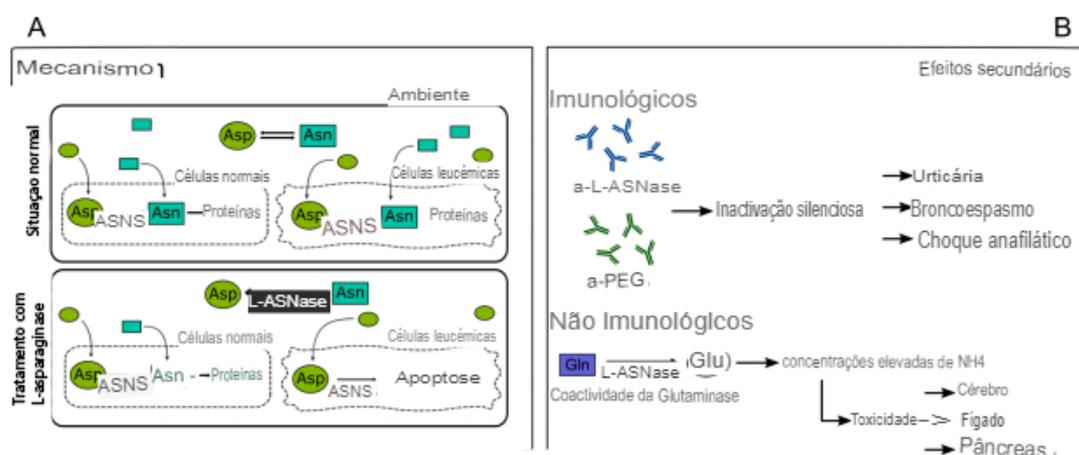


Figura 4: Principais mecanismos envolvidos no aparecimento de efeitos adversos utilizando L-asparaginase como tratamento para leucemia linfoblástica aguda.

1.3. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Com o passar dos anos o aumento da tecnologia recombinante associada à tecnologia de engenharia de proteínas tem elevado o número de sistemas conhecidos como heterólogos. A expressão heteróloga de proteínas tem seu marco estabelecido na produção de insulina. No entanto, atualmente novas moléculas são alvos da produção recombinante visando uma posterior aplicação na terapêutica de diversas doenças (45).

Dentre os diversos sistemas de produção de proteínas destacam-se a utilização de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, leveduras, fungos filamentosos, células de insetos, células de mamíferos, plantas transgênicas e animais transgênicos. As vantagens e desvantagens desses sistemas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos sistemas de produção de proteínas heterólogas, adaptado de Gomes *et al.* 2016 (46).

Sistema de Produção	Vantagens	Desvantagens
<i>Escherichia coli</i>	Fácil manipulação; Produção da proteína de interesse em curto período; Baixo Custo; Alta capacidade de crescimento celular; Possível aplicação de fermentação contínua.	Ausência da remoção de íntrons das transcrições; Possibilidade de terminação prematura da transcrição pela presença de códons de terminação; Ausência de modificação pós-traducional; Produção de proteínas em corpos de inclusão; Degradação de proteínas; Presença de endotoxinas.
<i>Bacillus subtilis</i>	Ausência da produção de endotoxinas; Possibilidade de secreção da proteína de interesse.	Produção de proteases extracelulares; Plasmídeos instáveis; Baixa produção da proteína de interesse.
Leveduras	Rápido crescimento celular com baixo custo; Possibilidade de modificações pós-traducionais; Ausência da produção	Hiperglicosilação de proteínas; Retenção intracelular; Viés de códon.

		de endotoxinas.	
Fungos Filamentosos		Alto nível de expressão.	Alta complexidade de processos bioquímicos e fisiológicos.
Células de Inseto		Alto nível de expressão; Seguro para vertebrados; Modificações pós-traducionais seguras; Excelente ferramenta para produção recombinante de glicoproteínas.	Complexas condições de cultura; A expressão contínua não é possível.
Células de mamíferos		Dobramento da proteína adequado; Modificações pós-traducionais seguras; Glicosilação adequada.	Alto custo; Demanda tecnologia complexa; Possibilidade de contaminação viral.
Plantas		Fácil escalonamento; Alto rendimento; Proteínas podem estar localizadas em diferentes regiões a depender do estágio de crescimento.	Os níveis de expressão altos podem ser tardios; Ensaio funcionais ainda precisam ser desenvolvidos.
Animais		Dobramento da proteína adequado; Modificações pós-traducionais seguras; Glicosilação adequada.	Baixo rendimento; Alto custo; Período de produção pode ser longo.

A expressão de genes exógenos em leveduras como *K. phaffii* (*P. pastoris*) depende de diversos fatores, como: a inserção de um gene por meio de um vetor de expressão, a introdução desse vetor no genoma fúngico e a avaliação das cepas que expressam a proteína de interesse (47).

Diversas espécies de fungos filamentosos foram exploradas em busca da produção de metabólitos e enzimas industriais. Espécies do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são altamente conhecidas pelas suas capacidades de produção de diferentes moléculas. A grande importância industrial é documentada na produção de enzimas de interesse farmacêutico como, β -galactosidase (48, 49), L-asparaginase (50, 51) proteases alcalinas

(52, 53). Além disso, esses organismos são grandes responsáveis pela produção de uma grande variedade de compostos tais como: antibióticos (54, 55), agentes anticancerígenos (56, 57), estatinas (58, 59), imunossuppressores (60, 61), entre outros.

O melhoramento nas condições de produção, bem como rendimento e diminuição dos custos é um dos objetivos das principais empresas que produzem biofármacos ou biomoléculas. A utilização de biologia molecular e a modificação de organismos em busca destes objetivos é frequentemente publicado na literatura. Organismos como *E.coli*, *S. cerevisiae*, e *K. phaffii* são conhecidos por serem explorados no aumento da produção de enzimas e proteínas de interesse (62-66).

1.3.1. *Komagataella phaffii*

Pichia pastoris (reclassificada como *Komagataella phaffii*) (67) foi primeiramente descrita por Koichi Ogata (1969) como uma levedura capaz de metabolizar o metanol e utilizar esse composto como fonte de carbono (68). Vendida pela Companhia *Phillips Petroleum*, inicialmente como uma fonte unicelular rica em proteínas para alimentação animal, a utilização dessa levedura sofreu impactos frente à crise econômica do petróleo na década de 70. Diante da queda do preço da soja e a perda de preferência na alimentação animal, a Companhia *Phillips Petroleum* juntamente com *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates* desenvolveram as cepas de *P. pastoris* visando a produção de proteínas heterólogas (47, 69).

Os sistemas de expressão de proteínas heterólogas utilizando cepas de *P. pastoris* já são bem descritos na literatura. Esses sistemas são aplicados principalmente na produção de biofármacos e enzimas industriais (70, 71). O conceito elevado dessas leveduras pode ser atribuído à diversos fatores segundo Cereghino e Cregg (2000): 1 – cepas de *P. pastoris* possuem alta capacidade de produção extra ou intracelular de proteínas heterólogas; 2 – as técnicas moleculares para modificação do genoma são relativamente simples e bem caracterizadas; 3 – Leveduras como *P. pastoris* são capazes de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilação (47).

O emprego dessas leveduras na expressão de proteínas heterólogas baseia-se na capacidade da utilização de metanol como fonte de carbono. O primeiro passo para a conversão de metanol em energia é fundamentado na atividade da enzima álcool oxidase (AOX1) encontrada no peroxissoma convertendo metanol em formaldeído (72) (Figura 4). A transcrição do gene AOX1 permite a expressão da proteína heteróloga por indução proveniente da presença de metanol no meio de cultivo. Basicamente, o crescimento e cultivo das cepas de *P. pastoris* baseiam-se em três fases, sendo a primeira delas, o crescimento em cultivo contendo glicerol como fonte de carbono que é metabolizado pela via da gliceraldeído-3-fostato (GL-3P) até a conversão em piruvato para utilização nas vias do ácido cítrico, essa etapa permite o crescimento de biomassa microbiana que será relevante nas próximas etapas. A segunda fase baseia-se na adaptação da levedura à indução com metanol e utilização do álcool como fonte de carbono e a terceira fase a indução da expressão heteróloga com diferentes concentrações de metanol, ativando o promotor AOX (73).

Existem diferentes cepas de *P. pastoris* utilizadas para transformação e produção de proteínas de interesse (Tabela 3). Algumas cepas possuem mutações no gene da enzima histidinol desidrogenase (*his4*), ou outras mutações em genes específicos e por esse motivo necessitam de complementação com histidina ou outros compostos para o crescimento em meios de cultura (74).

Tabela 3: Linhagens de *P. pastoris* utilizadas para expressão heteróloga - atualizado e adaptado (74, 75).

Linhagem	Genótipo	Metabolização de Metanol
X-33	Tipo-Selvagem	Mut ⁺
GS115	<i>his4</i>	His ⁻ , Mut ⁺
KM71H	<i>arg4 aox1:: ARG4</i>	Mut ^s , Arg ⁺
SMD1168	<i>pep4Δ his4</i>	His ⁻ , Mut ⁺ , deficiência na produção de proteases
SMD1165	<i>prb1 his4</i>	His ⁻ , Mut ⁺ , deficiência na produção de proteases
SMD1163	<i>pep4 prb1 his4</i>	His ⁻ , Mut ⁺ , deficiência na produção de proteases

Em relação a velocidade de crescimento em meio contendo metanol a cepa X-33 é considerada sem mutações no gene AOX1 e possui rápida conversão do substrato em produto (Mut⁺). A linhagem GS115 também possui metabolização rápida de metanol, no entanto, observa-se uma mutação do gene *his4* de *S. cerevisiae* (His⁻), a qual permite a seleção de vetores de expressão. KM71 é uma linhagem que possui a exclusão do gene AOX1 em

troca do gene *ARG4* de *S. cerevisiae*, o que resulta em uma diminuição na taxa de conversão do metanol (Mut^s) (74).

A utilização de leveduras na expressão de proteínas heterólogas já é amplamente difundida na literatura. A Tabela 4 mostra algumas proteínas produzidas em sistemas de expressão de *P. pastoris*, os diferentes vetores utilizados e a espécie de origem da qual o gene foi retirado.

Tabela 4: Expressão de proteínas em *Pichia pastoris*.

Enzima produzida	Vetor	Linhagem	Espécie de Origem	Referência
exo-β-(1,3)-glucanase	pPICZαB	X-33	N.R	(76)
GH16 agarase	β- pPIC9K	GS115	<i>Microbulbifer</i> sp. BN3	(77)
GH3 glucosidase	β- pPICZαA	GS115	<i>Solanum torvum</i>	(78)
Lipase	pPIC9K	GS115	<i>Aspergillus niger</i>	(79)
Protease	pPIC9K	GS115	<i>Rhizomucor miehei</i> CAU432	(80)
Quinase	pPICZαA	KM71H	<i>Bacillus licheniformis</i>	(81)
Xilanase	pGAPZα A	X-33	<i>Penicillium occitanis</i>	(82)
Xilanase	pPICZB	X-33	<i>Aspergillus fumigatus</i>	(83)
Xilanase	pPICZαA	KM71H	<i>Actinomadura</i> sp.	(84)
Xilanase	pGAPZα A	X-33	<i>C. thermophilus</i>	(85)
α-amilase	pPICZαA	X-33	N.R	(86)
α-L-rhamnosidase	pPIZα	GS115	<i>Aspergillus oryzae</i>	(87)
β-glucosidase	pPIC9K	GS115	<i>Paecilomyces thermophila</i>	(88)
β-mannanase	pPICZαA	X-33	<i>Aspergillus sulphureus</i>	(89)
β-mannanase	pGAPZα	GS115	N.R	(90)

	e			
	pGAPZB			
β -xilosidase	pPink α - HC	GS115	<i>Selenomonas ruminantium</i>	(91)

NR: Não relatado.

Recentemente a levedura *P. pastoris* X-33 foi reclassificada no gênero *Komagataella*, mais precisamente como *Komagataella phaffii* (92). Sendo um dos sistemas de produção de proteínas heterólogas mais utilizados no mundo. O alto conhecimento acerca da genética do microrganismo auxilia a utilização deste, além disso, a levedura *P. pastoris* possui a capacidade de adaptar o seu crescimento em diferentes meios de cultura com diferentes fontes de carbono e produzirem alta concentração celular (93-95).

A levedura *K. phaffii* não possui metabolismo fermentativo, o que diferencia o seu crescimento de outras leveduras utilizadas na produção de proteínas heterólogas como *S. cerevisiae*, gerando uma alta concentração celular pois o metabolismo do carbono não é direcionado para a produção de etanol (96-98). Entre as vantagens, observa-se um organismo reconhecidamente seguro (GRAS), capaz de secretar proteínas para o meio extracelular, diminuindo uma das etapas do processo de purificação (96, 99).

1.3.1.1. Vetor pPICZ

A utilização de vetores pPICZ e pPICZ α é bem difundida na literatura (76, 78, 81-83). Os vetores pPICZ (Figura 5) e pPICZ α (Figura 6) são construídos a partir da inserção da sequência 5' do promotor AOX1 (GACTGGTTCCAATTGACAAGC) e possuem a particularidade de promover resistência ao antibiótico Zeocina®. Esses vetores exploram a transcrição da enzima álcool oxidase em processos fisiológicos nos quais há a presença de metanol para consequentemente transcrever o gene inserido (47, 75) .

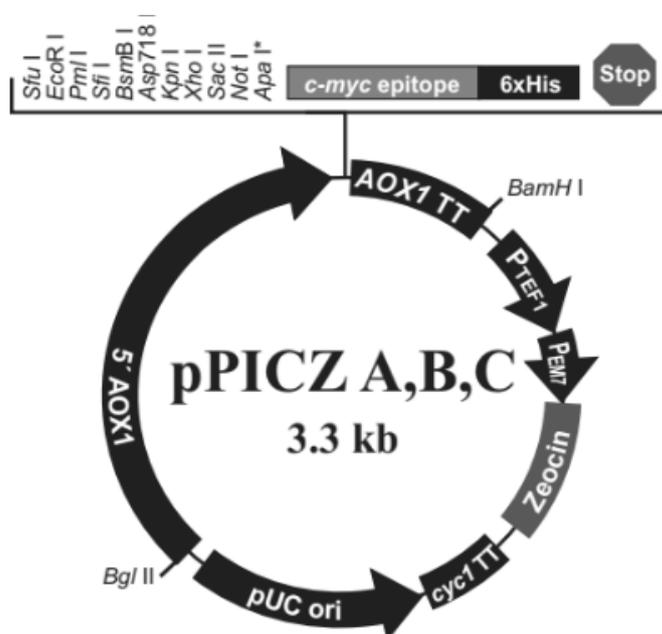


Figura 6: Esquema representativo dos vetores comerciais pPICZ (100).

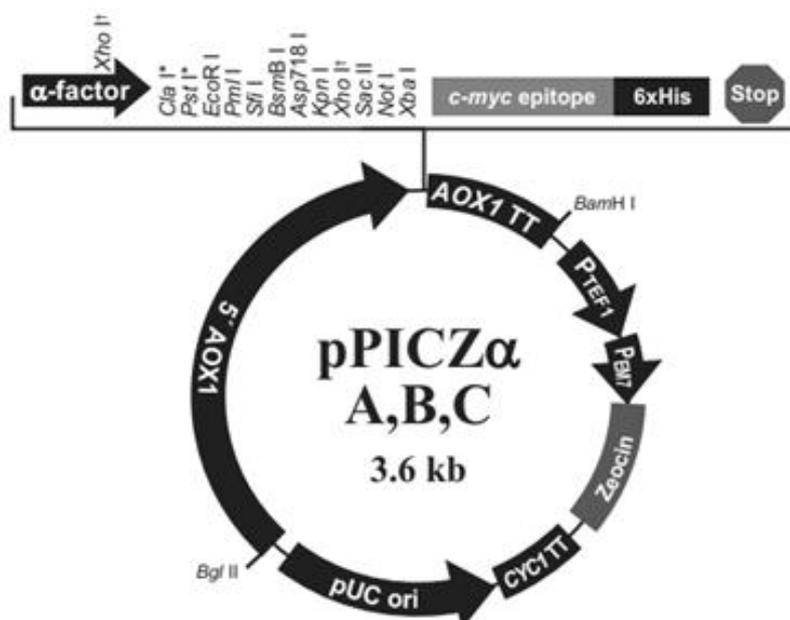


Figura 7: Esquema representativo dos vetores comerciais pPICZ α (100).

A diferença entre os dois vetores apresentados acima, é que o vetor pPICZ α possui uma sequência α do gene de *Sacharomyces cerevisiae* visando a indução da produção da enzima no meio extracelular, facilitando o processo de purificação. No entanto, sabe-se que enzimas que normalmente são produzidas intracelularmente tendem a continuarem sendo produzidas no citosol celular, enquanto enzimas produzidas normalmente de modo extracelular tendem a serem excretadas para o meio extracelular (75, 101).

Um estudo realizado por Dwivedi em 2014 comparou diversas sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados NCBI da proteína L-asparaginase de diferentes origens: bacteriana, fúngica e vegetal. Pôde-se observar uma proximidade nas sequências provenientes de fungos e bactérias, de aproximadamente 10,77% que estaria sendo representada pelo aminoácido alanina, o que sugere um papel importante deste aminoácido na composição da L-asparaginase. Além disso, o estudo demonstrou dois resíduos de glicina conservados em todas as sequências analisadas, o que representa uma função importante para esse resíduo na evolução das sequências de L-asparaginases de origem procariótica (102).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Clonar o gene codificador de L-asparaginase do fungo *Fusarium proliferatum* em *K. phaffii* X-33 visando a produção heteróloga estável e extracelular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o RNA total do fungo filamentoso produtor de L-asparaginase;
- Obter transformantes de *K. phaffii* X-33 expressando o gene de L-asparaginase fúngica;
- Desenvolver e otimizar a produção de L-asparaginase recombinante;
- Purificar a L-asparaginase por processos de baixa e alta resolução;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos e cinéticos;
- Avaliar a estabilidade da enzima pura;
- Avaliar o efeito citotóxico da enzima recombinante em células da linhagem Jurkat (ATCC TIB-152) provenientes de leucemia linfoblástica aguda identificando as concentrações que causam morte celular;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PREPARO DE MEIO DE CULTIVO E SOLUÇÕES

- Ágar Extrato de levedura/peptona/dextrose + Zeocina (YPD + Zeocin[®])

10 g Extrato de levedura

20 g Peptona bacteriológica

20 g Dextrose

20 g Ágar

100 µg/mL Zeocin[®]

Água purificada q.s.p - 1000 mL

- Meio BMGY (*Buffered complex medium containing glycerol*)

10 g Extrato de levedura

20 g Peptona bacteriológica

100 mM Fosfato de Potássio - pH 6,0

13,4 g YNB (*yeast nitrogen base without aminoacids* – Sigma Aldrich® cód. Y0626)

2 mL biotina 0,02% (p/v)

10 mL glicerol

Água purificada q.s.p. - 1000 mL

Todos os componentes para preparo do meio de cultivo foram pesados separadamente, diluídos, então autoclavados, com exceção da biotina, que foi submetida à uma filtração esterilizante e adicionada ao final do processo.

- Meio BMMY (*Buffered complex medium containing methanol*)

10 g Extrato de levedura

20 g Peptona bacteriológica

100 mM Fosfato de Potássio - pH 6,0

13,4 g YNB (*yeast nitrogen base without aminoacids* – Sigma Aldrich® cód. Y0626).

2 mL biotina 0,02% (p/v)

10 mL metanol

Água purificada q.s.p - 1000 mL

Todos os componentes para preparo do meio de cultivo foram pesados separadamente, diluídos, então autoclavados, com exceção da biotina, que foi submetida à uma filtração esterilizante e adicionada ao final do processo. O metanol foi adicionado após o resfriamento do meio de cultivo, sob condições estéreis em fluxo laminar.

- Solução de Hidroxilamina 1 mol/L

Procedeu-se com a solubilização de 13,89 g de hidroxilamina (Sigma-Aldrich) em 100 mL de água destilada. Essa solução foi considerada a solução estoque e inicialmente encontrava-se na concentração de 2 mol/L. No momento do uso a solução estoque foi diluída na proporção de 1:1 com uma solução de hidróxido de sódio 2 mol/L.

- Solução de L-asparagina 0,1 mol/L

0,132 g L-asparagina (Sigma-Aldrich)

Água purificada q.s.p - 10 mL

- Solução de Cloreto Férrico/Ácido Tricloroacético

Solução A – 16,48 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Água purificada q.s.p – 100 mL

Solução B – 7 mL Ácido Clorídrico 37%

20 mL Ácido Tricloroacético (TCA) 6,1 mol/L

Água purificada q.s.p – 100 mL

Ao final, as duas soluções foram unidas e armazenadas sob refrigeração.

3.2. CLONAGEM E EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE EM *K. phaffii* X-33 UTILIZANDO VETORES pPICZ α A.

As cepas utilizadas neste trabalho, bem como todas as etapas subsequentes de clonagem e transformação foram realizadas em parceria com laboratório da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Agroenergia) com apoio das pesquisadoras Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro e da Dra. Paula de Souza Monteiro e Dra. Kelly Barreto Rodrigues. O fungo produtor de L-asparaginase (*Fusarium proliferatum* DCFS10) foi identificado em um trabalho anterior publicado por Freitas e colaboradores (2021) (103). A identificação foi confirmada através da análise das sequências ITS, tub2 e ef-1 α . A sequência fúngica codificante para a enzima L-asparaginase foi amplificada e sequenciada neste trabalho e posteriormente clonada em cepas de *E. coli* TOP10 e *K. phaffii*.X-33

3.2.1. Desenho dos *primers*

Inicialmente foi feita a busca de sequências de nucleotídeos e/ou aminoácidos relativas à L-asparaginase de fungos de espécies do gênero *Fusarium* disponíveis no Banco de Dados – GenBank (website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Centro Nacional de Informação em Biotecnologia – NCBI). Essas sequências foram alinhadas no programa *Geneious* 11.0.4 para a

verificação da existência de regiões conservadas, as quais foram essenciais para o desenho dos *primers*, de maneira que a temperatura de anelamento dos *primers* com o genoma do fungo estivesse entre 50°C e 60°C. Os alinhamentos resultantes foram então analisados, ou seja, as regiões de sequências conservadas foram marcadas manualmente por sombreamento para melhor visualização e os oligonucleotídeos desenhados de acordo com os requisitos básicos para maior eficiência das reações de PCR. Na Tabela 5 estão as sequências dos oligonucleotídeos de L-asparaginase desenhados para a primeira fase da análise.

Tabela 5: *Primers* utilizados no estudo.

<i>Primers</i>	Sequência (5'- 3')
FusAsn-For1	ATGCCAGCTTTAAACGGCTT
FusAsn-Rev1	GTGCACTCCCGCGTGCTC
FusAsn-For2	ATGTCGCCCTCTCTTCAAT
FusAsn-Rev2	TGTCCTTGATCTCCTCAATAGACAGCTT

3.2.2. Extração do RNA

O fungo filamentososo isolado do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro foi identificado por Siqueira (2010) e encontra-se depositado na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho (104).

Inicialmente, o cultivo do fungo *F. proliferatum* DCFS10 foi realizado em meio Czapek-Dox modificado visando a produção de L-asparaginase, cuja composição é 0,2% (p/v) de glicose, 1,0% (p/v) de l-asparagina, 0,152% (p/v) de KH₂PO₄, 0,052% (p/v) de KCl, 0,052% (p/v) de MgSO₄·7H₂O, traço quantidades de CuNO₃·3H₂O, ZnSO₄·7H₂O e FeSO₄·7H₂O. O inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo. Discos de micélio do fungo foram recortados de placas de cultivo

recente (PDA) e inoculados nos frascos. Após incubação durante 2 dias a 28 °C graus e 120 rpm, o micélio foi coletado por filtração e congelado em ultrafreezer. O RNA total foi extraído conforme o método do kit *RNeasy Plant Mini*® (QIAGEN). Para obtenção do RNA, o micélio anteriormente congelado foi triturado em nitrogênio líquido. A concentração do RNA total foi determinada através da razão de absorvância do produto em 260/280 nm (Nanodrop®) e a integridade do RNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo formaldeído, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989). O RNA obtido foi visualizado pela coloração do gel com brometo de etídeo a 0,001 µg/mL.

3.2.3. Síntese do cDNA

O RNA previamente extraído foi utilizado para a síntese de cDNA através reações de transcrição reversa com o kit Super Script IV Reverse Transcriptase® (Invitrogen), nos quais utilizou-se cerca de 5µg de RNA juntamente com o iniciador oligo d(T)₂₀ (sequência: 5'd PO4 [(T)20]3'), de acordo com as orientações do kit.

3.2.4. Amplificação do cDNA

As reações de amplificação dos fragmentos de interesse foram realizadas testando-se os *primers*, conforme descrito mais adiante. Todas as reações foram realizadas utilizando-se a mistura *GoTaq® Hot Start Polymerase* (Promega) seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante: 10 µL de 5X *Colorless Go Taq Flexi Buffer*®, 1,5 U/mL de *Taq DNA polimerase*, 0,2 mM de *PCR Nucleotide Mix*® (Sigma Aldrich) e 2 mM de MgCl₂; 0,5 µM dos oligonucleotídeos iniciadores; 1µL de cDNA, água ultrapura estéril para o volume final de 50 µL.

As reações foram incubadas sob as seguintes condições:

1-Denaturação: 94°C, 5 min

2-Denaturação: 94°C, 1 min

3-Anelamento:* 55, 58, 60, 62°C, 1 min

} 35 X

4- Extensão: 72°C, 2 min

5- Extensão: 72°C, 10 min

(*) A temperatura de anelamento variou em função da otimização da reação, para cada par de iniciadores utilizados e para aumento do rendimento da reação. Os fragmentos gerados (observados através de eletroforese) foram diretamente sequenciados e posteriormente clonados.

3.2.5. Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação da qualidade, quantificação do DNA e análise de fragmentos de DNA. A agarose foi preparada em concentrações de 0,8 a 1,0% (p/v) em tampão de corrida TAE 1X e contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese, como descrito por Sambrook (1989)(105). Para visualização e fotodocumentação do DNA utilizou-se a incidência de luz ultravioleta em transiluminador. Como marcador de peso molecular para o gel utilizou-se o padrão *GeneRuler 1kb DNA Ladder*® (Thermo Scientific).

3.2.6. Transformação de vetores pPICZαA em *E. coli*.

Os vetores pPICZαA contendo a sequência codificadora de L-asparaginase de *F. proliferatum* foram obtidos da empresa Invitrogen e primeiramente clonados em *E. coli* TOP 10 para aumentar a quantidade de plasmídeo existente e possibilitar posterior transformação das leveduras. Foi utilizada a linhagem *E. coli* TOP 10/P3: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$ (Invitrogen - TOPO TA Cloning®). Esta linhagem possibilitou a realização de manipulações genéticas, como a propagação e multiplicação de DNAs plasmidiais provenientes da ligação da sequência codificadora ao vetor de clonagem.

As células de *E. coli* (não transformadas e transformadas) foram cultivadas em meio LB e conservadas a -80 °C em glicerol 25% estéril.

Inicialmente, as bactérias foram crescidas em 5 mL de meio líquido LB contendo zeocina (25 µg/mL) e incubadas por 1 dia a 37°C sob agitação de 200

rpm. Após transformação, as culturas foram plaqueadas em meio LB contendo 25 µg/mL de Zeocina® para seleção de transformantes. Os plasmídeos foram purificados utilizando-se o kit *Pure Link Quick Plasmid Miniprep®* (Invitrogen).

3.2.7. Transformação de *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) por eletroporação

Foram utilizadas para a transformação de *Pichia pastoris* da linhagem X-33. As cepas armazenadas em freezer a -80 °C foram inculadas em meio YPD ágar por 48 horas em temperatura de 28 °C. Uma colônia isolada de X-33 foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido em um Erlenmeyer de 125 mL durante a noite em 30 °C, sob agitação de 250 rpm (pré-inóculo). Foi inoculado 0,1 a 0,5 mL do pré-inóculo em 50 mL de meio YPD líquido. O crescimento ocorreu por cerca de 12 horas a 28 °C, sob agitação de 250 rpm até se obter uma absorbância (OD600) entre 1,3-1,5. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.500 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 50 mL de água ultrapurificada gelada estéril. As células foram novamente centrifugadas utilizando os mesmos parâmetros anteriores, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 25 mL de água estéril gelada. O processo de lavagem das células com água estéril para retirar de todo o meio de cultivo foi repetido duas vezes. Após esses passos, as células foram centrifugadas novamente nas mesmas condições, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 2 mL de Sorbitol 1 M gelado. Após a suspensão das células, elas foram transferidas para um tubo de centrífuga menor, centrifugando novamente a 1.500 g por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas em 200 µL de Sorbitol 1 M, para a obtenção de um volume final de 1,5 mL de células eletrocompetentes.

A reação para a transformação continha num tubo de 1,5 mL, 80 µL de células competentes e de 5 a 10 µg de DNA plasmidial linearizado ressuscitado em 5 a 10 µL de água ultrapura. A solução foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm, Gene Pulser Curvette® (Bio-Rad) e deixada no gelo por 5 min. A eletroporação foi realizada utilizando o equipamento Gene Pulser®

(Bio-Rad) sendo as condições utilizadas para a eletroporação: Capacitância de 25 μF ; resistência mínima de 400 Ω ; voltagem de 1500 V. Imediatamente após a eletroporação foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M gelado à cubeta. A solução foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril, incubando as células transformadas a 30° C por 2 horas. As células foram plaqueadas em meio YPD sólido, contendo o antibiótico Zeocina® (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas foram levadas para a estufa a 30° C e incubadas cerca de 2 dias. As colônias obtidas foram então semeadas em uma nova placa de meio YPD sólido, contendo antibiótico Zeocina® (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.2.8. Confirmação da integração do vetor ao genoma da levedura

A confirmação da integração do vetor ao genoma foi realizada através da reação da polimerase em cadeia (PCR) a partir do DNA genômico extraído dos clones selecionados resistentes à zeocina. A reação utilizou os oligonucleotídeos AOX1 5' e AOX1 3'. As quantidades de cada reagente foram: 5 μL de 5X *Colotorless Go Taq Flexi Buffer*®, 1,5 U/mL de *Taq DNA polimerase*, 0,2 mM de *PCR Nucleotide Mix*® e 2 mM de MgCl_2 ; 0,5 μM dos oligonucleotídeos iniciadores; 1 μL de cDNA, água ultrapura estéril para o volume final de 25 μL . As condições utilizadas para a reação da polimerase em cadeia foram:

- 1-Denaturação: 98°C, 3 min
 - 2-Denaturação: 98°C, 30 s
 - 3-Anelamento: 55°C, 30 s
 - 4- Extensão: 72°C, 2 min
 - 5- Extensão: 72°C, 10 min
- } 35 X

Após confirmação da transformação por PCR as células foram armazenadas em – 80 °C em solução contendo glicerol 10%.

3.3. EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE EM *PICHELIA PASTORIS* UTILIZANDO VETORES pPICZ α A

Para a produção da enzima em sistemas de produção heterólogo de *P. pastoris*, as cepas armazenadas em freezer -80 °C foram reativadas em placas de Petri de 90 mm contendo meio YPD Ágar com 100 μ g/mL Zeocina®. Após 48 horas, e observado o crescimento, uma colônia isolada foi adicionada em um tubo do tipo falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio BMMY. O cultivo denominado de pré inóculo teve como objetivo principal o crescimento de biomassa e foi mantido a 30 °C, 250 rpm, por 24 horas. O crescimento foi monitorado por leitura da densidade ótica em espectrofotômetro em comprimento de onda 600 nm.

Após o período de 24 horas, o pré-inóculo foi centrifugado por 10 minutos a 2000 g, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 30 mL de meio BMMY. Nesse momento o cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyers® de 250 mL nas mesmas condições citadas acima.

A cada 12 horas de cultivo em meio BMMY, foram adicionados 300 μ L de metanol com finalidade de induzir a expressão gênica e produção da enzima heteróloga. Após 48 horas de cultivo, novamente submeteu-se o meio de cultura a centrifugação a 2000g por 10 minutos. O caldo fermentado e as células cultivadas foram separadas e testadas para a produção de L-asparaginase.

A expressão enzimática seguiu as instruções estabelecidas no protocolo *EasySelect® Pichia Expression Kit for expression of Recombinant Proteins using pPICZ and pPICZ α in Pichia pastoris* - Invitrogen.

Foram testados 21 transformantes resistentes a zeocina, além da cepa selvagem X-33 (não transformada) como controle negativo da expressão.

3.4. ENSAIO ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE

A quantificação da atividade enzimática foi realizada pelo método proposto por Drainas e colaboradores (1997) com modificações, para a determinação da formação de β -hidroxamato aspártico como produto final da

reação (106). Inicialmente, 500 µL do meio de cultivo (sobrenadante) foram submetidos ao ensaio de atividade enzimática, seguido pela utilização de uma suspensão do cultivo de *P. pastoris* na concentração de 100 mg de células/mL. O ensaio enzimático foi realizado com a adição de 1,1 mL tampão Tris-HCl pH 8,6 50 mM, 200 µL de L-asparagina 0,1 mol/L, 200 µL de hidroxilamina 1 mol/L, 500 µL da suspensão preparada previamente com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,6. A reação foi incubada por 30 minutos a 37 °C, após esse período, adicionou-se 500 µL da solução de Cloreto Férrico/TCA. O tubo da reação foi centrifugado a 5000 rpm, o sobrenadante foi submetido a leitura por espectrofotômetro Biomate 3S®, (Thermo Scientific) a 500 nm.

Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 µmol de produto/min. A atividade enzimática foi determinada segundo a equação abaixo (Equação 1):

$$\text{Atividade de L - asparaginase} \left(\frac{UI}{mL} \right) = \frac{\mu\text{mol de } \beta\text{-hidroxamato aspártico}}{n \times \text{Tempo}}$$

Equação 1

Onde: n = quantidade de células em gramas; quantidade de amostra utilizada em mL

Na hipótese de testar o meio extracelular, substituiu-se a suspensão de células por 500 µL de caldo fermentado, a atividade foi calculada a partir do volume adicionado.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação de proteínas totais foi realizada por meio da utilização do *BCA Protein Assay kit® Pierce* (Thermo Fischer). Vinte e cinco µL de amostras foram incubados a 37 °C durante 30 minutos com 200 µL da mistura disponível no kit. A quantidade de proteínas pode ser calculada a partir da equação linear proposta pela curva padrão de albumina variando as quantidades desta proteína de 20 a 2000 µg.

3.6. CURVA DE CRESCIMENTO

A partir da triagem inicial realizada com 21 transformantes de *K. phaffii* X-33 resistentes a Zeocina, os cinco clones que demonstraram maior atividade foram submetidos à avaliação durante 24, 48 e 72 horas, para determinação do melhor tempo de cultivo e quantidade de biomassa, segundo os parâmetros determinados no tópico 3.3.

3.7. EXTRAÇÃO DA ENZIMA INTRACELULAR

A L-asparaginase produzida intracelularmente foi extraída de acordo com a metodologia aplicada por Lida e colaboradores (2008) com modificações. 30 mL das suspensões com concentração de 100 mg de células/mL foram submetidas a extração por sonificador ultrassônico com frequência de 40 KHz, em intervalos de 30 segundos ON/OFF durante 5 min (107). Todo o processo foi realizado em banho de gelo para manutenção da estrutura tridimensional da proteína. Ao final do processo, a mistura foi submetida a centrifugação por 10 min a 2000 g. O ensaio para quantificação de L-asparaginase foi aplicado ao sobrenadante da amostra.

3.8. CROMATOGRAFIA

Após a metodologia para extração enzimática por sonicação, o sobrenadante obtido foi submetido à purificação em coluna de troca iônica Hitrap® DEAE FF 5 mL (Cytivia - GE17-5055-01). Procedeu-se com a aplicação de 2 mL de amostra na coluna previamente equilibrada com Tampão Tris-HCL pH 8,6 sob um fluxo de 0,5 mL/min, seguida de uma lavagem para eliminação de resíduos, utilizando 25 mL de tampão. Após a etapa de lavagem, iniciou-se a eluição da amostra, variando as concentrações de NaCl de 0 a 0,5 M. Os tubos foram coletados em frações contendo 2 mL. Os ensaios de atividade enzimática e proteínas totais foram realizados em cada tubo. As frações onde foram realizadas atividades enzimáticas foram concentradas por liofilização para a continuação dos ensaios de caracterização. Todos os

estágios ocorreram no sistema de purificação *Akta pure*® (GE Healthcare Life Sciences).

3.9. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

3.9.1. Efeito da Temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática da L-asparaginase foi determinado realizando o ensaio de determinação da atividade enzimática em diferentes temperaturas. Os ensaios foram realizados nas temperaturas de 30, 40, 45, 50, 55 e 60 °C.

3.9.2. Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática da L-asparaginase foi determinado realizando o ensaio de determinação da atividade enzimática em diferentes valores de pH. Os ensaios foram realizados nos seguintes valores de pH 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Para a determinação da atividade enzimática em pH 5, foi utilizado tampão Acetato de sódio 50 mM, as soluções com valores de pH 6, 7 e 8 foram preparadas a partir de tampão Fosfato de sódio 50 mM, enquanto para os valores de pH 9 e 10 foi utilizado tampão Tris-HCl 50 mM.

3.9.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para a determinação da constante de Michaelis-mentem (K_m) e da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram realizados ensaios com concentrações de L-asparagina variando de 0 – 16 mM na reação. A análise dos resultados foi determinada pela construção do gráfico duplo recíproco (Lineweaver-Burk), utilizando como parâmetros a atividade de L-asparaginase e concentração de L-asparagina como substrato em pH 8,0 (13). Os cálculos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram realizados segundo as equações abaixo:

$$a = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}}$$

$$b = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Onde:

a = coeficiente angular da reta

b = coeficiente linear da reta

3.10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Os géis de poliacrilamida foram preparados segundo a metodologia proposta por Laemmli (1970) com modificações. A polimerização ocorreu através da adição de persulfato de amônio (APS) e tetrametiletenodiamina (TEMED). Os radicais derivados do persulfato induzem a reação de polimerização dos monômeros de acrilamida e de bisacrilamida. Os géis concentradores e separadores foram preparados segundo a tabela 6:

Tabela 6: Soluções utilizadas para o preparo de gel de poliacrilamida 12,5% para gel desnaturante com dodecil sulfato de sódio.

Gel concentrador	
Soluções	Concentração 4%
Acrilamida: Bis-acrilamida (29,2: 0,8)	0,65 mL
Tampão tris HCl 1,0 mol/L pH 6,8	1,25 mL
Água ultra purificada	3,5 mL
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %	0,05 mL
APS 10 %	0,05 mL
TEMED	0,005 mL
Gel separador	
Soluções	Concentração 12%
Acrilamida: Bis-acrilamida (29,2: 0,8)	4 mL
Tampão tris HCl 1,5 mol/L pH 8,8	2,5 mL
Água ultra purificada	3,3 mL
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %	0,1 mL
APS 10 %	0,1 mL
TEMED	0,004 mL

Para posterior comparação da massa molar foi utilizado um padrão de alto peso molecular *LMW-SDS Marker Kit for electrophoresis*® (GE Healthcare Life Sciences) com as seguintes proteínas: 220 KDa – Miosina; 170 KDa – α -2-

Macroglobulina; 116 KDa – β Galactosidase; 76 KDa – Trasferrina; 53 KDa – Glutamato desidrogenase.

3.10.1. Coloração com Azul de comassie

O perfil proteico do extrato bruto e das amostras purificadas foi analisado após coloração do gel de poliacrilamida em azul de Comassie. Para tal, a solução corante foi preparada adicionando 1 tablete de PhastGel Blue R[®] (Comassie Blue R-350 – GE Healthcare) e dissolvido em 80 mL de água destilada, a solução foi completada até 200 mL com metanol P.A e filtrada. Para coloração do gel a solução estoque de Comassie Blue R-350[®] foi diluída em uma proporção 1:1 com ácido acético glacial 20%. A solução final encontrava-se em uma concentração de 0,1%. O gel foi incubado durante 12 horas em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, retirou-se a solução corante e adicionou-se a solução fixadora (45 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial e q.s.p 45 mL de água destilada).

3.11. MODELAGEM ESTRUTURAL DA PROTEÍNA L-ASPARAGINASE *IN SILICO*

A partir do sequenciamento de cDNA obtida após reações de PCR utilizando os pares de primers citados na Tabela 5 (página 36) e com a utilização da sequência de aminoácidos de L-asparaginase após tradução, a modelagem molecular da estrutura terciária, tridimensional, foi realizada através da utilização do servidor de modelagem de estruturas de proteínas por homologia SWISS-MODEL disponível em <https://swissmodel.expasy.org/>. Esse servidor usa ferramentas como o ProMod3 (108), que é baseado na arquitetura OpenStructure (109). Em linhas gerais, o sistema analisa uma sequência de aminoácidos informada e a compara com estruturas homologas disponíveis na literatura em bancos de dados de proteínas (*Protein Data Base* - PDB). A resposta do sistema é uma série de estruturas criadas com base nos

homólogos encontrados. Para maiores informações sobre o funcionamento desse sistema, acessa: <https://swissmodel.expasy.org/docs/help>.

Uma segunda abordagem de modelagem foi realizada a partir da utilização de outro servidor, o I-TASSER Suite 5.1 disponibilizado pela Universidade de Michigan (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Este servidor realiza uma modelagem *ab initio* da proteína de interesse, a partir da sequência de aminoácidos. O sistema busca, dentro de uma programação baseada em aprendizagem de máquina, fragmentos de estruturas secundárias com homologia às frações da sequência de interesse. Na sequência, os fragmentos retirados dos modelos PDB são remontados em modelos completos por meio de simulações Monte Carlo, com as conexões (principalmente “loops”) construídas por modelagem *ab initio*. As estruturas formadas ainda são otimizadas para remoção dos eventuais choques estéricos, refinamento da topologia e otimização das ligações de hidrogênio.

Para maiores informações sobre o modo de funcionamento do servidor I-TASSE, acessar: <https://seq2fun.dcmdb.med.umich.edu/I-TASSER/about.html>.

Os modelos obtidos pelas duas metodologias foram utilizados para compreensão das diferentes estruturas da asparaginase produzida pelo *F. proliferatum*. Os parâmetros utilizados para avaliação das estruturas previstas foram: 1) GMQE (*Global Model Quality Estimation*) - que compara a qualidade do alinhamento alvo-modelo, a pontuação varia de 0 e 1, refletindo a precisão esperada para o modelo construído por meio de homologia; 2) QMEAN – que fornece uma estimativa da qualidade geométrica quanto ao posicionamento e angulação global e individual de cada resíduo de aminoácido, esse parâmetro varia de 0 a - 4, onde quanto mais próximo de 0, melhor seria a concordância entre modelo e estrutura; 3) C-score – é uma estimativa da qualidade dos modelos previstos pelo software I-TASSER. O C-score varia de - 5 a 2 onde um valor alto significa alta confiabilidade no modelo e vice-versa.

Para melhor caracterização de cada resíduo de aminoácido presente na modelagem *in silico*, a estrutura criada pelo software virtual I-TASSER Suite 5.1 foi analisada pelos softwares *Discovery Studio Visualizer*. A análise computacional comparou 10 possíveis estruturas para a sequência de L-asparaginase, onde DOPE-score e *Verify Score* foram utilizados como

parâmetros para análise comparativa entre as estruturas fornecidas pelo software.

Em busca da identificação e avaliação das regiões e resíduos de aminoácidos conservados com importante colaboração para a atividade catalítica foi realizada uma pesquisa por homologia usando a sequência linear da proteína no Uniprot BLAST (<https://www.uniprot.org/blast/> - UniprotKB com banco de dados de estrutura 3D). Os melhores resultados correspondentes foram alinhados usando o Software Jalview. Duas regiões importantes para a atividade catalítica, identificadas como “Região da Dobradiça” (*Hinge Region*) (HR) e “Região do loop flexível do sítio ativo” (*Active Site Flexible Loop*) (ASFL(110)) foram sobrepostas para avaliação da similaridade tridimensional, por cálculo da distância média quadrática mínima (Root-Mean-Square-Deviation), para fins de comparação da proteína predita com as encontradas nos bancos de dados de proteínas cristalizadas.

3.12. CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade bem como o cultivo celular foram realizados em parceria com o Laboratório de Hematologia e Células-Tronco da Universidade de Brasília.

3.12.1. Linhagem e Cultivo Celular

Linfócitos T de leucemia linfoblástica da linhagem Jurkat (ATCC number TIB-152) foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich – R8758) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e adicionado de 1% (v/v) da solução Penicilina-estreptomicina (Sigma Aldrich – P4333). O crescimento celular foi realizado em incubadora de CO₂ (Thermo Fischer) a 37°C, suplementada de 5% CO₂.

3.12.2. Citotoxicidade celular

Para análise da viabilidade celular, células Jurkat foram testadas frente a diferentes concentrações da enzima L-asparaginase pré-purificada em comparação com a enzima padrão L-asparaginase (Sigma Aldrich – A3809). O

ensaio de toxicidade celular foi baseado na metodologia proposta por Yap e colaboradores (2021) com adaptações (111). 5×10^4 células cultivadas em placas de 96 poços durante 24 horas a 37 °C, 5% CO₂, na presença das amostras de L-asparaginase nas concentrações de 0,0005, 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,007 e 0,01 UI/ mL em um volume total de 100 uL. Após esse período foram adicionados 10 µL de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (concentração final de 0,5 mg/mL) e incubadas nas mesmas condições anteriores durante 4 horas. O excesso de sobrenadante foi retirado e os cristais formados foram solubilizados com a adição de 100 µL de DMSO, seguido de leitura em espectrofotômetro DTX 800 Series multimode detector (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a 570 nm (112, 113). O cálculo da viabilidade celular foi determinado segundo a equação 2.

$$Viabilidade\ Celular = \frac{Viabilidade\ celular\ (controle) - Viabilidade\ celular\ (tratamento)}{Viabilidade\ celular\ (controle)} \times 100\%$$

Equação 2.

O ensaio realizado com a adição de MTT tem como objetivo principal analisar a atividade metabólica celular, onde haverá a redução do sal amarelo de tetrazólio e formação de cristais de formazan com coloração roxa, indicando um metabolismo celular ativo. Sendo assim, o método mede a formação de produtos proporcionalmente à quantidade de células viáveis (112, 113).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CLONAGEM E EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE EM *K. phaffii* UTILIZANDO VETORES pPICZαA.

4.1.1 Extração de RNA total

Primeiramente foi necessária a extração do RNA total do fungo *Fusarium proliferatum* em condições de cultivo apropriadas, para posterior obtenção da sequência de DNA codificante da enzima L-asparaginase. O RNA representa uma estrutura muito instável, tornando o processo de extração restrito às

condições especiais se obter RNA de boa qualidade para o sucesso das reações de PCR. Desta forma durante a execução deste trabalho foi obtida a concentração de RNA para o fungo *F. proliferatum* de 1337 ng/mL. Quando analisadas em gel de agarose, as amostras de RNA total apresentaram bandas correspondentes a extração do RNA mensageiro e os demais RNAs de baixo peso molecular.

4.1.2. Síntese de cDNA

As reações de síntese de cDNA foram realizadas com aproximadamente 1 µg de RNA total da amostra do fungo mencionado acima. Na Figura 8, analisando-se os dados obtidos através do perfil eletroforético em gel de agarose, nota-se a formação de uma banda de produtos na região dos genes β -tubulina. Desta forma, observa-se que, para a amostra de RNA o produto gerado pela síntese de cDNA permite a obtenção de “pools” de fragmentos de cDNA de alto peso molecular, onde as sequências esperadas para os genes poderiam ser encontradas.

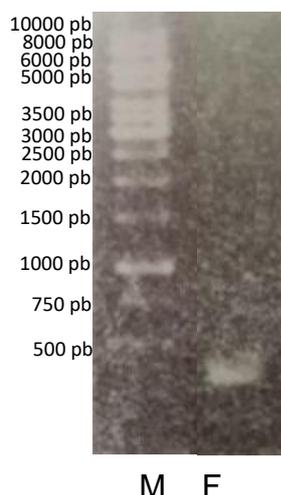


Figura 8: Perfil eletroforético de cDNA em gel de agarose a 1% em TAE 1X. M corresponde ao padrão de DNA “ladder” 1 kb. A amostra F corresponde ao cDNA obtido a partir da amostra de RNA total obtida do fungo *F. proliferatum* (F)

4.1.3. Amplificação do DNA genômico através de reações de PCR

Inicialmente, a otimização da temperatura de anelamento foi realizada com amostras do DNA genômico, para posteriormente, após a escolha da melhor temperatura, realizar a amplificação do gene de L-asparaginase com amostras do cDNA. Com relação à combinação dos *primers* *FusAsn-1* e *FusAsn-2* sintetizados para a amostra do fungo *F. proliferatum*, verificou-se que todas as temperaturas de anelamento testadas (55°C, 58°C, 60°C e 62°C) apresentaram amplificação do gene, obtendo-se fragmentos próximos de 1300 pb. Os fragmentos decorrentes da amplificação pelo par *FusAsn-For1/ FusAsn-Rev1* e *FusAsn-For2/FusAsn-Rev2* podem ser verificados na Figura 9, onde se observa uma banda de aproximadamente 1300 pb, correspondentes à sequência de cDNA de tamanho esperado para estas combinações dos oligonucleotídeos iniciadores (*primer*).

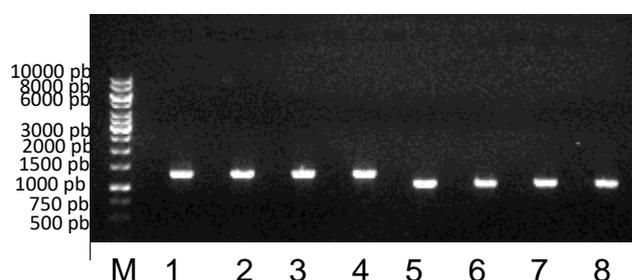


Figura 9: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X para os produtos amplificados utilizando cDNA de *F. proliferatum* como molde, obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores (*primer*). Da esquerda para a direita M refere-se ao DNA "ladder" de 1kb. Observar nas canaletas 1, 2, 3 e 4 bandas correspondente a 1300 pb amplificados com o par de *primer FusAsn-For1/ FusAsn-Rev1*, e nas canaletas 5, 6, 7 e 8 bandas correspondente a 1200 pb amplificados com o par de *primer FusAsn-For2/FusAsn-Rev2*.

A Tabela 5 apresenta a quantificação de DNA dos produtos de PCR purificados das oito amostras realizada no NanoDrop®, bem como os valores da razão A260/A280 nm, mostrando o grau de pureza das amostras de cDNA purificadas.

Tabela 5. Concentração de DNA dos produtos de PCR das amostras do fungo *F. proliferatum*

Amostra	Concentração de DNA (ng/μL)	Razão 260/280
1	334,5	1,72
2	223,5	1,55
3	187,5	1,67
4	381,5	1,73
5	178,0	1,44
6	323,5	1,72
7	342,5	1,71
8	470,5	1,69

4.1.4. Amplificação do cDNA genômico através de reações de PCR

A reação em cadeia da polimerase para amplificação da região codificante da L-asparaginase do fungo *F. proliferatum* teve como o DNA molde o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das células do fungo. A reação foi realizada primeiramente com a enzima Taq DNA polimerase, e após confirmação da amplificação em gel de agarose, outra reação de PCR foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase *High-Fidelity* que permite a polimerização de sequências de DNA de grande extensão com menor possibilidade de erros. Após os ciclos da reação da PCR, os fragmentos gerados foram purificados conforme descrito no próximo item. O produto da

amplificação apresentou pelo resultado da eletroforese um peso molecular de aproximadamente 1300 pb, indicando a amplificação completa do cDNA de interesse, o que está de acordo com a sequência reportada para o cDNA de L-asparaginase do fungo *F. proliferatum* (Figura 10)(114).

Fusarium proliferatum ET1 probable ASP3-1-L-asparaginase II (FPRO_01021), partial mRNA

Sequence ID: [XM_031219959.1](#) Length: 1314 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2427 bits(1314)	O.D	1314/1314(100%)	0/1314(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCCAGCTTTAAACGGCTTACGGCCGCGCCCTTGATTGCTACTGCTCCGGTTTACTGC	60		
Sbjct 1	ATGCCAGCTTTAAACGGCTTACGGCCGCGCCCTTGATTGCTACTGCTCCGGTTTACTGC	60		
Query 61	TCCGSACCAGCTGCTTCGTGACCATCAAGATGACCCCTTCATCGGCTTCTTGGATAACT	120		
Sbjct 61	TCCGSACCAGCTGCTTCGTGACCATCAAGATGACCCCTTCATCGGCTTCTTGGATAACT	120		
Query 121	TACCTGTGGGAATCATCTGAGTGTGTGGCCCTTCAACGGCGCTGCCAGTTTGGT	180		
Sbjct 121	TACCTGTGGGAATCATCTGAGTGTGTGGCCCTTCAACGGCGCTGCCAGTTTGGT	180		
Query 181	TCGTGGGCGCTTCGGTCTTGGTCTCTCTGTTTACGAGCTGTATCTTCAACCACACTTC	240		
Sbjct 181	TCGTGGGCGCTTCGGTCTTGGTCTCTCTGTTTACGAGCTGTATCTTCAACCACACTTC	240		
Query 241	TCCGCACATGCAAAAAGGCGCCAAATACAGACAGGCATTCCTTTGAAATCTCAACTACCCCT	300		
Sbjct 241	TCCGCACATGCAAAAAGGCGCCAAATACAGACAGGCATTCCTTTGAAATCTCAACTACCCCT	300		
Query 301	GAGTTCAACTGCTTCAGTCCGAACCTTCCAAATATCACCATCTATGCGACAGGGGGCACC	360		
Sbjct 301	GAGTTCAACTGCTTCAGTCCGAACCTTCCAAATATCACCATCTATGCGACAGGGGGCACC	360		
Query 361	ATTGCTGGATCTGCTAGTTCGGCTGACCAAACGACGGGATATCAATCAGCTGCGCTGAGT	420		
Sbjct 361	ATTGCTGGATCTGCTAGTTCGGCTGACCAAACGACGGGATATCAATCAGCTGCGCTGAGT	420		
Query 421	GTCCAAATCCCTCATTGATGCGGTGCCACAGCTTTGCAATGTTGCCAAGCTGAGAGGCGTT	480		
Sbjct 421	GTCCAAATCCCTCATTGATGCGGTGCCACAGCTTTGCAATGTTGCCAAGCTGAGAGGCGTT	480		
Query 481	CAATTCGCCAACACAGACAGTATAGACATGAGTTCAGACATGTTACAGGCGTGGTGGAG	540		
Sbjct 481	CAATTCGCCAACACAGACAGTATAGACATGAGTTCAGACATGTTACAGGCGTGGTGGAG	540		
Query 541	CAAAATCCAGGCCGATCTCGACAAATCCATCTACACAGGGCGCTGTTGTGACGACGGAAC	600		
Sbjct 541	CAAAATCCAGGCCGATCTCGACAAATCCATCTACACAGGGCGCTGTTGTGACGACGGAAC	600		
Query 601	GACACTCTGGATGAGTCGGCTTCTTCTCTGATCTCACGATCCAGAGCGATAAGCCCGTG	660		
Sbjct 601	GACACTCTGGATGAGTCGGCTTCTTCTCTGATCTCACGATCCAGAGCGATAAGCCCGTG	660		
Query 661	GTTGTGACGGGTTCATGCGTCCGCAACGGCTATAAGCGCTGATGGACCCATGAATTTG	720		
Sbjct 661	GTTGTGACGGGTTCATGCGTCCGCAACGGCTATAAGCGCTGATGGACCCATGAATTTG	720		
Query 721	CTGTCTTCAGTGACTTTGGCTGCTAATGAGAACGCCAGAGGCAAGGGAGTCAATGATTGCC	780		
Sbjct 721	CTGTCTTCAGTGACTTTGGCTGCTAATGAGAACGCCAGAGGCAAGGGAGTCAATGATTGCC	780		
Query 781	ATTAACGACCGCATCGGATCTGCTCGCTTACGACAAAGGTGAACGCCAACACCCTTGAC	840		
Sbjct 781	ATTAACGACCGCATCGGATCTGCTCGCTTACGACAAAGGTGAACGCCAACACCCTTGAC	840		
Query 841	GCTTTTCAAGCTCCTGATAGCGGCTTATTGGGAACATTTGTCAATATCCAGCCAGTCTTC	900		
Sbjct 841	GCTTTTCAAGCTCCTGATAGCGGCTTATTGGGAACATTTGTCAATATCCAGCCAGTCTTC	900		
Query 901	TTTTAECGGCCATCACGGCCCTTGGGCACACCAATTTCAAATACCGCCCGACCTCCA	960		
Sbjct 901	TTTTAECGGCCATCACGGCCCTTGGGCACACCAATTTCAAATACCGCCCGACCTCCA	960		
Query 961	TCAGCAGCAGCACTGCCCAAGTGGACATACTTACGCTTACCAGGAGCTCAGTGTGGC	1020		
Sbjct 961	TCAGCAGCAGCACTGCCCAAGTGGACATACTTACGCTTACCAGGAGCTCAGTGTGGC	1020		
Query 1021	ATGTTCAAGGCGGCTGTGATCTTGGCGCACGAGGCATCGTCTCGCAGGCCTTGGTGT	1080		
Sbjct 1021	ATGTTCAAGGCGGCTGTGATCTTGGCGCACGAGGCATCGTCTCGCAGGCCTTGGTGT	1080		
Query 1081	GGATTCTGGACTTCCAAAGGGCACGAGGAGATCCGACGCATAGTCCGGAGACCAAGATC	1140		
Sbjct 1081	GGATTCTGGACTTCCAAAGGGCACGAGGAGATCCGACGCATAGTCCGGAGACCAAGATC	1140		

Figura 10: Alinhamento da sequência do cDNA amplificado com sequência sugestiva de L-asparaginase de *F. proliferatum* disponível na base de dados Blast NCBI.

4.1.5. Purificação dos produtos de PCR, sequenciamento direto e clonagem dos Produtos amplificados

Em vista do fato de que as reações de amplificação das amostras do fungo *F. proliferatum* serem específicas de modo a serem observadas bandas únicas nos géis, os amplicons obtidos foram purificados diretamente das reações de PCR. O resultado pode ser verificado na Figura 11.

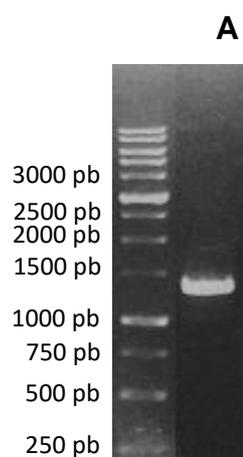


Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x para os fragmentos decorrentes da purificação direta das reações de PCR realizadas com os pares de oligonucleotídeos iniciadores FusAsn-For1/ FusAsn-Rev1. (A) banda correspondente a 1300 pb.

Os fragmentos resultantes da purificação foram então diretamente sequenciados para uma confirmação prévia de que eles eram correspondentes à sequência gênica de interesse, neste caso, codificante para L-asparaginase. O sequenciamento foi realizado pela empresa Eurofins Scientific, utilizando-se os mesmos *primers* (*FusAsn-For1/ FusAsn-Rev1*). A sequência de L-asparaginase amplificada obtida está apresentada abaixo (Figura 12).

ATGCCAGCTTTAAACGGCTTCACGGCCGGCCTTGATTGCTACTGCTCCGGTTTACTGCTCCGGACCAG
 CTGCTTCGTCGACCATCAAGATGACCCCTTCATCGGCTTCTTGGATAACTTACCTGTGGCGAATCATCCT
 GAGTGTGTTGGCCCTTCAACGGCGCTGCTCCAGTTTGGTTCGTGGGCGGCTTCGGTCTTGGGTCTCCT
 GTTCACGAGCTGTATCTTCAACCACACTTCTCCGCACTGCAAAAGGCGCCAATACAGACAGGCATTCCCT
 TTGAAATCTCAACTACCCCTGAGTTCAACTGCTTCAGTCCGAACCTTCCAAATATCACCATCTATGCGAC
 AGGGGGCACCATTGCTGGATCTGCTAGTTCGGCTGACCAAACGACGGGATATCAATCAGCTGCGCTGAGT
 GTCCAATCCCTCATTGATGCGGTGCCACAGCTTTGCAATGTTGCCAACGTGAGAGGCCTTCAATTCGCCA
 ACACAGACAGTATAGACATGAGTTCAGACATGTTACAGGGCTTGGTGGAGCAAATCCAGGCCGATCTCGA
 CAATCCATCTACACAGGGCGCTGTTGTGACGCACGGAAGTGAACCTCTGGATGAGTCCGGCTTCTCTCTC
 GATCTCACGATCCAGAGCGATAAGCCCCTGGTGTGACGGGTCTTATGCGTCTGCAACGGCTATAAGCG
 CTGATGGACCCATGAATTTGCTGTCTTCACTGACTTTGGCTGCTAATGAGAACGCCAGAGGCAGGGGAGT
 CATGATTGCCATTAACGACCGCATCGGATCTGCTCGCTTCCAGACAAAGGTGAACGCCAACCCACTTAC
 GCTTTTCAAGCTCCTGATAGCGGCTTATTTGGGAACATTTGTCAATATCCAGCCAGTCTTCTTTTACCCGC
 CATCACGGCCCTTGGCCACCAACCATTCAAAATTACCGCCCCGACCTCCATCAGCAGCAGCACTGCCTCA
 AGTGGACATACTCTACGCTTACAGGAGCTCAGTGTGGCATGTTCAAGGCGGCTGTGATCTTGGCGCA
 CGAGGCATCGTCTCAGAGGCCTTGGTGTGATTTCTGGACTTCCAAGGGCACTGAGGAGATCCGACGCA
 TAGTCCGGGAGACCAAGATCCCGTGTAGTGTAGCGCGGACAGAAAGCGGTTTCGTGGGACCCCTGCCA
 GGCAGGAATCGGAGCTGTTTCTCAACCCCCAAAAAGCGAGGATCCAGCTCCAACTCGCGCTTGAGACC

Figura 12: Sequência da enzima L-asparaginase do fungo *F. proliferatum*, amplificada com a utilização do conjunto de primers FusAsn-For1/ FusAsn-Rev1.

Através da base de dados do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foi realizada a tradução "Six Frame" (Figura 13) da sequência obtida, onde conseguiu-se verificar a identidade de sequências com as demais asparaginases já depositadas no GenBank®. Conforme demonstrado abaixo, o fragmento proteico encontrado apresentou 437 aminoácidos e peso molecular de 38532,69 Daltons.

MPSFKRLHGRALIATAPVYCSGPAASSTIKMTPSSASWITYLWRIILSVLAPSTALLQFGSWAA
 SVLGPPVHELYLQPHFSALQKAPIQTGIPFEISTTPEFNCFSENLNPNTIYATGGTIAGSASSA
 DQTTGYQSAALSVQSLIDAVPQLCNVANVRGVQFANTDSIDMSSDMLQALVEQIQADLDNPSTQ
 GAVVTHGTDLDES AFFLDLTIQSDKPVVVTGSMRPATAISADGPMNLLSSVTLAANENARGRG
 VMIAINDRIGSARFTTKVNNANHLDAFQAPDSGLLGTFVNIQPVFFYPSPRPLGHHHFKLPPRPP
 SAAALPQVDILYAYQELSVGMFKAAVDLGARGIVLAGLGAGFWTSKGTTEEIRRIVRETKIPVIV
 SRRPEGGFVGPQAGIGAGFLNPQKARIQLQLALETKMDNDAIRALFEHAGVH

Figura 12: Tradução "six frame" da enzima L-asparaginase obtida através da amplificação de fragmento de cDNA do fungo *F. proliferatum*.

4.2. CONSTRUÇÃO DOS VETORES

Para a expressão do cDNA da L-asparaginase na levedura *P. pastoris* foi utilizado o vetor de expressão pPICZ α A (Figura 14). O sítio de restrição *XhoI* foi utilizado na construção dos vetores conforme apresentado na Figura 15. A construção do vetor foi realizada pela empresa *GenOne Biotechnologies*. A expressão heteróloga do cDNA de L-asparaginase, a secreção da proteína de interesse em *P. pastoris* e a caracterização do produto recombinante foram analisados posteriormente.

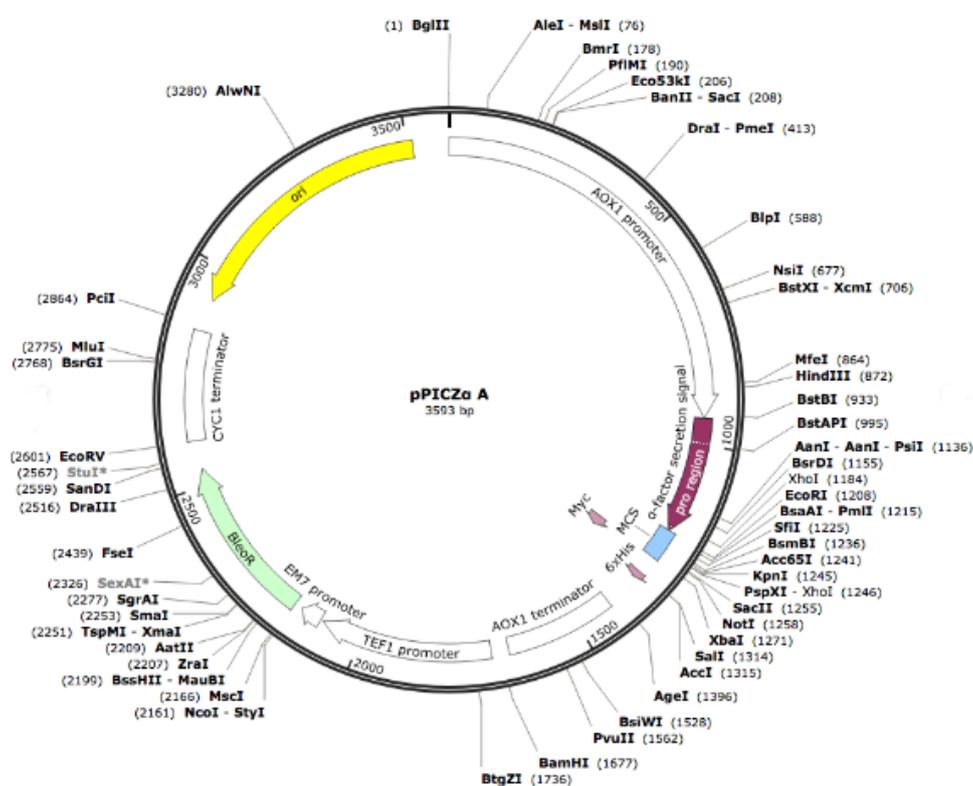


Figura 13: Vetor pPICZ α A utilizado para clonagem do cDNA da L-asparaginase e sua expressão em *P. pastoris*.

```

CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGCCAGCTTTAAACGGCTTCACGGCCGCGCCTTGATTGCTACTGCTCCGGTTTACTGCTCCG
GACCAGCTGCTTCGTGACCATCAAGATGACCCCTTCATCGGCTTCTTGGATAACTTACCTGTGGCGAATCATCCTGAGTGTGTGGC
CCCTTCAACGGCGCTGCTCCAGTTTGGTTTCGTGGGCGGCTTCGGTCTTGGGTCTCCTGTTACAGAGCTGTATCTTCAACCACACTTC
TCCGCACTGCAAAAGGCGCCAATACAGACAGGCATTCCCTTTGAAATCTCAACTACCCCTGAGTTCAACTGCTTCAGTCCGAACCTTC
CAAATATCACCATCTATGCGACAGGGGGCAACCATTGCTGGATCTGCTAGTTTCGGCTGACCAAACGACGGGATATCAATCAGCTGCGCT
GAGTGTCCAATCCCTCATTGATGCGGTGCCACAGCTTTGCAATGTGCCAACGTGAGAGGCGTTCAATTGCGCAACACAGACAGTATA
GACATGAGTTCAGACATGTTACAGGCGTTGGTGGAGCAAATCCAGGCCGATCTCGACAATCCATCTACACAGGGCGCTGTTGTGACGC
ACGGAACTGACACTCTGGATGAGTGGCTTTCTTCTCGATCTCAGATCCAGAGCGATAAGCCCGTGGTTGTGACGGGTTCTATGCG
TCCTGCAACGGCTATAAGCGCTGATGGACCCATGAATTTGCTGTCTTCAGTACTTTGGCTGCTAATGAGAACGCCAGAGGCAGGGGA
GTCATGATTGCCATTAAACGACCGCATCGGATCTGCTCGCTTACGACAAAGGTGAACGCCAACCCCTTGACGCTTTTCAAGCTCCTG
ATAGCGGCTTATTGGGAACATTTGTCAATATCCAGCCAGTCTTCTTTTACCCGCCATCACGGCCCTGGGCCACCACATTTCAAATT
ACCGCCCCGACCTCCATCAGCAGCAGCACTGCCTCAAGTGGACATACTCTACGCTTACCAGGAGCTCAGTGTGGCATGTTCAAGGCG
GCTGTTGATCTTGGCGCACGAGGCATCGTCCTCGCAGGCCTTGGTGTGGATTCTGGACTTCCAAGGGCACTGAGGAGATCCGACGCA
TAGTCCGGGAGACCAAGATCCCGTGATAGTGAGCCGCCGACCAGAAGGCGGTTTCGTGGGACCCTGCCAGGCAGGAATCGGAGCTGG
TTTCTTCAACCCCAAAAAGCGAGGATCCAGCTCCAACCTCGCGCTTGAGACCAGATGGACAACGACGCCATCCGAGCTCTTTTGG
CACGGGGAGTGCACTAACTCGAG

```

Figura 14: Esquemas demonstrativos das sequências de nucleotídeos para construção no vetor pPICZαA com o sítio de restrição XhoI.

4.3. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Após a construção do vetor pPICZαA a transformação de *E. coli* Top 10 foi realizada e a subclonagem no vetor de expressão foi confirmada por análises de restrição enzimática com a enzima *XhoI*. Uma maneira de se confirmar a inserção do gene ao vetor é a utilização de enzima de restrição *XhoI*, que digere o vetor em locais específicos que geram tamanhos diferentes entre o vetor vazio e o vetor recombinante. Como observado na Figura 16, nos 5 clones o vetor que contém o inserto produziu bandas de tamanhos maiores do que o vetor vazio, isto se deve ao fato de que ele apresenta o gene inserido.

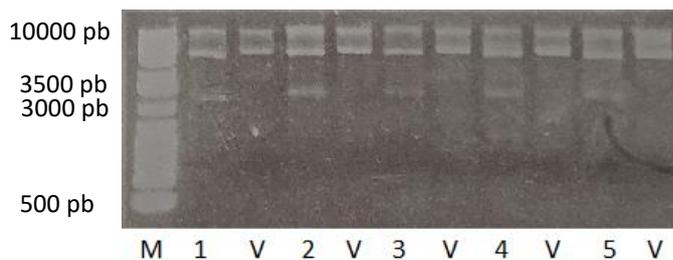


Figura 15: Confirmação do tamanho correto do vetor recombinante. 1- 5 Vetor recombinante, V- Vetor vazio, M- Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder® (Invitrogen).

4.4. PREPARO DO PLASMÍDEO PARA TRANSFORMAR A LEVEDURA

Para obter maior concentração do plasmídeo pPICZαA recombinante, este foi purificado através *Plasmid Plus Midi Kit*® (Qiagen). Precisou-se de no mínimo 10 µg de plasmídeo para ser realizada uma efetiva transformação da levedura *Pichia pastoris*, dessa forma, o plasmídeo foi linearizado com a enzima *BstXI*. A Figura 16 apresenta a confirmação do gene de L-asparaginase no vetor recombinante, uma vez que o plasmídeo vazio (controle negativo) também foi digerido com a mesma enzima de restrição e pode-se observar a presença de uma banda de tamanho inferior.



Figura 16: Digestão e purificação do gene e do vetor. M – Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder® (Invitrogen), 1 – Vetor pPICZαA antes da digestão e 2 – Vetor pPICZαA após digestão e purificação.

4.5. CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO VETOR AO GENOMA DA LEVEDURA

Foi realizado uma PCR com os iniciadores AOX 5' e 3' para confirmar a presença do gene de asparaginase no DNA genômico da *P. pastoris*. Das 30 colônias de leveduras selecionadas, 18 foram testadas positivamente quanto à presença do gene. A figura 17 demonstra os resultados da reação de cadeia de polimerase que foram interpretados como determinado pelo manual *Pichia Expression Kit® (Invitrogen)*, o qual nos permite esclarecer, através do gel de agarose, qual dos clones possui a integração correta do plasmídeo.

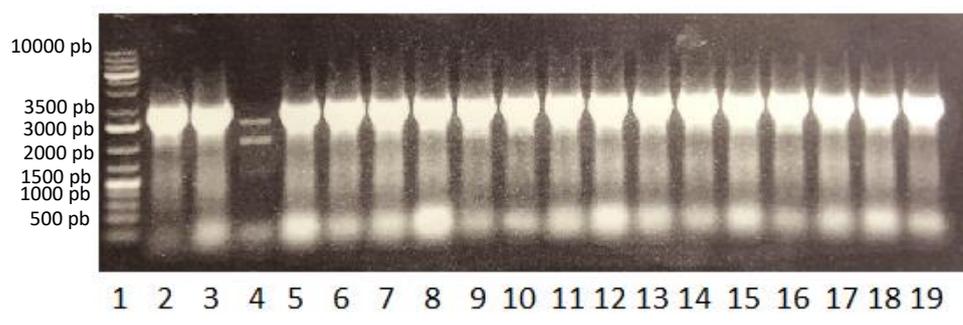


Figura 17: Produto da PCR com os *primers* AOX 3' e 5' (FusAsn-For1/ FusAsn-Rev1) de ASP1 em pPICZαA.

4.6. TRIAGEM DOS CLONES PARA A EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE

Vinte e um clones foram testados em relação à atividade de L-asparaginase. A maior atividade encontrada em suspensão celular foi expressa no clone 9 (2,84 UI/g), seguida pelas atividades nos clones, 12, 4.1, 13, 8 e 4. Os cinco melhores clones com exceção do clone de número 13 foram selecionados para a prospecção da curva de crescimento. Faz-se necessário uma boa relação biomassa/atividade enzimática, visto que a enzima encontra-se em meio intracelular, sendo assim, quanto mais elevada a quantidade de biomassa é provável que a quantidade de enzima produzida também esteja

elevada. As atividades enzimáticas para os clones testados encontram-se na tabela abaixo (Tabela 6.)

Tabela 7: Atividades de L-asparaginase avaliadas nas biomassas dos clones produzidos em comparação a atividade da cepa selvagem X-33.

Amostras	Atividade L-asparaginase (UI/g)	Biomassa g/L
1	1,388	82,917
2	1,471	55,278
4	1,785	87,579
5	1,405	88,578
6	0,919	85,581
7	1,305	77,256
8	1,840	85,914
9	2,849	86,247
10	1,951	86,58
11	1,782	90,243
12	2,546	87,579
13	1,907	84,582
14	0,719	66,267
15	0,540	57,276
16	0,701	64,602
17	0,689	59,94
18	0,536	65,268
2.1	0,777	90,576
4.1	2,269	88,245
5.1	0,747	86,58
6.1	0,735	82,584
X33	0,164	62,271

Este trabalho é o segundo relato na literatura de L-asparaginase recombinante em *Pichia pastoris* no qual o gene de origem pertence a um fungo filamentosos.

Lima e colaboradores (2019) clonaram e purificaram uma L-asparaginase de *E. coli* em *P. pastoris* obtendo uma atividade de 2,98 U/mg após 48 horas de cultivo. A enzima foi extraída com a utilização de tampão de lise sob banho de gelo (115). Do mesmo modo, ANSase extracelular recombinante em *P. pastoris* foi purificada expressando um atividade de cerca de 2,81 UI/mL em um trabalho expresso por Sajitha e colaboradores (2015) (116).

Ferrara e colaboradores (2006) obtiveram sucesso na expressão de L-asparaginase utilizando linhagem GS115 de *P. pastoris* a partir do gene de *S. cerevisiae* YAE3R-D12, após cerca de 30 horas de cultivo observou-se uma atividade de 562 UI/g adicionando 5 mL/L de metanol a 30 °C sob 250 rpm(117).

Freitas e colaboradores (2022) expressaram uma ASNase de *Penicillium* sp. em um sistema de expressão de *Pichia pastoris*, este trabalho foi o primeiro a apresentar a expressão de uma enzima de fungo filamentoso em um sistema de expressão de levedura. Os resultados apresentados na clonagem da sequência de *F. proliferatum* são semelhantes aos demonstrados no trabalho anterior (118). Vale ressaltar que apesar da sequência do peptídeo sinal de *Saccharomyces* ter sido usada para produzir a enzima extracelular, ambos os estudos demonstraram produção intracelular, enfatizando a função enzimática já descrita na literatura e que pequenas modificações nas sequências para expressão extracelular são importantes na atividade enzimática (119).

4.7. CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento demonstrou um aumento na atividade nos clones 4, 4.1 e 8 em um intervalo de 24 horas de cultivo e o decaimento após 48 horas de cultivo (Figura 18). Nessa curva os clones 9 e 12 apresentaram menor atividade do que demonstrado na triagem. Os clones 4.1 e 8 foram selecionados para testes de rompimento celular por meio de sonicação.

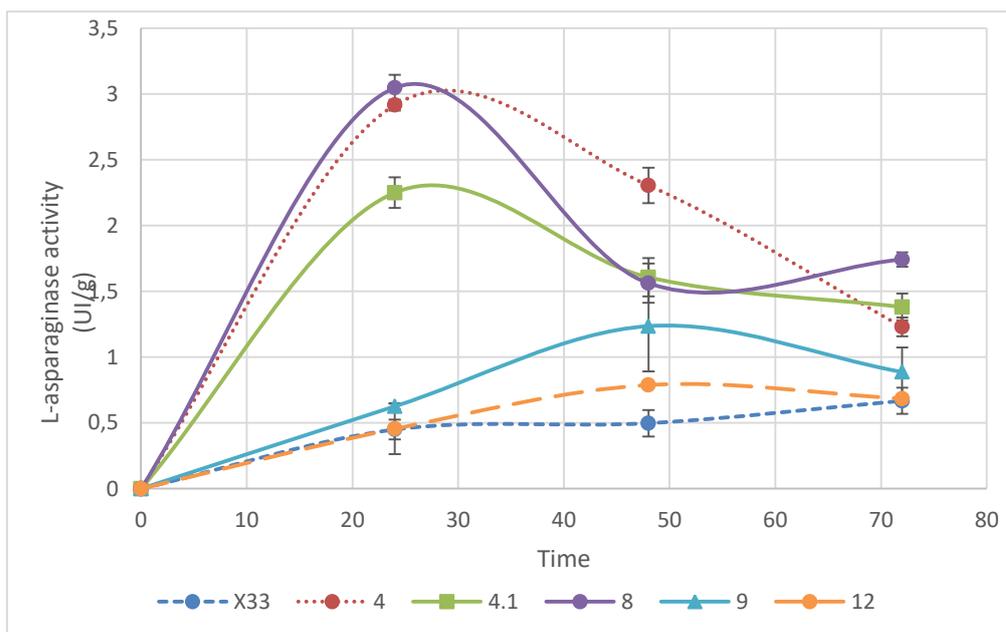


Figura 18: Curva de crescimento para os clones 4, 4.1, 8, 9 e 12.

Em uma revisão sistemática a respeito da produção de L-asparaginase publicada por Souza e colaboradores (2017), demonstrou-se que o tempo necessário para o cultivo do fungo em fermentação submersa foi, em média, 4 dias (41). A partir dos dados obtidos na curva de crescimento acima, pode-se observar que foram necessárias 24 horas para a produção máxima de L-asparaginase de *F. proliferatum* em *P. pastoris*. No trabalho publicado por Freitas e colaboradores (2021) foi possível avaliar a atividade enzimática de ASNase de *F. proliferatum* em um total de 192 horas, incluindo o tempo de crescimento do pré-inóculo até a filtração do micélio para determinação dos ensaios (103). O crescimento microbiano de leveduras *P. pastoris* para a produção de L-asparaginase no presente trabalho necessitou de 48 horas em todo o processo produtivo, reduzindo em cerca de 4 vezes o tempo para obtenção da enzima de interesse.

4.8. EXTRAÇÃO DA ENZIMA INTRACELULAR

O presente trabalho contou com a inserção do vetor pPICZ α A. Com a utilização desse vetor, existia a expectativa da produção extracelular da enzima de interesse, visto que o fator α de *S. cerevisiae* influencia na migração da proteína para o meio extracelular, o que como demonstrado nos resultados acima não ocorreu, pois o sinal de ancoramento à membrana nativo não foi retirado de sequência codificadora. Deste modo, buscou-se uma alternativa para extração da enzima intracelular. O processamento do peptídeo sinal de *S. cerevisiae* envolve uma série de etapas e pode ser influenciado por diversos aminoácidos e pela estrutura tridimensional da enzima. Sabe-se que a L-asparaginase II do estudo é uma proteína periplasmática e é possível que existam domínios que interajam com a parede celular da levedura *P. pastoris* impedindo a segregação da enzima mesmo na presença do fator α de *S. cerevisiae* (47, 101).

Os clones 4 e 8 foram selecionados para a extração por sonicator ultrassônico. Após o processo extrativo e a quantificação enzimática, observou-se uma atividade de cerca de 8 vezes maior para o clone 4 e 6 vezes maior quando comparados os resultados obtidos para o clone 8. Os resultados do processo de extração estão comparados à atividade inicial analisada na biomassa dos respectivos clones, e estão demonstrados na figura 19.

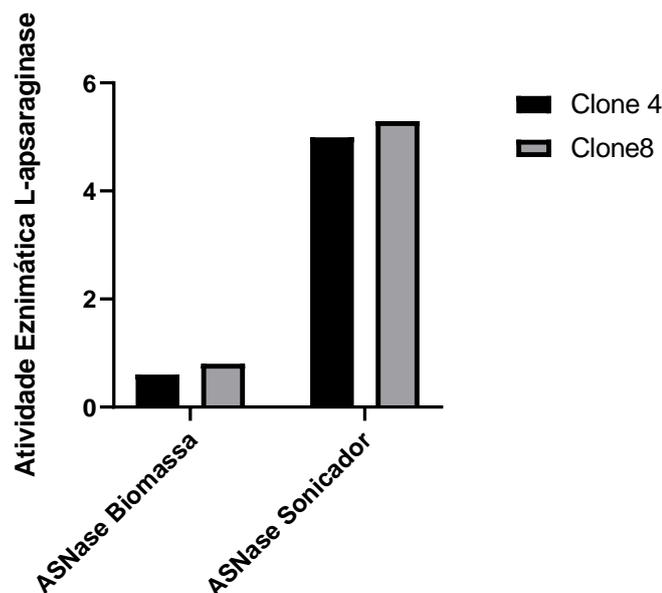


Figura 19: Comparação da Atividade enzimática de L-asparaginase (ASNase) quantificada na Biomassa (UI/g) com o processo de rompimento celular por Sonicador de ponteira (UI/mL).

Como analisado por Lida e colaboradores (2008), a concentração de células pode interferir diretamente no processo de rompimento por ultrassom (107). Sendo assim, outras concentrações das suspensões de *P. pastoris* necessitariam ser testadas para melhores análises das condições de extração da L-asparaginase.

Em comparação com os resultados presentes neste trabalho para os clones 4 e 8, a atividade encontrada próxima de 6 UI/mL após a extração mostra-se superior à atividade encontrada por Sajitha e colaboradores (2015) (2,8 UI/mL) para uma L-asparaginase extracelular (120).

Quando comparado aos outros métodos de extração, sabe-se que o uso de sonicador para rompimento celular é menos indicado visando um possível escalonamento no processo, no entanto, alguns estudos mostram uma maior eficácia de rompimento celular quando comparado aos outros métodos, como métodos físicos e físico-químicos (121).

4.9. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Após o processo de purificação por cromatografia de troca iônica, foi possível a obtenção da enzima parcialmente purificada. A identificação foi concretizada através do ensaio de quantificação do produto da reação β – hidroxamato aspártico, o qual foi realizado em todas as frações que apresentaram picos de absorbância. A ASNase parcialmente purificada foi identificada nas frações 6, 7 e 8 do primeiro pico proteico, conforme apresentado na Figura 20.

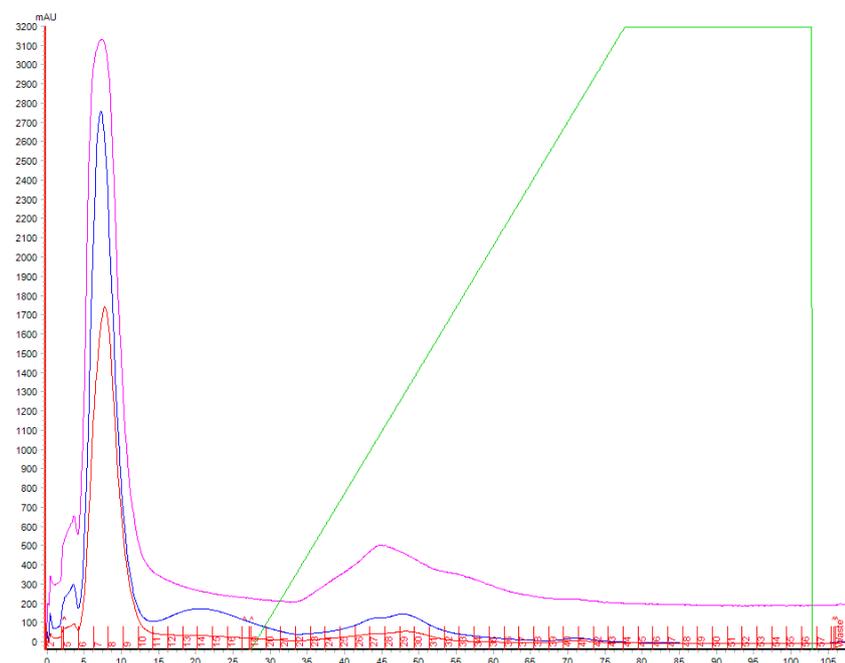


Figura 20: Perfil cromatográfico do extrato bruto da produção de L-asparaginase em coluna de troca iônica DEAF FF com tampão Tris-HCl 50 mM e fluxo de 0,5 mL/min. As linhas rosa, vermelha e azul representam a leitura em 214, 254 e 280 nm, respectivamente

Para análise dos processos na etapa de purificação foi realizado um gel de eletroforese em poliacrilamida comparando as etapas de purificação (Figura 22.)

A análise do gel de eletroforese demonstrou duas bandas de maior intensidade. Sabe-se que a ASNase recombinante apresentada neste trabalho

possui um monômero de cerca de 44 kDa, o que foi observado com maior evidência na fração 8 (Figura 21).

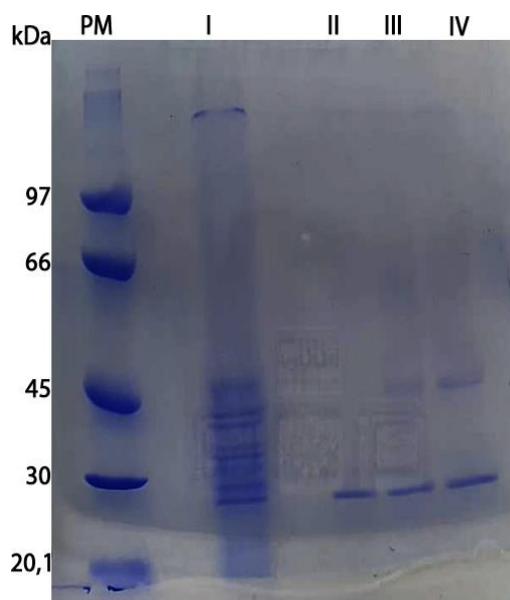


Figura 21: SDS-PAGE de purificação de L-asparaginase da coluna DEAE. PM – marcador de peso molecular (Calibration Kit Low Molecular Weight For Electrophoresis® - Cytivia 17-0446-01); I – extrato bruto; II – Fração 6; III – Fração 7; IV – Fração 8.

É válido ressaltar que a ASNase heteróloga produzida em *P. pastoris* foi parcialmente purificada com um único método cromatográfico. A diminuição do número de etapas de *downstream* bem como o rápido cultivo e bom rendimento nos processos de *upstream*, diminuem o custo de produção da enzima e podem auxiliar em novas tecnologias para obtenção e melhoramento de novos produtos (64).

O emprego de uma única etapa cromatográfica foi necessário visto o baixo rendimento no final do processo. A produção intracelular resultou na necessidade da exploração de um método de extração por sonicação, somado, simultaneamente, à diluição proveniente da cromatografia, e ao processo de liofilização, foi possível obter um rendimento de 2,95% e um fator de purificação (Pf) de 1,18 (Tabela 7).

Tabela 7: Etapas de purificação da L-asparaginase de *F. proliferatum* produzida em *P. pastoris*

Purificação	Volume (mL)	Atividade Total (UI/mL)	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (UI/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	25	2,3	2,2	1,04	1,00	100
DEAE FF	25	0,09	0,29	0,31	0,29	7,25
Enzima Concentrada (10x)	2,5	1,16	0,94	1,23	1,18	2,95

Em um estudo publicado por Kleingesinds e colaboradores (2023), foi possível obter um rendimento de aproximadamente 55% e um Pf de 70,9 após 4 etapas do processo de purificação, resultando em uma enzima extracelular com alto grau de pureza (122). Sabe-se que enzimas produzidas extracelularmente geram uma maior possibilidade de obtenção de altos rendimentos. No atual trabalho, a ASNase recombinante de *F. proliferatum* permaneceu intracelular, o que alterou as decisões por diferentes etapas de separação e purificação e de modo a diminuir, substancialmente, o rendimento e o Pf.

Arumugam e Thangavelu (2022) demonstraram a produção e purificação de uma ASNase intracelular de *Chaetomium* sp onde os resultados do fator de purificação (Pf = 2,45), utilizando duas etapas para purificação da enzima, foram semelhantes aos apresentados por este trabalho (62).

4.10. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

4.10.1 Temperatura ótima

O efeito da temperatura na taxa de conversão substrato-produto foi analisado incubando a enzima em diferentes condições. O pH 8,0 foi utilizado no ensaio por demonstrar maior resposta diante da atividade enzimática. A ANSase parcialmente purificada apresentou temperatura ótima em 40 °C (Figura 22), e pôde-se observar uma atividade enzimática em torno de 1,25

UI/mL sendo cerca de 20% maior quando comparada a atividade normal à 37 °C. Diversos estudos apontam a produção de ASNase com temperatura ótima próxima dos 40 °C, o que é essencial para o seu uso terapêutico (40, 62, 123, 124).

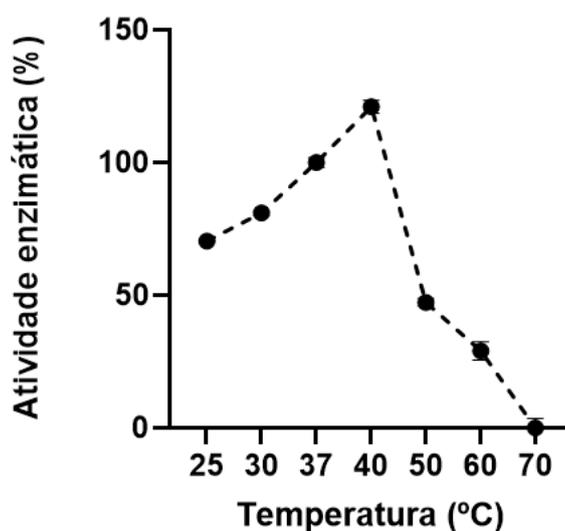


Figura 22: Efeito da temperatura na atividade de L-asparaginase recombinante de *F. Proliferatum* parcialmente purificada.

4.10.2. Influência do pH na atividade enzimática

A ASNase parcialmente purificada foi submetida à avaliação da atividade enzimática frente a diferentes valores de pH. Conforme demonstrado na figura 23, houve diferença significativa entre os valores testados. O maior potencial de catálise enzimático foi encontrado no pH 8,0. A enzima se mostrou estável quando testada em valores de pH mais elevados. Pode-se observar uma diminuição de cerca de 25 % na atividade relativa em pH 5,0 com aumento progressivo até atingir a atividade máxima.

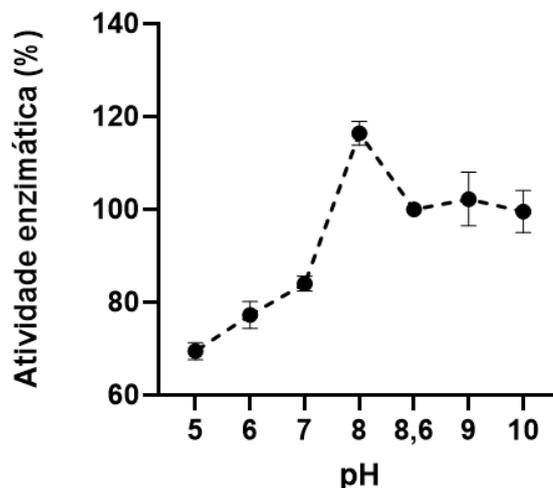


Figura 23: Efeito do pH na atividade de L-asparaginase parcialmente purificada.

4.10.3. Km e Vmáx

Os resultados dos parâmetros cinéticos foram avaliados sob as condições de 37 °C e pH 8,0. Utilizando os dados traçados pela equação da reta do gráfico ($y = 3,2585x + 0,1868$) de Lineweaver-Burk (Figura 24). O coeficiente de correlação para o gráfico duplo recíproco foi de 0,92, o que não indicia uma boa relação entre os dados, necessitando de maiores variações de substrato ao longo da curva apresentada. Contudo, a partir dos dados obtidos a constante de Michaelis-Menten foi calculada em 17,44 mM e a Vmáx em $5,35 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$. A literatura apresenta uma diferença de valores de kM bem ampla em relação ao substrato L-asparagina. Segundo o que é relatado para ASNase produzida por fungos os valores das constantes de Michaelis-Menten podem variar de 0,3 até 100 mM (39, 41, 63, 123, 125).

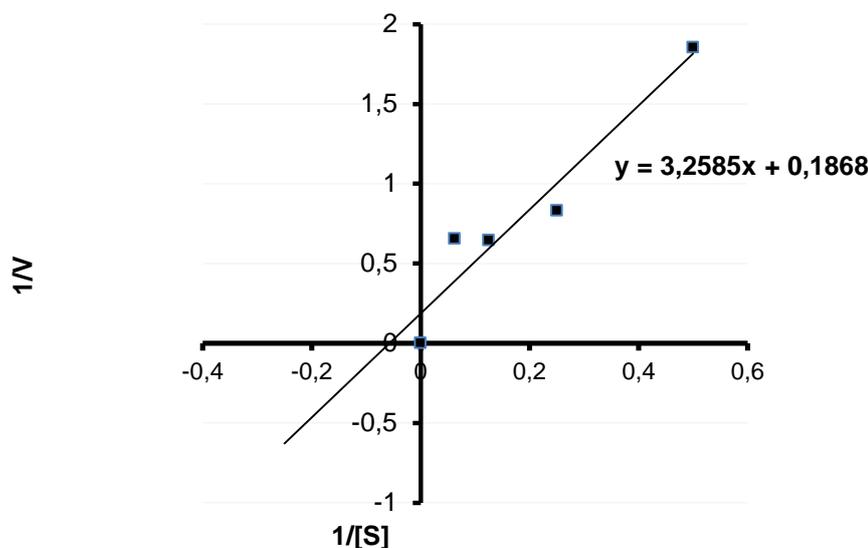


Figura 24: Gráfico de duplo recíproco para a hidrólise de L-asparagina pela enzima recombinante L-asparaginase de *F. proliferatum* produzida em sistema de produção heterólogo de *P. pastoris*

Em estudos recentes, pode-se observar uma diversidade de resultados e relação às características cinética da enzima ANSase. Mukherjee e Bera demonstraram a produção e L-asparaginase proveniente de *Brevibacillus borstelensis* com atividade ótima levemente em pH alcalino, e K_m e $V_{m\acute{a}x}$ calculado em 0,253 mM e $204.081 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente (126). Elsaba e colaboradores demonstraram a produção de L-asparaginase em *Trichoderma asperellum* com K_m calculado de 0,35 mM (127). Os valores de da Constante de Michalis- Mentem para L-asparaginase em função do substrato L-asaparagina tem grande variação como demonstrado em diversos estudos (98, 100).

No presente trabalho, os valores de K_m foram maiores do que encontrados na literatura, o que indica uma menor afinidade de enzima pelo substrato, no entanto, os ensaios de citotoxicidade demonstraram alta eficácia na eliminação de células neoplásicas o que aponta uma enzima de grande potencial terapêutico, no entanto, mais estudos necessitam ser realizados para garantir a segurança e eficácia do medicamento

4.11. MODELAGEM ESTRUTURAL DA PROTEÍNA L-ASPARAGINASE

A estrutura de L-asparaginase para a sequência de aminoácidos do fungo *F. proliferatum* definida por homologia pelo servidor SWISSMODEL - expasy (Figura 25) foi calculada a partir do *template da* L-asparaginase (E63Q) produzidas por *Erwinia chrysanthemi* contendo ácido aspártico no sítio catalítico (PDB 5I3z.1.A). O GMQE para a estrutura foi calculado em 0,61 e o QMEAN em -1,22. Inicialmente, a sequência foi identificada como formadora de um tetrâmero e com um alinhamento de 45,82% (Figura 26) com *template*. As regiões azuis apresentadas nas figuras 25 e 26 demonstram resíduos de aminoácidos que estão bem posicionados dentro da conformação estrutural da proteína em relação ao modelo proposto. As regiões em laranja apresentam tendências de ligações ruins (*bad-bonds*), e choques de átomos dentro da estrutura.

O princípio de Ramachandran ou diagrama de Ramachandran representa todas as possíveis combinações de ângulos nos aminoácidos em uma proteína, facilitando a determinação da estrutura secundária em certas sequências. Para cada ligação entre resíduos de aminoácidos presente em uma proteína pode-se avaliar dois ângulos de torção no carbono α : Ψ (psi) versus os ϕ (phi).

Através do diagrama de Ramachandran pode-se observar o grau de confiabilidade nos cálculos realizados comparando modelo e alvo. A L-asparaginase fúngica quando comparada ao modelo proposto, apresentou um percentual de 93,85 % de ajuste ao diagrama. Para esse tipo de predição, são aceitos níveis de confiabilidade no ajuste de pelo menos 98% (128, 129).



Figura 25: Predição por homologia da estrutura quaternária da L-asparaginase de *F. proliferatum*.

Model-Template Alignment	
Model_01:A	MPSFKRLHGRALIATAPVYCSGPAASSTIKMTPSSASWITYLWRIILSVLAPSTALLQFGSWAASVLGPP 70
Model_01:B	MPSFKRLHGRALIATAPVYCSGPAASSTIKMTPSSASWITYLWRIILSVLAPSTALLQFGSWAASVLGPP 70
Model_01:C	MPSFKRLHGRALIATAPVYCSGPAASSTIKMTPSSASWITYLWRIILSVLAPSTALLQFGSWAASVLGPP 70
Model_01:D	MPSFKRLHGRALIATAPVYCSGPAASSTIKMTPSSASWITYLWRIILSVLAPSTALLQFGSWAASVLGPP 70
5i3z.1.A	-----
Model_01:A	VHELYLQPHFSALQKAPIQTGIPFEISTTPEFNCFSF NLPNITIIYATGGTIAG SASSADQTTGYQSAALS 140
Model_01:B	VHELYLQPHFSALQKAPIQTGIPFEISTTPEFNCFSF NLPNITIIYATGGTIAG SASSADQTTGYQSAALS 140
Model_01:C	VHELYLQPHFSALQKAPIQTGIPFEISTTPEFNCFSF NLPNITIIYATGGTIAG SASSADQTTGYQSAALS 140
Model_01:D	VHELYLQPHFSALQKAPIQTGIPFEISTTPEFNCFSF NLPNITIIYATGGTIAG SASSADQTTGYQSAALS 140
5i3z.1.A	-----DKLPNIVILATGGTIAG SAATGTQTTGYAGALG 36
Model_01:A	VQSLIDAVPQLCNVANVRGVQFANTDSIDMSSDMLQALVEQIQADLDNPSTQGAVVTHGTDTLDES AFFL 210
Model_01:B	VQSLIDAVPQLCNVANVRGVQFANTDSIDMSSDMLQALVEQIQADLDNPSTQGAVVTHGTDTLDES AFFL 210
Model_01:C	VQSLIDAVPQLCNVANVRGVQFANTDSIDMSSDMLQALVEQIQADLDNPSTQGAVVTHGTDTLDES AFFL 210
Model_01:D	VQSLIDAVPQLCNVANVRGVQFANTDSIDMSSDMLQALVEQIQADLDNPSTQGAVVTHGTDTLDES AFFL 210
5i3z.1.A	VDTLINA VPEVKRLANVRGEGQFSNLSQNMTEGVVLLKLSQRVNEELDARDVDLGVVITHGTDTVVEESAYFL 106
Model_01:A	DLTIQSDKPVVVVTGSMRPATAISADGPMNLLSSVTLAANENARGRGVMIANDRIGSARFTTKVNNANHLD 280
Model_01:B	DLTIQSDKPVVVVTGSMRPATAISADGPMNLLSSVTLAANENARGRGVMIANDRIGSARFTTKVNNANHLD 280
Model_01:C	DLTIQSDKPVVVVTGSMRPATAISADGPMNLLSSVTLAANENARGRGVMIANDRIGSARFTTKVNNANHLD 280
Model_01:D	DLTIQSDKPVVVVTGSMRPATAISADGPMNLLSSVTLAANENARGRGVMIANDRIGSARFTTKVNNANHLD 280
5i3z.1.A	HLTVKSDKPVVVEHAMRPATAISADGPMNLLSVAVRVAGDQSRGRGVMMVINDRIGSARFTTKVNNANHLD 176
Model_01:A	AFOAPDSGLLGTFVNIQPVFFYPPSRPLGHHHFKLP RPPPSAAALPQVDILYAYQELSVGMFKA AVDLG 349
Model_01:B	AFOAPDSGLLGTFVNIQPVFFYPPSRPLGHHHFKLP RPPPSAAALPQVDILYAYQELSVGMFKA AVDLG 349
Model_01:C	AFOAPDSGLLGTFVNIQPVFFYPPSRPLGHHHFKLP RPPPSAAALPQVDILYAYQELSVGMFKA AVDLG 349
Model_01:D	AFOAPDSGLLGTFVNIQPVFFYPPSRPLGHHHFKLP RPPPSAAALPQVDILYAYQELSVGMFKA AVDLG 349
5i3z.1.A	TEAANE EGYLGVLDGNRIKLNKDKLHETRSVFDVRGL---TSLPKVDILDEYQDDPEFLYDAATQHG 242
Model_01:A	ARGIVLAGLGAGFWTSKGTEEIRRIVRETKIPVIVSRRPEGGFVGPCQAGI GAGFLNPQKARIQLQLA 417
Model_01:B	ARGIVLAGLGAGFWTSKGTEEIRRIVRETKIPVIVSRRPEGGFVGPCQAGI GAGFLNPQKARIQLQLA 417
Model_01:C	ARGIVLAGLGAGFWTSKGTEEIRRIVRETKIPVIVSRRPEGGFVGPCQAGI GAGFLNPQKARIQLQLA 417
Model_01:D	ARGIVLAGLGAGFWTSKGTEEIRRIVRETKIPVIVSRRPEGGFVGPCQAGI GAGFLNPQKARIQLQLA 417
5i3z.1.A	VRGIVYAGGAGVSRVGIAGMRK-AMEKGVVVINSIRTEGIVGPEDELPGLDLSLNPAHARILLMLA 311
Model_01:A	LETKMDNDAIRALFEHAGVH 437
Model_01:B	LETKMDNDAIRALFEHAGVH 437
Model_01:C	LETKMDNDAIRALFEHAGVH 437
Model_01:D	LETKMDNDAIRALFEHAGVH 437
5i3z.1.A	DTRTSDPKVIEYFHTY--- 328

Figura 26: Alinhamento da sequência de L-asparaginase com o modelo proposto pelo software SWISSMODEL-ExPasy.

Na figura 25 é possível identificar uma sequência inicial de 107 aminoácidos que não encontram correspondência com o template. Sugere-se que esses primeiros 107 aminoácidos podem estar relacionados à localização da enzima, ancorando essa na membrana plasmática da célula microbiana, impedindo a migração para o meio extracelular. Vale ressaltar que a mesma sequência codificante foi transformada em *Pichia pastoris* com a adição de uma sequência α de *Sacharomyces* para a produção extracelular, o que não ocorreu, como demonstrado anteriormente.

Para melhoramento da predição da estrutura tridimensional da L-asparaginase optou-se por uma modelagem *ab initio*, onde se procura prever a partir de pequenas sequências conhecidas na literatura a estrutura secundária (folhas - β e α – hélices) e a partir dessas previsões e cálculos prever uma estrutura terciária para a enzima de interesse. Utilizando a plataforma ITASSER foi possível a modelagem da estrutura da L-asparaginase (MODELO 1) (Figura 27) com C-score de -0,38, o que implica em uma confiabilidade mediana do modelo. No entanto, na falta de estruturas com alta homologia conhecidas, existe uma dificuldade em criar modelos tridimensionais com alta confiabilidade.

A modelagem *ab initio* demonstrou que os 107 primeiros aminoácidos (Parte azul escura e azul clara da figura) podem ser estruturas fora das subunidades diméricas da L-asparaginase, fundamento a hipótese de que esses resíduos poderiam ser responsáveis pela ancoragem da enzima à membrana plasmática (130-132) e podem não fazer parte da estrutura quaternária dessa proteína.

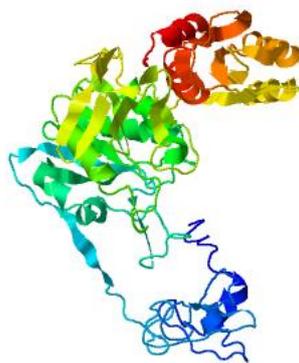


Figura 27: Modelagem *ab initio* da estrutura tridimensional para a sequência de L-asparaginase de *F. proliferatum*. Os 107 aminoácidos iniciais da sequência encontram-se em tonalidade azulada.

É importante destacar que o modelo proposto corrobora com alguns estudos da literatura e mostra resíduos de aminoácidos conservados no sítio ativo da enzima, como: 119-Glicina, 120-Treonina, 167-Serina, 168-Isoleucina, 199-Glicina, 200-Treonina, 201-Aspartato e 225-Serina (Figura 28) (133-135). Contudo, quando a estrutura proposta acima é relacionada às estruturas cristalizadas conhecidas na literatura, observa-se uma homologia de cerca de 48% em relação aos resíduos de aminoácidos, o que pode ser considerado baixo.

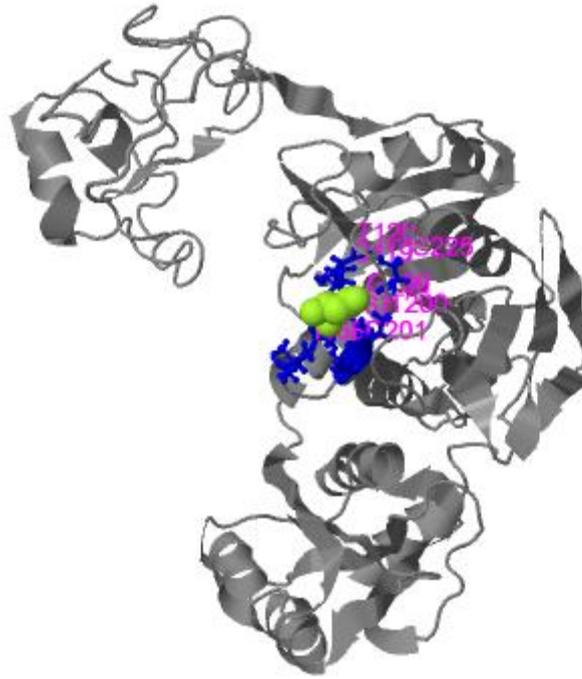


Figura 28: Resíduos de aminoácidos conservados no sítio ativo da L-asparaginase modelada pela plataforma I-TASSER.

Foi proposta outra modelagem *ab initio* retirando os 107 resíduos iniciais (MODELO 2) (Figura 29). Observou-se uma elevação no C-score de -0,38 para 1,59, resultado que denota alta confiança do modelo proposto, e demonstra que os 107 primeiros aminoácidos afetavam efetivamente os cálculos para dobramento da proteína, mas não afetaram a predição da estrutura presente no sítio ativo, que permaneceu com a mesma. Pode-se inferir que provavelmente os 107 primeiros aminoácidos, não estariam envolvidos direta ou indiretamente com a atividade catalítica da enzima.

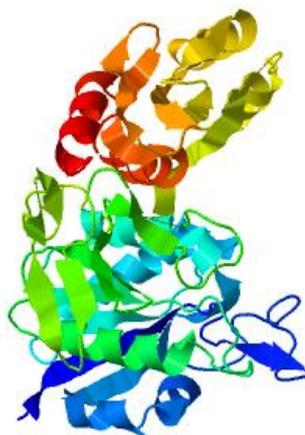


Figura 29: Modelo de estrutura tridimensional de L-asparaginase com a retirada dos 107 primeiros aminoácidos.

Com relação a homologia, o modelo II apresentou uma cobertura de cerca de 98% em relação a sequência de aminoácidos de estruturas cristalizadas existentes na literatura. Vale ressaltar que a sequência codificante da enzima L-asparaginase utilizada neste trabalho, possui 437 resíduos de aminoácidos e que os cálculos de modelagem estrutural se baseiam em estruturas já disponíveis, e atualmente não se encontra nenhuma estrutura de L-asparaginase fúngica cristalizada para comparação. Deste modo, existe a necessidade de purificar esta enzima e realizar a cristalografia por raio-X para melhor entendimento da estrutura tridimensional, assim como dos seus parâmetros cinéticos e dinâmicos.

Segundo a metodologia para análise estrutural de proteínas, o DOPE-score que apresentar menor valor é o mais confiável frente às comparações realizadas entre os modelos (136). A partir deste momento, foi possível a análise de cada resíduo de aminoácido (Figura 30.). Resíduos que possuem valores negativos tem maior confiabilidade no modelo quanto ao posicionamento e orientação espacial. O modelo apresentado possui uma região menos estável estruturalmente, a partir do resíduo de histidina-278 variando até alanina-350.

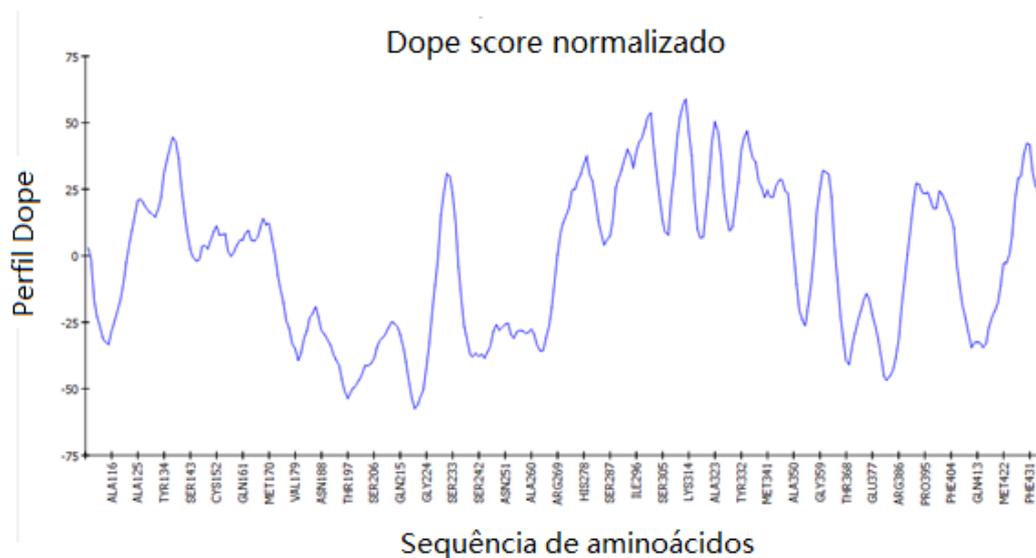


Figura 30: DOPE-score normalizado para os resíduos de aminoácidos da possível estrutura de L-asparaginase.

Para análises posteriores, o modelo estrutural para L-asparaginase de *F. proliferatum* poderá ser proposto por outras ferramentas que também utilizam da aprendizagem de máquina, como o AlphaFold2, que apresenta desde a sua publicação sucesso em termos de adoção da comunidade e proximidade aos resultados experimentais (137, 138). Isso, juntamente com métodos de validação, permite perspectiva de comparação entre modelos e obtenção de resultado com maior precisão.

Ao comparar os domínios conservados é necessário uma comparação das regiões críticas da enzima. Além do sítio de ligação, duas áreas relevantes para a atividade enzimática (Hinge Region – HR e Active Site Flexible Loop – ASFL) já foram descritas como necessárias para a estabilização do sítio catalítico (16, 17, 110). A Figura 31 representa o alinhamento dessas regiões e a sobreposição de suas estruturas tridimensionais. Este resultado evidencia que esta região vital está bem preservada mesmo em ASPases tetraméricas com baixa similaridade. O sítio ativo das L-asparaginases é relativamente rígido e também conservado.

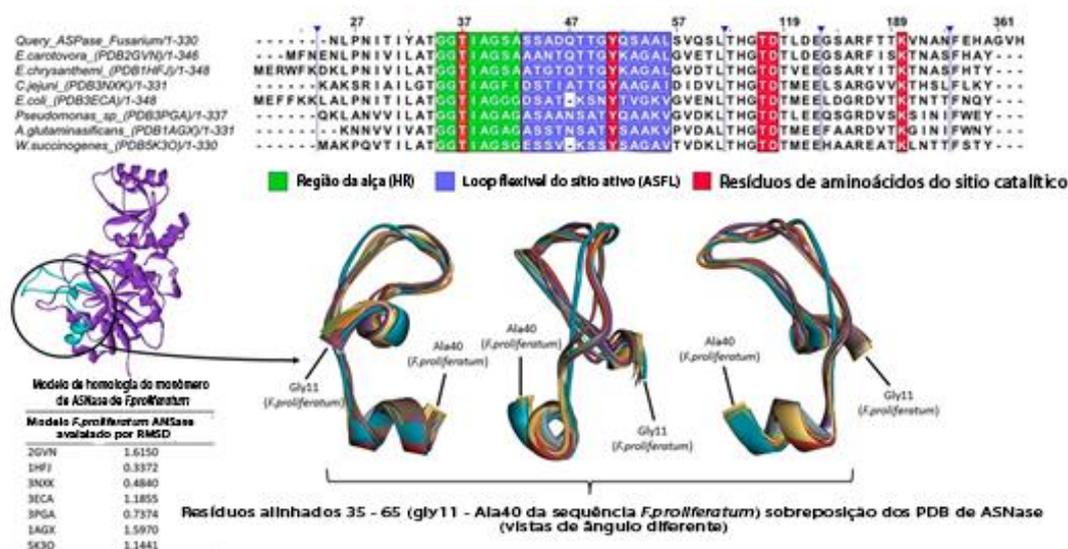


Figura 31: Análise estrutural de resíduos conservados da região da dobradiça, sítio ativo e sítio catalítico.

Existem cinco resíduos catalíticos de interesse no qual, a posição dos resíduos é relevante para a atividade enzimática. Há uma treonina no HR, uma tirosina no ASFL e três outros resíduos (um par de treonina-asparatato e uma lisina) localizados respectivamente a 64-67 e 137-140 (dependendo da asparaginase avaliada) resíduos de distância próximo do ASFL.. Na ASNase de *F. proliferatum*, esses resíduos são Thr13 (HR), Tyr27 (ASFL), Thr92, Asp93 e Lys166 (Figura 31). Um estudo realizado por Dwivedi em 2014 comparou várias sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados NCBI da proteína L-asparaginase de diferentes fontes: bacteriana, fúngica e vegetal. Uma similaridade pode ser observada nas sequências de fungos e bactérias, cerca de 10,77% seriam representados pelo aminoácido alanina, o que sugere um papel importante para este aminoácido na composição da L-asparaginase. Além disso, o estudo demonstrou dois resíduos de glicina em conversação em todas as sequências analisadas, o que representa uma função importante para este resíduo na evolução de sequências de L-asparaginases de origem procariótica (139).

4.12. CITOXICIDADE

A análise da citotoxicidade da ASNase parcialmente purificada foi avaliada utilizando MTT para a quantificação da formação de cristais de formazam e avaliação das vias metabólicas celulares. Pode-se observar um potencial citotóxico promissor nas concentrações de 0,007 UI/mL ($p = 0,009$) e 0,01 UI/mL ($p = 0,001$), eliminando cerca de 60% e 40% das células cancerígenas, respectivamente (Figura 32). Quando comparadas às mesmas concentrações do padrão adquirido pela Sigma-Aldricha (*L-asparaginase from E. coli* – cod. A3809), a enzima fúngica demonstrou maior capacidade de eliminação dos linfócitos da linhagem Jurkat (ATCC TIB-152).

Yap e colaboradores (2021) relataram que a concentração de 0,67 UI/mL de L-asparaginase de *F. proliferatum* não purificada, foi suficiente para eliminar 50% das células Jurkat viáveis em 24 horas de tratamento. Esses resultados corroboram que a ASNase produzida por esse fungo pode ter uma favorável utilização nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. Alguns parâmetros ainda necessitam ser avaliados, mas sabe-se que enzimas produzidas por organismos eucariotos possuem menor imunogenicidade devido às modificações pós traducionais. (111) Já em um trabalho publicado por Arumugam e Thangavelu (2022), foram necessárias 72 horas para observar a diminuição da viabilidade celular de células da linhagem MOLT-4 nas concentrações maiores que 13,04 μ M (62).

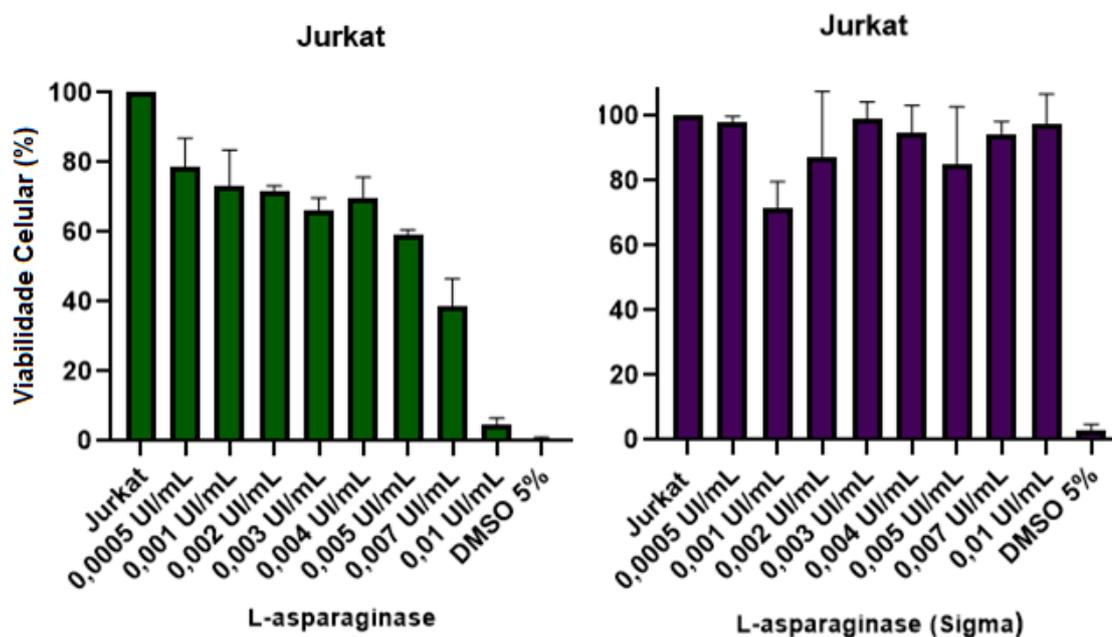


Figura 32: Viabilidade das células Jurkat contra diferentes concentrações de L-asparaginase recombinante de *F. proliferatum* em comparação com a L-asparaginase padrão de *E. coli* (Sigma Aldrich – cod A3809).

Os efeitos citotóxicos da amostra parcialmente purificada também foram avaliados sob microscopia óptica (Figura 33) Pode-se observar uma diminuição na proliferação celular quando o tratamento ocorreu mediante a aplicação da L-asparaginase de *F. proliferatum* (Figura 33A e Figura 33B). Quando os tratamentos são comparados com a utilização da enzima padrão de *E. coli* é possível considerar que não houve alteração na quantidade celular das amostras do poço controle (Figura 33C) e o poço contendo 0,01 UI/mL de L-asparagina padrão (Figura 33D).

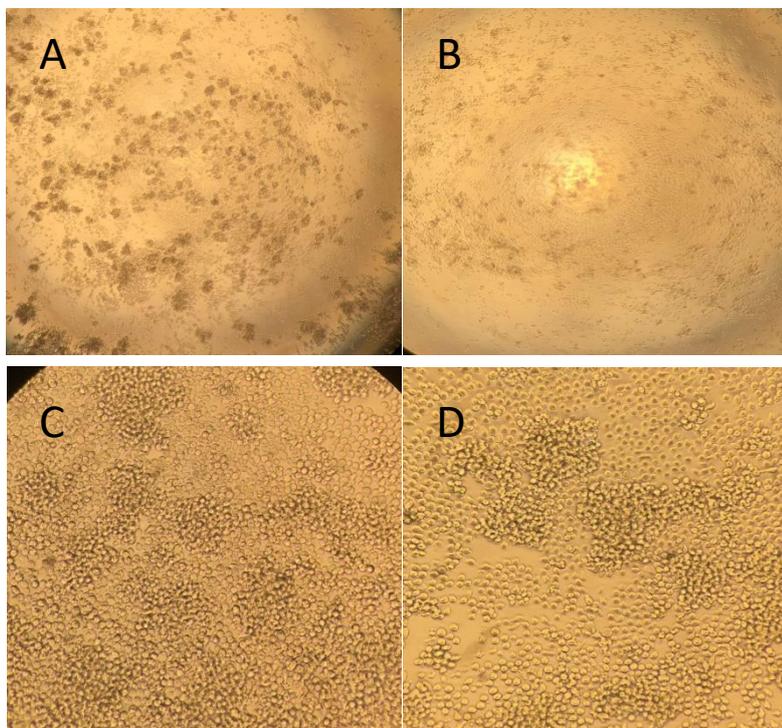


Figura 33: Avaliação morfológica de células da linhagem Jurkat (ATCC TIB-152) sob diferentes concentrações e amostras após o período de incubação de 24 horas. A e B – 0,0005 e 0,01 UI/mL de L-asparaginase de *F. proliferatum*; C e D – Controle negativo e 0,01 UI/mL

5.1. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou resultados da expressão e da quantificação de L-asparaginase em vetores de expressão de *Pichia pastoris* X33 transformados com a sequência da enzima de origem fúngica de *Fusarium proliferatum*. Apesar da presença do fator α de *Saccharomyces* nos vetores pPICZ α A para estimular a migração da enzima para o meio extracelular, notou-se uma produção intracelular da enzima, sendo necessário o emprego de um método de rompimento celular com sonicador ultrassônico de ponteira que, demonstrou-se eficaz na extração da enzima de interesse, aumentando em cerca de 8 vezes a quantidade enzimática. Optou-se pela permanência do peptídeo sinal para produção extracelular, pois a retirada de uma quantidade

grande de aminoácidos poderia afetar no dobramento da proteína e consequentemente na atividade catalítica.

Dos 21 clones testados os clones 4 e 8 foram selecionados para a continuidade do trabalho, visto que possuem uma relevante produção enzimática e de biomassa em 48 horas de cultivo utilizando a concentração de 1% de metanol a cada 12 horas. É conveniente destacar que todos os clones foram produzidos utilizando as mesmas metodologias no mesmo período, no entanto, na parte produtiva, buscou-se utilizar o clone de maior rendimento.

A enzima foi parcialmente purificada com o emprego de somente uma única etapa cromatográfica, apesar do baixo rendimento. A exploração de outras etapas sendo não cromatográficas poderia auxiliar na purificação total da enzima. No entanto, apesar do baixo rendimento e do baixo fator de purificação foi possível avaliar um potencial promissor da L-asparaginase parcialmente purificada frente às células de linhagem Jurkat. A comparação com a enzima padrão demonstrou que a ASNase recombinante de *F. proliferatum* produzida por *K. Phaffii* pode ser utilizada em mais ensaios de viabilidade celular, visando a redução de outras linhagens. A enzima apresentou temperatura ótima em 40 °C e pH ótimo de 8,0, valores relativamente importantes para o uso terapêutico da L-asparaginase.

A modelagem *in silico* para a sequência de L-asparaginase do fungo *F. proliferatum* foi realizada por uma sequência de softwares buscando a comparação em estruturas já existentes na literatura. Após a retirada dos 107 primeiros aminoácidos observou-se uma melhora nos índices do modelo proposto. No entanto, ainda existe uma dificuldade em realizar uma modelagem estrutural por homologia visto que não existem estruturas de L-asparaginases fúngicas depositadas em bases de dados de proteínas. A modelagem *ab initio* se mostrou eficaz na predição estrutural da enzima. Neste seguimento, a avaliação *in silico* indicou regiões conservadas no sítio catalítico com cinco resíduos essenciais para a atividade enzimática indicando também o possível ponto isoelétrico em 7,06. Além disso, foi possível analisar 5 resíduos altamente conservados em diversas sequências de L-asparaginase, o que indica a importância desses resíduos na atividade catalítica da enzima.

Sendo assim, conclui-se que a estratégia de expressão escolhida pode ser utilizada como método para a obtenção de asparaginases heterólogas de fungos filamentosos. É importante ressaltar que até onde se tem conhecimento, este é o segundo trabalho apresentado com clonagem de sequencias de L-asparaginase eucariótica em leveduras. Além disso, é necessário realizar testes em linfócitos saudáveis para futuras comparações. O presente trabalho demonstrou a clonagem, produção heteróloga, purificação, caracterização enzimática e ensaios de citotoxicidade, apresentando grande potencial para publicação e continuação dos estudos quanto à utilização terapêutica da enzima L-asparaginase.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beghi E, Logroscino G. Tumors in adolescents and young adults: Karger Medical and Scientific Publishers; 2016.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
3. INCA. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. In: Saúde Md, editor. Rio de Janeiro, RJ.: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.; 2019. p. 120.
4. Network CGAR. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(22):2059-74.
5. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environmental health perspectives*. 2007;115(1):138-45.
6. Zanette D, Rivadavia F, Molfetta GAd, Barbuzano F, Proto-Siqueira R, Falcão RP, *et al.* miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007;40(11):1435-40.
7. Fathollahzadeh S, Mirzaei H, Honardoost M, Sahebkar A, Salehi M. Circulating microRNA-192 as a diagnostic biomarker in human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer gene therapy*. 2016;23(10):327-32.
8. Fan S-j, Li H-b, Cui G, Kong X-l, Sun L-l, Zhao Y-q, *et al.* miRNA-149* promotes cell proliferation and suppresses apoptosis by mediating JunB in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*. 2016;41:62-70.
9. INCA. Atlas On-line de Mortalidade 2014 [Available from: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>].

10. Board PPTe. Childhood acute lymphoblastic leukemia treatment (PDQ®). PDQ Cancer Information Summaries [Internet]: National Cancer Institute (US); 2020.
11. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009;23(4):655-74.
12. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(2):166-78.
13. Douer D, Gökbuget N, Stock W, Boissel NJBR. Optimizing use of L-asparaginase–based treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia. 2022;53:100908.
14. Carobolante F, Chiaretti S, Skert C, Bassan RJTAiH. Practical guidance for the management of acute lymphoblastic leukemia in the adolescent and young adult population. 2020;11:2040620720903531.
15. Gökbuget N, Beck J, Brandt K, Brüggemann M, Burmeister T, Diedrich H, *et al*. Significant improvement of outcome in adolescents and young adults (AYAs) aged 15-35 years with acute lymphoblastic leukemia (ALL) with a pediatric derived adult ALL protocol; results of 1529 AYAs in 2 consecutive trials of the German multicenter study group for adult ALL (GMALL). 2013;122(21):839.
16. DeAngelo D, Stevenson K, Dahlberg S, Silverman L, Couban S, Supko J, *et al*. Long-term outcome of a pediatric-inspired regimen used for adults aged 18–50 years with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. 2015;29(3):526-34.
17. DeAngelo DJ, Stevenson K, Neuberg DS, Silverman LB, Ballen KK, Asch JD, *et al*. A multicenter phase II study using a dose intensified pegylated-asparaginase pediatric regimen in adults with untreated acute lymphoblastic leukemia: a DFCI ALL consortium trial. 2015;126(23):80.
18. Goekbuget N, Baumann A, Beck J, Brueggemann M, Diedrich H, Huettmann A, *et al*. PEG-asparaginase intensification in adult acute

lymphoblastic leukemia (ALL): significant improvement of outcome with moderate increase of liver toxicity in the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL) Study 07/2003. 2010;116(21):494.

19. SAÚDE MD. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME. In: Estratégicos DdAFel, editor. 7ª edição ed. Brasília. 2010.

20. SAÚDE MD. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME. In: Estratégicos DdAFel, editor. Brasília. 2022.

21. Kumar K, Kaur J, Walia S, Pathak T, Aggarwal D. L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. Taylor & Francis; 2014.

22. Labrou N, Papageorgiou A, Avramis V. Structure-function relationships and clinical applications of L-asparaginases. Current medicinal chemistry. 2010;17(20):2183-95.

23. Zhou R, Liang T, Li T, Huang J, Chen CJFiO. Possible mechanism of metabolic and drug resistance with L-asparaginase therapy in childhood leukaemia. 2023;13:1070069.

24. Costa-Silva T, Costa I, Biasoto H, Lima G, Silva C, Pessoa A, *et al.* Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. Blood Reviews. 2020:100651.

25. Quintanilla-Flores DL, Flores-Caballero MÁ, Rodríguez-Gutiérrez R, Tamez-Pérez HE, González-González JGJCriom. Acute pancreatitis and diabetic ketoacidosis following L-asparaginase/prednisone therapy in acute lymphoblastic leukemia. 2014;2014.

26. Yun M-K, Nourse A, White SW, Rock CO, Heath RJ. Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase I. Journal of molecular biology. 2007;369(3):794-811.

27. Baskar G, Renganathan S. Production of L-asparaginase from natural substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Effect of substrate, supplementary nitrogen source and L-asparagine. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 2009;7(1).
28. Gurunathan B, Sahadevan R. Production of L-asparaginase from natural substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Optimization of carbon source and operating conditions. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 2011;9(1).
29. Nakahama K, Imada A, Igarasi S, Tubaki K. Formation of L-asparaginase by *Fusarium* species. *Microbiology*. 1973;75(2):269-73.
30. Patro KR, Gupta N. Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*. 2012;3(3):30-4.
31. Dunlop PC, Roon RJ. L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme. *Journal of bacteriology*. 1975;122(3):1017-24.
32. Oliveira EM, Carvajal E, Bon EP, editors. L-Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals; 1999: Springer.
33. Sinclair K, Warner JP, Bonthron DT. The ASP1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. *Gene*. 1994;144(1):37-43.
34. Amer S, Darwish D. Production and optimization of L-asparaginase by bacteria isolated from Saudi Arabia. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*. 2019;15(2):227-34.
35. Kotzia GA, Labrou NE. L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. *Journal of biotechnology*. 2007;127(4):657-69.

36. Swain AL, Jaskólski M, Housset D, Rao J, Wlodawer A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(4):1474-8.
37. Cedar H, Schwartz JH. Localization of the two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 1967;242(16):3753-5.
38. Chi H, Xia B, Shen J, Zhu X, Lu Z, Lu F, *et al*. Characterization of a novel and glutaminase-free type II L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum* and its acrylamide alleviation efficiency in potato chips. 2022;221:1384-93.
39. Muneer F, Siddique MH, Azeem F, Rasul I, Muzammil S, Zubair M, *et al*. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. 2020;202:967-81.
40. Castro D, Marques ASC, Almeida MR, de Paiva GB, Bento HB, Pedrolli DB, *et al*. L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. 2021;105:4515-34.
41. Souza PM, de Freitas MM, Cardoso SL, Pessoa A, Guerra ENS, Magalhaes POJCRiOH. Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. 2017;120:194-202.
42. Van Trimpont M, Peeters E, De Visser Y, Schalk AM, Mondelaers V, De Moerloose B, *et al*. Novel insights on the use of L-asparaginase as an efficient and safe anti-cancer therapy. 2022;14(4):902.
43. Huang L, Yuan B, Wu H, Chu H, Liu Y, Wu S, *et al*. Comparative study of L-asparaginase-based LOP regimen over CHOP regimen before radiotherapy for stage IIE extranodal nasal type NK/T cell lymphoma: a study of 2 centers. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2017;17(3):152-8.
44. Merlen C, Bonnefoy A, Wagner E, Dedeken L, Leclerc JM, Laverdière C, *et al*. L-Asparaginase lowers plasma antithrombin and mannan-binding-lectin levels: Impact on thrombotic and infectious events in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric blood & cancer*. 2015;62(8):1381-7.

45. Vitolo M, Pessoa Jr A. *Biotecnologia farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial*: Editora Blucher; 2015.
46. Gomes AR, Byregowda SM, Veeregowda BM, Balamurugan V. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. 2016.
47. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*. 2000;24(1):45-66.
48. Cardoso BB, Silvério SC, Abrunhosa L, Teixeira JA, Rodrigues LR. β -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 2017.
49. Niu D, Tian X, Mchunu NP, Jia C, Singh S, Liu X, *et al*. Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β -galactosidases. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2017;27:37-43.
50. Dias FFG, Ruiz ALTG, Della Torre A, Sato HH. Purification, characterization and antiproliferative activity of l-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6(9):785-94.
51. Saeed H, Ali H, Soudan H, Embaby A, El-Sharkawy A, Farag A, *et al*. Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* l. asparaginase in *Escherichia coli*. *International journal of biological macromolecules*. 2018;106:1041-51.
52. Salihi A, Asoodeh A, Aliabadian M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International journal of biological macromolecules*. 2017;94:827-35.
53. Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017.

54. Barbosa PdPM, Speranza P, Ohara A, da Silva ÉB, de Angelis DA, Macedo GA. Fungi from Brazilian Savannah and Atlantic rainforest show high antibacterial and antifungal activity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017;10:1-8.
55. Ziemons S, Koutsantas K, Becker K, Dahlmann T, Kück U. Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* P2niaD18 is not dependent on the copy number of biosynthesis genes. *BMC biotechnology*. 2017;17(1):16.
56. Evidente A, Kornienko A, Cimmino A, Andolfi A, Lefranc F, Mathieu V, *et al*. Fungal metabolites with anticancer activity. *Natural product reports*. 2014;31(5):617-27.
57. Liu Y, Sun M-H, Shao S-K, Deng G. An affinity-based aqueous two-phase mixed micellar system and its purification of Yeast 3', 5'-bisphosphate nucleotidase. *Journal of Chromatography B*. 2017;1060:215-20.
58. Boruta T, Bizukojc M. Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;33(2):34.
59. Subhan M, Faryal R, Macreadie I. Production of statins by fungal fermentation. *Microbiology Australia*. 2017;38(2):70-2.
60. Ismaiel AA. Production of the immunosuppressant cyclosporin A by a new soil isolate, *Aspergillus fumigatus*, in submerged culture. *Applied microbiology and biotechnology*. 2017;101(8):3305-17.
61. Lu Y-H, Jin L-P, Kong L-C, Zhang Y-L. Phytotoxic, Antifungal and Immunosuppressive Metabolites from *Aspergillus terreus* QT122 Isolated from the Gut of Dragonfly. *Current microbiology*. 2017;74(1):84-9.
62. Arumugam N, Thangavelu PJPE, Purification. Purification and anticancer activity of glutaminase and urease free intracellular L-asparaginase from *Chaetomium* sp. 2022;190:106006.

63. Jebur IM, Najaf KN, Ali HHR, Ibrahim MSJJoPS, Research. Cloning and expression of L-Asparaginase gene from *Aspergillus terreus* in *E. coli*. 2019;11(3):961-5.
64. Jozala AF, Geraldés DC, Tundisi LL, Feitosa VdA, Breyer CA, Cardoso SL, *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. 2016;47:51-63.
65. Vieira Gomes AM, Souza Carmo T, Silva Carvalho L, Mendonça Bahia F, Parachin NSJM. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. 2018;6(2):38.
66. Vieira SM, da Rocha SLG, Neves-Ferreira AGdC, Almeida RV, Perales JJPNTD. Heterologous expression of the antimyotoxic protein DM64 in *Pichia pastoris*. 2017;11(7):e0005829.
67. Kurtzman CP. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2009;36(11):1435.
68. Ogata K, Nishikawa H, Ohsugi M. A yeast capable of utilizing methanol. *Agricultural and biological chemistry*. 1969;33(10):1519-20.
69. Wegner EH. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. Google Patents; 1986.
70. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;98(12):5301-17.
71. Juturu V, Wu JC. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. *ChemBioChem*. 2018;19(1):7-21.
72. Hartner FS, Glieder AJMcf. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. 2006;5(1):1-21.

73. Unrean PJBp. Pathway analysis of *Pichia pastoris* to elucidate methanol metabolism and its regulation for production of recombinant proteins. 2014;30(1):28-37.
74. Higgins DR, Cregg JM. Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia protocols*: Springer; 1998. p. 1-15.
75. Invitrogen. EasySelect *Pichia* expression kit user manual. Invitrogen Carlsbad, CA; 2010.
76. Xu Z, Shih M-C, Poulton JE. An extracellular exo- β -(1, 3)-glucanase from *Pichia pastoris*: purification, characterization, molecular cloning, and functional expression. *Protein expression and purification*. 2006;47(1):118-27.
77. Li R-K, Chen Z, Ying X-J, Ng TB, Ye X-Y. A novel GH16 beta-agarase isolated from a marine bacterium, *Microbulbifer* sp. BN3 and its characterization and high-level expression in *Pichia pastoris*. *International journal of biological macromolecules*. 2018;119:1164-70.
78. Suthangkornkul R, Sriworanun P, Nakai H, Okuyama M, Svasti J, Kimura A, *et al.* A *Solanum torvum* GH3 β -glucosidase expressed in *Pichia pastoris* catalyzes the hydrolysis of furostanol glycoside. *Phytochemistry*. 2016;127:4-11.
79. Zhang X-F, Ai Y-H, Xu Y, Yu X-W. High-level expression of *Aspergillus niger* lipase in *Pichia pastoris*: Characterization and gastric digestion in vitro. *Food chemistry*. 2019;274:305-13.
80. Sun Q, Chen F, Geng F, Luo Y, Gong S, Jiang Z. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food chemistry*. 2018;245:570-7.
81. Menghiu G, Ostafe V, Prodanovic R, Fischer R, Ostafe R. Biochemical characterization of chitinase A from *Bacillus licheniformis* DSM8785 expressed in *Pichia pastoris* KM71H. *Protein expression and purification*. 2019;154:25-32.

82. Driss D, Bhiri F, Chaabouni SE. Cloning and constitutive expression of His-tagged xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6 in *Pichia pastoris* X33: purification and characterization. *Protein expression and purification*. 2012;83(1):8-14.
83. Jeya M, Thiagarajan S, Lee J-K, Gunasekaran P. Cloning and expression of GH11 xylanase gene from *Aspergillus fumigatus* MKU1 in *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2009;108(1):24-9.
84. Sriyapai T, Somyoonsap P, Matsui K, Kawai F, Chansiri K. Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2011;111(5):528-36.
85. Yang Z, Zhang Z. Codon-optimized expression and characterization of a pH stable fungal xylanase in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*. 2017;53:80-7.
86. Sun L-h, Qin T, Liu Y, Zhao H, Xia X, Lei X. Cloning, expression, and characterization of a porcine pancreatic α -amylase in *Pichia pastoris*. *Animal nutrition*. 2018;4(2):234-40.
87. Ishikawa M, Shiono Y, Koseki T. Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* recombinant α -l-rhamnosidase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2017;124(6):630-4.
88. Yang S, Hua C, Yan Q, Li Y, Jiang Z. Biochemical properties of a novel glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase (PtBglu1) from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Pichia pastoris*. *Carbohydrate polymers*. 2013;92(1):784-91.
89. Chen X, Cao Y, Ding Y, Lu W, Li D. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* β -mannanase in *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*. 2007;128(3):452-61.

90. Zhu T, Sun H, Li P, Xue Y, Li Y, Ma Y. Constitutive expression of alkaline β -mannanase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process biochemistry*. 2014;49(12):2025-9.
91. Dehnavi E, Siadat SOR, Roudsari MF, Khajeh K. Cloning and high-level expression of β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in *Pichia pastoris* by optimizing of pH, methanol concentration and temperature conditions. *Protein expression and purification*. 2016;124:55-61.
92. Naumov GI, Naumova ES, Boundy-Mills KL. Description of *Komagataella mondaviorum* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111(7):1197-207.
93. Garcia-Ortega X, Adelantado N, Ferrer P, Montesinos JL, Valero F. A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. *Process Biochemistry*. 2016;51(6):681-91.
94. Ponte X, Montesinos-Seguí JL, Valero F. Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of PAOX1 is oxygen tension dependent. *Process Biochemistry*. 2016;51(12):1954-63.
95. Werten MW, Eggink G, Stuart MAC, de Wolf FA. Production of protein-based polymers in *Pichia pastoris*. *Biotechnology advances*. 2019;37(5):642-66.
96. Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, *et al*. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnology advances*. 2015;33(6):1177-93.
97. Vieira Gomes AM, Souza Carmo T, Silva Carvalho L, Mendonça Bahia F, Parachin NS. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms*. 2018;6(2):38.
98. Wagner JM, Alper HS. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*. 2016;89:126-36.

99. Vieira SM, da Rocha SLG, da Costa Neves-Ferreira AG, Almeida RV, Perales J. Heterologous expression of the antimyotoxic protein DM64 in *Pichia pastoris*. PLoS neglected tropical diseases. 2017;11(7):e0005829.
100. Invitrogen. EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. 2010. p. 95.
101. Ferrara MA, Severino NM, Mansure JJ, Martins AS, Oliveira EM, Siani AC, *et al.* Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. Enzyme and Microbial Technology. 2006;39(7):1457-63.
102. Dwivedi VD, Mishra SK. In silico analysis of L-asparaginase from different source organisms. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences. 2014;6(2):93-9.
103. Freitas M, Souza P, Cardoso S, Cruvinel K, Abrunhosa LS, Ferreira Filho EX, *et al.* Filamentous Fungi Producing L-Asparaginase with Low Glutaminase Activity Isolated from Brazilian Savanna Soil. 2021;13(8):1268.
104. Siqueira FGd. Resíduos agroindustriais com potencial para a produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases. 2011.
105. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual: Cold spring harbor laboratory press; 1989.
106. Drainas C, Kinghorn J, Pateman J. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. Microbiology. 1977;98(2):493-501.
107. Iida Y, Tuziuti T, Yasui K, Kozuka T, Towata A. Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field. Ultrasonics sonochemistry. 2008;15(6):995-1000.
108. Studer G, Tauriello G, Bienert S, Biasini M, Johnner N, Schwede TJPcb. ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. 2021;17(1):e1008667.

109. Biasini M, Schmidt T, Bienert S, Mariani V, Studer G, Haas J, *et al.* OpenStructure: an integrated software framework for computational structural biology. 2013;69(5):701-9.
110. Zheng W, Zhang C, Li Y, Pearce R, Bell EW, Zhang YJCrn. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. 2021;1(3):100014.
111. Yap LS, Lee WL, Ting ASYJJoMM. Optimization of L-asparaginase production from endophytic *Fusarium proliferatum* using OFAT and RSM and its cytotoxic evaluation. 2021;191:106358.
112. Berridge MV, Tan ASJAob, biophysics. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. 1993;303(2):474-82.
113. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson IJljoms. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. 2021;22(23):12827.
114. Niehaus E-M, Münsterkötter M, Proctor RH, Brown DW, Sharon A, Idan Y, *et al.* Comparative “omics” of the *Fusarium fujikuroi* species complex highlights differences in genetic potential and metabolite synthesis. Genome Biology and Evolution. 2016;8(11):3574-99.
115. Lima GM, Effer B, Biasoto HP, Feijoli V, Pessoa A, Palmisano G, *et al.* Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis. Biochemical Engineering Journal. 2020;156:107516.
116. Sajitha S, Vidya J, Binod P, Pandey A. Cloning and expression of L-asparaginase from *E. coli* in eukaryotic expression system. Biochemical Engineering Journal. 2015;102:14-7.
117. Ferrara MA, Severino NM, Mansure JJ, Martins AS, Oliveira EM, Siani AC, *et al.* Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. 2006;39(7):1457-63.

118. Freitas M, Souza P, Homem-de-Mello M, Fonseca-Bazzo YM, Silveira D, Ferreira Filho EX, *et al.* L-Asparaginase from *Penicillium sizovae* Produced by a Recombinant *Komagataella phaffii* Strain. 2022;15(6):746.
119. Lin-Cereghino GP, Stark CM, Kim D, Chang J, Shaheen N, Poerwanto H, *et al.* The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. 2013;519(2):311-7.
120. Sajitha S, Vidya J, Binod P, Pandey AJBej. Cloning and expression of L-asparaginase from *E. coli* in eukaryotic expression system. 2015;102:14-7.
121. Liu D, Ding L, Sun J, Boussetta N, Vorobiev E. Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review. *Innovative food science & emerging technologies*. 2016;36:181-92.
122. Kleingesinds EK, de Almeida Parizotto L, Effer B, Monteiro G, Long PF, Arroyo-Berdugo Y, *et al.* Downstream process and evaluation of the concomitant impact of a recombinant glycosylated L-asparaginase on leukemic cancer cells and the bone marrow tumor microenvironment. 2023.
123. Dias FFG, Santos Aguilar JGd, Sato HHJB. L-Asparaginase from *Aspergillus spp.*: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. 2019;9:1-10.
124. Kumar S, Darnal S, Patial V, Kumar V, Kumar V, Kumar S, *et al.* Molecular cloning, characterization, and in-silico analysis of L-asparaginase from Himalayan *Pseudomonas* sp. PCH44. 2022;12(8):162.
125. Dutta S, Ghosh S, Pramanik SJAb, microbiology. L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and some physicochemical properties. 2015;51:425-31.
126. Mukherjee R, Bera DJB, Biotechnology A. Biochemical characterization and thermodynamic principles of purified L-asparaginase from novel *Brevibacillus borstelensis* ML12. 2022;39:102260.

127. Elsaba YM, Salama WH, Soliman ERJB, Biotechnology A. In silico and biochemical analysis on a newly isolated *Trichoderma asperellum* L-asparaginase. 2022;40:102309.
128. Hollingsworth SA, Karplus PA. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. Biomolecular concepts. 2010;1(3-4):271-83.
129. Ramachandran GN. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. J Mol Biol. 1963;7:95-9.
130. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature protocols. 2010;5(4):725-38.
131. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nature methods. 2015;12(1):7-8.
132. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC bioinformatics. 2008;9(1):40.
133. Dhavala P, Papageorgiou AC. Structure of *Helicobacter pylori* L-asparaginase at 1.4 Å resolution. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2009;65(12):1253-61.
134. Jaskolski M, Kozak M, Lubkowski J, Palm G, Wlodawer A. Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: a case of enantiomorphic space groups. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2001;57(3):369-77.
135. Palm GJ, Lubkowski J, Derst C, Schleper S, Röhm K-H, Wlodawer A. A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: Crystal structure of a Thr-89-Val mutant. FEBS letters. 1996;390(2):211-6.
136. Shen My, Sali AJP. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. 2006;15(11):2507-24.

137. David A, Islam S, Tankhilevich E, Sternberg MJ. The AlphaFold database of protein structures: a biologist's guide. 2022;434(2):167336.
138. Yang Z, Zeng X, Zhao Y, Chen R, Jiang T. AlphaFold2 and its applications in the fields of biology and medicine. 2023;8(1):115.
139. Dwivedi VD, Mishra SK. In silico analysis of L-asparaginase from different source organisms. 2014;6:93-9.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS (2018-2023)

FREITAS, MARCELA ; SOUZA, PAULA ; **CARDOSO, SAMUEL** ; CRUVINEL, KELLEN ; ABRUNHOSA, LETÍCIA SANTOS ; FERREIRA FILHO, EDIVALDO X. ; INÁCIO, JOÃO ; PINHO, DANILO BATISTA ; PESSOA, ADALBERTO ; O. MAGALHÃES, PÉROLA . Filamentous Fungi Producing L-Asparaginase with Low Glutaminase Activity Isolated from Brazilian Savanna Soil. PHARMACEUTICS **JCR**, v. 13, p. 1268, 2021.

BEZERRA, V. H. S. ; **CARDOSO, SAMUEL** ; FONSECA-BAZZO, Y. ; SILVEIRA, DÂMARIS ; MAGALHÃES, P. O. ; SOUZA, PAULA M. . Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. MOLECULES **JCR**, v. 26, p. 7062, 2021.

CARDOSO, SAMUEL L.; DE FREITAS, MARCELA M. ; DE SOUZA, PAULA M. ; HOMEM-DE-MELLO, MAURICIO ; SILVEIRA, DÂMARIS ; FONSECA-BAZZO, YRIS MARIA ; FILHO, EDIVALDO X. ; JUNIOR, ADALBERTO P. ; MAGALHÃES, PÉROLA O. . Optimization of aqueous two-phase micellar system for partial purification of L-asparaginase from *Penicillium* sp. grown in wheat bran as agro-industrial residue. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY **JCR**, v. 1, p. 1, 2020.

MARTARELLO, RAQUEL DALL'AGNOL ; CUNHA, LUANA ; **CARDOSO, SAMUEL LEITE** ; DE FREITAS, MARCELA MEDEIROS ; SILVEIRA, DAMARIS ; FONSECA-BAZZO, YRIS MARIA ; HOMEM-DE-MELLO, MAURICIO ; FILHO, EDIVALDO XIMENES FERREIRA ; MAGALHÃES, PÉROLA OLIVEIRA . Optimization and partial

purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. *AMB Express JCR*, v. 9, p. 81, 2019.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

L-Asparaginase from *Fusarium proliferatum*: heterologous expression and in silico analysis. – Submissão na *Pharmaceutics Journal* . Data de Submissão: 29/07/2023

TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS (2018 – 2023)

CARDOSO, S. L.; CRUVINEL, KELLEN ; ABRUNHOSA, LETÍCIA SANTOS ; GUIMARAES, M. ; RODRIGUES, A. L. ; ABREU, J. ; HOMEM-DE-MELLO, MAURICIO ; MAGALHÃES, PÉROLA DE OLIVEIRA ; SOUZA, PAULA . In silico structural ANALYSIS OF L-ASPARAGINASE from *Fusarium proliferatum*. In: Biopartitioning & Purification Conference, 2022, Aveiro. Biopartitioning & Purification Conference, 2022.

SANTANA, A. L. F. ; MARTINS, D. H. N. ; **CARDOSO, SAMUEL L.** . PSILOCYBIN'S THERAPEUTIC POTENTIAL IN THE TREATMENT OF DEPRESSION AND ANXIETY. In: II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, 2022, Foz do Iguaçu. II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, 2022.

TASSA, A. Y. E. ; SANTANA, A. L. F. ; ALMEIDA, R. P. C. ; MAGALHAES, P. O. ; SILVEIRA, D. ; FONSECA-BAZZO, Y. ; **CARDOSO, S. L.** ; MARTINS, D. H. N. . ACQUISITION AND DISPENSATION OF PHYTOTHERAPICS BETWEEN 2013 AND 2017 IN THE BRAZILIAN SOUTHERN REGION. In: II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, 2022, Foz do Iguaçu. II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, 2022..

SOUZA, PAULA ; **CARDOSO, S. L.** ; CURVINEL, K. ; JUNIOR, ADALBERTO P. ; MAGALHAES, P. O. . THERMODYNAMIC STUDIES OF A ASPARAGINASE FROM *Fusarium proliferatum*. In: XXV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2021, Asunción. XXV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2021.

CARDOSO, S. L.; HOMEM-DE-MELLO, MAURICIO ; DE SOUZA, PAULA M. ; MAGALHAES, P. O. . ?In Silico? analysis of a recombinant fungal L-asparaginase produced in *Komagatella pastoris*. In: XXV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2021, Asunción. XXV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2021.

LOPES, C. F. ; LUPSCHINSKI, A. G. ; NORONHA, N. B. ; MULINAR, F. ; **CARDOSO, S. L.** . PROPRIEDADES DA MORINGA OLEIFERA E SUAS UTILIZAÇÕES NA ESTÉTICA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. In: I CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CENTRO OESTE, 2019, BRASÍLIA. I CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CENTRO OESTE, 2019. v. 1. p. 1.