



**Universidade de Brasília – UnB - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

Dissertação de Mestrado

**Expressão Heteróloga de asparaginase de Fusarium e Penicillium. Vetor de
Expressão constitutiva de baixa expressão pSFOXB1.**

JEMIMA AILA ASSUNÇÃO VITAL

Brasília, 2025



Universidade de Brasília – UnB - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Jemima Aila Assunção Vital

**Expressão Heteróloga de asparaginase de *Fusarium* e *Penicillium*. Vetor de
Expressão constitutiva de baixa expressão pSFOXB1.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Microbiana da
Universidade de Brasília (UnB)
para a obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Dra Eliane Ferreira Noronha
Coorientador: Pedro Hamann

Brasília, 2025.



JEMIMA AILA ASSUNÇÃO VITAL

**Expressão Heteróloga de asparaginase de Fusarium e Penicillium. Vetor de
Expressão constitutiva de baixa expressão pSFOXB1.**

Aprovado em 31 de Março de 2025.

Eliane Ferreira Noronha Professor Doutor – Presidente da Banca
Universidade de Brasília

Janice Lisboa de Marco Professor Doutor – Membro Interno
Universidade de Brasília

Alonso Roberto Poma Ticona Professor Doutor – Membro Externo Universidade de
Brasília

Brenda Rabello de Camargo Professora Doutora – Suplente Universidade de Brasília

Brasília, 2025.

A Deus, aos professores e pesquisadores da UnB, aos meus familiares e amigos que contribuíram direta ou indiretamente para execução dessa dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, autor da minha vida, meu Senhor. Nos momentos mais difíceis de toda a minha caminhada, especialmente acadêmica, o Senhor esteve comigo. Situações em que nem eu mesma acreditava que era capaz, o senhor me fez acreditar que era possível. Agradeço por despertar em mim sonhos e projetos, para que em cada um deles eu percebesse sua existência e perfeição. Essas oportunidades me fizeram provar que Tu és uma fonte inesgotável de poder e conhecimento. Vejo que as minhas orações/ súplicas são sempre ouvidas e uma a uma ao Seu tempo são respondidas. Obrigada por cuidar de mim de forma incondicional, obrigada pelas oportunidades e desafios que tem permitido em minha vida. Devo agradecer por chegar ao final de uma pós-graduação tão almejada por mim. Que venham muitos frutos desse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Isaías Vital de Oliveira e Arlete Ivânia Assunção Vital, porque me ensinaram, desde cedo, o amor de Deus, e por serem exemplos na minha vida. Todo esforço e dedicação que tenho nessa vida são para vocês. As orações que fizeram têm sido essenciais. Obrigada pela torcida! A toda minha família de um modo geral, que esteve ao meu lado sempre. Um carinho especial à minha Tia Alice Vital de Oliveira que me amparou desde pequena e aos meus primos pelos conselhos. Samuel Vital de Oliveira Júnior, meu mestre, primo e colega de profissão que me inseriu no mercado de trabalho. Agradeço e dedico aos meus avós (Astrogilda Ribeiro Dias, Loli, Acascia Maria Assunção, Raimundo, Rodolfo Galindo Borda pelos ensinamentos, experiência de vida e todo amor e cuidado que me proporcionaram).

Agradeço imensamente à minha Orientadora Eliane Ferreira Noronha, que agora considero amiga, pela orientação dessa dissertação, por compartilhar comigo seu tempo, sua experiência e seus conhecimentos. Muito obrigada pelos ensinamentos e retorno nas correções e sugestões. Obrigada por ter acreditado em mim e me guiado nessa jornada. Agradeço pela paciência que teve comigo. Minha inspiração!

Agradeço à Banca Examinadora (Alonso Roberto Poma Ticona, Janice Lisboa De Marco, Brenda Rabello de Camargo, Pedro Ricardo Vieira Hamann) por prestigiar e avaliar minha dissertação, reservando parte do tempo para enriquecimento do mesmo, com os conselhos e considerações. Obrigada por fazerem parte dessa conquista tão importante pra mim!

Agradeço à Universidade de Brasília por ofertar essa pós-graduação tão interessante e importante. Aos professores de cada disciplina que pude cursar (especialmente ao Geraldo Lucchese, André Moraes Nicola e Patrícia Nicola). A todos os professores do Instituto de Ciências Biológicas; Gratidão pelas instruções repassadas que foram muito além da sala de aula. Um agradecimento especial ao Gabriel Sérgio Costa Alves, ao Luiz Henrique Ferreira do Vale e ao Helson Mario Martins do Vale que participaram do meu ingresso no mestrado quando realizei a Prova Oral. Desde aquele momento me transmitiram ensinamentos e mostraram caminhos para a pesquisa.

Ao Eric Borges Ribeiro, que foi meu professor de Química no ensino médio e em quem me inspirei para fazer mestrado. Ao Kaio César, biomédico, por ter me apresentado o IB e pelas saídas. Ao Samuel Júnior, também biomédico da Universidade Católica de Brasília pelas dúvidas sanadas. Ao Adriano Luis Silva Guimarães, um farmacêutico que muito admiro. Ao Ricardo Pires Dos Reis que foi muito prestativo me auxiliando em muitos experimentos, sanando dúvidas e me aconselhando durante o mestrado. Ao Cleiton pelos conselhos e ensinamentos.

Aos meus amigos do mestrado com os quais foram compartilhados momentos de alegria, tristeza, muito estudo e perseverança. Agradeço ao Donizete, Gisele e Mariana. Um carinho mais que especial ao Cezar Júnio Coêlho Paranhos, Artur Stranz, Raul Lima, Rosa, Jéssica Pinheiro, Gabriela, Tayna Frederico, Luanne, Lorena, Marina, Letícia, João Holanda, Vinícius, Luisa, Eduardo e Guilherme por serem companheiros no Laboratório de Enzimologia e por todo auxílio.

Às secretárias do Instituto de Ciências Biológicas, especialmente a Luciana Medeiros, que sempre esteve à disposição para ajudar em todos os momentos durante o Mestrado, e participando ativamente da matrícula web, incluindo disciplinas e orientando no fluxo.

Agradeço às minhas primas e tias, Caroline Vital, Lucélia Vital de Oliveira, Losanges, Denise, Conceição, Heloísa, Alexandra, Alessandra, Vilma. Aos meus primos Samuelson Vital de Oliveira, Daniel Vital de Oliveira, Danilo, Maxwell Oliveira Barbosa dos Santos, Paulo Hudson, João, Mateus, Filipe, Marcos Santiago, Paulo Józimo. Aos meus Tios, Sady Vital de Oliveira, Daniel Vital. Todos da Minha Família Vital e Assunção. Muito obrigada a todos.

Aos amigos verdadeiros (especialmente os da minha escola Adventista de Taguatinga), que com palavras de ânimo e alento me confortaram nos momentos difíceis. Aos meus chefes, Weverton Araújo de Santana, Fabrício Campelo e Ana Flávia do RH, obrigada por todas as liberações nos dias de orientação. Muito Obrigada Weverton Araújo de Santana por todo apoio profissional e pessoal.

Um agradecimento e carinho especial ao Weverton Araújo de Santana, que me possibilitou finalizar esse Mestrado graças às liberações concedidas. Seu auxílio foi essencial para que eu pudesse prosseguir e concluir meus experimentos nos momentos cruciais. Um abraço, serei eternamente grata.

Por fim, agradeço aos colegas que contribuíram direta e indiretamente para o meu crescimento.

Um abraço a todos.

*"O sucesso é a soma de
pequenos esforços repetidos dia após dia."*

Robert Collier

*"Tudo posso naquele que me fortalece"
(Filipenses 4:13)*

RESUMO

A enzima L-asparaginase é utilizada no tratamento da Leucemia Linfoblástica aguda (LLA) no Brasil e no Mundo. No Brasil, já se tem um protocolo de tratamento desenvolvido pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) de 2001, utilizando L - asparaginases de origem bacteriana, principalmente de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. No Brasil não há registro de produção de L-Asparaginase no país e o SUS (Sistema Único de Saúde), apresenta dificuldade no seu abastecimento uma vez que esta enzima é importada. Neste cenário, a presente proposta de pesquisa teve como meta central desenvolver linhagens bacterianas produtoras de L-asparaginases de origem fúngica, *Fusarium proliferatum* e *Penicillium sizovae* e avaliar a sua utilização no desenvolvimento de formulação estável para tratamento de LLA e, assim, contribuir para o desenvolvimento de processo nacional de produção de L-asparaginases em larga escala. As sequências dos genes de asparaginases de *P. sizovae* e *F. proliferatum* foram sintetizadas e clonadas no vetor pET28A. No presente trabalho, a meta central foi expressar estes genes em *Escherichia coli* utilizando vetores de expressão constitutiva da série pSFOXB (pSFOXB1, 11 e 15). O gene da L-asparaginase de *F. proliferatum* foi subclonado no vetor pSFOXB1, sendo obtidos clones recombinantes confirmados por PCR de colônia. Apesar de certificarmos a presença do gene, a proteína heteróloga não foi detectada na fração solúvel ou insolúvel do lisado dos clones positivos.

Palavras-chave: Leucemias. L-Asparaginase. Produção. Expressão Heteróloga. *Penicillium, Fusarium*.

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase is used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Brazil and worldwide. In Brazil, there is already a treatment protocol developed by the National Cancer Institute (INCA) in 2001, using L-asparaginases of bacterial origin, mainly from *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. In Brazil, there is no record of production of L-asparaginase in the country and the SUS (Unified Health System) has difficulty in its supply since this enzyme is imported. In this scenario, the present research proposal had as its central goal to develop bacterial strains that produce L-asparaginases of fungal origin, *Fusarium proliferatum* and *Penicillium sizovae*, and to evaluate their use in the development of a stable formulation for the treatment of ALL and, thus, contribute to the development of a national process for the production of L-asparaginases on a large scale. The sequences of the asparaginase genes of *P. sizovae* and *F. proliferatum* were synthesized and cloned into the pET28A vector. In the present study, the main goal was to express these genes in *Escherichia coli* using constitutive expression vectors of the pSFOXB series (pSFOXB1, 11 and 15). The L-asparaginase gene of *F. proliferatum* was subcloned into the pSFOXB1 vector, and recombinant clones were obtained and confirmed by colony PCR. Although we confirmed the presence of the gene, the heterologous protein was not detected in the soluble or insoluble fraction of the lysate of the positive clones.

Keywords: Leukemias. L-Asparaginase. Production. Heterologous Expression. *Penicillium, Fusarium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - SEQ Figura * ARABIC 1 - Mecanismo geral da reação da L-asparaginase catalisada.	19
Figura 2 - SEQ Figura * ARABIC 2 - Cronologia da enzima L-asparaginas	21
Figura 3 - Mecanismo de ação da L-asparaginase contra a LLA . Fonte: Camilo, Cãnedo e Cardoso (2022, p.7)	24
Figura 4 - Estrutura 3 D da L-asparaginase de Escherichia coli.....	26
Figura 5 - Estrutura cristalográfica L-asparaginase de E.coli e sítios ativos da L-asparaginas.....	27
Figura 6 - Sequência de aminoácidos da enzima asparaginase II de E. coli cuja estrutura quaternária está representada na figura 5.	30
Figura 7 - Características físicas, químicas e biológicas de L-asparaginases	30
Figura 8 - Mapa do plasmídeo pET28A.....	35
Figura 9 - Promotor bacteriano fraco.....	39
Figura 10 - Promotor intermediário.....	40
Figura 11 - Análise em gel de agarose a 1% dos clones transformantes contendo os vetores pET28aF (com inserto de L-ASNase de Fusarium proliferatum) e pET28aP (com inserto de L-ASNase de Penicillium sizovae). As amostras F1 e P1 estão indicadas pelas setas. Marcad	42
Figura 12 - Gel da digestão de pET28a para liberação dos insertos de L- ASNaseF e L-ASNaseP.....	44
Figura 13 - Gel com a digestão de pSFOXB com as enzimas de restrição para confirmação da presença do inserto de L-ASNase.	45
Figura 14 - Gel de pSFOXB com os insertos e a digestão para verificação a presença dos mesmos.	47
Figura 15 - Avaliação dos clones de Fusarium ok - Minipreps	48
Figura 16 - Proteínas de alto peso molecular obtido da E. coli BL21 (DE3) transformada/ Gel SDS-Page.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da asparaginase do tipo II de E.coli.....	27
Tabela 2 - Grau de identidade entre as sequências de aminoácidos das L-Asparaginases bacterianas (em %)......	31
Tabela 3 - Grau de identidade e similaridade entre as asparaginases: ECA – Asparaginase de E. coli, EWA – Asparaginase de E. chrisanthemi e ASP – Asparaginase de S. cerevisiae clonada e expressa em P. pastoris.	32
Tabela 4 - Tipos de L-asparaginase disponíveis para uso clínico no mundo.	33
Tabela 5 - Quantificação das amostras de F1, F2, P1 e P2.....	55
Tabela 6 - Quantificação das amostras de F2, F3, P2 e P5.....	55
Tabela 7 - Quantificação das amostras OXB 1	55
Tabela 8 - Quantificação das amostras OXB 11	55
Tabela 9 - Quantificação das amostras OXB 15	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D — Tridimensional

ADN – desoxirribonucléico

DF — Distrito Federal

DNA - ácido desoxirribonucleico ELSPAR - L-asparaginase

FAPDF - Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Fig. - Figura

HCP - proteína da célula hospedeira

INCA - Instituto Nacional de Câncer LB - Luria-Bertani

LLA - Leucemia linfoblástica aguda OD - densidade óptica

OXB – Oriented Strand Board

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PEG-ASP – polietilenoglicol-Asparaginase

RMN – Ressonância magnética

RNA - ácido ribonucleico

SUMÁRIO

14

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS RECENTES DA LLA – BRASIL E O MUNDO	18
2.2 MECANISMO CATALÍTICO DA L-ASPARAGINASE NA HIDRÓLISE DA L- ASPARAGINA	19
2.3 DIFERENÇAS ENTRE ASPARAGINASES DE ORGANISMOS EUCARIOTOS E PROCARIOTOS.....	22
2.4 ESTRUTURA DA L-ASPARAGINASE.....	25
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS GENES DE L-ASPARAGINASES.....	35
4.1.1 Obtenção dos genes.....	35
4.1.2 Subclonagem Nos Vetores Constitutivos.....	36
4.1.3 Subclonagem nos vetores de expressão constitutiva pSFOXB1, pSFOXB11 e pSFOXB15	37
4.1.4 Protocolo de ligação e meios para a transformação.....	37
4.2 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA (VETOR-INSERTO)	38
4.3. ANÁLISE DOS CLONES TRANSFORMANTES.....	39
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

5.1 ANÁLISE DOS CLONES TRANSFORMANTES.....	15 46
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

A L-asparaginase (L-asparagina amidahidrolase; EC 3.5.1.1), enzima que catalisa a hidrólise do grupo amida da cadeia lateral da L-asparagina formando ácido aspártico e amônia, é muito aplicada para o tratamento do câncer, especificamente a leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil. A L-asparagina é um aminoácido não essencial em células normais, sendo possível sintetizá-lo por meio da asparagina sintetase. Entretanto, as células tumorais não são capazes de sintetizá-la e por isso necessitam da asparagina presente no soro sanguíneo, sendo para estas um aminoácido essencial. No decurso do tratamento quimioterápico, com o uso de L-asparaginase, a asparagina circulante é transformada em ácido aspártico e amônia, ocasionando eliminação seletiva das células leucêmicas impedindo, assim, sua proliferação (CORREA,2022).

O Brasil enfrenta desafios no abastecimento da L-asparaginase, essencial no tratamento da LLA. A dependência de importações desse medicamento tem levado a iniciativas governamentais para garantir seu fornecimento. Em 2022, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) autorizou, excepcionalmente, a importação direta da L-asparaginase pelo Ministério da Saúde, devido à indisponibilidade no mercado nacional e ao risco de desabastecimento. Além disso, um estudo analisou as compras federais de antineoplásicos no Brasil entre 2004 e 2013, destacando que, diferentemente de outros medicamentos, o preço médio ponderado (PMP) da L-asparaginase aumentou significativamente (117%), refletindo o desabastecimento no mercado mundial. Esses dados ressaltam a necessidade de estratégias para assegurar o fornecimento contínuo da L-asparaginase no país, garantindo o acesso dos pacientes ao tratamento adequado (SILVA AL.,2024).

O tratamento da LLA está associado à ocorrência de eventos adversos (EA) e à mortalidade relacionada à toxicidade dos medicamentos utilizados. Protocolos que incluem a L-asparaginase (L-Asp) têm demonstrado melhor prognóstico, embora esse fármaco, derivado da *Escherichia coli*, possa provocar reações de hipersensibilidade e a formação de anticorpos neutralizantes. Para contornar esses efeitos, a L-Asp produzida por *E. coli* pode ser conjugada ao monometoxipolietilenoglicol, originando a

PEG-asparaginase (PEG-Asp), que apresenta menor imunogenicidade e meia-vida prolongada (CARDOSO; RIBEIRO; SOARES,2023).¹⁷

Além de procariontos, fungos filamentosos são produtores de L-asparaginase (SILVA, 2018). Novas L-asparaginases já foram descritas para os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* (FREITAS,2021; SOLER,2015).

A partir de trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Pérola Magalhães no Laboratório de Controle de Qualidade e Produtos Naturais – Faculdade de Ciências da Saúde; UnB; Brasília (DF), foi mostrada a produção de L-Asparaginase por fungos filamentosos presentes no solo e em espécies vegetais do bioma do Cerrado brasileiro, localizado na região Centro-Oeste. Dois fungos, *Penicillium sizovae* e *Fusarium proliferatum*, foram descritos como produtores de L-asparaginases e então selecionados para dar continuidade no seu estudo como modelo para produção desta enzima para desenvolvimento de formulações para tratamento de LLA em crianças.

O presente estudo consiste no estabelecimento de metodologia de produção de L-asparaginase dos fungos acima citados por expressão heteróloga. Desta forma, este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de tecnologia Nacional para produção desta enzima terapêutica diminuindo a dependência do País por sua importação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS RECENTES DA LLA – BRASIL E O MUNDO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma das principais causas de morte por câncer em crianças e adolescentes em todo o mundo. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, a LLA é responsável por cerca de 30% das mortes por câncer em crianças e adolescentes, sendo a segunda causa mais comum de câncer infantil, atrás apenas do neuroblastoma (NATIONAL CANCER INSTITUTE — NCI, 2021).

No entanto, é importante notar que, nos últimos anos, os índices de sobrevivência para crianças e adolescentes diagnosticados com LLA melhoraram consideravelmente. De acordo com a Sociedade Europeia de Hematologia Pediátrica, a taxa de sobrevivência para crianças e adolescentes com LLA aumentou de cerca de 40% em 1975 para cerca de 85% em 2015 (HOELZER et al., 2016).

Esse aumento na sobrevivência pode ser atribuído aos avanços nos diagnósticos, tratamentos e terapias. Além disso, a criação de programas de rastreamento e vigilância para casos de LLA permite que o diagnóstico seja feito de forma mais precoce, o que justifica o melhor prognóstico observado (GUPTA et al., 2023).

Atualmente, a incidência da LLA no Brasil é de aproximadamente 2,3 casos por 100 mil habitantes por ano. Estima-se que mais de 8.500 brasileiros sejam diagnosticados com essa doença anualmente. De acordo com estudos epidemiológicos realizados no Brasil, ocorre um aumento da incidência da LLA em todas as faixas etárias, sendo que a maior incidência é observada na faixa etária de 0 a 14 anos. Além disso, verificou-se que a maior incidência ocorre em crianças do sexo masculino. A maioria dos casos diagnosticados é da subclasse B da LLA, que é a mais comum nos países desenvolvidos (MUTTI et al., 2018).

2.2 MECANISMO CATALÍTICO DA L-ASPARAGINASE NA HIDRÓLISE DA L-ASPARAGINA

A L-Asparaginase está presente em diferentes organismos, como microrganismos, vegetais e alguns animais. Esta enzima catalisa a hidrólise do aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia. O processo de hidrólise ocorre em duas etapas através de um intermediário: beta-acil-enzima (Fig. 1). Na primeira etapa do processo, o resíduo nucleofílico da enzima é ativado por uma base forte e ataca o átomo de carbono amida da L-asparagina (substrato), gerando um produto intermediário beta-acil-enzima. A segunda etapa da reação é um ataque ao carbono éster feito por um nucleófilo ativado por uma molécula de água (CACHUMBA et.al, 2016, p.1).

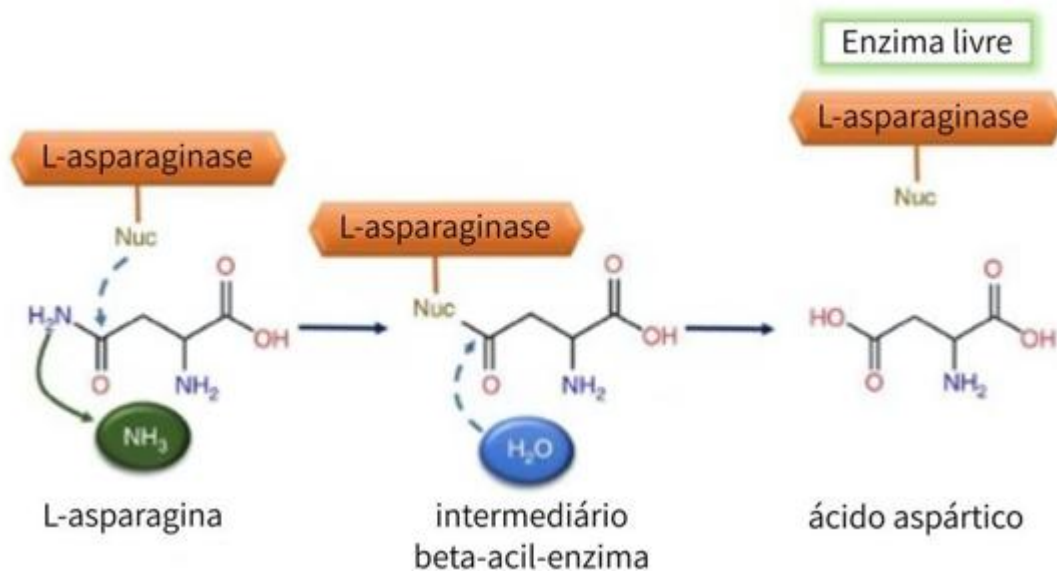


Figura 1 - SEQ Figura * ARABIC 1 - Mecanismo geral da reação da L-asparaginase catalisada. A seta tracejada mostra o ataque nucleofílico
Fonte: Adaptado de Cachumba et.al (2016, p.1).

Atualmente existem três formas dessa enzima disponíveis comercialmente, a produzida por *Escherichia coli*, a produzida por *Erwinia chrysanthemi* e uma forma

20
sintética, a L-asparaginase peguilada de *E. coli*, que contém cadeias de polietilenoglicol (PEG-ASP). No caso do PEG-ASP, a maior vantagem é que a meia-vida é mais longa, pois produz uma maior redução da asparagina e as reações a essa enzima são menores por possuir cadeias de carboidratos que mimetizam as proteínas sintetizadas no corpo. A baixa imunogenicidade associada à enzima peg-asp se deve ao fato de o polietilenoglicol conferir impedimento estérico, formando uma espécie de obstáculo a moléculas muito volumosas, como anticorpos ou enzimas de atividade proteolítica. A associação da enzima ao polietilenoglicol (peguilação) é uma alternativa que tem trazido melhores efeitos relativamente à tolerância pelos organismos dos pacientes. A estratégia foi testada clinicamente pela primeira vez em 1984, sendo aprovada pelo FDA (do inglês *Food and Drug Administration*, agência de controle norte-americana) para o tratamento de pacientes com LLA que apresentaram hipersensibilidade às formas nativas da enzima em 1994 (PEREIRA, 2017).

O interesse nesta enzima surgiu quando foi demonstrado que a L-asparaginase sérica poderia apresentar propriedades antilinfomas (Fig. 2) baseados em trabalho que demonstrou a cura de ratos com linfomas que receberam a administração de soro suínos com essa enzima (MARQUES, SANTOS E MARQUES, 2022, p.3).

A principal característica do câncer é o crescimento descontrolado de células neoplásicas, formando tumores. Tecidos tumorais apresentam dependência do aminoácido L- asparagina para se desenvolver, sendo a obtenção desse aminoácido feita do meio extracelular. Alguns medicamentos quimioterápicos hidrolisam a asparagina em amônia e ácido aspártico, eliminando a fonte sérica de asparagina das células tumorais, causando uma apoptose seletiva. Esse efeito é possível pela presença da enzima asparaginase utilizada como princípio ativo dos medicamentos anticancerígenos. Essa molécula é isolada principalmente da bactéria *E. coli*, porém pacientes têm apresentado efeitos colaterais ao uso de medicamentos que a contém, sendo necessárias novas alternativas farmacológicas (MENEZES; GARCIA; SILVA; LIMA, 2021).

A asparagina é um aminoácido importante para a formação de proteínas, por isso quando esse aminoácido diminui as células blásticas entram em apoptose. Embora essa diminuição da asparagina para ativar a apoptose seja aceita, existem fatores que

são importantes na resposta e podem até modificá-la, assim, vemos que a produção de asparagina pelas células mesenquimais da medula óssea produz um efeito protetor para os blastos (CARDOSO et. al, 2022).

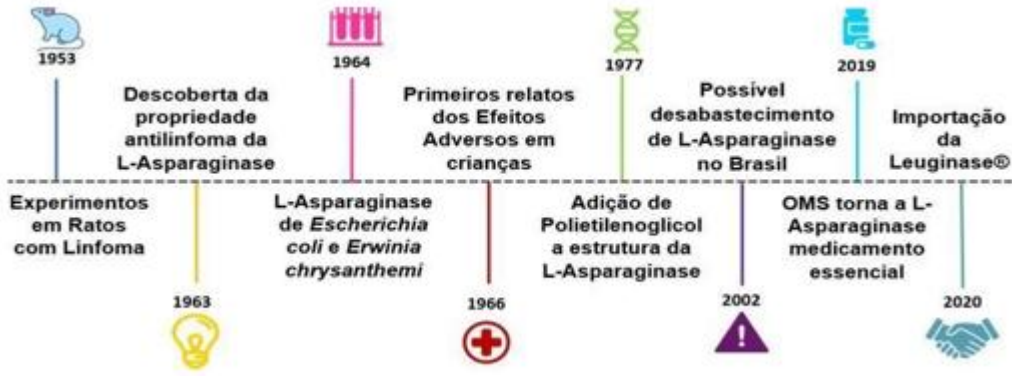


Figura 2 - SEQ Figura * ARABIC 2 - Cronologia da enzima L-asparaginase
Fonte: Camilo, Cãnedo e Cardoso (2022, p.4).

Nos últimos 30 anos, esta enzima vem sendo utilizada em protocolos de quimioterapia para o tratamento de desordens linfoproliferativas e linfomas, particularmente a Leucemia Linfoblástica Aguda- LLA infantil (DA SILVA, CACHUMBA, et al., 2016). A relevância dessa enzima não é apenas limitada ao seu uso como agente antitumoral em humanos, possuindo outras aplicações médicas, como sua utilização como antimicrobiano, no tratamento de doenças infecciosas, de doenças autoimunes e de câncer canino e felino (NARAYANA, 2018). Na indústria alimentícia é utilizada para reduzir a produção de acrilamida em alimentos processados a altas temperaturas (SOLER, 2015).

A aplicação da enzima no tratamento da LLA se baseia no fato de que as células normais do corpo humano são capazes de sintetizar o aminoácido asparagina a partir de aspartato, devido à presença de genes que codificam a enzima asparagina sintetase, sendo esta responsável pela biossíntese de asparagina endógena. No entanto, as células neoplásicas perdem a capacidade de sintetizar asparagina para seu metabolismo e divisão celular, dependendo exclusivamente de fontes exógenas do aminoácido, o captando do plasma sanguíneo. Assim, L-asparaginase, utilizada sozinha

ou combinada com outros medicamentos como vincristina e glicocorticoides (CAMILO²², CÂNEDO, CARDOSO, 2022, p.7).

2.3 DIFERENÇAS ENTRE ASPARAGINASES DE ORGANISMOS EUCARIOTOS E PROCARIOTOS

Vários grupos de pesquisa estudaram a produção e purificação de asparaginase na tentativa de minimizar as reações alergênicas provocadas por seu uso terapêutico (Campbell et al. 1967, Boss 1997, Gallagher et al. 1999). A busca por outras fontes de asparaginase, como microrganismos eucarióticos, pode levar a uma enzima com menos efeitos adversos, já que asparaginases de diferentes organismos apresentam diferenças em suas propriedades bioquímicas. A L-asparaginase de origem fúngica tem mostrado alta atividade enzimática (SHRIVASTAVA et al. 2010) e menos efeitos adversos (PATRO & GUPTA, 2012).

As asparaginases são enzimas responsáveis pela conversão do aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia. Embora a função básica seja semelhante, existem diferenças significativas entre as asparaginases de eucariotos e procariotos, refletindo as distintas complexidades celulares desses organismos. Os procariotos, como *Escherichia coli*, produzem asparaginases com estruturas mais simples. Já os os organismos eucariotos como plantas, fungos e animais possuem asparaginases com estruturas mais complexas, frequentemente compostas por múltiplas subunidades. As asparaginases dos procariotos estão localizadas no citoplasma, devido à ausência de compartimentalização celular. Nos eucariotos, além do citoplasma, essas enzimas podem estar presentes em organelas específicas, como mitocôndrias e cloroplastos, refletindo a compartimentalização celular característica.

As asparaginases dos procariotos são essenciais para a síntese de proteínas e metabolismo de nitrogênio, enquanto nos eucariotos, além dessa função/regulação, as asparaginases estão envolvidas em processos de desenvolvimento e resposta a estresses ambientais, com regulação mais complexa envolvendo múltiplos sinais intracelulares. As asparaginases de origem eucariótica, como as derivadas de plantas ou fungos, apresentam menor imunogenicidade, oferecendo alternativas terapêuticas

com potencial redução de efeitos colaterais. Já as asparaginases de *E. coli* são ²³ utilizadas no tratamento de leucemias, mas podem causar efeitos adversos devido à sua origem não humana e está nessa questão o desafio de alternativas menos imunogênicas (COSTA,2020;GUIMARAES,2019).

Embora as asparaginases de eucariotos e procariotos compartilhem a função básica de metabolizar asparagina, elas diferem em aspectos estruturais, locais de ação, mecanismos regulatórios e aplicações terapêuticas, refletindo as distintas complexidades biológicas de eucariotos e procariotos.

A atividade antitumoral da asparaginase tem como pilar o fato de alguns tipos de células tumorais necessitarem da atividade da L-asparagina sintetase, o que impossibilita a síntese de novo da L-asparagina a partir do ácido aspártico. Quando a L-asparaginase é administrada, a concentração de L-asparagina na corrente sanguínea diminui causando inibição do crescimento na fase G1 do ciclo celular devido ao bloqueio da síntese de proteínas e conseqüentemente a inibição da síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucleico, possibilitando assim a apoptose das células leucêmicas suscetíveis. Os íons amônio (um dos subprodutos da atividade da L-asparaginase) modificam o pH por difusão para o citosol, que ativa a via de transdução do sinal associada à fosforilação de substratos e à apoptose. As células normais não são afetadas, pois sintetizam L-asparagina, através da L-asparagina sintetase, em quantidades suficientes para suas necessidades metabólicas (Fig. 3) (SOUZA, 2019).

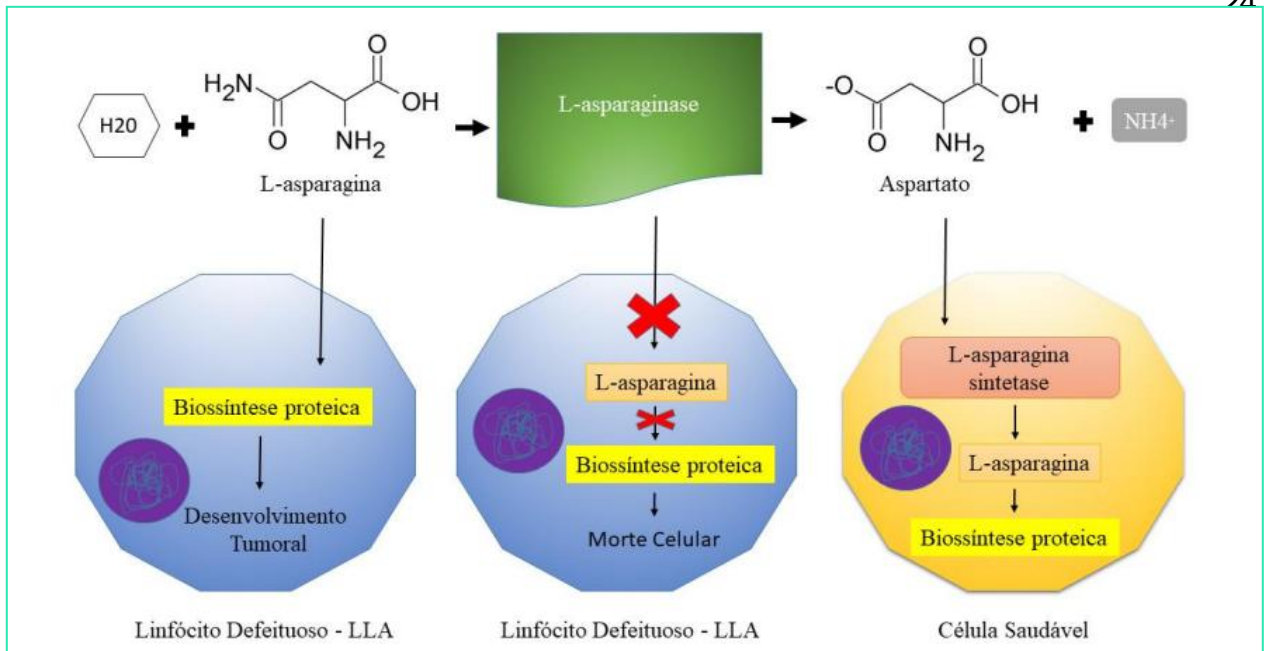


Figura 3 - Mecanismo de ação da L-asparaginase contra a LLA . Fonte: Camilo, Cãnedo e Cardoso (2022, p.7)

No que diz respeito às bactérias, os melhores produtores de L- Asparaginase são membros da família *Enterobacteriaceae*. Por exemplo, na indústria farmacêutica, essa enzima é produzida principalmente a partir de bactérias como *Escherichia coli* e *erwinia carotovora*, (também conhecida como *Erwinia chrysanthemi*), geralmente utilizadas no tratamento de leucemia e linfoma.

As asparaginases de origem fúngicas têm se mostrado uma alternativa promissora às asparaginases de origem bacterianas devido a sua baixa imunogenicidade e menor probabilidade de causar reações alérgicas. Elas são derivadas de fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae*, e têm sido amplamente estudadas por suas propriedades bioquímicas e terapêuticas (CUNHA et al, 2022).

Outra vantagem das asparaginases fúngicas é a possibilidade de modificação genética para aumentar sua eficácia terapêutica e diminuir a toxicidade. Por exemplo, a modificação genética da asparaginase fúngica de *A. oryzae* levou a uma maior eficácia antitumoral e menor toxicidade em modelos de câncer *in vivo* (OTHMAN et al, 2022).

Embora as asparaginases fúngicas tenham mostrado muitas promessas como alternativa às asparaginases bacterianas, ainda há muitas pesquisas a serem feitas para otimizar sua atividade e eficácia. É necessário realizar mais estudos em modelos

animais e ensaios clínicos em humanos para avaliar a segurança e eficácia das asparaginases fúngicas em comparação com as asparaginases bacterianas (OTHMAN et al, 2022).²⁵

2.4 ESTRUTURA DA L-ASPARAGINASE

A L-asparaginase é uma proteína de 443 aminoácidos com uma massa de 50.000 daltons. A enzima é composta por quatro subunidades idênticas, cada uma das quais contém um sítio ativo. O sítio ativo contém um resíduo de cisteína que é responsável pela catálise da hidrólise da asparagina. Estudos posteriores a descoberta da L-asparaginase como agente antineoplásico foram realizados com o intuito de ilustrar a estrutura da enzima, dentre eles o de Campbell et al. (1967) que identificaram a presença de duas isoformas da enzima, sendo L-asparaginase Tipo I e L-asparaginase Tipo II das quais apresentam estruturas bioquímicas e genéticas diferenciadas. A L-asparaginase Tipo I, apresenta uma estrutura quaternária dimérica com baixa afinidade por L-asparagina; a L-asparaginase Tipo II, possui uma estrutura quaternária tetramérica e alta afinidade por L-asparagina. Abaixo a estrutura 3 D ou Estrutura Cristalina da Forma Trigonal da *Escherichia coli* Asparaginase II.



Figura 4 - Estrutura 3 D da L-asparaginase de Escherichia coli
 Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/1IHD> - (PDB - Protein Data Bank) PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb1IHD/pdb>

O estudo da estrutura tridimensional (3D) da L-Asparaginase permitiu uma melhor compreensão do mecanismo de ação da enzima e a identificação de possíveis alvos para a otimização do tratamento contra o câncer. A L-Asparaginase é uma proteína composta por cerca de 300 aminoácidos, dobrada em uma estrutura globular compacta, com vários sítios ativos envolvidos na ligação e hidrólise de L-asparagina (PEREIRA, 2022). A determinação da estrutura 3D da L-Asparaginase tem sido realizada por várias técnicas, incluindo cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN). Esses estudos revelaram detalhes importantes sobre a conformação da enzima, incluindo a localização dos sítios ativos e as interações entre os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise enzimática. Portanto, a compreensão da estrutura 3D da L-Asparaginase pode fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de novos inibidores da enzima, bem como para a engenharia de variantes enzimáticas mais estáveis e eficientes para uso terapêutico.

Característica	Referência de <i>E.coli</i>
Massa Molecular	133 -141 KDa
Subunidades	Aparentemente 4 idênticas de aproximadamente 32 kDa cada uma
Resíduos de Aminoácidos	326

Ponto Isoelétrico	5,66
Meia-vida	1,28 dia IM e 0,76 dia IV

Tabela 1 - Características da asparaginase do tipo II de *E.coli*.
Fonte: BRITO,2017.

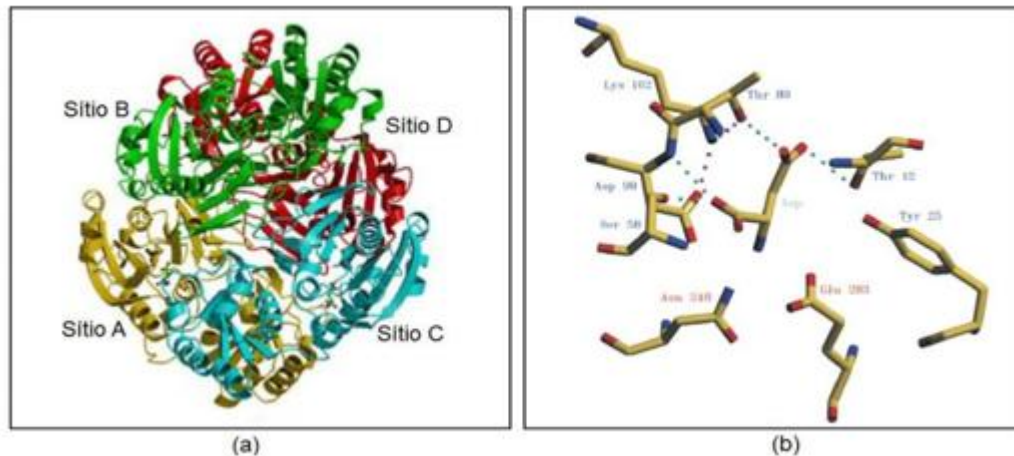


Figura 5 - Estrutura cristalográfica L-asparaginase de *E.coli* e sítios ativos da L-asparaginas

Estrutura cristalográfica da L-asparaginase tipo II de *Escherichia coli*, evidenciando a estrutura quaternária da proteína e as suas sub-unidades A (em amarelo), B (em verde), C (em azul) e D (em vermelho) (adaptado de YUN et al., 2007); sítio ativo da L-asparaginase tipo II de *E. coli* (SWAIN et al., 1993).

As asparaginases bacterianas são as mais amplamente utilizadas em aplicações clínicas e industriais, especialmente na terapia de LLA. As principais fontes bacterianas utilizadas comercialmente são *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (VERMA et al., 2007; BATOOL et al., 2016).

Bioquimicamente, as asparaginases bacterianas apresentam elevada atividade catalítica, com Km (constante de Michaelis-Menten) variando entre 10^{-6} a 10^{-4} M para L-asparagina, o que indica alta afinidade pelo substrato. A atividade específica pode ser bastante elevada, dependendo do grau de purificação e da cepa produtora (VERMA et al., 2007).

O pH ótimo dessas enzimas varia entre 7,0 e 8,5, com boa estabilidade nessa faixa, enquanto a temperatura ótima de atividade geralmente se encontra entre 35 °C e 45 °C. No entanto, algumas variantes recombinantes ou modificadas apresentam

estabilidade térmica aprimorada (BATOOL *et al.*, 2016).

Uma das principais limitações bioquímicas das asparaginases bacterianas é a significativa atividade glutaminásica, ou seja, a capacidade de também catalisar a hidrólise da L-glutamina. Essa atividade não desejada está associada a efeitos colaterais como toxicidade hepática, pancreatite, reações alérgicas e imunossupressão (PATEL *et al.*, 2020). Isso tem impulsionado o desenvolvimento de variantes com menor atividade sobre glutamina, sem comprometer a eficácia terapêutica.

As asparaginases bacterianas geralmente são expressas como proteínas tetraméricas, com massa molecular total entre 130–140 kDa, formadas por subunidades de aproximadamente 33–35 kDa cada. O sítio ativo é altamente conservado e composto por resíduos catalíticos essenciais, como treonina, que participa da formação do intermediário acil-enzima (SWAIN *et al.*, 2013).

Do ponto de vista industrial, a produção de asparaginase por bactérias é vantajosa por permitir cultivo rápido, facilidade de manipulação genética e alto rendimento enzimático. No entanto, as enzimas bacterianas frequentemente requerem etapas de purificação rigorosas para remoção de endotoxinas (em especial as de *E. coli*), além de testes rigorosos de imunogenicidade (SILVA, LIMA, 2017).

A produção de L-Asparaginase terapêutica utilizando a tecnologia de DNA recombinante de *Escherichia coli* tem se mostrado vantajosa devido à alta capacidade de expressão e à produção escalonável de proteínas de interesse por procedimento relativamente barato. A utilização de um vetor constitutivo em *E. coli*, por exemplo, permite a produção contínua da enzima sem a necessidade de indução, além de aumentar a estabilidade do mRNA transcritos e a eficiência da tradução (ROTH *et al.*, 2012).

As asparaginases fúngicas apresentam um conjunto de propriedades bioquímicas que as diferenciam de suas homólogas bacterianas e que podem influenciar diretamente sua aplicação em contextos clínicos e industriais. Essas características incluem parâmetros como atividade específica, estabilidade térmica, pH ótimo, especificidade por substrato e presença ou ausência de atividade glutaminásica (CUNHA, 2020).

Uma das vantagens bioquímicas mais relevantes das asparaginases fúngicas

está relacionada à menor atividade glutaminásica observada em diversas cepas. A atividade sobre a glutamina é indesejada no tratamento oncológico, pois pode acarretar efeitos colaterais como imunossupressão, toxicidade hepática e pancreática (KUMAR ET AL., 2012; EL-NAGGAR *et al.*, 2022). Por esse motivo, a busca por asparaginases com alta especificidade pela L-asparagina e baixa afinidade pela glutamina tem direcionado o interesse para fontes fúngicas.

Em relação ao pH ótimo, as asparaginases fúngicas geralmente atuam de forma eficaz em faixas que variam entre 5,0 e 9,0, dependendo da espécie produtora e das condições de cultivo (BASHA *et al.*, 2009). Essa flexibilidade é vantajosa, especialmente para aplicações em ambientes com diferentes condições fisiológicas ou de processamento industrial.

A temperatura ótima de atividade dessas enzimas também pode variar amplamente, sendo comum encontrar asparaginases fúngicas com boa estabilidade em faixas entre 30 °C e 60 °C (MAYSA *et al.*, 2020). Essa característica é importante para garantir eficiência catalítica em processos que envolvem aquecimento, como na indústria alimentícia.

Do ponto de vista estrutural, as asparaginases fúngicas são geralmente proteínas globulares com massas moleculares que variam entre 30 e 50 kDa, podendo ocorrer na forma de monômeros ou oligômeros, dependendo da espécie produtora (ZUO *et al.*, 2015). A estrutura tridimensional dessas enzimas inclui domínios catalíticos com resíduos essenciais, como serina, treonina ou cisteína, envolvidos na formação do intermediário acil-enzima durante o mecanismo de hidrólise.

Além disso, muitos fungos produzem asparaginase em sua forma extracelular, o que facilita a purificação e o escalonamento do processo, ao contrário de algumas fontes bacterianas cuja enzima é frequentemente intracelular (RAJA *et al.*, 2016).

Essas características bioquímicas fazem das asparaginases fúngicas candidatos promissores tanto para o desenvolvimento de terapias enzimáticas menos imunogênicas quanto para processos industriais otimizados e ambientalmente sustentáveis.

A asparaginase II de *S. cerevisiae* apresenta uma sequência sinal de 25 resíduos de aminoácidos em seu N-terminal, que encaminha a enzima ao espaço periplásmico,

onde é clivada. Assim como todas as proteínas secretadas, a asparaginase II apresenta glicosilação. O sítio ativo da enzima possui os mesmos aminoácidos, treonina, aspartato e lisina (SOUZA,2019).

10	20	30	40	50	60
MEFFKKTALA	ALVMGFSGAA	LALPNITILA	TGGTIAGGGD	SATKSNYTVG	KVGVENLVNA
70	80	90	100	110	120
VPQLKDIANV	KGEQVVNIGS	QDMNDNVWLT	LAKKINTDCD	KTDGDFVITHG	TDTMEETAYF
130	140	150	160	170	180
LDLTVKCDKP	VVMVGAMRPS	TSMSADGPFN	LYNAVVTAAAD	KASANRGVLV	VMNDTVLDGR
190	200	210	220	230	240
DVTKTNTTDV	ATFKSVNYGP	LGYIHNGKID	YQRTPARKHT	SDTPFDVSKL	NELPKVGIVY
250	260	270	280	290	300
NYANASDLPA	KALVDAGYDG	IVSAGVGNNG	LYKSVFDTLA	TAAKTGTAVV	RSSRVPTGAT
310	320	330	340		
TQDAEVDDAK	YGFVASGTLN	PQKARVLLQL	ALTQTKDPQQ	IQQIFNQY	

Figura 6 - Sequência de aminoácidos da enzima asparaginase II de E. coli cuja estrutura quaternária está representada na figura 5.

Fonte: Souza, 2019

Abaixo encontra-se a figura 8 com as características físicas, químicas e biológicas de L- asparaginases produzidas por microrganismos.

Origem	Massa Molecular (kDa)	Tipo	Estrutura	Temperatura (°C)	pH	Atividade Específica (U/mg)	Referência
<i>Bacillus circulans</i>	140	II	Tetrâmero	N.D.	8.6	N.D.	PRAKASHA M et al.,2010
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	70	I	Dímero	85	9.5	3300.0	CHOHAN e RASHID, 2013
<i>Vibrio succinogenes</i>	146	II	Tetrâmero	N.D.	7.3	202.0	DISTASIO et al., 1976
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	34	I	Monômero	37	9.0	723.3	MANNA et al., 1995
<i>Bacillus aryabhatai</i>	155	II	Tetrâmero	40	8.5	647.47	SINGH et al., 2013

Figura 7 - Características físicas, químicas e biológicas de L-asparaginases

Fonte: (VERAS,2017).

No estudo de Paiva (2021), o gene que codifica a L-Asparaginase aplicada como modelo de biofármaco é proveniente da bactéria Gram-negativa *Aliivibrio fischeri*.

Assim como a *E. coli*, esta bactéria apresenta em seu genoma as sequências de dois tipos de L-asparaginase, entretanto esta enzima nunca foi produzida e caracterizada. Uma delas é a L-asparaginase I, codificada pelo gene *ansA*, a qual é citoplasmática e possui baixa afinidade pelo substrato L-Asparagina. Enquanto a L-asparaginase II, codificada pelo gene *ansB* e periplasmática, tem alta afinidade pelo mesmo substrato e, com isso, alto potencial para ser aplicada no tratamento de leucemias.

A Tabela abaixo compara a identidade entre a sequência de aminoácidos das L-asparaginases antileucêmicas comerciais provenientes de *E. coli* (AnsB Ec) e *E. chrysanthemi* (AnsB Ew) com a sequência da L-asparaginase de *A. fischeri* (AnsB Af) e da L-asparaginase I de *E. coli* sem atividade antileucêmica (AnsA Ec).

	AnsB Ec	AnsB Af	AnsB Ew	AnsA Ec
AnsB Ec	100			
AnsB Af	70,9	100		
AnsB Ew	44,6	49,4	100	
AnsA Ec	9,9	11,7	5,5	100

Tabela 2 - Grau de identidade entre as sequências de aminoácidos das L- Asparaginases bacterianas (em %)

Fonte: PAIVA (2021).

Como demonstrado na tabela 2, AnsB de *A. fischeri* possui alta identidade em relação a AnsB de *E. coli* (70,9%) e de *E. chrysanthemi* (49,4%) e baixa identidade com AnsA de *E. coli* (11,7%), indicando alto potencial para atividade antileucêmica.

Já um estudo de 2019 mostrou o grau de identidade e similaridade entre as asparaginases: ECA — Asparaginase de *E. coli*, EWA — Asparaginase de *E. chrysanthemi* e ASP — Asparaginase de *S. cerevisiae* clonada e expressa em *P. pastoris*.

Asparaginase	Identidade (%)	Similaridade (%)
ECA/EWA	47	73,7
ECA/ASP	37,9	64,3
EWA/ASP	43,7	71,4

Tabela 3 - Grau de identidade e similaridade entre as asparaginases: ECA – Asparaginase de *E. coli*, EWA – Asparaginase de *E. chrisanthemi* e ASP – Asparaginase de *S. cerevisiae* clonada e expressa em *P. pastoris*.

Fonte: SOUZA (2019) Apud Girão (2016)

A tabela apresenta alguns dos preparos comerciais de L-asparaginase disponíveis para uso clínico ao redor do mundo.

Nome comercial	Princípio ativo	Países de registro do medicamento
Kidrolase	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Eslovênia, Argentina, França, Israel, Equador, Bulgária
Leunase	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Malásia, Taiwan, Indonésia, China, Japão, Filipinas, Turquia, México, Austrália, Nova Zelândia
Paronal	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Bélgica, Países Baixos
L-Asparaginaze	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Lituânia
LeugiNase	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Brasil, China, Honduras, Peru, Índia, Paraguai
L-Asperone	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Georgia
Laspar	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	África do Sul
Celginase	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Índia
Spectrila	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> recombinante	Alemanha; aprovado para tratamento da LLA nos países membros da União Europeia
Erwinase	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Grécia, Alemanha, Países Baixos, Polônia, França, Nova Zelândia, Suécia

Oncaspar	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> associada ao polietilenoglicol	Países membros da União Europeia, Islândia, Noruega, Bielorrússia, Rússia, Ucrânia, Estados Unidos, Argentina, Brasil
----------	--	---

Tabela 4 - Tipos de L-asparaginase disponíveis para uso clínico no mundo.

Fonte: Juliana Pereira (2017) apud Ascom/Anvisa, 2017; Businesswire, 2016; Committee For Medicinal Products For Human Use, 2015; Drugs.Com; Hospital Pharmacy Europe, 2016.

Dentre as opções demonstradas na tabela em comparação com os processos estudados, a Leuginase® é o biofármaco cuja enzima mais se aproxima da L-asparaginase nativa; em contrapartida, a Oncaspar® representaria o biofármaco com enzima mais parecida com a L-asparaginase monoPEGuilada, embora existam diversas diferenças.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Expressar asparaginases do tipo II de *P. sizovae* e *F. proliferatum* em *E. coli* em vetores de expressão constitutiva, visando à obtenção de enzimas que possam ser futuramente avaliadas quanto à sua aplicação na formulação de biofármacos para tratamento de LLA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter linhagens transformantes de *E. coli* que expressem as L-asparaginases de *P. sizovae* e *F. proliferatum*;
- Avaliar a produção e a atividade das enzimas heterólogas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS GENES DE L-ASPARAGINASES

4.1.1 Obtenção dos genes

Os genes codificadores das L-asparaginases de *P. sizovae* e *F. proliferatum* isolados mantidos na coleção de fungos do Laboratório de Enzimologia da UnB foram sintetizados pela empresa GenOne Biotech (Rio de Janeiro, Brasil). Os genes foram clonados no vetor de expressão pET28A (Figura 9 flanqueados pelos sítios de restrição *NcoI* e *NdeI* na extremidade 5' e *XhoI* na extremidade 3' com código de parada antes da cauda de histidina. A construção foi feita de forma a manter a cauda de histidina na extremidade 5'.

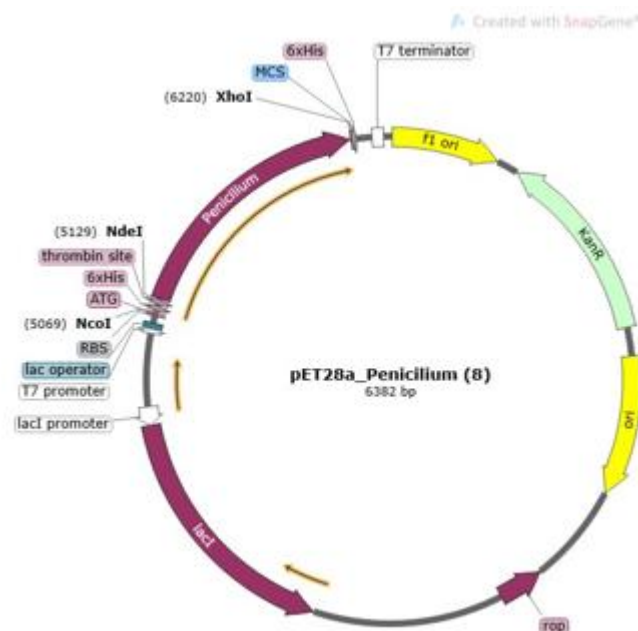


Figura 8 - Mapa do plasmídeo pET28A.

Legenda: Mapa do plasmídeo construído em vetor pET28A utilizado para a clonagem dos genes codificadores das L-asparaginases de *P. sizovae* e *F. proliferatum*.

5.1.2 Subclonagem Nos Vetores Constitutivos

Inicialmente as construções denominadas pET28AF e pET28AP foram utilizadas para a transformação de *E. coli* DH10B por choque térmico (RUSSELL; SAMBROOK, 2001) para amplificação dos plasmídeos. Para tanto, 1 µL (300 ng) de cada uma das construções pET28AF e pET28AP foi adicionado à suspensão de células competentes em tubos plásticos do tipo *ependorf*[®], que foram incubados no gelo por 30 minutos. Em seguida os tubos contendo as células foram incubados a 42°C por 90 segundos e transferidos para o gelo por mais 5 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados 800 µL de meio SOC (Bactotripton 20 g/L; Extrato de Levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCl 50 mM e Glicose 20 mM) e as culturas foram incubadas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após 1 hora de incubação, 50 µL de cada um dos tubos foram inoculados em placas de Petri contendo meio LB sólido (10 g de Tripton, 5 g de Extrato de Levedura, e 5 g de Cloreto de Sódio, 1g de ágar) e canamicina na concentração final de 30 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 16-18 horas.

As colônias emergentes, 5 para cada construção, foram coletadas e transferidas para 10 mL de meio LB líquido (10 g de Tripton, 5 g de Extrato de Levedura, e 5 g de Cloreto de Sódio) com canamicina a 100 µg/mL e incubadas a 37°C. Após 16-18 horas, 2 mL das culturas de 1 clone para a construção pET28AF denominado pET28AF1 e de 1 clone para a construção pET28AP denominado pET28AP1 foram centrifugados a 200 rpm e as células utilizadas na extração de DNA plasmidial utilizando o *Kit* QIAprep Spin Miniprep[®] (Qiagen).

O DNA plasmidial dos clones pET28AF1 e pET28AP1 foram então digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I/*Nco*I e *Xho*I para verificar a presença do inserto.

Verificada a presença do inserto, por eletroforese em gel de agarose, estes clones foram estocados a -80 °C em glicerol a 20% como criopreservante e também utilizados nas etapas seguintes para subclonagem nos vetores de expressão constitutiva.

4.1.3 Subclonagem nos vetores de expressão constitutiva pSFOXB1, pSFOXB11 e pSFOXB15

Uma alíquota da preparação plasmidial acima mencionada foi utilizada para a digestão com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. A digestão foi realizada utilizando-se 1 µL de DNA plasmidial (equivalente a 300 µg), 1 µL das enzimas de restrição *XhoI* (20 U/µL) e *NcoI* (10 U/µL), 1 µL de tampão rCutSmart_(10x) e 1 µL água Milli-Q para completar o volume de 20 µL. A reação foi incubada à 37°C por 3 horas e interrompida pela incubação à 65°C por 20 minutos.

A digestão foi analisada em gel de agarose a 1% utilizando o marcador GeneRuler 1KB DNA Ladder® (Thermo Fisher Scientific). Respetivamente, foram eluídos do gel de agarose utilizando *Kit* da invitrogen (*PureLink Quick Gel Extraction Kit* K2100-12). Para as duas construções a digestão com *NcoI* ou *NdeI* foi feita visando se obter a cauda de histidina e sítio de trombina a montante do gene.

Os vetores de expressão pSFOXB foram digeridos com *NcoI* e *XhoI* a 3', para a subclonagem. Os insertos eluídos e vetores digeridos foram então utilizados na reação de ligação.

4.1.4 Protocolo de ligação e meios para a transformação.

Para realizar a ligação foi necessário tampão da DNA ligase (Tampão T4 10x), vetor (pSFOX 1, 11 e 15), inserto (*Penicillium* e *Fusarium*) e a enzima ligase, sendo o volume final completado com água miliQ.

Os genes codificadores das L-asparaginases de *P. sizovae* e *F. proliferatum* isolados (insertos) eluídos apresentaram uma quantificação de 4,2ng/uL e 14,5ng/uL, respectivamente. Já os vetores pSFOX B1, B11 e B15 apresentaram uma concentração igual a 56un/uL, 92,5ng/uL e 36,5ng/uL, respectivamente.

O protocolo de ligação do inserto ao vetor segue uma proporção calculada pela

fórmula:

$$(vetor\ ng \times tamanho\ inserto\ kb \times proporção\ inserto/vetor) = inserto\ ng.$$

A quantidade de vetor necessária seria 50 ng. Como todos os outros parâmetros da fórmula são constantes, a quantidade em ng de inserto do *Penicillium* ficou 42,82 ng e do *Fusarium* 51,42 ng, constantemente também. São sempre 50 ng dos vetores e sempre 42,82 ng de inserto de *Penicillium* e 51,42 ng de inserto de *Fusarium*. O volume final é 20 µL de acordo com o protocolo, então como o tampão é 10x, acrescentou-se 2µL em todas reações e completou-se o volume de água miliQ até atingir o volume final. Para a enzima, foi utilizada 1U (1µL) por reação.

4.2 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA (VETOR-INSERTO)

As reações de ligação foram realizadas utilizando os vetores pSFOXB1, pSFOXB11 e pSFOXB15, que possuem, respectivamente, promotores constitutivos bacterianos de intensidade fraca, média e forte.

Para a ligação do vetor OXB1 com inserto de *Penicillium*, a reação utilizou 2µL de tampão ligase 10X, 0,89µL (49,9ng totais) de vetor, 10,2µL (42,8ng totais) de inserto, 5,91µL de água MiliQ, 1µL (1U) de enzima ligase, para um volume constante final de 20µL.

Para a ligação do vetor OXB1 com inserto de *Fusarium*, os valores em µL dos reagentes foram os mesmos, exceto para o inserto que foi de 3,55µL (51,4ng totais) e água MiliQ que foi 12,56µL.

Para a ligação do vetor OXB11 com inserto de *Penicillium*, a reação utilizou 2µL de tampão ligase 10X, 0,54µL (49,9ng totais) de vetor, 10,2µL (42,8ng totais) de inserto, 6,3µL de água MiliQ, 1µL (1U) de enzima ligase, para um volume constante final de 20µL.

Para a ligação do vetor OXB11 com inserto de *Fusarium*, os valores em µL dos

reagentes foram os mesmos, exceto para o inserto que foi de 3,55uL (51,4ng totais)³⁹ e água MiliQ que foi 12,9μL.

Para a ligação do vetor OXB15 com inserto de *Penicillium*, a reação utilizou 2μL de tampão ligase 10X, 1,37μL (50ng totais) de vetor, 10,2μL (42,8ng totais) de inserto, 5,43μL de água MiliQ, 1μL (1U) de enzima ligase, para um volume constante final de 20μL.

Para a ligação do vetor OXB15 com inserto de *Fusarium*, os valores em μL dos reagentes foram os mesmos, exceto para o inserto que foi de 3,55μL (51,4ng totais) e água MiliQ que foi 12,08μL.

4.3. ANÁLISE DOS CLONES TRANSFORMANTES

Foi realizado PCR do lisado das bactérias transformadas para análise de transformação e ligação do inserto nos vetores transformados utilizando *primers* para a amplificação de parte da sequência do inserto contendo 254pb para o inserto de *Penicillium* e 344 para o inserto de *Fusarium*.

A reação de PCR foi realizada segundo o protocolo da enzima DNA polimerase termoestável (Cat. número POL-100XS) da empresa cellco — Biotecnologia ao seu alcance (São Carlos, Brasil).

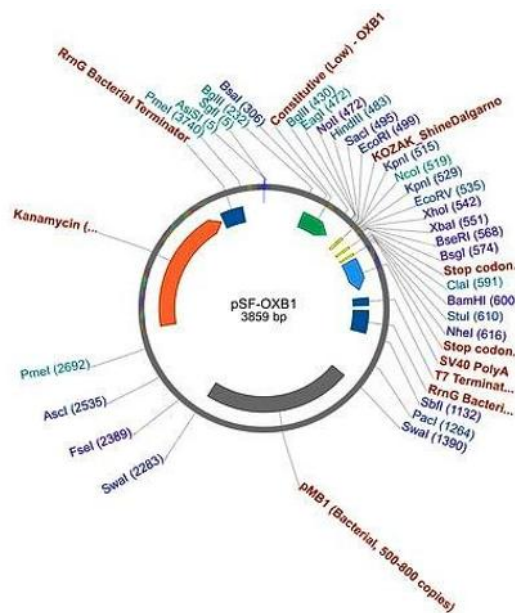


Figura 9 - Promotor bacteriano fraco

-Vetor PSF-OXB1. Fonte: Merck

Legenda: Plasmídeo de PSF-OXB1 - Plasmídeo Promotor Bacteriano De Força Fraca; vetor de clonagem, vetor de expressão, vetor de clonagem molecular, plasmídeo, vetor plasmídeo, vetor.

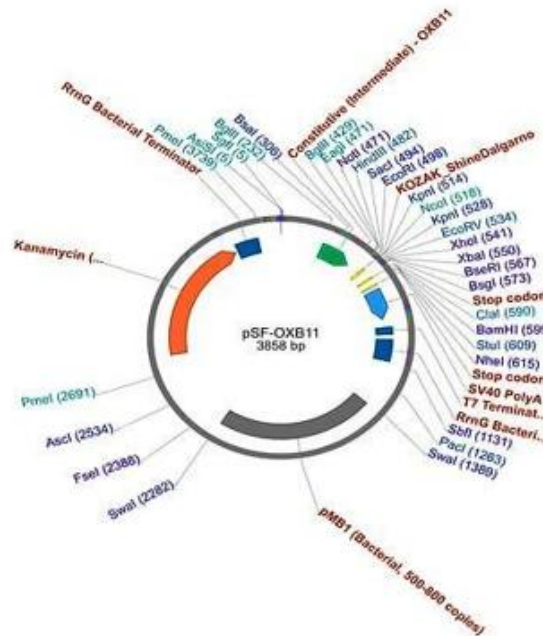


Figura 10 - Promotor intermediário PSF-OXB11. Fonte: Merck

Legenda: Plasmídeo de PSF-OXB11 - Plasmídeo Promotor Bacteriano de média força; vetor de clonagem, vetor de expressão, vetor de clonagem molecular, plasmídeo, vetor plasmídeo, vetor.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Os clones transformantes confirmados por PCR de colônia foram cultivados em meio LB, as células foram centrifugadas e lisadas (sonicador), e ambas as frações, solúvel e insolúvel, avaliadas quanto à presença da proteína heteróloga. A presença da proteína heteróloga foi analisada por eletroforese em gel e pela detecção da atividade da L-asparaginase, utilizando o método de Nessler, que quantifica a liberação de amônia resultante da reação enzimática. Transformantes com o vetor vazio foram utilizados como controle negativo.

As amostras da proteína recombinante serão analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, de acordo com técnica preconizada

por LAEMMLI (1970). Foram analisadas amostras obtidas das culturas de *E. coli*⁴¹ BL21(DE3), transformadas com o plasmídeo pSFOX B1, 11 e 15. De acordo com o volume das amostras, foi adicionado tampão da amostra 4x concentrado (250mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 20% β e 0,008% de azul de bromofenol). As amostras foram homogeneizadas, incubadas por 5 minutos a 100°C, e aplicadas no gel. O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida em tampão (1,875M Tris, pH 8,8 e 1% SDS) e de 5% de poliacrilamida para o gel concentrador em tampão (1,875M Tris, pH 6,8 e 0,5% SDS).

A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 100V por até 80 minutos em temperatura ambiente.

Após a eletroforese, os géis serão transferidos para uma cuba contendo solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,05% de *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 50% de metanol e 10% de ácido acético) e deixados sob baixa agitação por até 20 minutos. A descoloração dos géis será realizada com solução descolorante (30% de metanol e 7% de ácido acético) sob baixa agitação por até 1 hora. Os géis foram conservados em água destilada. A massa molecular da proteína foi estimada com base na seqüência de aminoácidos resultantes do seqüenciamento de DNA de L-asparaginase.

Inicialmente as construções denominadas pET28aF (vetor com o inserto de L-ASNase de *Fusarium*) e pET28aP (vetor com o inserto de L-ASNase de *Penicillium*) foram utilizadas para a transformação de *E. coli* DH10B por choque térmico. As colônias foram coletadas e selecionadas com canamicina. Após a extração de DNA plasmidial, foi utilizado minipreparação para purificação dos vetores.

Os vetores clonados foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da presença do inserto nos vetores, como mostrado na Figura 11.

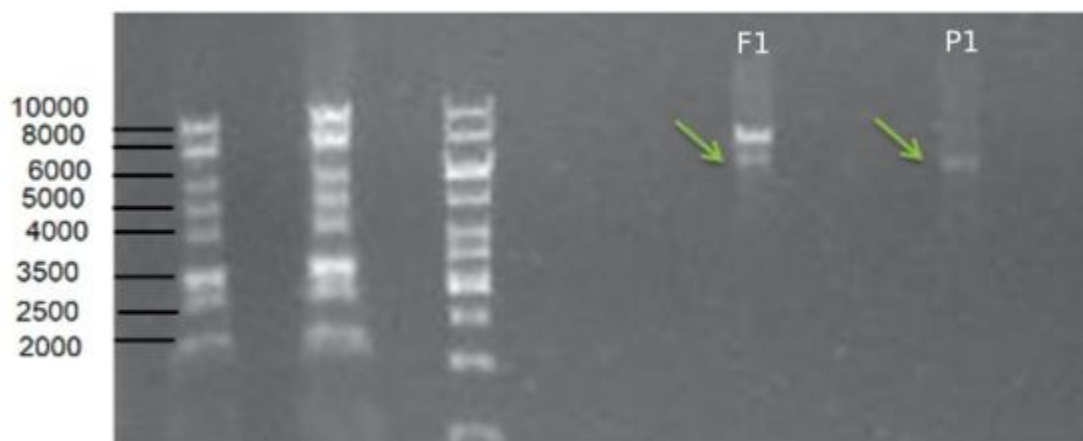


Figura 11 - Análise em gel de agarose a 1% dos clones transformantes contendo os vetores pET28aF (com inserto de L-ASNase de *Fusarium proliferatum*) e pET28aP (com inserto de L-ASNase de *Penicillium sizovae*). As amostras F1 e P1 estão indicadas pelas setas. Marcad

Na figura 12, podemos ver que nos três primeiros poços há marcador de massa molecular 1KB, e nos dois poços seguintes, estão a amostra de pET28aF e pET28aP com massas correspondentes à inserção do gene de L-ASNase dos respectivos fungos. A imagem evidencia uma eletroforese em gel de agarose com diferentes bandas de DNA visualizadas com marcadores de massa molecular à esquerda, o que permite estimar o tamanho dos fragmentos. Duas amostras, identificadas como F1 e P1, estão marcadas com setas. O marcador contém bandas de tamanhos conhecidos (2.000 pb a 10.000 pb), o que serve de referência para estimar o tamanho dos fragmentos nas amostras. A amostra F1 apresenta uma banda próxima de 6.000 pb ou 7.000 pb. Esse tamanho pode indicar a presença

de um fragmento de DNA com um gene de interesse, possivelmente o gene da L-asparaginase isolado de fungo filamentoso. A banda P1 é mais fraca e menor em comparação com F1, estando próxima da faixa de 3.000 pb. A banda está posicionada em um tamanho inferior ao de F1, possivelmente representando um fragmento menor, como o vetor linearizado ou o inserto liberado. A presença de uma banda forte em F1 sugere que a amplificação foi bem-sucedida para essa amostra, indicando que o gene de interesse foi isolado com o tamanho esperado, próximo de 5.000 pb. A diferença na intensidade entre F1 e P1 pode indicar variações na quantidade de DNA amplificado ou diferenças no tamanho dos produtos. Se P1 foi uma tentativa de amplificar uma variante do gene da L- asparaginase, a menor intensidade poderia sugerir uma menor eficiência de amplificação ou menor concentração de DNA nessa amostra. Para confirmar que as bandas correspondem ao gene de L-asparaginase, recomenda-se realizar uma análise adicional, como digestão enzimática, sequenciamento do DNA ou uma reação de PCR específica. Esses dados são promissores para a continuação dos estudos de clonagem e expressão em *Escherichia coli* para a produção da L-asparaginase de interesse.

Na figura 13, há um gel de eletroforese de digestão do vetor pET28a, indicando a liberação dos fragmentos (inserções) correspondentes a genes de L-asparaginase (L-ASNaseF e L-ASNaseP). Na imagem está presente o marcador de massa molecular, utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA e com bandas conhecidas, como 1.000 pb, 1.500 pb, 3.000 pb, 4.000 pb, e 6.000 pb. Além disso estão as amostras 1, 2, 3 e 4: Cada amostra parece conter produtos de digestão do vetor pET28a correspondentes genes de L-asparaginase, o que é evidenciado pela presença de fragmentos adicionais em cada poço.

As setas apontam para bandas entre aproximadamente 1.000 e 1.500 pb, que correspondem ao tamanho esperado dos fragmentos de inserção (genes L-ASNaseF e L-ASNaseP). Esses fragmentos foram liberados do vetor após a digestão enzimática, confirmando que os genes foram inseridos corretamente no vetor. No vetor linearizado há bandas maiores acima de 4.000 pb, visíveis em cada amostra, representam o vetor pET28a linearizado após a digestão. Esse vetor tem um tamanho esperado de aproximadamente 5.000 pb, o que está de acordo com as bandas observadas.

A presença de bandas distintas tanto para o vetor quanto para os fragmentos de inserção em todas as amostras indica que a digestão enzimática foi bem-sucedida, liberando os genes de L-asparaginase do vetor pET28a. A presença dos fragmentos no intervalo de 1.000 a 1.500 pb nas quatro amostras (1, 2, 3 e 4) confirma que os genes L-ASNaseF e L-ASNaseP foram inseridos com o tamanho esperado. Isso é um indicativo de que o processo de clonagem foi realizado corretamente, e os genes estão presentes no vetor. Com a confirmação da presença dos genes, pôde-se prosseguir com a expressão em *Escherichia coli* para verificar a produção de L-asparaginase.

A figura 12 mostra o perfil de restrição dos plasmídeos de pET28a contendo o inserto do gene de L-Asparaginase, com tamanho em torno de 1100pb, em gel de agarose 1%. Como mostrado na figura, temos marcador de massa molecular no primeiro poço do gel, posteriormente as amostras de *Penicillium* e *Fusarium*.

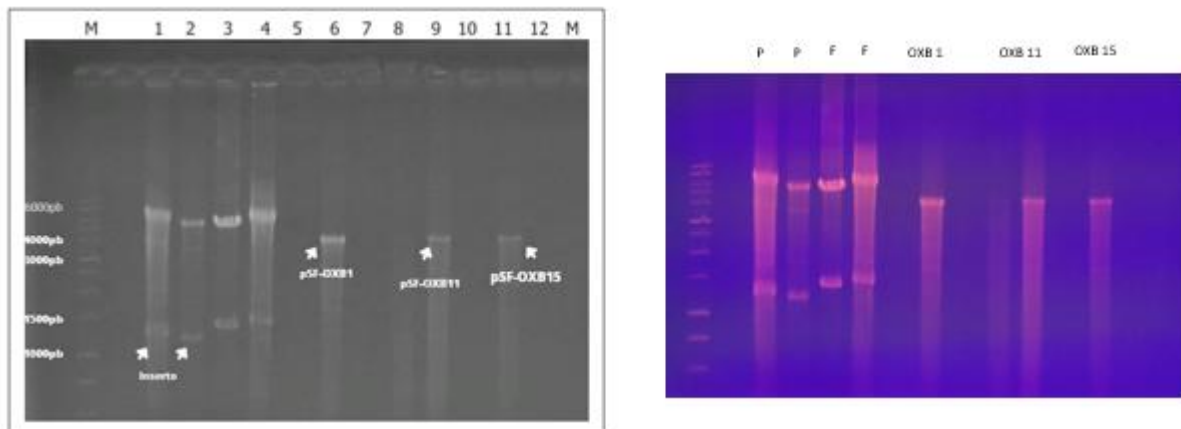


Figura 12 - Gel da digestão de pET28a para liberação dos insertos de L- ASNaseF e L-ASNaseP

Legenda: Perfil de restrição dos plasmídeos de pET28a contendo o inserto do gene de L-Asparaginase, com tamanho de 1100pb, em gel de agarose 1%. Marcador no primeiro poço do gel, posteriormente as amostras de *Penicillium* e *Fusarium*. As últimas amostras são os Vetores pSF – OXB1, B11 e B15 linearizados, com tamanho de 3857 pb.

Nosso próximo passo foi digerir os insertos e os plasmídeos pSFOXB1, 11 e 15 com as enzimas de restrição NcoI e XhoI ou NdeI e XhoI para posterior clonagem dos insertos de L-ASNase de *Fusarium* e *Penicilium* nestes vetores.

Após ligação destes insertos nos respectivos vetores, foi feito mini e maxipreparação das amostras. Então, fizemos a digestão dos vetores clonados com as enzimas de restrição para verificar a presença dos insertos nos plasmídeos.

Como mostrado na figura 13, pode-se observar os poços M indicando os marcadores de massa molecular.

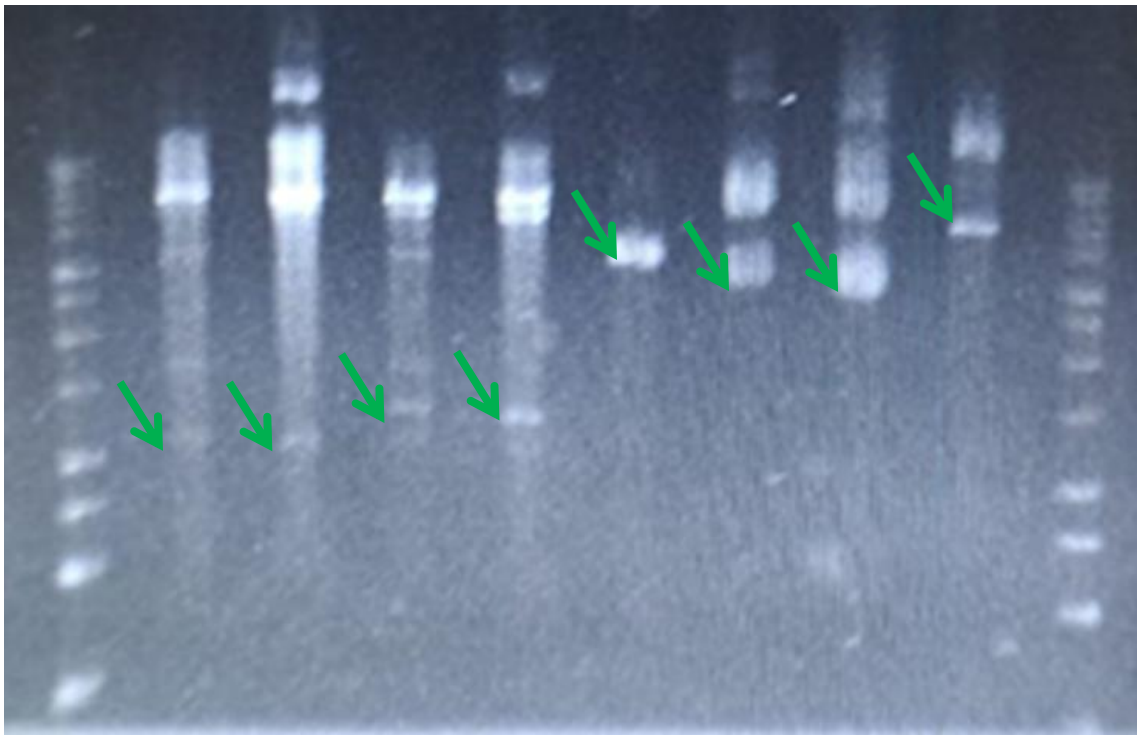


Figura 13 - Gel com a digestão de pSFOXB com as enzimas de restrição para confirmação da presença do inserto de L-ASNase.

Legenda: Poço 1 - Marcador (3uL + 1uL de tampão) / Poço 3 - P2 NcoI/XhoI (11uL + 2uL de tampão) / Poço 5 - P2 NdeI/XhoI (12uL + 2uL de tampão) / Poço 7 - F4 NcoI/XhoI (10uL + 2uL de tampão) / Poço 9 - F4 NdeI/XhoI (10 uL + 2uL de tampão) / Poço 11 - OXB 1 (7 uL + 2 uL de tampão) / Poço 13 - OXB11 (7uL + 2 uL de tampão) / Poço 15 - OXB 15 (7uL + 2 uL de tampão) / Poço 17 - pET28a (7uL + 2 uL de tampão) / Poço 19 – marcador novamente.

No gel de eletroforese de digestão do vetor pSFOXB utilizando enzimas de restrição verifica-se a presença do inserto de L-asparaginase (L-ASNase). A presença de bandas de tamanho consistente em várias amostras (1 a 8), próximas de 1.500 pb,

confirma que o gene L-ASNase foi inserido corretamente no vetor pSFOXB e liberado⁴⁶ com sucesso pela digestão enzimática. Isso indica que a clonagem foi bem-sucedida. A presença de bandas claras e bem definidas em cada poço sugere uma digestão eficiente com as enzimas de restrição, pois os fragmentos esperados foram liberados e visualizados no gel. Isso indica que as enzimas segmentaram nos locais corretos, liberando o inserto de L-ASNase do vetor.

Os resultados confirmam que o gene de L-asparaginase foi inserido com sucesso no vetor pSFOXB e que a construção pode ser utilizada em experimentos de expressão e purificação da enzima. A presença do gene de L-ASNase em todas as amostras analisadas sugere uma boa estabilidade e reprodutibilidade do processo de clonagem.

A última banda de baixo para cima seria a do inserto. *NcoI* e *XhoI* realmente são insertos maiores, pois *NcoI* está mais a 5' quando comparado ao *NdeI* no vetor, mas a digestão ainda foi parcial, principalmente com *Penicillium NcoI* e OXB1.

Foram necessárias análises e confirmações das clonagens através das corridas em gel de agarose e estimativa dos tamanhos das bandas das amostras comparadas aos marcadores. Foram realizadas corridas com os plasmídeos digeridos e não digeridos com as enzimas de restrição específicas, além das confirmações das sub-clonagens.

5.1 ANÁLISE DOS CLONES TRANSFORMANTES

O próximo gel, mostrado na figura 14, mostra todos os plasmídeos obtidos de transformações em bactérias com os vetores contendo o inserto (de três densidades ópticas diferentes) para identificar corretamente que o vetor acrescia o peso do inserto de, aproximadamente, 1100pb.

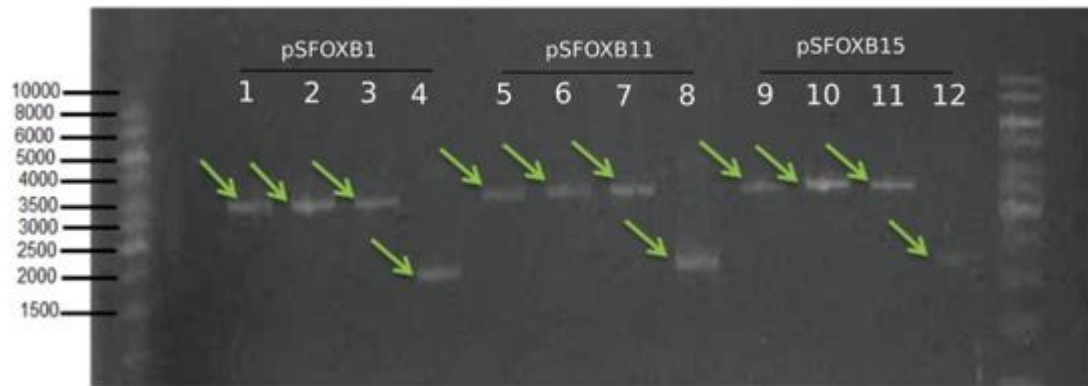


Figura 14 - Gel de pSFOXB com os insertos e a digestão para verificação a presença dos mesmos.

Legenda: Como pode-se observar na figura 15, temos nos poços 1, 2 e 3 o vetor pSFOXB1 de três transformações e crescimentos distintos (três densidades ópticas) contendo o inserto. O poço 4 mostra o vetor vazio. Os poços 5, 6 e 7 o vetor pSFOXB11 de três transformações e crescimentos distintos (três densidades ópticas) contendo o inserto. O poço 8 mostra o vetor vazio. Já os poços 9, 10 e 11 o vetor pSFOXB15 de três transformações e crescimentos distintos (três densidades ópticas) contendo o inserto. O poço 12 mostra o vetor vazio.

A análise da digestão dos plasmídeos pET28AP e pET28AF confirmou a inserção do gene de interesse. Neste estudo, buscamos otimizar a produção de asparaginase a partir de leveduras e coli, visando sua viabilidade e eficácia em uma escala de produção para uso biofarmacêutico. Para isso, selecionamos e clonamos o gene L- asparaginase proveniente de *P. sizovae* e *F. proliferatum* nos vetores pET28a e subclonamos utilizando vetores PSF-OXB1, PSF-OXB11 e PSF-OXB15, que possuem diferentes intensidades de ação dos promotores OXB de indução (fraco, médio e forte, respectivamente).

O gel de digestão do vetor pSFOXB com as enzimas de restrição confirma a presença do gene L-ASNase, indicada pelas bandas com tamanhos superiores a 3.500 pb em todas as amostras analisadas (Figura 15). Esses resultados são fundamentais para avançar com a expressão do gene em sistemas heterólogos, visando a produção e purificação da L-asparaginase.

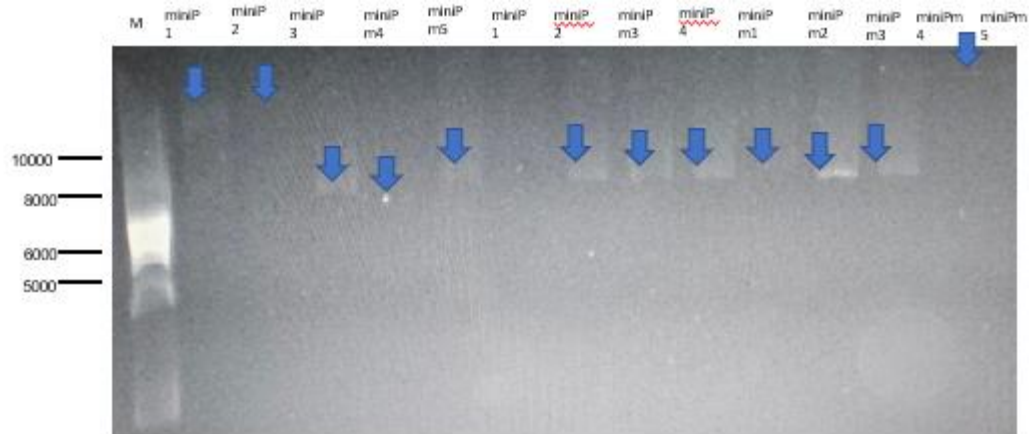


Figura 15 - Avaliação dos clones de *Fusarium ok* - Minipreps

A figura 15, apresentada mostra um gel de eletroforese com amostras de vetores clonados (pSFOXB1, pSFOXB11 e pSFOXB15) submetidos a digestão enzimática, com o objetivo de verificar a presença dos insertos. O Marcador de massa Molecular (ladder) está localizado nos extremos do gel (faixas 1 e 13), serve como referência para o tamanho dos fragmentos de DNA. Os tamanhos variam de 1.500 pb a 10.000 pb, permitindo a comparação com as amostras. O pSFOXB1 (poços 1 a 3) apresentam bandas de diferentes tamanhos, com as principais destacadas por setas verdes com bandas próximas de 3.000–4.000 pb sugerem a presença do vetor com inserto. O pSFOXB11 (poços 5 a 7) também mostram bandas principais destacadas, próximas de 3.000–4.000 pb. Indicam que o inserto está presente neste vetor. O pSFOXB15 (poços 9 A 11) apresentam bandas claras e nítidas de tamanhos similares às amostras anteriores e também sinalizam a presença do inserto no vetor. As bandas próximas de 3.000–4.000 pb em todas as amostras indicam que os genes de interesse (provavelmente L-asparaginases) foram inseridos corretamente nos vetores clonados. A presença de bandas consistentes entre os vetores pSFOXB1, pSFOXB11 e pSFOXB15 sugere que o processo de clonagem foi bem-sucedido para as três variantes. As bandas bem definidas indicam que a digestão enzimática foi eficiente, permitindo a liberação dos fragmentos de interesse. Todos os vetores (pSFOXB1, pSFOXB11 e pSFOXB15) apresentam resultados semelhantes, com tamanhos de bandas que correspondem ao vetor completo com o gene inserido. Os resultados do gel confirmam que os genes

foram clonados corretamente nos vetores pSFOXB1, SFOXB11 e pSFOXB15.⁴⁹ A digestão enzimática revelou fragmentos de tamanhos esperados, confirmando a presença dos insertos (figura 15). Com os vetores confirmados, as próximas etapas devem incluir a transformação em *E. coli* e a análise da expressão dos genes clonados.

Em nosso trabalho, os resultados obtidos mostraram que os vetores PSF-OXB1 e PSF-OXB11 apresentaram maior eficiência, com bandas mais intensas nas análises de inserção do fragmento da L-asparaginase em comparação com o vetor de forte expressão, PSF-OXB15. Bradley et al. (2022) realizaram uma subclonagem do gene *hedH4* de pBG102 em pSF-OXB1, utilizando sítios de restrição *NcoI* e *XbaI*. O vetor pSF-OXB1 foi escolhido pois contém um gene de resistência à canamicina e permite a expressão constitutiva de baixo nível do promotor, o mesmo utilizado neste estudo para uma baixa intensidade de ação dos promotores OXB de indução. A pesquisa de Jonkers et al. (2020) também utilizou como promotores de força intermediária o pSF-OXB11 apresentando bons resultados, corroborando com os achados do presente estudo. Várias possíveis causas foram consideradas para explicar a menor eficiência observada no vetor PSF-OXB15. Uma delas é o tamanho do fragmento de L-asparaginase inserido. Fragmentos muito grandes podem ser mais difíceis de serem clonados de forma precisa no vetor, o que poderia ter impactado negativamente na eficiência da clonagem no PSF-OXB15. Além disso, elementos regulatórios específicos presentes no vetor PSF-OXB15 podem ter entrado em conflito com o fragmento de L-asparaginase, afetando sua expressão ou clonagem.

Esses resultados sugerem que, para a produção de L-asparaginase recombinante, os promotores de indução fraca e média são mais adequados, proporcionando uma expressão controlada e eficiente da enzima. Essa descoberta é relevante, pois destaca a importância de escolher o promotor adequado para evitar problemas de toxicidade celular e facilitar a purificação da proteína. Assim como concluíram Terol et al. (2021) que promotores e a força associada a eles são essenciais para o ajuste da expressão de proteínas de interesse.

No entanto, é fundamental destacar que ainda são necessários estudos adicionais para aperfeiçoar a produção em larga escala da enzima L-asparaginase.

Estudos anteriores, como os de Doriya et al. (2016) e Garcia et al. (2023), já

investigaram diferentes estratégias para otimizar a expressão da L-asparaginase recombinante em leveduras, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento nessa área. O trabalho de Freitas et al. (2022) também ressalta a importância de desenvolver métodos mais eficientes e práticos para a produção em larga escala dessa enzima e foi um estudo pioneiro na produção de asparaginase advindo de *P. sizovae* pelo vetor indutivo pPICZαA.

Observou-se que, inicialmente, a corrida em gel de agarose não foi eficiente para visualizar as bandas que apresentam os fragmentos de DNA, o que levou à necessidade de novas corridas em gel de agarose. Esse tipo de situação é comum e pode estar relacionado a diversos fatores, como concentração de DNA, intensidade de corante utilizado, tamanho dos fragmentos analisados, entre outros. Após nova corrida em gel de agarose contendo o DNA alvo, foi possível observar a presença das bandas esperadas, indicando que o processo de clonagem foi bem sucedido. As presenças de bandas específicas indicaram que as amostras clonadas continham o fragmento de DNA esperado (figura 14), correspondente ao gene de L-asparaginases de *P. sizovae* e *F. proliferatum*.

Portanto, a análise em gel de agarose mostrou-se uma técnica útil e eficiente para verificar a presença dos genes clonados nos vetores de expressão, garantindo a qualidade do material utilizado para o próximo passo do processo de expressão heteróloga e avaliação das enzimas recombinantes.

O papel da eletroforese em gel de agarose no contexto da clonagem do gene da L-asparaginase é fundamental para verificar a presença e a integridade dos fragmentos de DNA clonados nos vetores de expressão.

A clonagem do gene L-asparaginase envolve a inserção desse gene em um vetor de expressão, que é um segmento de DNA usado para transportar o gene de interesse para as células hospedeiras. Nesse caso, o gene L-asparaginase do fungo foi clonado em um vetor contendo um promotor constitutivo. Isso significa que, uma vez dentro das células hospedeiras (*E. coli*), o promotor constitutivo inicia a transcrição do gene, levando à produção da enzima L-asparaginase.

Após a clonagem do gene L-asparaginase no vetor de expressão, é necessário confirmar se os fragmentos de DNA clonados estão presentes e se a inserção foi bem-

sucedida. Isso é feito através da análise de eletroforese em gel de agarose.

Neste trabalho, dois genes de asparaginases provenientes dos microrganismos de *P. sizovae* e *F. proliferatum* foram eficientemente ligados em plasmídeo de expressão pSFOXB e clonados em *E. coli*. Os clones positivos foram confirmados por análise de PCR e gel de agarose a 1%.

Algumas clonagens foram bem-sucedidas, onde os insertos gênicos que codificam a asparaginase foram visualizados no tamanho esperado entre 6.000 e 10.000 e pb. Considerando as etapas descritas anteriormente, é possível afirmar que todas elas são fundamentais para o sucesso do projeto de obtenção de enzimas de origem eucariótica.

A clonagem do gene da L-asparaginase de origem eucariótica nos vetores pSFOXB por meio de digestão e clivagem do DNA plasmidial permitiu a obtenção de construções adequadas para a expressão da proteína de interesse.

A digestão foi utilizada para a transformação das células bacterianas com o vetor contendo o gene da L-asparaginase de origem eucariótica, possibilitando futuramente a produção da proteína de interesse em larga escala. Além disso, a técnica de extração e clivagem do DNA plasmidial permitiu a obtenção de DNA puro e adequado para a clonagem.

Todas essas etapas foram importantes para o sucesso do projeto, pois permitem a obtenção de construções adequadas para a expressão da proteína de interesse e a transformação das células bacterianas com o vetor. Com isso, é possível obter uma produção mais eficiente e com menor toxicidade da enzima, contribuindo para o desenvolvimento de uma formulação estável para os testes no tratamento de Leucemia Linfoblástica.

É interessante frisar que a confirmação de clones positivos tanto nos clones de pET28a quanto nos subclones de pSFOXB é um indicativo importante de que a clonagem do gene da L-asparaginase de origem eucariótica foi bem-sucedida. A presença do inserto no vetor é fundamental para a produção da proteína de interesse e a confirmação da sua presença nos clones obtidos é um passo importante para a continuidade do projeto. A partir desses clones positivos, é possível prosseguir com a análise da produção da proteína de interesse, bem como dos seus efeitos e possíveis

aplicações.

Os resultados das corridas em gel de agarose demonstraram que, realmente, o inserto está no vetor pela análise do tamanho da banda, com número de aproximadamente 6.000 pares de bases, que é total do vetor vazio com o gene de L-asparaginase (6.382pb). O tamanho dos vetores constitutivos são aproximadamente

4.000 pb (3.859 = psfoxb1, 3858 = psfoxb11, 3.857, psfoxb15) e o tamanho do inserto 5.369bp. Ainda na figura 14, a seta no poço 1, mostra os fragmentos de 6000 bp, 2000 bp, esses fragmentos são os esperados quando há a clivagem com as enzimas de restrição, que são do vetor e do inserto. Esses fragmentos são os esperados quando o fragmento gênico é adicionado no vetor, o que confirma neste caso, que o fragmento gênico é capaz de expressar a proteína L-asparaginase por estar inserido no vetor. Essas evidências podem ser usadas em conclusões e perspectivas futuras.

O fragmento gênico de L-asparaginases foi amplificado na expressão heteróloga. Foi possível também clivar os vetores com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*, bem como foi possível fazer a ligação do inserto/vetor, portanto é válido expressar a L-asparaginase em sistema de expressão heteróloga usando *E. coli* BL21(DE3) e nos subclones pSFOXB 1, 11 e 15.

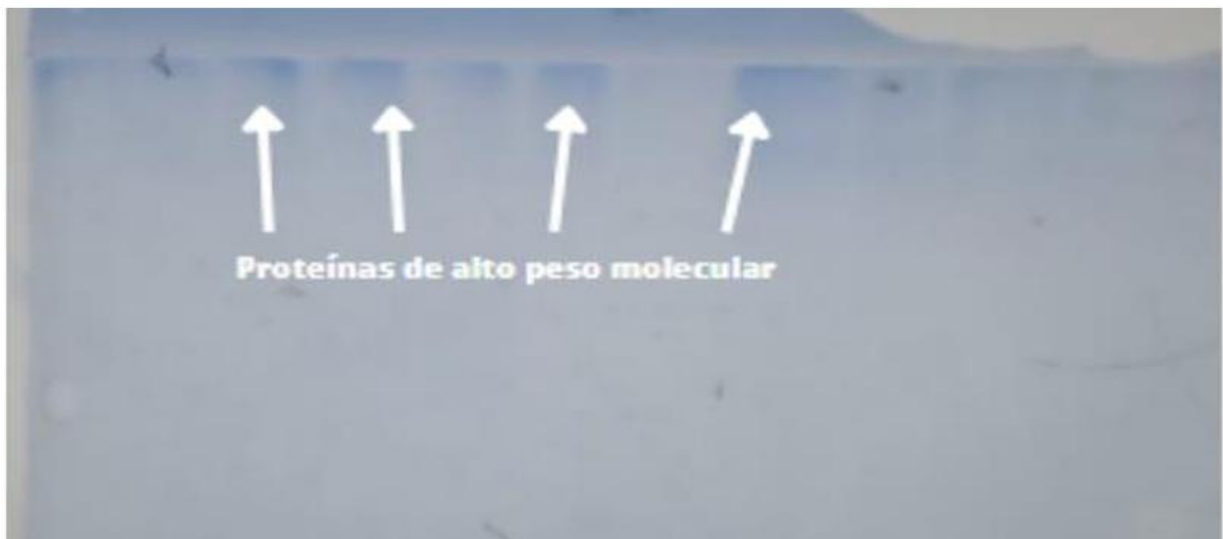


Figura 16 - Proteínas de alto peso molecular obtido da *E. coli* BL21 (DE3) transformada/ Gel SDS-Page

Durante o desenvolvimento deste trabalho, a etapa de clonagem do gene que codifica a enzima L-asparaginase mostrou-se como um grande desafio e uma experiência ímpar de aprendizagem.

O vetor pET-28a(+) confere à proteína a fusão de uma cauda de seis histidinas na região N-terminal, o que facilitaria os ensaios de purificação. O insucesso na clonagem direta do produto de PCR ao vetor pET-28a (+) levou a testar várias hipóteses, como a eficiência das competências e das enzimas: DNA polimerase recombinante nas reações de PCR de colônia e enzimas de restrição nas reações de digestão. Todas as hipóteses foram analisadas: a eficiência da competência das bactérias, diferentes lotes de DNA polimerase e de ligase, e no último caso, avaliação de contaminações na etapa de transformação. Além disso, foi realizada uma análise da eficiência das enzimas *NdeI*, *NcoI* e *XhoI* na clivagem dos *primers* desenhados.

Para possibilitar a ligação no vetor de clonagem, é necessário que o produto de PCR possua nucleotídeos de adenina (A) nas suas extremidades. Diante dos fatos relatados, foi necessário traçar nova estratégia de clonagem e repeti-las autoclavando todos os itens a fim de evitar contaminação no processo.

O vetor pET28(+) é um vetor de expressão amplamente utilizado em estudos de biologia molecular e engenharia genética. Ele é derivado do plasmídeo pBR322 e contém várias características úteis para a expressão de proteínas em *Escheria coli* (*E. coli*). Esse plasmídeo foi modificado para incluir elementos de expressão de proteínas. O vetor pET28(+) contém genes de resistência a antibióticos, como a resistência à canamicina e ampicilina. Isto permite selecionar células bacterianas que incorporaram o vetor através do crescimento em meio de cultura contendo o antibiótico apropriado. O vetor pET28a (+) possui um promotor T7 lac, que permite a expressão induzível de proteínas utilizando o sistema de transcrição T7. O promotor T7lac é ativado pela enzima RNA polimerase T7, que é introduzida nas células hospedeiras através de um sistema de expressão complementar. O vetor pET28(+) possui múltiplos sítios de clonagem, onde o gene de interesse pode ser inserido. Os sítios de clonagem mais comumente usados são *NdeI*, *NcoI* e *XhoI*, que permitem a inserção do gene na posição correta em relação ao promotor e sequência de iniciação da tradução. O vetor pET28(+) possui uma sequência de codificação para a tag de afinidade de histidina de

seis resíduos (6x His) no terminal C da proteína recombinante (PORTUGAL,2014).

Diversos métodos químicos foram estabelecidos para induzir a transformação de células bacterianas. Atualmente, os métodos mais amplamente empregados incluem o tratamento com CaCl₂ para *E. coli* e a transformação de protoplastos bacterianos induzida por polietilenoglicol (PEG). A existência desses métodos tem contribuído significativamente para nosso conhecimento atual sobre a genética de *E. coli* e *B. subtilis*.

As bactérias portadoras de plasmídeo podem ser selecionadas em placas com nutrientes contendo o antibiótico. As bactérias sem plasmídeo morreram. Cada bactéria sobrevivente deu origem a bactérias idênticas em que todas carregam o mesmo plasmídeo.

A incorporação do gene de resistência à canamicina revelou-se uma ferramenta inestimável ao assegurar a sobrevivência somente das células que efetivamente incorporaram o vetor contendo o gene de interesse. Essas células puderam então proliferar em um meio contendo o referido antibiótico. Esse mecanismo assegurou a manutenção adequada e a expressão contínua do gene de interesse nas células bacterianas, conferindo uma maior confiabilidade e controle ao processo de produção de proteínas recombinantes.

No presente estudo, foram testadas transformações nas espécies XL 10 Gold e DE 3 (em concentrações de 50 e 100 uL) que demonstram eficientemente a incorporação do plasmídeo de resistência, tanto para as amostras de *Fusarium* quanto *Penicillium*.

Foram realizadas quantificações de DNA das amostras. Os resultados com maior concentração foram escolhidos para a corrida em gel de agarose. A fluorescência é proporcional à concentração de DNA e pode-se determinar a quantidade de DNA através da eletroforese em gel de agarose, por comparação com padrões conhecidos, justamente o intuito da pesquisa para verificar o sucesso da transformação da *E. coli* e a incorporação do plasmídeo de pSFOXB.

Amostra	Concentração	Relação 260/280	Relação 260/230

1 - F1	44,5 ng/μL	1,884	1,294
2 - F2	39,5 ng/μL	1,837	1,234
3 - P1	54,0 ng/μL	1,895	1,612
4 - P2	46,0 ng/μL	1,917	1,278

Tabela 5 - Quantificação das amostras de F1, F2, P1 e P2.

Amostra	Concentração	Relação 260/280	Relação 260/230
Fusarium (F2)	48 ng/μL	1,897	1,043
Fusarium (F3)	405 ng/μL	1,688	1,985
Penicilum (P2)	42 ng/ μL	1,743	0,808
Penicilum (P5)	1.186 ng/μL	1,768	2,268

Tabela 6 - Quantificação das amostras de F2, F3, P2 e P5

Amostras OXB 1			
Amostra	Concentração	Relação 260/280	Relação 260/230
1	94	1,885	1,895
2	113	1,915	1,548
3	66	1,950	1,404

Tabela 7 - Quantificação das amostras OXB 1

Amostras OXB 11			
Amostra	Concentração	Relação 260/280	Relação 260/230
1	93	1,979	1,453
2	87	1,977	1,554
3	76	1,949	1,551

Tabela 8 - Quantificação das amostras OXB 11

Amostras OXB 15			
Amostra	Concentração	Relação 260/280	Relação 260/230
1	63	1,944	1,662
2	162	1,952	1,884
3	123	1,892	1,618

Tabela 9 - Quantificação das amostras OXB 15

A estimativa da concentração de DNA depende do tipo e quantidade de amostra disponível. Para amostras com alto grau de pureza, com baixo nível de contaminação por proteínas, fenóis, polissacarídeos, álcool, ou outros ácidos nucleicos, a estimativa por espectrofotômetro, medida pela absorvância a 260 nm, consiste em um método simples, rápido e com certa precisão. A relação entre 260 nm e 280 nm (DO260/DO280) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos, sendo que soluções puras de DNA e RNA possuem valores de DO260/DO280 de 1,8 e 2, respectivamente. Se existe contaminação por proteínas, a relação DO será muito menor e a precisão nas quantidades de ácidos nucleicos será baixa (SILVA, 2023).

Os vetores pET promovem a síntese de grandes quantidades do mRNA, acarretando acúmulo da proteína de interesse em altas concentrações. A expressão exagerada da T7 RNA polimerase pode resultar em instabilidade na expressão (BANEYX, 1999) e isso justifica a nossa escolha de subclonar nossos insertos em outro vetor de expressão heteróloga, como o pSFOXB, além de testá-lo com variáveis níveis de expressão. A composição nucleotídica na região codificadora inicial parece ser importante para a expressão gênica, bem como a presença de códons raros, localizados ao final do gene, que podem causar alterações na fase de leitura, problemas no início da transcrição pelo ribossomo e término precoce da transcrição (KANE, 1995; LAURSEN et al., 2005; BANDMANN & NYGREN, 2007). A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* pode se tornar difícil, quando códons do gene recombinante diferem de códons da célula hospedeira. Tal fato pode ser explicado pelo retardamento da transcrição do RNA recombinante, que resulta na degradação proteica ou substituições e erros na reunião dos códons que destroem as características funcionais da proteína (CARSTENS & WAESHE, 1999).

Para minimizar essa problemática, recomenda-se examinar a seqüência do gene recombinante para a presença desses códons raros e, então, utilizar células hospedeiras contendo o plasmídeo com o tRNA apropriado, ou até sintetizar o gene para a remoção desses códons (KANE, 1995).

Os vetores apresentavam diferentes características, porém, em ambos os vetores, as proteínas produzidas ao final da expressão seriam fusionadas a resíduos de histidina. A maioria dos estudos com proteínas recombinantes de *E. coli* descrevem

a utilização do sistema pET para clonagem e expressão dessas proteínas (OHASHI ⁵⁷ et al., 1998; McBRIDE et al., 1999; ZHANG et al., 2004). Esse sistema é o mais utilizado para expressar proteínas em *Escherichia coli* (BANEYX, 1999). Muitos sistemas de expressão têm sido investigados para produção de proteínas recombinantes na bactéria *Escherichia coli*, os quais demandam a utilização de vetores plasmidiais com diferentes características, como promotores, sítios de ligação para o ribossomo (ribosomal-binding site - RBS), genes para proteínas de fusão, terminadores da transcrição e marcadores de resistência a antibióticos. Apesar das inúmeras publicações que relatam sucesso na expressão de proteínas heterólogas por meio destes sistemas, muitos pesquisadores, continuamente, encontram problemas como a baixa ou até a ausência de expressão proteica, formação de corpúsculos de inclusão ou degradação proteolítica (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Segundo Baneyx e Mujacic (2004), esses obstáculos podem ser evitados pelo uso de diferentes concentrações do indutor ou do meio de cultura, uso de mutantes da célula hospedeira ou diferentes temperaturas de indução. Uma possibilidade possível é transferir o gene que codifica a proteína de interesse para outro vetor que utilize um sistema de expressão distinto, como descrito anteriormente.

Alguns desafios foram destacados na pesquisa durante a expressão de proteínas heterólogas, inclusive no projeto maior, sendo o maior deles a formação de agregados proteínicos insolúveis que se sedimentam durante a centrifugação da amostra (*pellets*), como verificado também nessa pesquisa.

É necessário destacar que não há uma estratégia absoluta e universal para todos os casos de expressão proteica. São indispensáveis diversas análises empíricas para cada proteína bem como cepa utilizada.

Gutiérrez-González (2019) *apud* Silva (2021) cita que a expressão de proteínas insolúveis se correlaciona com temperaturas maiores e um menor tempo provavelmente devido à necessidade que a célula apresenta de acumular a proteína a fim de evitar danos bacterianos. Provavelmente a alteração no tempo de indução bem como na temperatura leva a uma melhor expressão como relatado em estudos que se utilizam de vetores de expressão por indução.

O gel de agarose a uma concentração apropriada de aproximadamente 1% em

tampão TBE normalmente é analisado de acordo com o número de pares de bases⁵⁸ (tamanho esperado do fragmento de DNA). O corante brometo de etídio facilita a visualização das bandas posteriormente. Esse corante deve interagir com o DNA e emitir fluorescência quando exposto à luz ultravioleta.

O resultado é obtido comparando-se o tamanho das bandas de DNA nas amostras com o controle que corresponde a um marcador de massa molecular padrão que, geralmente, é comercialmente adquirido. Se o inserto de *Escherichia coli* sob promotor constitutivo estiver presente é então observado uma banda correspondente à soma dos pares de base do plasmídeo com o vetor. No caso, somente *Fusarium* tem 1323 bp, somente *Penicillium* possui 1100 pb, e somente pET-28a (+) possui 5369 bp. *Penicillium* com pET-28a(+) possui 6382 bp e *Fusarium* com pET-28a(+) tem 6.652 bp.

A confirmação da ligação do inserto em um vetor de clonagem através da eletroforese em gel é um procedimento comum na biologia molecular. Isso envolve a análise das amostras de DNA após a clonagem para verificar se o fragmento de DNA de interesse (o "inserto") foi corretamente ligado ao vetor de clonagem. As bandas presentes nas amostras contendo o inserto (controle positivo) devem corresponder ao tamanho esperado do inserto. Isso significa que a eletroforese revelará uma banda que é maior do que a banda do vetor vazio (controle negativo). É importante ressaltar que a eletroforese confirma apenas a presença do fragmento de DNA no gel, mas não garante a integridade sequencial do inserto.

Posteriormente às corridas em gel de agarose e análise das placas com meio LB sólido, foram observadas possíveis contaminações nas mesmas e clones que poderiam ser falso positivos.

Por esses motivos foram realizadas novas transformações e crescimento em placas numa concentração maior de antibiótico canamicina (100 µg/µl)]. Foram escolhidas as linhagens XL10-Gold e DE3 para plaqueamento. Duas placas com cada espécie foram analisadas.

Para cada uma foi feita uma placa sem antibiótico e uma com canamicina na concentração de 100 µg/µl. Era esperado que a placa com antibiótico não crescesse e a sem antibiótico crescesse. Porém num primeiro momento foi observado contaminação e

repetiu-se o plaqueamento com diluição de 1/10 e 1/100. Novamente foi observado⁵⁹ contaminação e menor quantidade do que deveria de ágar deixando a placa mais líquida.

Por fim, o último plaqueamento de XL 10 Gold e DE 3 funcionou, pois, a placa com antibiótico não cresceu nada (não foi observada contaminação) e a placa sem antibiótico cresceu um pouco, visto que foram selecionadas culturas específicas na placa de origem. Foi observado também menor concentração na maior diluição (1/1000) e maior concentração de culturas na menor diluição (1/10).

As células ultracompetentes XL 10-Gold foram projetadas para a clonagem de grandes plasmídeos e DNA ligado com a maior eficiência de transformação possível, exibindo crescimento mais rápido e colônias maiores. As células XL 10- Gold ultracompetentes possuem o fenótipo de alta transformação (Hte), o que dá a essas células uma eficiência média de transformação de $\geq 5 \times 10$ transformantes/ μ g de DNA superenovelado (SILVA,2021).

A produção da proteína L-asparaginase por expressão heteróloga no vetor pSFOXB segue um processo geral que envolve a clonagem da L-asparaginase no vetor, a transformação das células de *E.coli* com o vetor e a cultura para expressão da proteína: Foram realizadas medições da OD (densidade óptica) dos 2 cultivos de *Fusarium* (realizados em 2 semanas consecutivas).

Os resultados indicaram que o número de células estava satisfatório (pela turbidez e confirmado posteriormente pela análise de OD). Algumas das principais aplicações de medições de OD são a determinação do momento ideal para a colheita, a determinação do momento ideal para induzir uma cultura ao executar um protocolo de expressão proteica ou o monitoramento de procedimentos de clonagem. O crescimento de células, bactérias em meios de cultura líquidos é comumente controlado medindo a densidade óptica a 600 nm (DO600). As medições OD600 são normalmente usadas para determinar o estágio de crescimento de uma cultura bacteriana. Essas medições ajudam a garantir que as células sejam colhidas em um ponto ideal que corresponda a uma densidade apropriada de células vivas (BIOFACTORY COMPETENCE CENTER,2019), em que OD600 equivale a uma quantidade de células igual a 8×10^9 células/mL.

Posteriormente realizou-se outro gel de agarose para checagem dos clones⁶⁰ transformantes para finalização das análises.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Foram confirmados clones positivos em clones de pET28a e subclones de pSFOX B 1,11. O método de produção de L-asparaginase por *E. coli* através de expressão heteróloga oferece vantagens significativas em termos de eficácia terapêutica, segurança e viabilidade econômica. Essa estratégia envolve a clonagem do gene da L- asparaginase de fungos filamentosos em um vetor de expressão apropriado contendo um promotor constitutivo. O promotor constitutivo permite uma expressão constante da enzima, independentemente das condições ambientais ou indução por fatores externos. A expressão heteróloga de L-asparaginase em *E. coli* sob um promotor constitutivo oferece benefícios, como uma produção mais rápida e eficiente da enzima em grande quantidade. Essa abordagem tem sido amplamente utilizada para a produção comercial de L-asparaginases de fungos filamentosos, tornando possível o acesso a quantidades suficientes da enzima para aplicações terapêuticas e de pesquisa.

A expressão heteróloga da L-asparaginase de leveduras oferece uma abordagem promissora para a produção eficiente da enzima com potencial para aplicações terapêuticas e comerciais. Os resultados obtidos na análise em gel de agarose e nas etapas subsequentes confirmam o sucesso da clonagem do gene e a possibilidade de expressão da proteína de interesse. Esses resultados abrem caminho para a continuidade dos estudos visando a produção em larga escala e a implementação de testes para o tratamento de Leucemia Linfoblástica com L-asparaginase heteróloga de origem fúngica.

É importante ressaltar que o uso da L-asparaginase como biofármaco requer atenção especial à sua pureza e segurança para a aplicação terapêutica. A inclusão de etapas rigorosas de purificação é imperativa para garantir a eliminação de componentes potencialmente tóxicos ou inibitórios no organismo dos pacientes. Dessa forma, acredita-se que a presente pesquisa deve prosseguir assim direcionada, buscando aprimorar o desenho desenvolvido e incorporar estratégias de purificação que assegurem um altíssimo grau de pureza à enzima, atendendo aos padrões de qualidade e eficácia. Essa busca poderá contribuir significativamente para o avanço da

medicina e proporcionando benefícios reais e confiáveis aos pacientes que deles⁶² necessitam.

Até o presente momento foram confirmados clones positivos em clones de pET28a e subclones de pSFOXB 1, 11 e 15, demonstrando a viabilidade dos mesmos. Isso abre novas e promissoras possibilidades para a biotecnologia, visto que tais conquistas oferecem resistência a doenças, melhor adaptação ao ambiente e maior produtividade. No entanto, mesmo diante desses avanços, é fundamental prosseguir com uma abordagem cautelosa, garantindo que sejam conduzidos mais estudos e avaliações para compreender totalmente o impacto e as implicações desses clones no ecossistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALE – Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia – **O que é Leucemia Linfóide Aguda** – 2022 – Disponível em: <https://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/lla/o-que-e/>

AZEVEDO VF. Estamos preparados para prescrever biossimilares? **Rev Bras Reumatol.** 2010;50(3):221- 4.

BLOOM, M. V; FREYER, G. A.; MICKLOS, D. A. Laboratory DNA science: an introduction to recombinant DNA techniques and methods of genome analysis. [s.l.] **Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.**, 1996.

BLOMMEL, Paul G.; BECKER, Katie J.; DUVNJAK, Petar; FOX, Brian G. Enhanced Bacterial Protein Expression During Auto-Induction Obtained by Alteration of Lac Repressor Dosage and Medium Composition. *Biotechnology Progress*, [S.l.], v. 23, n. 3, p. 585-598, 5 set. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp070011x>.

BORÉM, Aluizio; DOS SANTOS, Fabrício Rodrigues. **Biossegurança de OGMS.** *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, p. 29-30, 2008.

BRADLEY, Noah P. et al. Resistance-guided mining of bacterial genotoxins defines a family of DNA glycosylases. **Mbio**, v. 13, n. 2, p. e03297-21, 2022.

BRIAND, L.; MARCION, G.; KRIZNIK, A.; HEYDEL, J. M.; ARTUR, Y.; GARRIDO, C.; SEIGNEURIC, R.; NEIERS, F. A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 1-11, 9 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33037>.

CACHUMBA, J. J. M.; ANTUNES, F. A. F.; PERES, G. F. D.; BRUMANO, L. P.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47: 77-85, 2016.

CACHUMBA, J.J.M.; ANTUNES, F.A.F.; PERES, G.F.D.; BRUMANO, L.P.; SANTOS, J.C.; SILVA, S.S. - **Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production** – 2016 - Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/DPgVGPcH8sBfRsjhdnSW59y/?lang=en#>

CAMILO, F.M.; CANÊDO, G.S.; CARDOSO, A.M. – **L-Asparaginase e Perspectivas no Tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda: Revisão da Literatura** – 2022 - Disponível em: <chromeextension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/03/1359838/406-texto-do-artigo-1141-1-10-20220225-1.pdf>.

CARDOSO, S.L. – **Avaliação e Produção de L-Asparaginase por Fungo Isolado do Solo Cerrado Brasileiro em meio ao Contendo resíduo Agroindustrial** – 2018 – Disponível em: chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/33112/1/2018_SamuelLeiteCardoso.pdf. ⁶⁴

CORREA, Carolina Ferraz Babin. **Engenharia de proteínas aplicadas à L-asparaginase II de E. coli para o aumento da atividade enzimática e redução da imunogenicidade**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/directbitstream/36e331f0-4d2d-483b-80be-2d2bd54aaa72/Carolina%20Ferraz%20Babin%20Correa.pdf>. Acesso em: 09 maio 2023.

CORREIA, R.C. – Produção Biotecnológica de L-Asparaginase (ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris* – 2015 – Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-15122015-082825/publico/Rafaela_Coelho_Correia_ME_corrigida.pdf.

CREGG, J. M. et al. Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. **Methods in Biotechnology**, v. 463, p. 169-189, 2009.

CROWLEY, Erika L.; RAFFERTY, Steven P. Review of lactose-driven auto-induction expression of isotope-labelled proteins. **Protein Expression and Purification**, [S.l.], v. 57, p. 70-85, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2019.01.007>.

DA CUNHA, Marília Crivelari et al. L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* spp.: effects of production process and biochemical parameters. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 253-263, 2022.

DA SILVA, S. S. et al. Current applications and different approaches for microbial LAsparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, Lorena, São Paulo, Brasil, 27 Agosto 2016. 77-85.

DIVINO, B.S. - **Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris*** – 2015 - Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-15122015-172127/pt-br.php>.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and Asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 493-501, 1977.

FASSAM, Al et al. *Rhizopus oryzae* AM16; a new hyperactive Lasparaginase producer: Semi solidstate production and anticancer activity of the partially purified protein. **Biomedical Reports**, v. 16, n. 3, p. 1-9, 2022.

FREITAS, Marcela et al. **L-Asparaginase from *Penicillium sizovae* produced by a recombinant *Komagataella phaffii* strain**. *Pharmaceuticals*, v. 15, p. 1-17 art. 746,

2022 Tradução . . Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3390/ph15060746>. Acesso em: 09 maio 2023.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening LAsparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23-26, 1997.

GYNNÅ, Arvid Hedén. **Induction kinetics of the lac operon**. Molecular Biotechnology Programme, [S.I.] p.1-33, 2014.

HENRIQUE, Izabella de Macedo. **Cultivo em meios complexos para produção de L-asparaginase em E. coli BL21(DE3)**. TCC (Especialização). Secretaria do Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Antônio Guilherme de Souza" desenvolvido no Instituto Butantã para o Curso de Especialização em Biotecnologia para a saúde: Vacinas e Biofármacos. 2020.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85-89, 1973.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER – INCA – **Tipos de Câncer Leucemia – 2020** - Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 93-99, mar. 2017.

JACOB, F.; ULLMANN, A.; MONOD, J. Délétions fusionnant l'opéron lactose et un opéron purine chez Escherichia coli. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 3, p. 704-719, 1965.

JAYA RAJU, K. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. **IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 2, p. 121-129, 2013.

JONKERS, Tim JH et al. Development of a high-throughput bioassay for screening of antibiotics in aquatic environmental samples. **Science of the Total Environment**, v. 729, p. 139028, 2020.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803-822, 2018.

KOEHN, J.; HUNT, I. High-Throughput Protein Production (HTPP): A Review of Enabling Technologies to Expedite Protein Production. *In*: High Throughput Protein Expression and Purification. **Methods in Molecular Biology**, v. 498, 2009.

LEHNINGER, L. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman & Co, 4 ed., pp. 1100, 2004.

LI, Z.; RINAS, U. Recombinant protein production-associated metabolic burden reflects anabolic constraints and reveals similarities to a carbon overfeeding response. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, p. 94–105, 2021.

MAGALHÃES et. al. **Sequencing and characterization of an L-asparaginase gene from a new species of Penicillium section Citrina isolated from Cerrado**. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/354471692_Sequencing_and_characterization_of_an_Lasparaginase_gene_from_a_new_species_of_Penicillium_section_Citrina_isolated_from_Cerrado. Nature.2021.

MAIRHOFER, J. et al. Comparative transcription profiling and in-depth characterization of plasmid-based and plasmid-free *Escherichia coli* expression systems under production conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 3802–3812, 2013.

MARQUES, C.F.; SANTOS, G.C.; MARQUES, C.A. - **L-asparaginase e Perspectivas no Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda: Revisão da Literatura – 2022 –** Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/03/1359838/406-texto-do-artigo-1141-1-10-20220225-1.pdf

MEDWAR C.V.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANNA, C.M.M., COSTA, T.M.A. - **PEG-asparaginase e L-asparaginase de Escherichia coli nativa na leucemia linfoblástica aguda em crianças e adolescentes: uma revisão sistemática – 2020**.

MENEZES, L. M. da S., GARCIA, L. R., GONÇALVES, G. C. F., SILVA, . R. C. da, & LIMA, A. de M. (2021). PROSPECÇÃO DE CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DE TUMORES MALIGNOS. **Revista Multidisciplinar De Educação E Meio Ambiente**, 2(1), 29. <https://doi.org/10.51189/rema/820>.

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, n. 1573- 0972, p. 577-587, 2013.

MORSHEDI, Fatemeh et al. Fusion Protein Consisting of Hemagglutinin Small Subunit and Truncated Nucleoprotein as a Universal Influenza Vaccine Candidate: Starting In-Silico Evaluation Toward In Vitro Expression. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 15, n. 1, p. 57, 2023.

NAG, N.; KHAN, H.; TRIPATHI, T. Strategies to improve the expression and solubility of recombinant proteins in *E. coli*. **Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods**, p. 1-12, 2022.

NARAYANA, K.J.P., KUMAR, K.G. e VIJAYALAKSHMI, M. (2018) L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Ind J Microbiol** 48,331–336.

NARAYANA, K.J.P., KUMAR, K.G. e VIJAYALAKSHMI, M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Ind J Microbiol**, 2018, 48,331–336.

ONCOGUIA – **Tipos de Câncer- Leucemia Linfoide Aguda** – 2020 - Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/1100/135/#:~:text=Os%20principais%20tipos%20de%20tratamento,ser%20utilizados%20em%20circunst%C3%A2ncias%20especiais>.

ONCOGUIA - **Tratamento Típico da Leucemia Linfoide Aguda (LLA)** – 2015 – Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamento-tipico-da-leucemia-linfoide-aguda-lla/7861/318/>

ONCOGUIA – **Tratamentos de Cancer** – 2013 – Disponível em: http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=oncoguia_search&utm_term=cancer_tratamentos&gclid=Cj0KCQjwyYKUBhDJARIsAMj9IkGN4u_vhLjwjpKu-1d60p572fHBNU7YWT8gfRkmQNSz1uXnPED7N-laAv4NEALw_wcB. Acessado 09 maio. 2023.

PEDROSA, F.; LINS, M - **Leucemia linfóide aguda: uma doença curável** – 2002- Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-307866>.

PENNA, T.C.V; OLIVEIRA, P. S. O. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 89, p. 88-94, 2014.

PEREIRA, J.C.C.V. Expressão heteróloga e purificação de uma L-asparaginase de **Zymomonas mobilis**. Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da

PETERSON, R.E. e CIEGLER, A. L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. **Appl Microbiol**, 2019, 18, 64–67.

PETERSON, R.E.; Ciegler, A. L-Asparaginase production by various bacteria. **Appl. Microbiol.** 1969, 17, 929–930.

PIETERS, R. et al. L-Asparaginase Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia A Focus on *Erwinia* Asparaginase. **Cancer**, p. 238-249, 2011.

RODRIGUES, D. et al. Fed-batch production of *Saccharomyces cerevisiae* L-Asparaginase II by recombinant *Pichia pastoris* MUT s strain. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 16, 2019.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1- 17, 2014.

RUSSELL, D. W.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. [s.l.] **Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor**, NY, 2001. v. 1

SALERNO, M.S; MATSUMOTO, C; FERRAZ, I. **Biofármacos no Brasil:** Características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento. Texto para discussão. IPEA.2018.

SARQUIS, M.I.; OLIVEIRA, E.M.; SANTOS, A.S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489-492, 2004.

SHI, Ran et al. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes. **International journal of biological macromolecules**, v. 96, p. 93-99, 2017.

SILVA, L.F. Da. **Produção de l-asparaginase por espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* endofíticos de *Tillandsia catimbauensis***. Centro de biociências. Departamento de micologia. Universidade federal de Pernambuco. Dissertação de Mestrado. 2018.

SILVA, S. S. et al. Current applications and different approaches for microbial LAsparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, Lorena, São Paulo, Brasil, 27 Agosto 2016. 77-85.

SINGHA, T. K. et al. Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 17-31, 2017.

SOARES, Natália Cristina. Clonagem e expressão heteróloga da proteína promotora de florescimento. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, Campus Araras, Araras, 2023.

SOLER, M.F.C. **Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras.2015.**

SOUZA, Ticiane Cavalcante de. Estratégias para obtenção da enzima recombinante L-arabinose isomerase (L-AI) por expressão heteróloga em *E. coli* BL21 (DE3) através do método de autoindução. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Noredeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2020.

SPRING, KEVIN J. et al. L-asparaginase genes in *Escherichia coli*: isolation of mutants and characterization of the *ansA* gene and its protein product. **Journal of bacteriology**, v. 166, n. 1, p. 135-142, 1986.

STUDIER, F. William. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, [S.l.], v. 41, n. 1, p.207-234, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.

TAN, J. et al. Independent component analysis of *E. coli*'s transcriptome reveals the cellular processes that respond to heterologous gene expression. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 360–368, 2020.

TEROL, G.L. et al. Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* BL21. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre-RS: Artmed, 2012.

Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Dissertação de Mestrado**, 2017.

VIDYA, J. et al. **Therapeutic enzymes**: L-Asparaginases BT - Current developments in biotechnology and bioengineering. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (Eds.). . Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Production, Isolation and Purification of Industrial Products. 1. ed. Elsevier, 2017. p. 249-265.

YAGUI, C.R. **Biofármacos** – da bioprospecção de moléculas produzidas por micro-organismos extremófilos às estratégias para o desenvolvimento de biobetter. Universidade de São Paulo. 2018.

ZHANG, Shuai; CAO, Yong; CHENG, Hao. Expression of *Aspergillus niger* N5-5 in *E. coli* and purification and identification of products. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 8, p. 1842-1848, 2017.