

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA LUISA LEONCIO RODRIGUES

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA L-  
ASPARAGINASE DE *Fusarium proliferatum* EM  
SISTEMA DE EXPRESSÃO *Escherichia coli* BL21(DE3)

BRASÍLIA

2023

ANA LUÍSA LEONCIO RODRIGUES

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA L-ASPARAGINASE DE *Fusarium proliferatum* EM SISTEMA DE EXPRESSÃO *Escherichia coli* BL21(DE3)

Dissertação de mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof.Dra. Paula Monteiro de Souza

BRASÍLIA

2023

Ana Luisa Leoncio Rodrigues

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA L-ASPARAGINASE DE *Fusarium proliferatum* EM SISTEMA DE EXPRESSÃO *Escherichia coli* BL21(DE3)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 07 de Dezembro de 2023

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Monteiro de Souza – Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliane Ferreira Noronha – Universidade de Brasília

---

Prof. Dr Samuel Leite Cardoso – Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista – Universidade de Brasília (Suplente)

Dedico esse trabalho aos meus queridos pai e mãe, cujo amor incondicional e apoio constante me impulsionaram a alcançar o melhor de mim.

## Agradecimentos

À minha família, meus dedicados pais Silvia e Ailton e meu irmão Victor Henrique, que por toda a vida me apoiaram e incentivaram incondicionalmente a seguir meus sonhos, jamais chegaria aqui sem eles.

Ao meu companheiro Victor, por ser meu grande amor e apoio emocional, sempre me dando força, carinho e compreensão.

Aos meus avós Edice e José (*in memoriam*), que desde a infância estiveram ao meu lado nos momentos mais importantes, sendo amáveis e deixando memórias que continuam a iluminar meu caminho.

Ao meu fiel amigo de quatro patas, Oliver, cuja presença carinhosa me acompanhou por grande parte da escrita desse trabalho.

À minha orientadora Paula Monteiro, pela confiança, acolhimento, conselhos e dedicação em contribuir com o desenvolvimento do meu mestrado.

À professora Pérola Magalhães, que desde a graduação foi uma inspiração e exemplo de profissional e pesquisadora, obrigada pelas valiosas oportunidades e incentivos.

Ao meu mentor e amigo Joel, que desde o primeiro dia me ensinou muito sobre biologia molecular e sempre demonstrou companheirismo e paciência em todos os experimentos que realizei.

À equipe do Laboratório de Produtos Naturais, Joel, Letícia, Ana Letícia, Marina, Samuel, Artur, Diegue e Paula Garcia, pela amizade e momentos divertidos dentro e fora do laboratório, conhecimentos compartilhados e pela leveza que trouxeram para meu dia a dia de trabalho.

Às técnicas Patrícia e Júlia, pelo constante apoio e dedicação na organização do Laboratório de Produtos Naturais.

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio financeiro nos processos 19300001492/2021-37 e 1930000919/2020-07, bem como pela bolsa de mestrado.

Por fim, minha imensa gratidão à Universidade de Brasília e a todos com quem compartilhei conhecimentos e experiências ao longo dos meus oito anos fazendo parte da universidade.

## Lista de figuras

- Figura 1. Linhagens sanguíneas provenientes da medula óssea (Figura adaptada pela autora em “BioRender”)..... 17
- Figura 2. Número estimado de novos casos mundiais de leucemias no ano de 2020, nos sexos feminino e masculino, de 0 a 19 anos (Oceania 0,64%, America do Norte 5%, Europa 8,5%, América Latina e Caribe 11,3%, África 11,4% e Asia com maior concentração de casos de 63,2%). (Disponível em: Global Cancer Observatory <http://gco.iarc.com>)..... 18
- Figura 3. Células normais à direita e blastos celulares predominantes na leucemia linfoblástica aguda (Atlas de Histologia em Cores da PUCRS e NewsLab, 2019). ... 19
- Figura 4. Mecanismo de ação da L-asparaginase contra células leucêmicas, convertendo o aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia. (Figura adaptada pela autora em “BioRender”) ..... 22
- Figura 5. Representação do vetor pET-28a (+) contendo o gene de L-ASNase\_Fp. (Figura gerada pelo programa SnapGene Viewer) ..... 42
- Figura 6. Camadas de filtro, membrana e gel, para realização do ensaio de Western Blot (Figura adaptada pela autora em “BioRender”)..... 51
- Figura 7. Curva padrão AHA para quantificação da atividade enzimática através da produção de  $\beta$ -hidroxamato..... 52
- Figura 8. Curva padrão reagente de Nessler para quantificação da atividade de L-asparaginase através da concentração de amônia formada na reação. .... 54
- Figura 9. Gel de agarose 0,8% representando o tamanho do DNA plasmidial das cepas DH10B e BL21 (DE3) após serem transformadas utilizando vetor pET-28a (+), comparado ao marcador de fragmentos de DNA de 10.000 a 500 pb. (A) Plasmídeo da cepa DH10B, de tamanho correspondente ao esperado. (B) PCR da linhagem de E. coli DH10B de tamanho correspondente ao fragmento analisado. (C) Gel de agarose 1,2% confirmando por PCR a extração do plasmídeo na cepa de BL21(DE3). ..... 62
- Figura 10. Gel de agarose 1,2% representando o tamanho dos clones transformados, confirmando a transformação através da análise de fragmento de PCR. (A) Gel de agarose após extração plasmidial dos 10 clones transformados, confirmando a etapa de extração através da análise do tamanho correspondente a aproximadamente 6.000 pb. (B) PCR dos 10 clones transformados, utilizando a cepa DH10B como controle

positivo e o vetor pET-28<sup>a</sup> (+) como controle negativo, confirmados através da análise do fragmento de 344 pb. ....63

Figura 11. Géis de SDS-PAGE das frações solúveis (Gel A: clones 1-7 e gel B: clones 8 e 9) e insolúveis (gel B: clones 1-4 e gel C) de proteínas produzidas por *E. coli* BL21 (DE3) após indução com IPTG. (A) Ausência de bandas correspondentes à 45kDa na forma solúvel, indicando ausência da proteína de interesse. (B e C) As bandas representadas a partir do Clone 1 indicam a presença da proteína de interesse na forma de corpos de inclusão na altura de 45 kDa, .....65

Figura 12 Análise da presença de L-ASNase\_Fp por Western Blot utilizando anticorpo Anti His-Tag. As bandas marcadas estão na altura entre 40 kDa e 55 kDa, confirmando a presença da enzima de 48,6 kDa, analisada a partir dos clones 5, 6 e 10, na sua forma solúvel e insolúvel. Não foram observadas bandas nas amostras utilizadas como controle negativo, tanto nas frações solúveis quanto nas frações insolúveis. 66

Figura 13. Gel de SDS-PAGE a 12% revelando perfil eletroforético das metodologias de rompimento celular. Método 1: 7 minutos, 35 segundos ON e 45 segundos OFF, com amplitude de 30%; Método 2: 10 minutos, 1 minuto ON e 1 minuto OFF, com amplitude de 30%; Método 3: 20 minutos, 1 minuto ON e 1 minuto OFF, com amplitude de 30%; Método 4: 10 minutos, 1 segundo ON e 1 segundo OFF, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo, amplitude de 30%; Método 5, de 15 minutos, 1 segundo ON e 1 segundo OFF, com amplitude de 30%. A última metodologia foi a que demonstrou maior intensidade de bandas, se destacando como método mais adequado para rompimento celular. ....67

Figura 14. Curva de crescimento semilogarítmica da densidade ótica em função do tempo de amostras de *E. coli* BL21 (DE3) – L-ASNase\_Fp. Os tempos de incubação variaram de 0 a 12 horas e a densidade ótica foi medida a cada 2 horas de cultivo.69

Figura 15. Curva logarítmica da densidade ótica em função do tempo. O momento de indução determinado na metade da fase estacionária é de aproximadamente 2 horas e 30 minutos. ....69

Figura 16. Perfil eletroforético das frações insolúveis cultivadas a 37 °C sob diferentes tempos após indução e concentrações de indutor. (A) 0 a 4 horas de cultivo, variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (B) 4 a 12 horas de cultivo variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (C) 12 a 24 horas de cultivo variando entre 0.1 e 1 mM de IPTG. Em todas as imagens se observa bandas na altura de 45 kDa, indicando a presença da enzima L-ASNase\_Fp de 48,6 kDa produzida por *E. coli* BL21 (DE3), onde o cultivo

de 12 horas após indução com 0.5 mM de IPTG se destacou com maior produção de proteínas insolúveis.....	71
Figura 17. Perfil eletroforético das frações solúveis cultivadas a 37 °C sob diferentes tempos após indução e concentrações de indutor. (A) 0 a 4 horas de cultivo, variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (B) 4 a 12 horas de cultivo variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (C) 12 a 24 horas de cultivo variando entre 0.1 e 1 mM de IPTG. Não são observadas bandas na altura de 45 kDa, indicando a ausência da enzima L-ASNase_Fp produzida por E. coli BL21 (DE3), indicando que a 37 °C não há formação de L-asparaginase solúvel.....	72
Figura 18. Perfil eletroforético das frações insolúveis cultivadas a 20 °C sob diferentes tempos após indução e concentrações de indutor. (A) 0 a 4 horas de cultivo, variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (B) 4 a 12 horas de cultivo variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (C) 12 a 24 horas de cultivo variando entre 0.1 e 1 mM de IPTG. Não são observadas bandas na altura de 45 kDa, demonstrando que com a diminuição da temperatura após indução, não houve formação de agregados insolúveis.....	74
Figura 19. Perfil eletroforético das frações solúveis cultivadas a 20 °C sob diferentes tempos após indução e concentrações de indutor. (A) 0 a 4 horas de cultivo, variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (B) 4 a 12 horas de cultivo variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (C) 12 a 24 horas de cultivo variando entre 0.1 e 1 mM de IPTG. São notadas bandas na altura de 45 kDa, indicando a presença da enzima L-ASNase_Fp produzida por E. coli BL21 (DE3), reforçando que a diminuição da temperatura produziu proteínas solúveis.....	75
Figura 20. Gel de SDS-PAGE a 12% representando amostras de proteínas solubilizadas com diferentes concentrações de ureia. O extrato bruto foi comparado com as amostras solubilizadas e as bandas demarcadas representam a proteína recombinante, eficazmente solubilizada a partir de 6 M de ureia.....	77
Figura 21. Cromatografia de afinidade (HisTrap HP 5 mL). Purificação isocrática da enzima L-ASNase_Fp, indicando as diferentes condições de pH aplicadas em cada etapa, sem alteração na concentração dos tampões utilizados. ....	78
Figura 22. Gel de poliacrilamida de amostras coletadas após ensaio de purificação por cromatografia de afinidade. A seta em vermelho representa o extrato bruto contendo os corpos de inclusão solubilizados, enquanto a seta em amarelo representa a fração eluída purificada de L-ASNase_Fp. As demais bandas, representam frações coletadas nas outras etapas da purificação, como ligação e lavagem. ....	79



## Lista de tabelas

Tabela 1. Tipos de L-asparaginases bacterianas .....	23
Tabela 2. Formulações de L-asparaginase disponíveis no mercado mundial .....	25
Tabela 3. Soluções tampão .....	39
Tabela 4. Meio de cultivo líquido e sólido .....	40
Tabela 5. Soluções para reação de PCR.....	45
Tabela 6. Metodologias adaptadas de lise celular .....	47
Tabela 7. Componentes para preparo de gel de poliacrilamida.....	50
Tabela 8. Ensaio de quantificação da atividade de L-asparaginase .....	53
Tabela 9. Reagentes para Etapa 1 .....	54
Tabela 10. Reagentes para Etapa 2 .....	54
Tabela 11. Condições de otimização de tempo e concentração de indutor da produção de L-asparaginase.....	56
Tabela 12. Concentrações de reagentes e amostra para solubilização .....	58
Tabela 13. Etapas da purificação .....	60
Tabela 15. Teor de proteína L-ASNase_Fp em diferentes processos.....	80

## Lista de abreviações e siglas

- AHA** Ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxâmico
- Anvisa** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- Asn** L-Asparagina
- APS** Persulfato de amônio
- BCA** Ácido bicinconinico
- BSA** Albumina de soro bovino
- EDTA** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FDA** *Food and Drug Administration*
- GCO** *Global Cancer Observatory*
- 6x His-Tag** Cauda de Histidina
- INCA** Instituto Nacional do Câncer
- IPTG** Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida
- L-ASNase** L-asparaginase
- L-ASNase\_Fp** L-asparaginase de *Fusarium proliferatum*
- LB** Luria Bertani
- LLA** Leucemia Linfoblástica Aguda
- MS** Ministério da Saúde
- OD** Densidade ótica
- OMS** Organização Mundial da Saúde
- PEG** Polietilenoglicol
- SDS** Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE** Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
- SUS** Sistema Único de Saúde
- TCA** Ácido tricloroacético
- Temed** Tetrametiletilenodiamina
- VC** Volume de Coluna

## Resumo

RODRIGUES, Ana Luisa Leoncio. **EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA L-ASPARAGINASE DE *Fusarium proliferatum* EM SISTEMA DE EXPRESSÃO *Escherichia coli* BL21(DE3)**. Brasília, 2023. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

A L-asparaginase é uma enzima com propriedades de hidrólise da L-asparagina, um aminoácido essencial para células neoplásicas e não essencial para o organismo humano e síntese de células normais, já que o organismo humano possui capacidade de síntese desse aminoácido, sendo convertida em ácido aspártico e amônia. Essa enzima é amplamente utilizada no tratamento de doenças linfoproliferativas e linfomas, com destaque para a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), se tornando um dos principais agentes quimioterápicos dos últimos anos. A L-asparaginase atualmente aplicada nos esquemas terapêuticos são oriundas de microrganismos como *Escherichia coli* e *Dickeya chrysanthemi*, além da L-asparaginase PEGuilada que foi introduzida com o objetivo de diminuir a variedade de efeitos imunogênicos, neurotóxicos e de hipersensibilidade que os pacientes apresentam durante o tratamento oncológico, se tornando necessária a busca por novas fontes de produção da enzima. Portanto, esse trabalho avaliou a produção e atividade de L-asparaginase do fungo filamentosos do Cerrado brasileiro, *Fusarium proliferatum*, expressa em *E. coli* modificada pela deleção do gene nativo de L-asparaginase como hospedeira. A construção contendo o gene da L-asparaginase de *F. proliferatum* foi obtida utilizando o vetor de expressão pET-28a. A triagem de clones transformados resultou na seleção de um clone que foi utilizado ao longo de todo o trabalho, e a otimização de condições de cultivo revelou que a temperatura de 37 °C, utilizando uma concentração de 0.5 mM de IPTG foi a mais adequada para produção da enzima. A proteína foi extraída por metodologia de rompimento celular utilizando sonicador e analisada por eletroforese em gel de SDS-PAGE e *Western blot*. Os resultados evidenciaram o potencial para a expressão de uma proteína recombinante originária de um organismo eucarioto em um organismo procarioto, ressaltando a necessidade de otimização de processos e a importância dessas pesquisas no avanço do desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

Palavras-chave: L-asparaginase; fungos filamentosos, leucemia linfoblástica aguda, proteínas recombinantes.

## Abstract

L-asparaginase is an enzyme with hydrolytic properties targeting L-asparagine, an essential amino acid for neoplastic cells but non-essential for the human body and normal cell synthesis. The human body can synthesize this amino acid, converting it into aspartic acid and ammonia. Widely utilized in the treatment of lymphoproliferative diseases and lymphomas, notably Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), L-asparaginase has become one of the key chemotherapeutic agents in recent years. The L-asparaginase currently used in therapeutic regimens is derived from microorganisms such as *Escherichia coli* and *Dickeya chrysanthemi*. Additionally, PEGylated L-asparaginase has been introduced to reduce the variety of immunogenic, neurotoxic, and hypersensitivity effects observed in patients during oncological treatment, necessitating the search for new enzyme production sources. Hence, this study assessed the production and activity of L-asparaginase from the Brazilian Cerrado filamentous fungus, *Fusarium proliferatum*, expressed in *E. coli* modified through the deletion of the native L-asparaginase gene as the host. The construction containing the L-asparaginase gene from *F. proliferatum* was obtained using the expression vector pET-28a. Screening of transformed clones led to the selection of a clone used throughout the study, and optimization of cultivation conditions revealed that a temperature of 37 °C, with a concentration of 0.5 mM IPTG, was most suitable for enzyme production. Protein extraction employed cell disruption methodology using a sonicator and was analyzed through SDS-PAGE gel electrophoresis and Western blotting. Results highlighted the potential for expressing a recombinant protein originating from a eukaryotic organism in a prokaryotic organism, emphasizing the need for process optimization and the importance of such research in advancing the development of biotechnological products.

Keywords: L-asparaginase, filamentous fungi, acute lymphoblastic leucemia, recombinant proteins.

# Sumário

1	Introdução.....	15
2	Revisão bibliográfica.....	17
2.1	Leucemia.....	17
2.2	Leucemia Linfoblástica Aguda.....	18
2.3	L-asparaginase.....	21
2.3.1	L-asparaginase fúngica .....	28
2.4	Produção heteróloga de proteínas recombinantes.....	30
2.5	Corpos de inclusão.....	34
3	Objetivos.....	36
3.1	Objetivos gerais.....	36
3.2	Objetivos específicos .....	37
4	Materiais e métodos.....	38
4.1	Sequenciamento do gene de L-asparaginase de <i>Fusarium proliferatum</i> .....	38
4.2	Preparo de Reagentes e Soluções.....	38
4.3	Soluções e Reagentes .....	40
4.4	Construção do vetor pET-28a (+) .....	41
4.5	Preparo de células termocompetentes e transformação .....	42
4.6	Clonagem do vetor pET-28a (+) – L-ASNase em <i>E. coli</i> DH10B .....	43
4.7	Expressão do vetor pET-28a (+) – L-ASNase em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e seleção de clones transformados .....	45
4.8	Construção de banco de células .....	45
4.9	Extração de proteínas por sonicação .....	46
4.10	Otimização das metodologias de rompimento celular .....	46
4.11	Quantificação de proteínas totais .....	48
4.12	Precipitação de proteínas por interação hidrofóbica com ácido tricloroacético	48
4.13	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.....	49

4.14	<i>Western blot</i> .....	50
4.15	Quantificação da atividade enzimática de L-asparaginase .....	51
4.15.1	Método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxâmico (AHA) .....	51
4.15.2	Método do reagente de Nessler.....	53
4.16	Curva de crescimento bacteriano.....	54
4.17	Otimização do cultivo de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em meio LB.....	55
4.18	Concentração das amostras cultivadas a 20 °C.....	56
4.19	Solubilização dos corpos de inclusão.....	57
4.20	Purificação de L-ASNase_ <i>Fp</i> por cromatografia de afinidade.....	59
5	Resultados e discussão.....	60
5.1	Transformação de <i>E. coli</i> BL21(DE3) – L-ASNase_ <i>Fp</i> com vetor pET-28a (+) 61	
5.2	Extração de proteína através de lise celular a partir da seleção de clones de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) – L-ASNase_ <i>Fp</i> .....	63
5.3	Confirmação da expressão de L-ASNase_ <i>Fp</i> por <i>Western blot</i> .....	65
5.4	Otimização das metodologias de rompimento celular .....	67
5.5	Curva de crescimento microbiano.....	68
5.6	Otimização das condições de cultivo de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) – L-ASNase_ <i>Fp</i> 70	
5.6.1	Cultivo a temperatura de 37 °C.....	70
5.6.2	Cultivo a temperatura de 20 °C.....	72
5.7	Concentração de proteínas solúveis cultivadas a 20 °C após indução .....	75
5.8	Solubilização de corpos de inclusão .....	76
5.9	Purificação da L-ASNase_ <i>Fp</i> por cromatografia de afinidade.....	77
6	Conclusão e Perspectivas .....	82
7	Referências.....	83

## 1 Introdução

Ao longo dos anos, as pesquisas acerca das aplicações da enzima L-asparaginase (L-ASNase) na indústria farmacêutica têm demonstrado que sua utilização constitui uma alternativa eficaz no tratamento de diversas neoplasias, incluindo, entre elas, a Leucemia Linfoblástica Aguda e o Linfoma de Hodgkin (CACHUMBA *et al.*, 2016). As células neoplásicas, por sua vez, não possuem a enzima L-asparagina sintetase, restringindo sua capacidade de produzir L-asparagina. Isso, conseqüentemente, compromete a síntese de DNA nessas células. Assim sendo, os tumores recorrem à L-asparagina disponível no organismo para sustentar seu crescimento (VIMAL; KUMAR, 2017). O tratamento com L-ASNase visa, portanto, a redução da concentração de L-asparagina disponível, induzindo, dessa forma, a apoptose das células tumorais por deficiência desse aminoácido (FONSECA *et al.*, 2021). Entretanto, é necessário destacar que o uso terapêutico da L-ASNase acarreta uma ampla variedade de efeitos adversos, que incluem hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, disfunções no sistema nervoso central, pancreatite e tromboembolismo (POKROVSKAYA *et al.*, 2022).

Para manejar esses efeitos foram produzidas L-ASNases PEGuiladas, que fazem ligação covalente com um grupo polietilenoglicol e são bastante difundidas atualmente, mas também apresentam efeitos indesejáveis para o tratamento, tendo alguns pacientes apresentado resistência cruzada entre as formulações e ainda outros efeitos tóxicos (FONSECA *et al.*, 2021). As L-ASNases produzidas em escala industrial que estão disponíveis no mercado atualmente são de origem bacteriana, sendo grande parte derivadas de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, já que estes microrganismos são relativamente mais estáveis e fáceis de se modificar geneticamente (VIMAL; KUMAR, 2017). Dessa forma, há três tipos diferentes de L-ASNase sendo produzidas, a enzima nativa derivada de *E. coli*, a enzima PEGuilada que também é proveniente da *E. coli* nativa e as isoladas de *E. chrysanthemi*, sendo as duas últimas as mais difundidas atualmente por apresentarem menos reações de imunossensibilidade e efeitos adversos semelhantes. Apesar disso, ainda há limitações quanto a sua toxicidade (WANG *et al.*, 2021).

Não obstante de existirem mais estudos a respeito da produção de L-ASNase por bactérias, pesquisas por outros microrganismos, como fungos, vêm ganhando

espaço e apresentando elevado potencial de produção e purificação de L-ASNase. Por serem organismos eucariotos os fungos representam uma vantagem em relação às bactérias, já que suas enzimas parecem ser mais semelhantes às de mamíferos, o que contribui para diminuição das reações adversas causadas pela L-ASNase bacteriana (GONÇALVES *et al.*, 2016).

A utilização de sistemas de expressão heteróloga em bactérias para produção de proteínas se tornou atrativo devido a sua habilidade de crescimento acelerado, alta densidade de substratos, genética bem caracterizada e uma grande variedade de vetores de clonagem e cepas hospedeiras (TERPE, 2006). O sistema de expressão pET foi descrito por (STUDIER, 1991) a partir da análise da atividade da lisozima T7, demonstrando uma variedade de aplicações e sua versatilidade. Dessa forma é possível que a expressão seja induzida utilizando uma cepa hospedeira (por exemplo *E. coli*) lisogenizada por um fragmento de fago, no caso o DE3, que codifica a DNA polimerase do T7, o gene bacteriófago e um indutor (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). Ao longo dos anos os vetores plasmidiais foram se tornando uma ferramenta essencial para biologia molecular e a ciência como um todo, permitindo o avanço das técnicas biotecnológicas para produção de diversos produtos para saúde (NORA *et al.*, 2019).

Levando em consideração que as L-ASNases produzidas pelas bactérias causam reações adversas em grande parte dos pacientes que a utilizam, a busca por fontes novas de microrganismos para produção da enzima tem sido necessária. Dessa forma, os fungos veêm sendo estudados e identificados como potenciais produtores da enzima, com menor imunogenicidade e alta taxa de produção. Por isso, este trabalho tem como fundamento produzir e purificar uma L-asparaginase recombinante obtida de um fungo filamentosso isolado do Cerrado Brasileiro, *Fusarium proliferatum*, utilizando *E. coli* como sistema de expressão.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Leucemia

A leucemia é uma condição patológica caracterizada por mutações genéticas somáticas nas células progenitoras hematopoiéticas localizadas na medula óssea, mais especificamente nas precursoras que não atingiram o estágio de diferenciação completo (Figura 1). Esse fenômeno desencadeia uma proliferação descontrolada e atípica de glóbulos brancos, resultando na progressiva substituição das células normais da medula óssea por uma população de células tumorais, resultando no acúmulo dessas células e impedindo a produção de células sanguíneas normais (VICENTE AUGUSTO DE CARVALHO, 2008). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as leucemias são classificadas em linfoblástica e mieloide, podendo ainda ser divididas em agudas e crônicas. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) apresenta diversos tipos de leucemias, com destaque para os quatro principais, sendo eles a leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfoblástica crônica e leucemia linfoblástica aguda. (INCA, 2023)

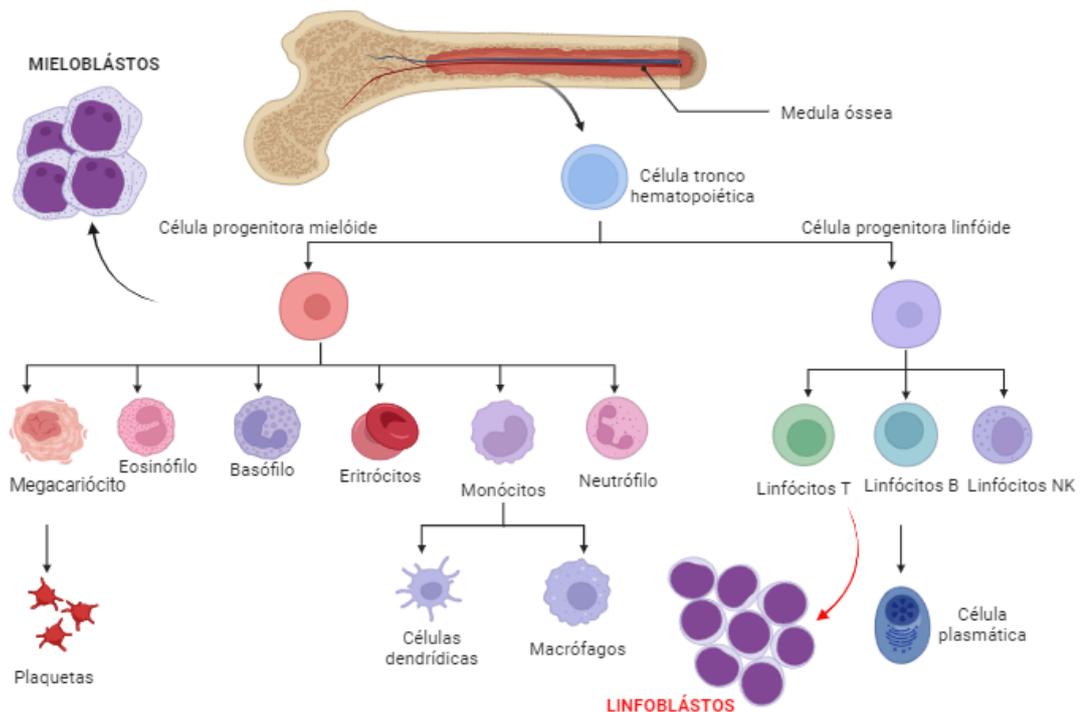


Figura 1. Linhagens sanguíneas provenientes da medula óssea (Figura adaptada pela autora em “BioRender”).

Essas formas de leucemia são categorizadas de acordo com a taxa de progressão e a linhagem de células sanguíneas que o câncer se origina, onde as leucemias agudas se desenvolvem rapidamente, ao passo que as leucemias crônicas manifestam um desenvolvimento mais lento (NCI, 2022). Dessa forma, a leucemia mieloide acontece quando as células acometidas são granulócitos e monócitos e a leucemia linfoblástica quando os linfócitos são as células afetadas (SHAFIQUE; TEHSIN, 2018).

No Brasil, segundo dados do INCA, cerca de 11.540 novos casos de leucemia surgiram no ano de 2022 e o número de mortes no ano de 2020 chegou a 6.738. No mundo, de acordo com dados do *Global Cancer Observatory* (“Global Cancer Observatory”, [s.d.]) os diagnósticos de leucemia em crianças e adultos jovens até 19 anos chegou a ultrapassar 80 mil casos, que se concentraram em maioria na região da Ásia (Figura 2). Além disso, o câncer é uma das causas mais comuns de mortes em crianças depois de acidentes (WHITEHEAD *et al.*, 2016), sendo a leucemia linfoblástica aguda correspondente a 30% dentre os tipos de câncer diagnosticados em crianças com menos de 15 anos (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007).

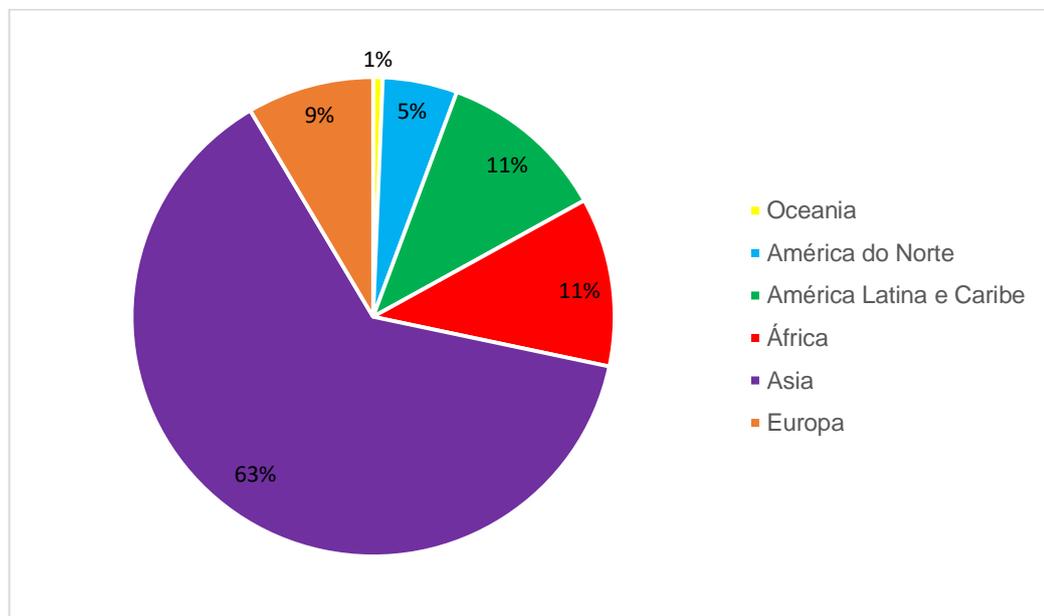


Figura 2. Número estimado de novos casos mundiais de leucemias no ano de 2020, nos sexos feminino e masculino, de 0 a 19 anos. (Disponível em: Global Cancer Observatory <http://gco.iarc.com>)

## 2.2 Leucemia Linfoblástica Aguda

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é um tipo de câncer que acomete as células progenitoras linfóides (Figura 3), sendo acumuladas em linfoblastos em diferentes estágios de maturação

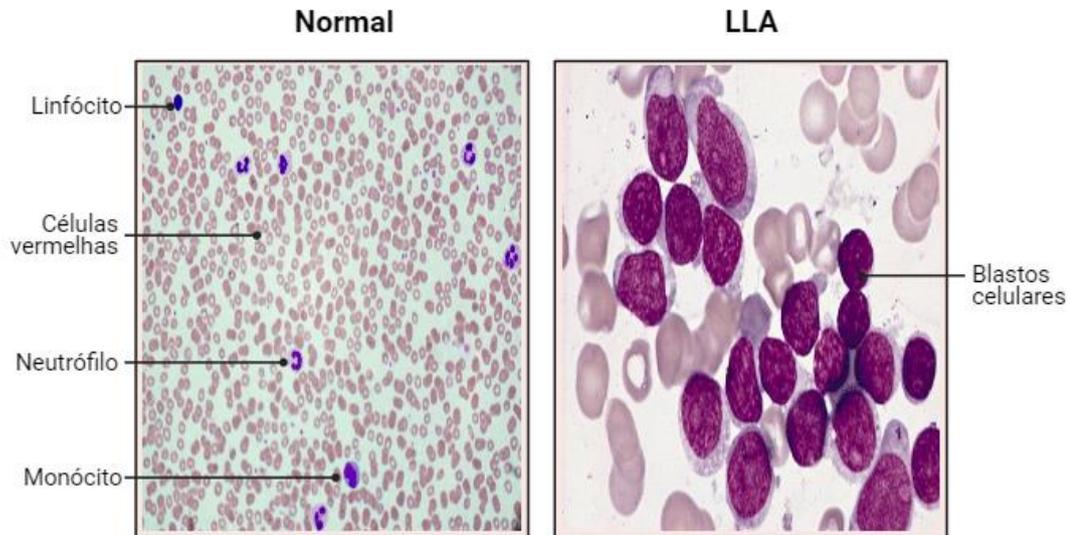


Figura 3. Células normais à direita e blastos celulares predominantes na leucemia linfoblástica aguda (Atlas de Histologia em Cores da PUCRS e NewsLab, 2019).

Os fatores de risco associados a leucemia linfoblástica aguda não são totalmente esclarecidos, provavelmente a doença tem origem em interações entre exposições exógenas ou endógenas, fatores genéticos e aleatórios (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). O pico de incidência geralmente ocorre dos 3 aos 5 anos de idade, com maior prevalência em meninos do que em meninas, sendo a síndrome de Down e mutações nos genes associados a diferenciação celular e regulação transcricional, alguns dos fatores genéticos conhecidos que podem estar associados a um maior risco de desenvolvimento da LLA (HUNGER; MULLIGHAN, 2015). Apesar disso, não somente fatores genéticos podem representar uma porcentagem atribuída ao desenvolvimento da LLA, levando em consideração que fatores externos ambientais podem também estar desempenhando um papel no desenvolvimento e aumento de casos da doença em crianças ao longo do tempo, como exposição a radiações e produtos químicos (WHITEHEAD *et al.*, 2016).

Em um estudo mais recente publicado em 2020, Inaba e Mullighan indicam alguns fatores de predisposição para desenvolvimento da LLA que estão associados

a alterações genéticas sutis, como síndromes constitucionais raras, como a síndrome de Down, ataxia-telangiectasia e síndrome de Li-Fraumeni, além de deficiência no reparo do DNA e mutações em linhagens germinativas (INABA; MULLIGHAN, 2020). Não obstante aos diversos estudos que procuram identificar as causas da LLA em crianças, a grande maioria das causas ainda não são esclarecidas. Algumas infecções crônicas também estão associadas ao desenvolvimento da doença, como HIV, vírus Epstein-Barr e malária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Dessa forma, a prevenção da LLA em crianças ainda é um desafio, levando à necessidade de serem realizados diagnósticos precoces, seguido de uma terapia eficaz, garantindo uma maior qualidade de vida e chances de sobrevivência aos pacientes.

O diagnóstico da LLA, após relatos de sintomas como febre recorrente, petéquias, fraqueza, palidez, dispneia, nódulos linfáticos inchados e perda de apetite (NCI, 2022), é realizado através de um exame de sangue completo, onde é possível observar um aumento significativo de células brancas do sangue (SHAFIQUE; TEHSIN, 2018). Além disso, é essencial a análise e identificação morfológica dos linfoblastos e avaliação imunofenotípica da linhagem e do estágio de desenvolvimento dessas células (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013).

O tratamento da LLA é realizado em três estágios, podendo durar de 2 a 2,5 anos, sendo eles: 1) Indução da remissão, correspondente a primeira fase do tratamento onde o objetivo é erradicar 99% das células leucêmicas tanto no sangue como na medula óssea e garantir ao paciente uma remissão e a volta dos parâmetros normais do organismo; 2) Consolidação ou intensificação, que tem como objetivo a consolidação ou intensificação do tratamento anterior para garantir que não haja restos de células doentes ou que sejam produzidas novas células leucêmicas por esse organismo; 3) Manutenção, a última fase, na qual o propósito é manter o organismo sem nenhum rastro de célula leucêmica, utilizando doses maiores do que nas duas primeiras fases e sendo uma fase crítica pois serve também para prevenir a recidiva da doença (NCI, 2022). A fase de indução geralmente inclui a administração de glicocorticóides como prednisolona ou dexametasona, vincristina e outro agente quimioterápico como a asparaginase e antraciclinas. Na fase de consolidação os medicamentos comumente utilizados são a dexametasona com ou sem antraciclina, mercaptopurina, metotrexato e uma dose mais alta de asparaginase por um período prolongado (PUI; EVANS, 2006). Enquanto na fase de manutenção as doses de metotrexato e mercaptopurina são aplicadas, podendo ou não utilizar dexametasona

e vincristina (PUI *et al.*, 2012).

### **2.3 L-asparaginase**

A L-asparaginase (EC 3.5.1.1) é uma enzima que possui propriedade de catalisar a hidrólise da L- asparagina, um aminoácido não essencial, sendo convertida em ácido aspártico e amônia, o que diminui sua concentração no plasma sanguíneo (CACHUMBA *et al.*, 2016) (Figura 4). Essa enzima é amplamente utilizada no tratamento de doenças linfoproliferativas e linfomas, principalmente no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda, se tornando um dos principais agentes quimioterápicos dos últimos anos, visto que a L-asparagina é um nutriente importante para o desenvolvimento das células malignas (GONÇALVES *et al.*, 2016). As células leucêmicas da LLA não possuem capacidade de sintetizar L-asparagina, se tornando dependente de fontes externas para processos como síntese de seu DNA, RNA e proteínas, então com a presença de L-ASNase, o tumor é privado da L-asparagina necessária para seu desenvolvimento, levando-o à morte celular (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). Além da sua utilização na indústria de medicamentos, também é amplamente utilizada na indústria de alimentos para reduzir os níveis de acrilamida em alimentos previamente fritos ou assados, já que a acrilamida é uma substância neurotóxica e potencialmente cancerígena, formada a partir da interação da L-asparagina com açúcares redutores presentes nesses alimentos (DUMINA *et al.*, 2021).

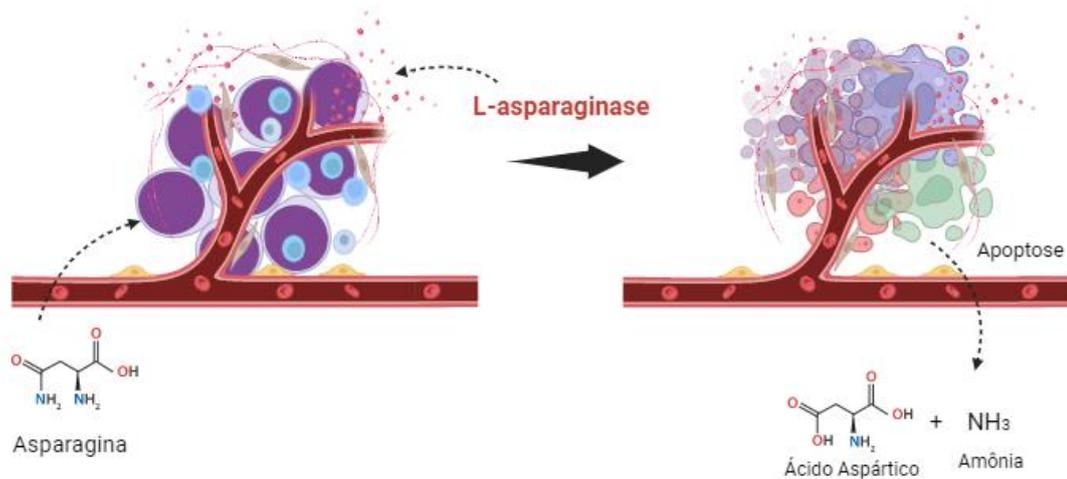


Figura 4. Mecanismo de ação da L-asparaginase contra células leucêmicas, convertendo o aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia. (Figura adaptada pela autora em “BioRender”)

Os primeiros experimentos que identificaram a L-ASNase como inibidora de crescimento de determinados linfomas foram descritos pela primeira vez no ano de 1953 por Kidd (KIDD, 1953), onde o soro do porquinho-da-índia foi reconhecido pela sua capacidade antitumoral. Estudos posteriores confirmaram que a enzima seria responsável pela inibição do crescimento dos linfomas, através de ensaios de estabilidade, que comparavam o soro de animais recém-nascidos sem atividade de asparaginase com aqueles que possuíam atividade da enzima, confirmando que a presença da enzima estava diretamente relacionada com o grau de inibição do tumor (BROOME, 1963). Algum tempo depois foi identificado que a L-ASNase está amplamente distribuída (WRISTON; YELLIN; WASHINGTON, 1973), podendo ser identificada em animais como ratos, microrganismos como *Pseudomonas* e *Saccharomyces* (ARIMA *et al.*, 1972), leveduras, algas e algumas plantas (RAMYA *et al.*, 2012). A enzima produzida por bactérias, como *E. coli*, ganhou destaque devido ao seu grande potencial de atividade antitumoral.

De acordo com experimentos de Schwartz *et al.* (1966), que caracterizou duas variantes de L-ASNase isoladas de *E. coli* e avaliou seu potencial de atividade antitumoral, ambas as enzimas foram eficazes em reduzir o nível de L-asparagina no meio. Esses estudos foram essenciais para iniciar a aplicação terapêutica da L-ASNase no tratamento de tumores. Posteriormente, em novos estudos acerca da capacidade das bactérias de produzir L-ASNase, outras espécies foram sendo

identificadas como produtoras da enzima, como *Erwinia chrysanthemi* e *Serratia marcescens*, além de demonstrarem níveis significativos de atividade antitumoral (BROOME, 1963.; SCHWARTZ, 1966).

Em outros ensaios, Mashburn e Wriston (1964) demonstraram a relação entre a atividade de L-asparaginase derivada de *E. coli* e o nível de inibição de tumores, mais especificamente linfosarcomas, em ratos. Os resultados demonstraram que, dependendo do número de unidades administradas, a enzima inibiu de forma eficaz o crescimento do tumor (MASHBURN; WRISTON JR, 1964). Posteriormente, analisando mais a fundo as características da L-asparaginase de *E. coli* foi possível identificar a presença de dois tipos da enzima, a L-ASNase do tipo I e tipo II, que a depender das condições de crescimento, solubilidade em soluções e pH, desempenham resultados diferentes quanto sua atividade antitumoral. Ambas apresentam a capacidade de hidrólise da L-asparagina, em diferentes proporções, onde a L-ASNase do tipo II demonstrou atividade contra células leucêmicas, ao contrário da EC1 não apresentou toxicidade contra células tumorais (CAMPBELL, 1953; BROOME, 1963.; SCHWARTZ *et al.*, 1966). Além disso, se diferenciam também quanto a sua estrutura e origem na célula bacteriana, enquanto a L-ASNase do tipo I se apresenta como um dímero, a L-ASNase do tipo II forma um tetrâmero com 4 subunidades idênticas (CASTRO *et al.*, 2021). A L-ASNase do tipo II se encontra situada no espaço periplasmático, mais especificamente entre a membrana plasmática e o envelope celular de bactérias como *E. coli*, por outro lado a L-ASNase do tipo I está situada no citoplasma bacteriano (CEDAR; SCHWARTZ, 1968) (Tabela 1).

Tabela 1. Tipos de L-asparaginases bacterianas

<b>L-asparaginase</b>	<b>Localização</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Afinidade por L-asparagina</b>	<b>Afinidade por L-glutamina</b>	<b>Atividade antitumoral</b>
<b>Tipo I</b>	Citosol	Dímero	Baixa	Alta	Ausência
<b>Tipo II</b>	Periplasma	Tetrâmero	Alta	Baixa	Presença

A partir dessas descobertas que tornaram a L-ASNase do tipo II, em um potencial agente antitumoral, outros experimentos foram sendo conduzidos, os quais

resultaram em regressões e remissões em doenças como LLA e alguns tipos de linfossarcomas. Nesse período, notou-se que a L-ASNase possuía um índice terapêutico superior a outros medicamentos que eram utilizados para tratar tumores, o que poderia interferir positivamente na diminuição da sua toxicidade (CROWTHER, 1971). Hill *et al.*, (1967) demonstraram resultados positivos quanto a atividade da enzima em animais e humanos, porém, apesar de não ter identificado nenhuma grande toxicidade aguda, observou o desenvolvimento de sensibilidade em pacientes após um mês de terapia, caracterizada por reações cutâneas como urticária. Apesar desses efeitos, os resultados positivos na inibição de tumores em animais levaram a um grande interesse da comunidade científica em desenvolver um novo medicamento contra doenças linfoproliferativas e abriu caminho para mais estudos acerca da atividade de L-ASNase. (HILL *et al.*, 1967).

A produção da enzima foi então amplamente estudada dentre os organismos produtores já conhecidos, geralmente microrganismos e em particular, bactérias Gram negativas como *Escherichia coli*, enquanto fontes animais e plantas não foram amplamente identificados como grandes produtores de L-ASNase (RAMYA *et al.*, 2012). Ao longo dos anos desde as primeiras aplicações da enzima bacteriana, as taxas de remissão e sobrevivência de pacientes com leucemia linfoblástica aguda aumentou consideravelmente (PIETERS *et al.*, 2011). A primeira versão aprovada pelo FDA disponível industrialmente da L-asparaginase foi produzida a partir de *E. coli* em 1978, com o nome comercial Elspar (R) (Merck), se tornando um componente essencial no esquema terapêutico de crianças com LLA (LEW, 2020). Apesar desse grande avanço e da excelente produtividade da enzima por bactérias, esse vem sendo um problema de grande destaque devido ao desenvolvimento de reações alérgicas, o que interfere diretamente na resposta ao tratamento. As L-ASNase aprovadas pelo FDA para uso terapêutico são derivadas de proteínas exógenas que podem desencadear uma resposta imunológica, levando à formação de anticorpos anti-asparaginase, o que pode diminuir a eficácia do tratamento em resposta à redução da atividade da enzima, resultando em efeitos adversos (KLEINGESINDS *et al.*, 2023). Essas reações podem ser pancreatite, hemorragia, trombose, hiperglicemia, hiperlipidemia, disfunções hepáticas, reações alérgicas fortes e hipersensibilidade em pacientes pediátricos (KAWEDIA; RYTTING, 2014), cefaleia, vômitos, sonolência, letargia e até mesmo coma já foram descritos (GRAHAM, 2003).

Assim, desde os anos 60 a L-ASNase é administrada em pacientes pediátricos

com LLA por via endovenosa ou intramuscular, sendo melhorada ao longo dos anos (PUI *et al.*, 2012). Na busca pela diminuição dos efeitos adversos mencionados e melhora na progressão do tratamento, outras formulações foram sendo desenvolvidas, como a L-ASNase derivada de *Erwinia chrysanthemi*, que é a segunda opção para pacientes que apresentam hipersensibilidade ao medicamento derivado de *E. coli*, a L-ASNase PEGuilada, produzida por *E. coli* e ligada covalentemente à uma molécula de polietilenoglicol (PEG) com o objetivo de diminuir a antigenicidade (GRAHAM, 2003) e com uma meia-vida maior do que as anteriormente utilizadas (LI *et al.*, 2020), e as L-ASNase recombinantes, que utilizam modificações genéticas para produção da proteína de interesse em um hospedeiro (MAESE *et al.*, 2021) (Tabela 2).

Tabela 2. Formulações de L-asparaginase disponíveis no mercado mundial

<b>L-asparaginase</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Origem</b>	<b>Variante</b>	<b>Referência</b>
<b>Kidrolase</b> ®	EUSA Pharma	<i>E. coli</i> nativa		(VAN TRIMPONT <i>et al.</i> , 2022)
<b>Elspar</b> ®	Ovation Pharmaceuticals	<i>E. coli</i> nativa		(PIETERS <i>et al.</i> , 2011)
<b>Oncaspar</b> ®	Enson Pharmaceuticals Inc	<i>E. coli</i> nativa	PEGuilada	(FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2014)
<b>Erwinase</b> ®	EUSA Pharma	<i>E. chrysanthemi</i>		(VAN TRIMPONT <i>et al.</i> , 2022)
<b>Leunase</b> ®	Sanofi-aventis	<i>E. coli</i> nativa		(PIETERS <i>et al.</i> , 2011)
<b>Spectrila</b> ®	Rentscheler Biopharma SE	<i>E. coli</i> nativa	Recombinante	(VAN TRIMPONT <i>et al.</i> , 2022)

Ademais formulações mencionadas, existem estudos que sugerem que a

encapsulação da L-ASNase de *E. coli* proporciona aumento significativo da meia vida, além de diminuir as chances de desenvolvimento de reações imunológicas, porém essa formulação não foi aprovada pelos órgãos reguladores VAN TRIMPONT et al., 2022).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) é responsável pela compra do medicamento e desde 2013 este era fornecido pela empresa MEDAC, representada pela Bagó no Brasil, com o nome Aginasa®, porém algum tempo depois a empresa alemã comunicou que não iria mais produzir o medicamento, levando à um desabastecimento do medicamento no país (MACIEL, 2017) . A partir de 2017 o MS passou a importar o medicamento chinês LeugiNase® (Bejin SL Pharmaceutical), porém pouco tempo depois passou a ser alvo de críticas devido a diversas irregularidades, sendo suspenso logo em seguida (MORAIS, 2017).

Dessa forma, o medicamento atualmente utilizado, que possui registro na ANVISA e alto índice de eficácia com menor incidência de hipersensibilidade e melhores parâmetros farmacocinéticos (MEDAWAR *et al.*, 2019), é a L-ASNase PEGuilada, Oncaspar, da Enson Pharmaceuticals Inc, garantindo o abastecimento e tratamento dos pacientes que necessitam do medicamento (COLON, 2018). As proteínas PEGuiladas tem menor imunogenicidade, ou seja, não induzem a síntese de anticorpos no organismo e permanecem na corrente sanguínea por mais tempo devido a sua degradação mais lenta, o que aumenta a meia-vida do medicamento, sem diminuir sua atividade antitumoral (KAFKEWITZ; BENDICH, 1983). Apesar do sucesso do medicamento, alguns centros de tratamento do país já enfrentaram problemas relacionados ao risco de desabastecimento gerado pelo alto custo do mesmo, já que os gastos de um único hospital chegaram a mais de 800 mil reais (G1 TRIÂNGULO E ALTO PARANÁIBA, 2019).

Adicionalmente, mudanças pós-traducionais podem provocar transformações na estrutura molecular da enzima, como é o caso da ligação da L-ASNase de *E coli* ao PEG, que teve sua meia-vida aumentada significativamente (CASTRO *et al.*, 2021). Entretanto, levando em consideração que, apesar de haver manejos para os efeitos adversos causados pela L-ASNase bacteriana, como a PEGuilação mencionada anteriormente, ainda há grande interesse em desvendar novas formas de obtenção de uma enzima igualmente eficaz, porém menos tóxica. Por isso, outros microrganismos foram sendo estudados ao longo dos anos, objetivando uma melhora tanto nos sintomas relacionados a atividade de L-ASNase quanto na de glutaminase.

Já em 1971, De-Angeli e colaboradores investigaram uma L-ASNase produzida por *Aspergillus terreus* e seus resultados demonstraram que a enzima produzida pelo fungo filamentoso apresentou efeitos positivos contra tumores. Pouco tempo depois, Scheetz *et al.*, (1971) identificou que a enzima produzida por *Fusarium tricinctum* diminuiu um tumor de linfossarcoma em ratos. Essas perspectivas levaram a busca de uma fonte eucariota para produção de uma L-ASNase que possui capacidade de hidrólise da L-asparagina com baixa atividade de glutaminase. (DE-ANGELI *et al.*, 1970; SCHEETZ; WHELAN; WRISTON, 1971). Essas buscas pela redução da antigenicidade, juntamente com aumento da meia vida da L-ASNase, impactam significativamente o tratamento de pacientes com LLA, podendo diminuir a concentração e frequência de administração, bem como redução nos efeitos adversos mais graves (BECKETT; GERVAIS, 2019).

Um fator também relevante quando se pretende avaliar a toxicidade associada ao uso de L-ASNase e é a sua atividade de glutaminase, já que além de atuar na quebra da L-asparagina em ácido aspártico e amônia, a enzima também participa, com menos afinidade, da quebra de glutamina em ácido glutâmico e amônia (CHAN *et al.*, 2014). A glutamina é um aminoácido de grande abundância no corpo humano e participa de diversas fases do metabolismo, sendo o principal transportador de nitrogênio e servindo de substrato para divisão celular (OLLENSCHLAGER *et al.*, 1988). A atividade de hidrolisar a L-glutamina intrínseca à asparaginase pode gerar sintomas graves de pancreatite, trombose intracranial, hemorragias (MAHAJAN *et al.*, 2012), imunossupressão (KAFKEWITZ; BENDICH, 1983) anafilaxia, disfunções cerebrais (DORIYA; KUMAR, 2016), disfunção hepática, convulsões, coagulação anormal (SUDHIR *et al.*, 2014), todos associados à sua atividade combinada com os efeitos da L-ASNase derivada de bactérias. Em um estudo de Ollenschlager (1988), que comparou as concentrações plasmáticas de aminoácidos com as concentrações plasmáticas de proteínas sintetizadas pelo fígado em pacientes com LLA utilizando L-ASNase de *E. coli*, foi identificado que o nível de L-glutamina no organismo desses pacientes estava muito abaixo do normal, gerando um distúrbio metabólico, o que pode indicar que, a queda brusca das concentrações de um aminoácido que participa da síntese de proteínas hepáticas, pode estar diretamente associada aos efeitos colaterais gerados pela depleção do aminoácido pela L-ASNase. (OLLENSCHLAGER *et al.*, 1988).

Em resumo, fatores como imunogenicidade, diretamente associada à atividade

de glutaminase, meia vida relativamente curta e alto custo para o Brasil quando se trata da necessidade de importação do medicamento, são as principais limitações relacionadas ao tratamento da LLA no país, portanto, sendo necessária e importante a busca por novas metodologias e microrganismos que possam proporcionar um medicamento mais eficaz e seguro, não somente nacionalmente, mas em proporções mundiais no futuro.

### 2.3.1 L-asparaginase fúngica

Na busca por novas fontes de L-ASNase, Doriya e Kumar (2016) isolaram 45 espécies de fungos de diferentes fontes para avaliar a possível produção de enzimas industrialmente importantes, dentre elas, L-asparaginase e L-glutaminase, onde um desses fungos apresentou atividade de hidrólise da L-asparagina, sem atividade de glutaminase, reforçando o proposto por Shrivastava *et al.* (2012) de que a utilização de uma enzima derivada de um organismo eucarioto pode minimizar o desenvolvimento de reações imunológicas, já que os fungos possuem uma proximidade evolutiva maior com seres humanos do que as bactérias (SHRIVASTAVA *et al.*, 2016).

Algumas espécies de fungos endofíticos como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* já são descritos como bons produtores de L-ASNase com baixa atividade de glutaminase e atualmente já são implementados na indústria de alimentos para diminuir a produção de acrilamida (PARASHIVA *et al.*, 2023). El-Gendy e colaboradores (2021) avaliaram a produção extracelular da L-ASNase de *Fusarium equiseti* que demonstrou resultados relevantes quanto a produção da enzima e uma baixa citotoxicidade em células normais (EL-GENDY *et al.*, 2021). Além disso, as espécies *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* já demonstraram em outros estudos serem potenciais produtores de L-asparaginase (BASKAR; RENGANATHAN, 2012; EL-NAGGAR; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014; G.; MANAWADI, 2017). Em um estudo promovido por (SAEED *et al.*, 2018) a enzima derivada do fungo filamentoso *Aspergillus terreus* foi produzida de forma recombinante em *Escherichia coli* e apesar de ter como resultado uma quantidade significativa de proteína recombinante, esta estava na sua forma inativa, agregada em corpos de inclusão, o que é comum a diversas proteínas recombinantes produzidas utilizando *E.coli*. Apesar desse

resultado, os corpos de inclusão podem ser uma forma interessante de purificar essas proteínas, que podem ser obtidas posteriormente após aplicação de estratégias de renaturação e purificação. Ainda de acordo com (SAEED *et al.*, 2018) esses resultados são promissores e os mecanismos de engenharia genética desenvolvidos podem auxiliar na obtenção de uma enzima ativa. Os fungos filamentosos são microrganismos multicelulares de grande importância para produção de diversas enzimas comerciais e orgânicas, possuindo vantagens significativas em relação a outros sistemas de produção, como as bactérias, por secretarem facilmente um alto nível de enzimas (SU *et al.*, 2012).

Em uma revisão sistemática publicada por Souza e colaboradores (2017), novas espécies de diferentes fungos foram analisadas, como *A. terreus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Cladosporium sp.*, *Flammurina velutipes*, *Penicillium cyclopium* e *Rhizomucor mihei*. De acordo com os resultados, a produção de L-ASNase foi altamente influenciada pela composição do meio de fermentação, além dos fatores físicos como temperatura, pH, agitação, concentração de inóculo e tempo de fermentação, ou seja, cada organismo requer condições específicas para alcançar a máxima produção enzimática, o que leva a necessidade de otimização do processo, incluindo diferentes componentes de meio e parâmetros de cultivo (SOUZA *et al.*, 2017).

Freitas *et al.* (2021) e o grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Brasília realizou experimentos com 21 fungos derivados do solo do Cerrado buscando identificar quais seriam produtores de L-ASNase. Dentre as espécies identificadas, o fungo *Fusarium proliferatum* se destacou quanto a produção da enzima e por sua baixa atividade de glutaminase, sendo interessante para prosseguir com estudos acerca da sua capacidade de produzir L-ASNase. Posteriormente, em experimentos realizados por Cardoso *et al.* (2023) o gene de L-asparaginase de *F. proliferatum* foi sequenciado e expresso em um sistema heterólogo utilizando a levedura *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) como hospedeira, objetivando uma produção melhorada e em maior escala da enzima. Além disso, também foram demonstradas por meio de ensaios *in silico* as características estruturais da proteína produzida por *F. proliferatum*, possibilitando a utilização de informações essenciais para a aplicação das metodologias demonstradas nesse trabalho (CARDOSO *et al.*, 2023; FREITAS *et al.*, 2021; SIQUEIRA, 2010).

## 2.4 Produção heteróloga de proteínas recombinantes

A recombinação de proteínas é essencial para o desenvolvimento das espécies, auxiliando os microrganismos a sobreviverem em diferentes ambientes. Os estudos genéticos envolvendo bactérias ganhou destaque a partir dos anos 1950, quando diversos cientistas demonstraram que esses microrganismos possuíam capacidade de troca de material genético, sugerindo a possibilidade de que estas podiam trocar esse material genético não somente entre bactérias, mas também com espécies de outros gêneros (BORZANI *et al.*, 2017).

As técnicas de engenharia genética foram aprofundadas por Boyer e Cohen em 1973 quando obtiveram um organismo funcional que possuía informações genéticas de diferentes espécies. Esse organismo foi produzido utilizando a bactéria *Escherichia coli*, que se tornou o principal hospedeiro para produção de proteínas recombinantes por já ser amplamente conhecida, possuir baixo custo de produção, crescimento acelerado e alta eficiência na expressão de DNA (KAUR *et al.*, 2018). A ampliação dos conhecimentos acerca da manipulação genética torna a produção de sistemas recombinantes uma estratégia de obtenção de genes de interesse, podendo produzir linhagens de grande importância industrial.

A maioria das proteínas produzidas por *E. coli*, inclusive a L-ASNase, e de outros microrganismos são produzidas no espaço periplasmático estando envolvidas na absorção de nitrogênio dos substratos, ao contrário das proteínas recombinantes que são geralmente produzidas no citosol (DE MOURA *et al.*, 2020). Além disso, a produção de proteínas heterólogas extracelulares não é recomendada, pois, na maioria das vezes resulta em um nível de expressão muito baixo (PANDA, 2003). Os primeiros passos para produção de uma proteína recombinante incluem o isolamento de uma sequência de nucleotídeos da proteína de interesse, a clonagem dessa sequência e a expressão da sequência clonada em uma linhagem celular para sua produção. No caso de a proteína ser de origem eucariota, o mRNA é isolado e convertido em cDNA para gerar múltiplas cópias por PCR, que serão inseridas em um vetor para sua amplificação. Dessa forma, o DNA recombinante será mantido ao longo das divisões celulares da célula transformada, sendo traduzido e transcrito pelo hospedeiro (WALSH, 2014) A principal vantagem da produção de proteínas recombinante então é a capacidade de se utilizar um hospedeiro para obtenção de proteínas adequadamente preparadas a partir de um gene heterólogo, com

rendimento máximo, a baixo custo, que resultará em uma proteína recombinante de alta qualidade.

Os procariotos desempenham um papel proeminente na produção de proteínas heterólogas devido à sua ampla exploração e conhecimento em termos biológicos, bioquímicos e fisiológicos. São especialmente vantajosos devido à sua capacidade de alcançar densidades celulares significativas em escalas industriais, como em biorreatores, em meio de cultura diversificados, e por meio da otimização de protocolos de engenharia genética que fazem uso de vetores de clonagem, genes regulatórios e promotores de expressão (GLICK; PATTEN, 2022).

Para que ocorra a replicação eficaz do DNA recombinante na célula hospedeira, é necessário que o sistema de síntese de DNA do hospedeiro identifique e reconheça a sequência do DNA recombinante. Assim, para assegurar essa compatibilidade, vetores são empregados como portadores dessas sequências reconhecíveis. Em particular, os plasmídeos, que representam elementos genéticos extracromossômicos, incorporam origens de replicação capazes de reconhecer o DNA, permitindo sua reprodução independentemente da célula procariótica em questão. Esse mecanismo viabiliza a replicação bem-sucedida do DNA recombinante dentro da célula hospedeira (BORZANI *et al.*, 2017).

Um dos sistemas mais conhecidos e desenvolvidos para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é o sistema pET. Nesse sistema, os genes são clonados nos plasmídeos sob controle de um promotor de transcrição com expressão induzida pela T7 RNA polimerase na célula hospedeira e um T7 terminador da transcrição (MIERENDORF *et al.*, 1998). A expressão desse plasmídeo suporta altos níveis de transcrição em linhagens de *E. coli* que contenham o fragmento do fago lisogenizado DE3 que codifica a T7 RNA polimerase, por isso é considerado um promotor forte, além da presença de um operador *lac* adjacente ao promotor T7, que está presente para suprimir uma expressão não induzida, sendo a cepa BL21 de *E. coli* a mais utilizada para expressão proteica de rotina devido a modificações genéticas, como deficiência em proteases, que conferem a essa linhagem uma maior estabilidade (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008; SHILLING *et al.*, 2020). As clonagens em *E. coli* podem ter sua transcrição induzida, onde o indutor se comportará como substrato da enzima codificada por determinado gene, e neste caso um dos indutores mais conhecidos para expressão de proteínas em *E. coli* é o operador *lac*, que é induzido por lactose, geralmente utilizando isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) (BORZANI *et al.*,

2017). O IPTG é um indutor forte, análogo à lactose, assim, quando adicionado ao meio, ele ativa o operador *lac* em sistemas de expressão gênica que utilizam *E. coli* como sistema de expressão. No entanto, em sistemas que utilizam a T7 RNA polimerase, o IPTG não desempenha um papel direto nessa ativação, já que a T7 RNA polimerase é ativada por outros mecanismos, o que resulta em uma transcrição aumentada dos genes alvo e uma alta carga metabólica para a produção de proteínas. (WURM et al., 2016). Dessa forma, a expressão de genes heterólogos pode ser regulada pelo aumento ou diminuição da concentração de IPTG no meio de cultivo, contudo, essa superexpressão de proteínas recombinantes pode aumentar a toxicidade para a célula hospedeira ou gerar proteínas insolúveis, como é o caso dos corpos de inclusão (LI et al., 2022).

Os plasmídeos são modificados pela inserção de genes de resistência à antibióticos com a finalidade de restringir o crescimento de células que não contenham esse plasmídeo (ROSANO; CECCARELLI, 2014). No contexto dos vetores da série pET, são empregados os marcadores *bla*, para resistência a  $\beta$ -lactamases ou ampicilina, e *kan* para resistência a canamicina (MIERENDORF et al., 1998). Além do mais, é comum a introdução de um marcador adicional para detecção ou subsequente recuperação e purificação da proteína de interesse, como a cauda de histidina (*His-Tag*), que geralmente é adicionada na porção N-terminal juntamente com um sítio de clivagem de trombina para permitir a remoção do marcador após purificação (LI et al., 2022; MIERENDORF et al., 1998).

Um componente que se encontra nos plasmídeos e desempenha um papel crucial na manipulação do DNA utilizado na síntese de proteínas recombinantes são as endonucleases de restrição, também chamadas enzimas de restrição. As endonucleases são enzimas que podem clivar moléculas de DNA em fragmentos aleatoriamente ou em locais específicos determinados pela sequência nucleotídica, dando origem a fragmentos de comprimento definidos, com extremidades determinadas pelos pontos de clivagem específicos de cada enzima (ARBER, 1978). Sua importância então, se dá pela sua especificidade de clivagem, pois apenas irá catalisar a sequência de nucleotídeos específica, clivando a ligação fosfodiéster, deixando livres as extremidades 5' e 3', que correspondem ao substrato da enzima DNA ligase, para que posteriormente outra sequência possa ser ligada covalentemente nessas extremidades (BORZANI et al., 2017; NATHANS; SMITH, 1975).

As etapas empregadas na purificação dependem principalmente da localização das proteínas, sendo que, quando são expressas extracelularmente são mais fáceis de purificar, já que exigem menos etapas para separação dos outros componentes celulares do hospedeiro. Porém, para purificação de proteínas intracelulares, expressas no citosol, como as proteínas recombinantes, exigem um maior cuidado e atenção durante seu isolamento, uma vez que ainda possuem um rendimento menor em comparação com as proteínas produzidas no espaço periplasmático (GLICK; PATTEN, 2022; HARCUM, 2008; NILSSON *et al.*, 1997).

O processo de purificação de proteínas recombinantes é uma etapa essencial para o seguimento de aplicações nos processos *downstream*, e, como mencionado anteriormente, podem ser expressas com um marcador de afinidade adicionado à porção N ou C terminal, o que facilita a purificação utilizando a cromatografia de afinidade em uma etapa e detecção por *Western Blot* da proteína recombinante. A cromatografia de afinidade é um método que se baseia nas interações específicas e fortes entre um soluto e um ligante que é conectado a uma resina de suporte. Apesar de ser um método de alto custo, devido à essa afinidade específica, pode ser utilizada para produzir proteínas altamente purificadas em apenas uma etapa, o que é economicamente mais interessante do que a utilização de várias etapas de purificação (HARCUM, 2008).

A ligação de um marcador é uma estratégia ideal para a realização de purificação por afinidade, uma vez que existe uma ampla gama de proteínas de fusão disponíveis, diferenciando-se em termos de tamanho e demonstrando interações seletivas com um ligante fixado em uma matriz cromatográfica. Um exemplo eficaz desse processo é a fusão de uma *His-Tag* à proteína de interesse e aplicação da cromatografia em uma coluna carregada com o íon metálico  $Ni^{2+}$ , onde as histidinas presentes na superfície da proteína asseguram que apenas aquelas proteínas que a contêm possam interagir com a coluna. Isso, por sua vez, possibilita a recuperação de proteínas recombinantes, mesmo quando produzidas em quantidades limitadas. É importante ressaltar que em casos de produção de proteínas terapêuticas, essas *Tags* podem ser potencialmente imunogênicas, sendo necessário removê-las após etapas de renaturação.

Este conjunto de elementos confere às proteínas recombinantes um dos principais progressos no campo da engenharia genética, permitindo a produção otimizada de uma variedade de compostos. Essa tecnologia tem o potencial de

impactar significativamente a indústria, resultando em avanços notáveis no tratamento de doenças, como o câncer, bem como na fabricação de produtos com diversas outras aplicações.

## 2.5 Corpos de inclusão

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é o microrganismo mais comumente utilizado para produção de proteínas recombinantes de organismos eucariotos, porém diversos trabalhos já indicaram que os altos níveis de expressão desses genes heterólogos resultam na formação de proteínas agregadas, com influência de fatores como condições de crescimento, temperatura e o sistema de expressão selecionado (ARIÉ *et al.*, 2006; BHATWA *et al.*, 2021; KANE; HARTLEY, 1988). Corpos de inclusão representam estruturas intracelulares que se originam durante um rápido crescimento de cadeias polipeptídicas, resultando em agregados proteicos parcialmente enovelados ou inadequadamente dobrados, apresentando-se na forma de manchas hidrofóbicas que conduzem a formação de agregados amorfos (BOWDEN; PAREDES; GEORGIU, 1991; SINGH *et al.*, 2015; UPADHYAY *et al.*, 2012).

Essa alta taxa de expressão é favorecida por fatores como a utilização de um promotor forte, que aumenta a carga metabólica da célula, a otimização de códons, uma alta concentração de indutor, que gera um número elevado de cópias do gene alvo, porém, de certa forma quando há uma taxa de crescimento muito baixa corre-se o risco de perda do plasmídeo nas gerações seguintes (SINGH *et al.*, 2015). Além disso, esse aumento excessivo na taxa de expressão da proteína recombinante é muitas vezes maior do que a própria célula pode suportar, diminuindo sua capacidade de gerenciar modificações e dobramento pós-traducional da proteína, tornando-a cada vez mais dobrada de forma inadequada, fazendo com que a proteína exponha resíduos hidrofóbicos que estavam armazenados em seu interior, resultando na formação dos agregados (BHATWA *et al.*, 2021).

Os corpos de inclusão são de natureza muito específica, consistindo principalmente da proteína recombinante de interesse, possibilitando a aplicação de procedimentos de purificação subsequentes para obtenção da proteína recombinante, que pode ser convertida a sua forma nativa através de processos de desnaturação e renaturação, uma vez que nessa conformação as proteínas assumem sua forma

inativa (MIDDLEBERG, 1996). Em um experimento realizado por Upadhyay e colaboradores (2012), onde a L-ASNase expressa por *E. coli* foi avaliada quanto a formação de agregados, foi identificado que diferentes proteínas possuem diferentes mecanismos de agregação durante a expressão recombinante, e que, a expressão da enzima em *E. coli* após indução com IPTG leva à formação de pequenos e vários agregados que se associam entre si para formar porções agregadas maiores, ou seja, podem ser classificados como corpos de inclusão clássicos, pois são densos, resistentes ao ataque de proteases e podem ser solubilizados com altas concentrações molares de agentes caotrópicos e desnaturantes (UPADHYAY *et al.*, 2012).

A estratégia predominante para purificar proteínas que se encontram agregadas em corpos de inclusão envolve a purificação dos próprios corpos de inclusão, sua subsequente solubilização, *refolding* da proteína solubilizada e, por fim, a purificação através de métodos cromatográficos. A utilização de altas concentrações de agentes como ureia e hidrocloreto de guanidina, associados a solventes orgânicos como  $\beta$ -mercaptoetanol, que auxiliam a manter a proteína na sua conformação desnaturada, leva a completa desestruturação da estrutura da proteína, desfazendo os agregados, entretanto, em alguns casos pode ser que se a proteína for solubilizada eficientemente com baixas concentrações desses desnaturantes, não sejam necessárias etapas de renaturação. Nesse contexto, as etapas de solubilização e renaturação da proteína desempenham um papel crítico na obtenção de uma proteína funcional (SINGH *et al.*, 2015). Vale ressaltar que as etapas posteriores, conhecidas como processos *downstream*, compõem uma parcela significativa da produção industrial de proteínas recombinantes, e os custos aumentam a cada etapa adicional que precisa ser realizada. Portanto, a implementação de etapas de purificação eficazes é de suma importância.

Já foram desenvolvidas várias estratégias para reduzir a formação de corpos de inclusão em *Escherichia coli*, como a otimização das taxas de expressão, modificações pós-traducionais e ajustes nos vetores de expressão. Embora os corpos de inclusão possam parecer indesejáveis à primeira vista, sob uma perspectiva alternativa, eles podem ser considerados vantajosos. Isso ocorre porque, devido à sua seletividade, eles de certa forma facilitam o isolamento da proteína de interesse no citoplasma, que está principalmente agrupada nesses corpos de inclusão e podem ser recuperadas proteínas bioativas após solubilização (BHATWA *et al.*, 2021; GASSER

*et al.*, 2008). Dessa forma, os corpos de inclusão podem ser utilizados para produção comercial de proteínas terapêuticas, levando em consideração a aplicação de técnicas de fermentação para aumentar a densidade celular e melhorar a renaturação das proteínas para aumentar o rendimento das proteínas recombinantes (PANDA, 2003).

Diante do exposto, embora a maioria das pesquisas sobre a L-ASNase tenha sido predominantemente focada em bactérias, os estudos com fungos estão ganhando destaque devido ao seu potencial de alta produção de proteínas bioativas. Por serem eucariotos, os fungos oferecem vantagens em relação às bactérias, já que suas enzimas são mais semelhantes às de mamíferos, o que reduz as reações adversas causadas pelo uso terapêutico da enzima. Os sistemas de expressão heteróloga tornam-se, assim, atrativos devido ao rápido crescimento, alta densidade de substratos e à variedade de vetores de clonagem disponíveis. Apesar da praticidade em obter quantidades satisfatórias de culturas bacterianas, é crucial considerar as limitações relacionadas ao uso terapêutico da L-ASNase derivada desses microrganismos, motivando, portanto, a busca por novas fontes. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo produzir e purificar uma L-ASNase recombinante derivada de um fungo filamentosos, aproveitando os conhecimentos e as vantagens da *E. coli* como sistema de expressão.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Expressar a L-asparaginase do fungo *Fusarium proliferatum*, isolado do solo do

Cerrado Brasileiro, em *Escherichia coli* BL21 (DE3). Avaliar a sua produção e atividade.

### 3.2 Objetivos específicos

- Expressar o gene de L-asparaginase de *F. proliferatum* em *E. coli* BL21 (DE3) utilizando vetor de expressão pET-28a (+);
- Produzir e extrair a proteína de interesse;
- Otimizar as condições de cultivo e extração proteica;
- Purificar a proteína isolada e quantificar a atividade enzimática

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 Sequenciamento do gene de L-asparaginase de *Fusarium proliferatum*

O fungo filamentoso *Fusarium proliferatum*, cuja enzima L-ASNase foi utilizada nesse trabalho, foi isolado do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro, identificado morfologicamente por Siqueira (2010) e molecularmente por Freitas et al. (2021). Atualmente o fungo *F. proliferatum* é mantido na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010770/2013-05 e está sob supervisão do responsável pelo laboratório, Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho.

A sequência da L-ASNase do *F. proliferatum* foi obtida através do fragmento de PCR a partir do DNA genômico do fungo por Cardoso et al., (2023). A sequência resultante foi alinhada com auxílio do programa ClustalW (disponível em <https://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) e os *primers* foram sintetizados com base nas regiões gênicas com maior similaridade. O fragmento correspondente ao gene foi enviado para sequenciamento e, após obtenção da sequência completa foi possível realizar a expressão em *E. coli* (CARDOSO et al., 2023).

### 4.2 Preparo de Reagentes e Soluções

As soluções utilizadas durante todos os experimentos estão listadas nas Tabelas 3 e 4, juntamente com cada componente e informações importantes para sua produção.

Tabela 3. Soluções tampão

<b>Tampão</b>	<b>Materiais</b>	<b>pH</b>
<b>Tris-HCl 50 mM</b>	Tris-HCl 50 mM e água ultrapurificada q.s.p 1 L	8.6
<b>PBS</b>	KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24 g, Na <sub>2</sub> CHPO <sub>4</sub> 1,44 g, KCl 0,1 g, NaCl 8 g, água destilada q.s.p 1 L	7.4
<b>Tris-Glicina</b>	Tris-base 125 mM, glicina 960 mM e água ultrapurificada q.s.p 1 L	
<b>TBS</b>	Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM e Água ultrapurificada	7.6
<b>TBST</b>	Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, água ultrapurificada q.s.p 1 L	7.6
<b>Tampão de Amostra proteína</b>	Tris-HCl 0,5 M, SDS 20%, β-mercaptoetanol 4%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0,1%.	6.8
<b>Tampão de Amostra DNA</b>	Tris-HCl 200 mM, SDS 4%, β-mercaptoetanol 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 4%.	6.8
<b>Tampão de transferência</b>	de 200 mL de Metanol, 5,8 g de Tris-base, 0,37 g de SDS, 2,9 g de glicina-HCl e água destilada q.s.p 1 L	8.3
<b>Tampão de corrida</b>	Tris 125 mM, glicina 0,96 M, SDS 0,5%	8.4
<b>Tampão de Lise</b>	Tris-HCl 50 mM, PMSF 1mM e EDTA 5 mM	8.6
<b>Tampão TAE</b>	Tris-Base 0,04 M, 1,141 mL de Ácido Acético Glacial, EDTA 0.5 M	7.4
<b>Tampão de ligação</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, Ureia 8 M	8.0
<b>Tampão de eluição</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, Ureia 8 M	4.5
<b>Tampão de lavagem</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, Ureia 8 M	6.3

Tabela 4. Meio de cultivo líquido e sólido

<b>Meio de cultivo</b>	<b>Massa</b>	<b>Volume</b>
<b>Triptona (Sigma)</b>	10 g	
<b>NaCl (Sigma)</b>	10 g	
<b>Extrato de levedura (Sigma)</b>	5 g	
<b>Água destilada</b>		q.s.p 1 L
<b>Ágar LB 1,4%</b>	14 g	q.s.p 1 L

### 4.3 Soluções e Reagentes

- Solução de Coomassie Blue R250 (GE Healthcare)

1 tablete dissolvidos em 80 mL de água destilada

120 mL de etanol

- Solução descorante

450 mL de metanol

100 mL de ácido acético glacial

q.s.p. 1000 mL de água destilada

- Solução de Acrilamida/bisacrilamida

58,4 g de acrilamida

1,6 g de bis-acrilamida

200 mL de água destilada

Filtrar em membrana de 22  $\mu$ m e refrigerar

- Marcador LMW

Solução de L-asparagina 0,1 M

49,9 mg de L-asparagina (Sigma)

2 mL de água ultrapurificada

- Solução de hidroxilamina 1M

Solução estoque de 2 M de hidroxilamina

278 mg de Cloridrato de hidroxilamina

2 mL de água ultrapurificada

Solução neutralizante:

160 mg de NaOH

2 mL de água ultrapurificada

Solução de hidroxilamina 1 M é obtida pela mistura das duas soluções na proporção 1:1 e pH 7.0.

- Solução de FeCl<sub>3</sub>/TCA/HCl

**Solução de FeCl<sub>3</sub>:**

10 mg de cloreto férrico

100 mL de água ultrapurificada

**Solução TCA/HCL:**

5,45 mL de ácido clorídrico 37%

20 mL de ácido tricloroacético

100 mL de água ultrapurificada

Misturar as duas soluções.

#### 4.4 Construção do vetor pET-28a (+)

A construção do vetor e a expressão heteróloga da L-ASNase do fungo *Fusarium proliferatum* foi realizada por meio de uma parceria com a coordenadora do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia (Universidade de Brasília), Professora Dr<sup>a</sup>. Eliane Noronha, que solicitamente também cedeu o espaço físico do laboratório para realização desses experimentos. Após obtenção da sequência completa do fragmento correspondente ao gene de L-ASNase *F. proliferatum* previamente identificado por Cardoso *et al.* (2023), a sequência foi códon otimizada para expressão em *E. coli* e encontra-se flanqueada por sítios de restrição para as enzimas XhoI e NdeI. À jusante do gene de L-ASNase foi adicionado um códon de parada a fim de impossibilitar a expressão da *His-6-Tag* na porção C-terminal. À montante do gene de L-ASNase, está localizado o promotor T7lac. Uma sequência nucleotídica correspondente a *His-6-Tag*, denominada cauda de histidina, foi adicionada na posição N-terminal e a mesma encontra-se fusionada

ao gene da L-ASNase com um sítio de clivagem de trombina para posterior remoção da cauda. Além disso, o vetor pET-28a (+) conta com uma sequência de nucleotídeos que confere resistência à canamicina, que vai atuar como agente de seleção. O gene de L-ASNase de *F. proliferatum* foi sintetizado e clonado no vetor pET-28a (+) foi sintetizado pela empresa GenOne Biotech (Figura 5).

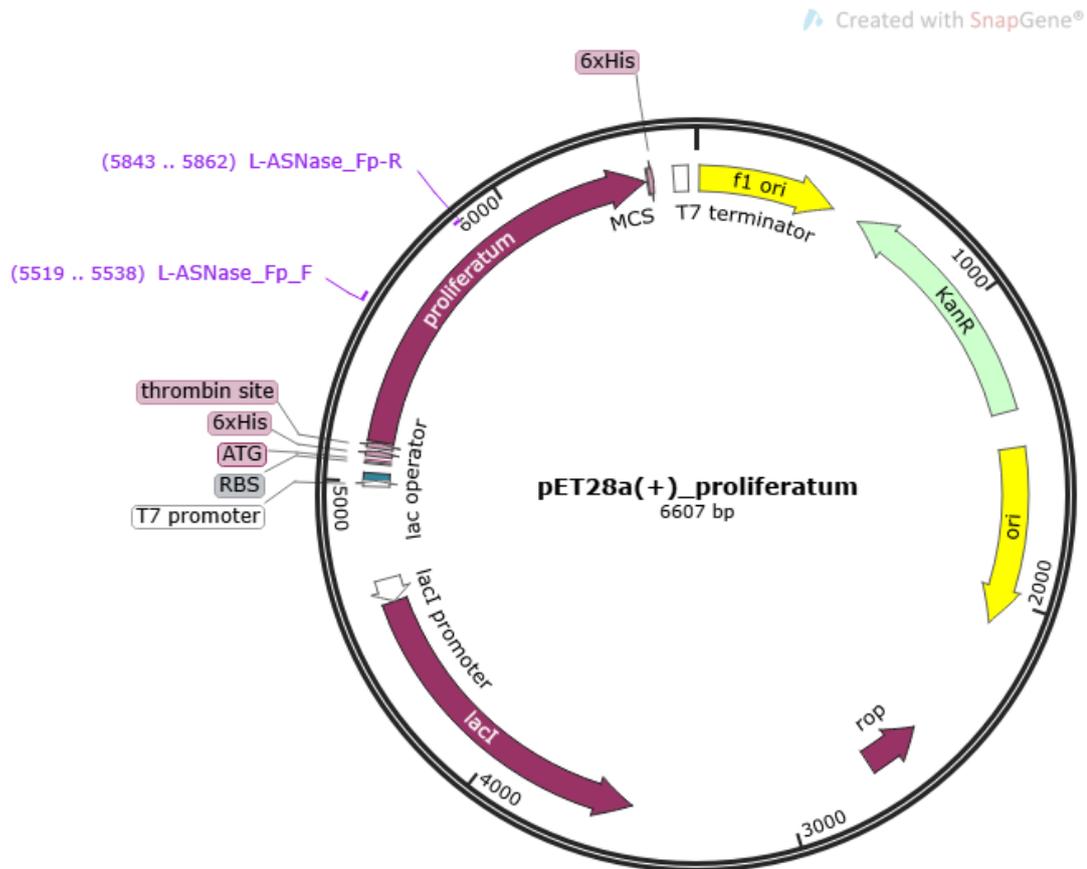


Figura 5. Representação do vetor pET-28a (+) contendo o gene de L-ASNase\_Fp. (Figura gerada pelo programa SnapGene Viewer)

#### 4.5 Preparo de células termocompetentes e transformação

Uma colônia da cepa de *E. coli* DH10B, foi adicionada em 1 mL de meio Luria Bertani (LB) (KASVI) e mantida em agitação de 200 rpm, a temperatura de 37°C, durante um período de 16 horas. Após finalização da cultura, foi adicionado 1 mL da cultura crescida em 99 mL de meio LB e mantido nas mesmas condições de agitação e temperatura mencionados, por 4 horas. Separou-se a cultura em 2 tubos Falcon mantidos em banho de gelo por 20 minutos. Em seguida, esse conteúdo foi

centrifugado nas condições de 2000 x g, 4 °C por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 20 mL de solução gelada de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,1 M e mantido em banho de gelo por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* unidos e ressuspendidos em 5 mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M com glicerol 15%. Alíquotas de 200 µL foram transferidas para microtubos e armazenadas em *freezer* a -80 °C.

Posteriormente, 200 µL dessas células competentes foram incubadas com 0,02 µg de DNA plasmidial em banho de gelo por 30 minutos. Os sistemas de transformação foram incubados a 42 °C por 3 minutos e em seguida incubados em banho de gelo por 2 minutos. Aos tubos submetidos ao choque térmico foi adicionado 900 µL de meio LB e manteve-se incubando por 1 hora a 37 °C. Essas amostras foram submetidas a centrifugação a 14000 rpm, por 30 segundos e 800 µL do sobrenadante foi descartado. Os 100 µL restantes corresponde as células transformadas que foram semeadas em placas de Petri, contendo meio LB ágar com 10 µL de canamicina (50 mg/mL) e mantido incubando por 37 °C em estufa, *overnight*.

#### **4.6 Clonagem do vetor pET-28a (+) – L-ASNase em *E. coli* DH10B**

As células da linhagem de *E. coli* DH10B foram cedidas gentilmente também pela Professora Dr<sup>a</sup>. Eliane Noronha, e foram transformadas conforme descrito no item 4.4. Uma colônia foi selecionada para multiplicação do plasmídeo e cultivada em 20 mL de meio LB, contendo 20 µL de canamicina (50 mg/mL), sob agitação de 200 rpm, a 37 °C, *overnight*. Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial, utilizando o Kit de Extração de DNA Plasmidial (Invitrogen), onde 1,5 mL da cultura foi coletada e centrifugada nas condições 8 000 x g, 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante descartado e mais 1,5 mL de cultura foi coletada e submetida a centrifugação nas mesmas condições. Na segunda etapa, foi adicionado 250 µL de tampão de ressusensão contendo RNase A e o *pellet* foi ressuspendido até homogeneidade. Na fase de lise foi adicionado 250 µL de tampão de lise, misturando gentilmente até a solução estar homogênea e esta foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 350 µL de tampão de precipitação e, após gentilmente misturada, a solução foi centrifugada a 12 000 x g, 4 °C, por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante da etapa anterior foi adicionado a um tubo de lavagem e o conteúdo foi centrifugado nas mesmas condições por 1 minuto. Após

centrifugação, foi adicionado a coluna 500 µL de tampão de lavagem com etanol, que foi incubada por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores. Para remover o etanol foi adicionado 700 µL de tampão de lavagem, a coluna foi centrifugada novamente sob as mesmas condições e ao final a coluna foi encaixada a um novo tubo de lavagem e centrifugada novamente seguindo os mesmos parâmetros. O tubo contendo filtro foi descartado. Para eluição a coluna foi adicionada a um tubo de eluição limpo e 75 µL de água foram adicionados ao centro da coluna e permaneceu em incubação por 1 minuto em temperatura ambiente. Novamente, a centrifugação foi realizada a 12000 x g por 2 minutos para que fosse obtido o DNA plasmidial purificado no tubo de lavagem. A integridade do vetor foi analisada em gel de agarose 0,8% (0,4 g para 50 mL de tampão TAE) corado com 5 µL de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), e a confirmação foi feita utilizando reação de PCR.

Para reação de PCR foi adicionado 1 µL de DNA molde (100 ng/ µL) e um controle negativo contendo apenas 1 µL de água destilada. Os *primers forward* e *reverse*, de sequências (5'-AGACCACGGGTTATCAGAGC-3') e (5'-GACGCTAGACAGCAGGTTCA-3'), respectivamente, foram utilizados na reação de PCR, com os respectivos reagentes e volumes descritos na Tabela 5. A amplificação foi realizada com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida por 30 ciclos repetidos de 94°C por 30 s, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 minutos. e após fim da reação de PCR, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1,2% (0,6 g para 50 mL de tampão TAE), corado com 5 µL de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

O mesmo procedimento foi realizado com o vetor pet-28a para utilização como controle negativo.

Tabela 5. Soluções para reação de PCR

Soluções		Concentração	Volume
GoTaq® DNA Polymerase (Promega Corporations)		5 U/ $\mu$ L	0,1 $\mu$ L
Reaction Buffer	(Promega Corporations)	22mM	2 $\mu$ L
dNTPs (Promega Corporations)		20 mM	0,4 $\mu$ L
Primer forward		10 mM	2 $\mu$ L
Primer reverse		10 mM	2 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>		1.65 mM	1,2 $\mu$ L
DNA molde			1 $\mu$ L
Água destilada autoclavada			20 $\mu$ L

#### 4.7 Expressão do vetor pET-28a (+) – L-ASNase em *E. coli* BL21(DE3) e seleção de clones transformados

A linhagem de *E. coli* BL21(DE3), com gene de L-ASNase nativa deletado, foi fornecida gentilmente pela empresa farmacêutica de pesquisa e desenvolvimento de processos biotecnológicos, ©BIOBREYER. O preparo de células competentes dessa linhagem foi preparado conforme descrito no item 4.4 e a partir do cultivo nas placas de Petri 10 colônias isoladas foram selecionadas para serem cultivadas em 20 mL de meio LB, contendo 20  $\mu$ L de canamicina (50 mg/mL) e a extração do DNA e PCR foram feitas conforme descrito no item 4.5.

#### 4.8 Construção de banco de células

Após confirmação da transformação um estoque de células de *E. coli* das linhagens DH10B e BL21 (DE3) foi preparado para criopreservação em freezer -80 °C. Para esse estoque os clones transformados foram adicionados a 15 mL de meio LB em tubo Falcon de 50 mL, contendo 15  $\mu$ L de canamicina (50 mg/mL) e mantidos sob agitação a 200 rpm, 37 °C, *overnight*. Quando o cultivo atingiu a OD (600) de 1.5, ou seja, a fase estacionária, essas amostras foram centrifugadas a 9000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspensionado em 1 mL de NaCl 0,85%. Uma alíquota de 12 mL do cultivo foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante resultante dessa última centrifugação foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 12 mL de meio de criopreservação, contendo 85% de meio

LB estéril e 15% de glicerol estéril. Essa solução foi dividida em porções de 500 µL em criotubos e armazenadas em *freezer* -80 °C.

#### 4.9 Extração de proteínas por sonicação

Anteriormente à extração de proteínas dos 10 clones selecionados, foram preparados cultivos em tubos Falcon estéreis com 15 mL de meio LB, contendo 15 µL de canamicina (50 mg/mL) e 15 µL de células transformadas criopreservadas. Além disso, o pET-28a (+) foi cultivado nas mesmas condições para ser utilizado como controle. Esses cultivos foram mantidos em *shaker* a 200 rpm, 37 °C, por aproximadamente 18 horas. Após esse período, foi mensurada a OD (600) de cada um para calcular o quanto seria utilizado desse pré-inóculo para preparo do cultivo.

Para extração propriamente dita foram preparados cultivos contendo 30 mL de meio LB em Erlenmeyers autoclavados com 30 µL de canamicina (50 mg/mL) e mantidos em *shaker* sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 5 horas. Em seguida, foi adicionado 13,5 µL de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) na concentração de 0,45 mM e mantido nas mesmas condições de cultivo *overnight*. As culturas crescidas foram centrifugadas em tubos Falcon de 50 mL a 8000 x g por 10 minutos a 4 °C e o meio foi descartado. Uma alíquota de 10 mL de Tampão Tris-HCl 50 mM foi adicionada aos tubos e as amostras misturadas em agitadores tipo vórtex até completa homogeneização, estando prontas para extração celular de proteínas.

A extração de proteínas foi realizada utilizando a metodologia de rompimento celular com ultrassom Sonicador Vibra Cell de ponteira VC-50 ¼. A ponteira do equipamento é mantida em contato na amostra que está no tubo Falcon de 50 mL submerso em gelo. Cada uma das amostras foi submetida a sonicação nos parâmetros 7 minutos, 30 segundos ON, 45 segundos OFF, com amplitude de 30% (COSTA-SILVA *et al.*, 2018). Após lise celular, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g, por 10 minutos e a 4 °C. O sobrenadante transferido para um novo tubo é denominado fração solúvel e o *pellet* ressuspenso e misturado com tampão Tris-HCl 50 mM é denominado fração insolúvel.

#### 4.10 Otimização das metodologias de rompimento celular

Para avaliar qual método de rompimento celular apresenta maior eficiência e

resultado na lise celular, 5 métodos adaptados com diferentes tempos e pulsos foram executados. Após o ensaio de *Western Blot* o clone que apresentou banda mais intensa foi selecionado para a otimização e um pré-inóculo para cada método foi preparado como descrito no item 2.8. Em seguida, após realizar a leitura da OD600 e transferir o volume equivalente para uma OD600 de 0,1 foram preparados 5 inóculos em tubos Falcon, contendo 20 mL de meio LB suplementado com 20 µL de canamicina (50 mg/mL) e incubado em *shaker* a 200 rpm, 37 °C por 3 horas. A expressão foi induzida após esse período com 10 µL de IPTG 0,5 mM e incubou-se novamente sob as mesmas condições de agitação e temperatura por 18 horas.

Após incubação, cada amostra foi centrifugada a 10000 x g, 4 °C por 10 minutos, o meio foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8.6 e em seguida os métodos listados na Tabela 6 foram executados utilizando Sonicador Vibra Cell de ponteira VC-50 ¼.

Tabela 6. Metodologias adaptadas de lise celular

<b>Método</b>	<b>Tempo</b>	<b>Pulso</b>	<b>Amplitude</b>
(COSTA-SILVA <i>et al.</i> , 2018)	7 minutos	35 seg <i>ON</i> 45 seg <i>OFF</i>	30%
(UPADHYAY <i>et al.</i> , 2014)	10 minutos	1 min <i>ON</i> 1 min <i>OFF</i>	30%
(UPADHYAY <i>et al.</i> , 2014)	20	1 min <i>ON</i> 1 min <i>OFF</i>	30%
(SINGHVI <i>et al.</i> , 2021)	10 ciclos de 1 minuto com pausa de 1 minuto entre cada ciclo	1 seg <i>ON</i> 1 seg <i>OFF</i>	30%
(LIMA <i>et al.</i> , 2020)	15 minutos	1 seg <i>ON</i> 1 seg <i>OFF</i>	30%

Ao final dos testes de lise celular as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e denominado fração solúvel e o *pellet* foi ressuspensado em 10 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8.6 e denominado fração insolúvel. As amostras foram posteriormente submetidas a quantificação de proteínas totais e precipitadas para análise em gel de SDS-PAGE.

#### 4.11 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais extraídas conforme item 4.9 foi realizada utilizando a metodologia do ácido bicinconínico com o Kit de Ensaio de Proteínas BCA Pierce (Thermo Fisher Scientific). O reagente de BCA é uma mistura de bicinconinato (BCA) e sais de cobre. Em um meio alcalino, na presença de proteínas, as ligações peptídicas reduzem o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ , que por sua vez interage com o bicinconinato (BCA) formando um complexo colorido, que pode variar do verde ao roxo dependendo da concentração de proteínas presentes, onde a intensidade da cor é diretamente relacionada ao número de ligações formadas, ou seja, a quantidade de proteínas na solução (BROWN; JARVIS; HYLAND, 1989; SMITH *et al.*, 1985). O ensaio se deu pela adição de alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  de cada uma das 10 amostras de proteínas extraídas e de 200  $\mu\text{L}$  do reagente que foram adicionadas em triplicata em uma placa de 96 poços. A dosagem das proteínas totais está expressa em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A absorbância da solução pode ser medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 562 nm a temperatura de 37 °C por incubados por 30 minutos. Dessa forma, as proteínas foram quantificadas em  $\mu\text{g}/\text{mL}$  utilizando a equação da reta ( $y = 0,0011x + 0,0386$ ) obtida pelas diluições da Albumina de Soro Bovino (BSA) em diferentes concentrações.

#### 4.12 Precipitação de proteínas por interação hidrofóbica com ácido tricloroacético

O ácido tricloroacético (TCA) é um derivado do ácido acético, no qual os átomos de hidrogênio foram substituídos por átomos de cloro. A adição de TCA a soluções aquosas de proteínas resulta na desestruturação das ligações de hidrogênio presentes na solução, levando à diminuição da solubilidade das proteínas e à precipitação das mesmas (KOONTZ, 2014). Dessa forma, a partir dos dados obtidos na quantificação de proteínas foi utilizado TCA para precipitação de cada uma das amostras em microtubos por 18 horas, contendo o volume em  $\mu\text{L}$  correspondente a 50  $\mu\text{g}$  de proteína, e em seguida as proteínas precipitadas foram recuperadas por centrifugação nas condições 10000 x g por 10 minutos a 4 °C e lavagem com 1 mL de acetona. Esse processo foi repetido 3 vezes e ao final as amostras foram mantidas a temperatura de 25 °C para secagem da acetona. Após a lavagem, foi adicionado às

amostras uma mistura de 20  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra contendo  $\beta$ -mercaptoetanol para desnaturação das proteínas e estas foram mantidas em banho seco a 100 °C por 5 minutos para secagem do  $\beta$ -mercaptoetanol e, em seguida, mantidas *freezer* -20°C para posterior análise em gel de SDS-PAGE.

#### **4.13 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%**

As amostras proteicas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) que é uma técnica científica que utiliza um campo elétrico para separação de moléculas através de uma matriz de gel com base em suas propriedades eletrofísicas e químicas (KUMAR ROY; SENTHIL KUMAR; GURUSUBRAMANIAN, 2012). Os géis separador e concentrador foram preparados conforme protocolo adaptado de Marcelino & Grossi de Sá (2015) descrito na Tabela 7, utilizando solução de acrilamida e bisacrilamida para polimerização e formação da rede porosa, que na presença de persulfato de amônio forma o gel de SDS-PAGE, além da utilização do tetrametiletilenodiamina para manutenção da conformação desnaturada da proteína (MARCELINO; GROSSI DE SÁ, 2015).

Os 20  $\mu\text{L}$  das 10 amostras precipitadas como descrito no item 4.12 foram adicionadas aos poços formados no gel concentrador, juntamente com 10  $\mu\text{L}$  de um marcador de baixo peso molecular (*Low Molecular Weight* GE Healthcare) contendo fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14 kDa). Uma voltagem de 150 a 250 V foi ajustada para corrida eletroforética e posteriormente os géis foram corados utilizando o Kit *PlusOne Silver Staining* (GE Healthcare) em diferentes etapas. Na primeira etapa, de fixação, o gel foi incubado em 50  $\mu\text{L}$  de solução fixadora (100 mL de etanol, 25 mL de ácido acético glacial, água destilada q.s.p 250 mL) por 30 minutos em mesa agitadora a 100 rpm. Em seguida, a solução fixadora foi trocada por 50  $\mu\text{L}$  de solução sensibilizante (75 mL de etanol, 10 mL de tiosulfato de sódio, 17 g de acetato de sódio, água destilada q.s.p 250 mL) contendo 250  $\mu\text{L}$  de glutaraldeído e mantida sob as mesmas condições de tempo e agitação anteriores.

Foram realizadas 3 lavagens com água destilada por cerca de 5 minutos e uma solução de nitrato de prata (25 mL de nitrato de prata e água destilada q.s.p 250 mL) foi adicionada por 20 minutos a 100 rpm, seguida de mais 2 lavagens com água

destilada, de 1 minuto cada, para em seguida, adicionar 50 mL da solução reveladora (6,25 g de carbonato de sódio e água destilada q.s.p 250 mL) com 40 µL de formaldeído para que fosse possível observar o surgimento das bandas. Essa reação foi interrompida utilizando solução de parada (3,65 g de EDTA-N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O e água destilada q.s.p 250 mL). Os géis corados com *Coomassie Blue* (GE Healthcare) foram banhados com a solução e mantidos sob agitação de 100 rpm *overnight* e em seguida foram lavados com solução descorante até que o gel ficasse transparente e as bandas perceptíveis.

Tabela 7. Componentes para preparo de gel de poliacrilamida

<b>Material</b>	<b>Gel Separador</b>	<b>Gel Concentrador</b>
<b>Água ultrapurificada</b>	3,34 mL	3,65 mL
<b>Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6.8</b>	_____	1,25 mL
<b>Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8.8</b>	2,5 mL	_____
<b>Acrilamida/Bisacrilamida 30 %</b>	4 mL	1 mL
<b>SDS 10%</b>	100 µL	60 µL
<b>TEMED (marca)</b>	10 µL	6 µL
<b>Persulfato de amônio 10% (APS)</b>	50 µL	30 µL

#### 4.14 *Western blot*

Dos 10 clones analisados por SDS-PAGE, os 3 com bandas mais intensas foram selecionados para análise e confirmação por *Western Blot*, sendo eles o clone 5, clone 6 e clone 10. Além disso, foi utilizado um controle negativo de amostras de *E. coli* BL21(DE3) clonadas com pET-28a (+) vazio. Inicialmente foi realizada uma corrida em gel de SDS-PAGE e em seguida, na etapa de transferência, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) do tamanho do gel de SDS-PAGE. Abaixo da membrana está um filtro de papel e o gel de SDS-PAGE é então posicionado acima da membrana, e acima dele outro filtro de papel (Figura 6).

Tanto os filtros de papel e a membrana devem ser mergulhados em tampão de transferência. O processo de transferência foi realizado em um sistema semi-seco, por 1 hora e 30 minutos, a 14 V. Após a transferência, a membrana foi mergulhada em solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5% (p/v) solubilizado em 5 mL de tampão TBST) durante 2 horas sob agitação de 25 rpm. Em seguida foi adicionado o anticorpo *Anti-His Tag* (Invitrogen) diluído 1:5000, por 1 hora sob agitação de 25 rpm. Para finalizar, a membrana foi submetida a 3 lavagens de 10 minutos utilizando tampão TBST e foi revelada por quimioluminescência.

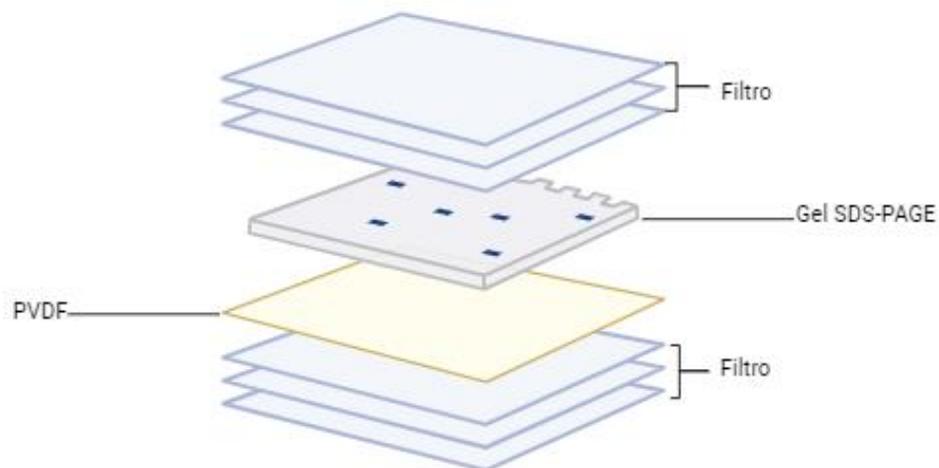


Figura 6. Camadas de filtro, membrana e gel, para realização do ensaio de *Western Blot* (Figura adaptada pela autora em "BioRender")

#### 4.15 Quantificação da atividade enzimática de L-asparaginase

##### 4.15.1 Método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxâmico (AHA)

No método utilizando ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxâmico (AHA) o ácido aspártico gerado durante a hidrólise da L-asparagina é empregado como um substrato para avaliar a atividade enzimática na presença de hidroxilamina. Conseqüentemente, quando o ácido aspártico reage com a hidroxilamina em um meio contendo L-ASNase, ocorre a formação de  $\beta$ -hidroxamato aspártico. A interrupção da reação é realizada mediante a adição de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), ácido tricloroacético (TCA) e ácido clorídrico (HCl), resultando na formação de complexos com o  $\beta$ -hidroxamato aspártico, que manifestam uma coloração marrom a rosada. Para determinação da atividade

enzimática da L-asparaginase então foi utilizada a metodologia descrita por Drinas *et al.* (1977) com modificações (Tabela 8), aplicada as amostras de cada um dos 10 clones cultivados, em triplicata. A mistura permaneceu incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e em seguida foi adicionada a solução de FeCl<sub>3</sub>/TCA/HCl para interrupção da reação. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm, a 4 °C por 5 minutos. Uma alíquota de 200 µL foi retirada para fazer a leitura em espectrofotômetro a 500 nm. (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). Para a construção da curva padrão (Figura 7) foi utilizado uma solução padrão de β-hidroxâmato aspártico 5 mM. Uma unidade de asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol β-hidroxâmato aspártico por minuto.

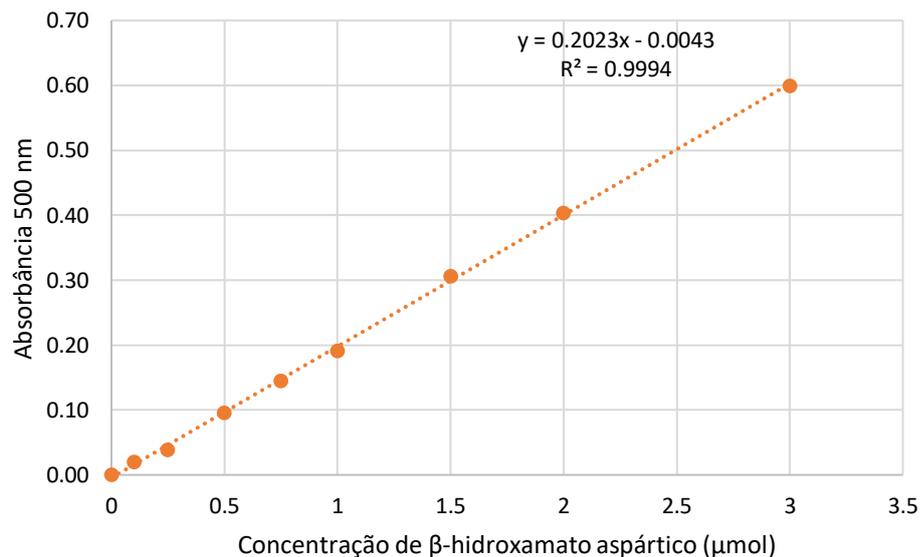


Figura 7. Curva padrão AHA para quantificação da atividade enzimática através da produção de β-hidroxâmato.

Tabela 8. Ensaio de quantificação da atividade de L-asparaginase

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
<b>Tris HCl 50 mM pH 8.6</b>	1,5 mL
<b>L-asparagina 0,1 M</b>	0,2 mL
<b>Hidroxilamina 1 M pH 7.0</b>	0,2 mL
<b>Solução de cloreto férrico/TCA/HCl</b>	0,5 mL

#### 4.15.2 Método do reagente de Nessler

A metodologia de detecção de atividade de L-asparaginase utilizando o reagente de Nessler quantifica a amônia presente no meio, baseada no mecanismo de ação da L-ASNase, que libera ácido aspártico e amônia quando realiza a hidrólise da L-asparagina. De acordo com Imada *et al.* (1973), uma unidade internacional (UI) de L-ASNase representa a quantidade da enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de amônia por minuto. Para esse ensaio, foram preparadas a curva padrão com uma solução de amônia 12mM (Figura 8) e as soluções listadas na Tabela 9, e o banho-maria foi estabilizado para 37 °C. Na Etapa 1 as soluções foram adicionadas em microtubo de 5 mL, em triplicata e no branco da amostra, e foram mantidas por 5 minutos em banho-maria a 37 °C. 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra de clone foi adicionado e os tubos foram agitados por inversão e mantidos no banho-maria por 30 minutos. As amostras não são adicionadas ao branco nessa fase do ensaio. Após esse período, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) para interromper a reação. Nos tubos identificados como “branco” as amostras correspondentes foram adicionadas e em seguida o TCA, nas mesmas proporções já mencionadas. Os tubos foram agitados por inversão e centrifugados a 8 000 x g por 2 minutos. Na Etapa 2 novos tubos foram separados e as soluções listadas na Tabela 10 foram adicionadas na ordem apresentada na tabela. Por último, os tubos foram agitados por inversão e após 1 minuto as absorbâncias foram medidas a 436 nm. (IMADA *et al.*, 1973).

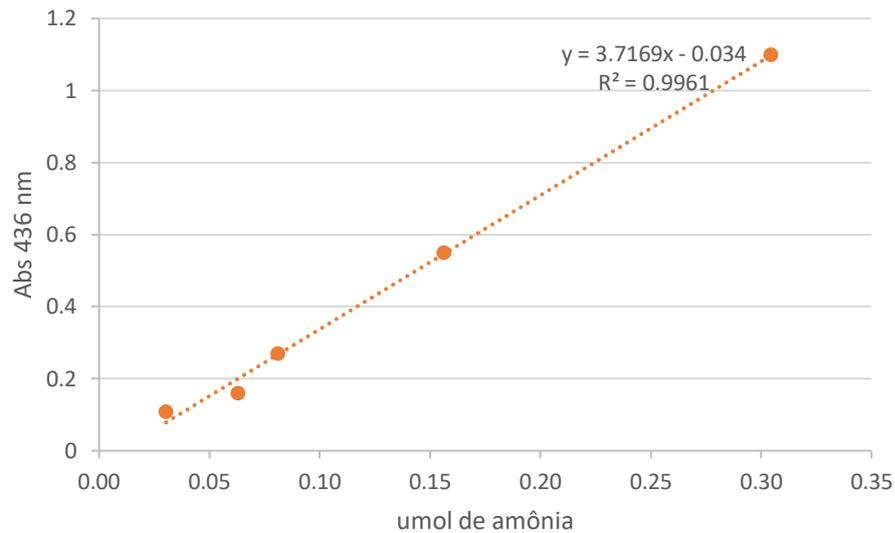


Figura 8. Curva padrão reagentes de Nessler para quantificação da atividade de L-asparaginase através da concentração de amônia formada na reação.

Tabela 9. Reagentes para Etapa 1

<b>Solução</b>	<b>Volume Amostra</b>	<b>Volume Branco</b>
<b>Tris HCl 50 mM pH 8.6</b>	1 mL	1 mL
<b>L-asparagina</b>	100 µL	100 µL
<b>Água ultrapurificada</b>	400 µL	400 µL

Tabela 10. Reagentes para Etapa 2

<b>Solução</b>	<b>Volume Amostra</b>	<b>Volume Branco</b>
<b>Água ultrapurificada</b>	4,3 mL	4,3 mL
<b>Sobrenadante</b>	200 µL	200 µL
<b>Reagente de Nessler</b>	500 µL	500 µL
<b>Volume final</b>	5 mL	5 mL

#### 4.16 Curva de crescimento bacteriano

Anteriormente a otimização da produção de L-ASNase foi preparada uma curva de crescimento para avaliar o momento ideal de indução da expressão de acordo com a densidade ótica de cada tempo de cultivo. Inicialmente foi feito um pré-inóculo

contendo 15 mL de meio LB suplementado com 15 µL de canamicina (50 mg/mL) e 50 µL de *E. coli* BL21 (DE3) contendo L-ASNase\_*Fp*, que foi mantido em *shaker* sob agitação a 200 rpm, 37 °C, *overnight*. A OD600 foi medida e calculada para 0,1 utilizando uma alíquota de 1 mL. Três cultivos em 100 mL de meio LB foram preparados, adicionando 100 µL de canamicina (50 mg/mL) e o volume de pré-inóculo correspondente a OD600 de 0,1. A cada 2 horas, durante 10 horas de cultivo, foi retirada uma nova alíquota de 1 mL para monitorar o crescimento celular medindo a densidade ótica a 600 nm e os valores foram adicionados em triplicata a uma tabela para obtenção da curva de crescimento.

#### **4.17 Otimização do cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB**

A otimização da produção de L-asparaginase foi iniciada preparando-se um pré-inóculo em 3 tubos Falcon de 50 mL contendo 20 mL de meio LB, 20 µL de canamicina (50 µg/mL) e 100 µL do estoque de *E. coli* BL21 (DE3) contendo L-ASNase\_*Fp*, que foi mantido sob 200 rpm de agitação em *shaker*, a 37 °C, *overnight*. A partir desse cultivo, foi coletado um volume correspondente a OD600 inicial de 0,1, transferido para Erlenmeyer contendo 210 mL de meio LB, 210 µL de canamicina (50 mg/mL), mantido sob as mesmas condições de agitação e temperatura anteriores. Essa amostra foi dividida em 21 tubos Falcon de 50 mL, contendo 10 mL de meio LB, 10 µL de canamicina (50 mg/mL), submetida a agitação de 200 rpm, 37 °C por 2,5 horas, período no qual a OD600 atinge aproximadamente 75% da fase exponencial.

Decorridas as 2,5 horas do início do cultivo, as culturas foram induzidas com diferentes concentrações de IPTG, sendo elas 0,1 mM, 0,5 mM e 1,0 mM, distribuídos conforme Tabela 11. Além da concentração do indutor, a temperatura também foi uma variante analisada, onde esse mesmo processo foi repetido em amostras com crescimento após indução de 20 °C. Dessa forma, o início do cultivo se deu a 37 °C e, após indução, 21 amostras permaneceram a 37 °C, enquanto outras 21 foram mantidas a 20 °C.

Tabela 11. Condições de otimização de tempo e concentração de indutor da produção de L-asparaginase

<b>Amostra</b>	<b>Tempo de cultivo (h)</b>	<b>IPTG (mM)</b>
<b>0</b>	0	0.1
		0.5
		1.0
<b>1</b>	2	0.1
		0.5
		1.0
<b>2</b>	4	0.1
		0.5
		1.0
<b>3</b>	8	0.1
		0.5
		1.0
<b>4</b>	12	0.1
		0.5
		1.0
<b>5</b>	20	0.1
		0.5
		1.0
<b>6</b>	24	0.1
		0.5
		1.0

A cada intervalo de tempo de cultivo especificado na Tabela 11, foram coletadas amostras, retiradas do agitador, e submetidas a uma centrifugação a 10.000 x g, a 4 °C, por 10 minutos, com subsequente descarte do sobrenadante. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 10 mL de tampão de lise. Posteriormente, as amostras foram sonicadas em um banho de gelo, utilizando a metodologia selecionada com base no método mais apropriado, conforme definido pela descrição no item 4.15.

Após o processo de lise celular, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, a 4 °C, e divididas em frações solúveis e insolúveis. As frações foram então armazenadas a -20 °C. A quantificação das proteínas totais foi realizada, seguida pela precipitação e subsequente análise por eletroforese em gel de poliacrilamida.

#### **4.18 Concentração das amostras cultivadas a 20 °C**

As amostras das frações solúveis a 20 °C foram submetidas à concentração

utilizando uma coluna contendo uma membrana, que promove a separação de biomoléculas pelo tamanho quando sujeitas a centrifugação, com o objetivo de obter uma quantidade ampliada de proteínas solúveis para a subsequente avaliação da atividade enzimática da L-ASNase. Para iniciar este ensaio, foi preparado um cultivo contendo 200 mL de meio LB, ao qual foram adicionados 200 µL de canamicina (50 mg/mL) e 50 µL de células BL21 (DE3) previamente armazenadas. O cultivo foi conduzido de acordo com as melhores condições estabelecidas, sendo iniciado a 37 °C e com uma fase de crescimento de 12 horas após a indução com 0,5 mM de IPTG, a uma temperatura de 20 °C, mantido sob agitação a 200 rpm. Após esse período, o cultivo foi transferido para 2 frascos Falcon de 50 mL e submetido a uma centrifugação a 8.000 x g, a 4 °C, por 10 minutos. Esse processo foi repetido duas vezes, sendo que, a cada centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionados mais 50 mL de cultivo a cada repetição do processo. Ao final, os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de tampão de lise e armazenado em a -20 °C.

Utilizando Vivaspin 6, 10 kDa (Cytiva), as amostras de 10 mL anteriormente armazenadas foram submetidas a centrifugação a 6.000 x g, 4 °C por 30 minutos. Após centrifugação, 2 mL da amostra concentrada foi recuperada para realizar ensaio de atividade enzimática utilizando a metodologia do reagente de Nessler, conforme citado no item 4.13.2, e o conteúdo que atravessou a membrana foi descartado.

#### **4.19 Solubilização dos corpos de inclusão**

Os corpos de inclusão são comumente solubilizados por meio do uso de concentrações elevadas de agentes desnaturantes, como ureia (SINGH *et al.*, 2015). Nessa metodologia de solubilização, foram testadas diferentes concentrações de ureia a fim de determinar a concentração na qual os corpos de inclusão se tornariam mais solúveis. Dessa forma, foi preparado um cultivo composto por 20 mL de meio LB, 20 µL de canamicina (50 mg/mL) e 10 µL de células BL21 (DE3) previamente armazenadas. Esse cultivo foi mantido sob agitação de 200 rpm, por 12 horas após indução com 0.5 mM de IPTG, a 37 °C. Subsequentemente, o cultivo foi centrifugado a 10.000 x g, 4 °C por 10 minutos e o *pellet* resultante foi ressuspensado em 10 mL de tampão de lise e, então, submetido a sonicação para rompimento celular com o método estabelecido pelo ensaio descrito no item 4.15.

Para solubilização, inicialmente foi preparado 200 mL de uma solução de ureia

9 M e 1000 mL de tampão Tris-HCl 50 mM. As amostras foram divididas conforme a Tabela 12 e mantidas em agitação de 100 rpm, a 25 °C por 4 horas. Posteriormente, foram submetidas a centrifugação a 12.000 x g, 4 °C, por 30 minutos, na qual sobrenadante foi recuperado e filtrado utilizando uma membrana estéril de PVDF (Merck) com poros de 22 µm. Uma alíquota de 15 µL foi combinada com 5 µL de uma mistura de β-mercaptoetanol e tampão de amostra, previamente preparada, e fervida em banho-seco por 5 minutos a 100 °C. Em seguida, as amostras solubilizadas foram submetidas a análise em eletroforese em gel de poliacrilamida.

Tabela 12. Concentrações de reagentes e amostra para solubilização

<b>Concentração de ureia</b>	<b>Volume de ureia 9 M</b>	<b>Volume de amostra</b>	<b>Volume de tampão Tris-HCl 50 mM</b>	<b>Volume final</b>
<b>1 M</b>	1,1 mL	1 mL	7,8 mL	10 mL
<b>2 M</b>	2,2 mL	1 mL	6,7 mL	10 mL
<b>3 M</b>	3,3 mL	1 mL	5,6 mL	10 mL
<b>4 M</b>	4,4 mL	1 mL	4,5 mL	10 mL
<b>5 M</b>	5,5 mL	1 mL	3,4 mL	10 mL
<b>6 M</b>	6,6 mL	1 mL	2,3 mL	10 mL
<b>7 M</b>	7,7 mL	1 mL	1,2 mL	10 mL
<b>8 M</b>	8,8 mL	1 mL	0,1 mL	10 mL

Após determinação da concentração de ureia apropriada foi preparado um cultivo de 200 mL de meio LB, suplementado com 200 µL de canamicina (50 mg/mL) e 50 µL de células BL21 (DE3) previamente transformadas. Após ser mantido sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 12 horas após indução com 0.5 mM de IPTG, uma alíquota de 50 mL do cultivo foi transferida para um tubo Falcon e centrifugada a 10.000 x g, 4 °C por 10 minutos. Esta etapa foi repetida 4 vezes até que todo o cultivo fosse centrifugado. Por fim, o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise e submetido a sonicação para rompimento celular com o mesmo método mencionado no ensaio anterior. Essa amostra foi então submetida a solubilização utilizando a concentração de ureia pré-determinada no ensaio anterior e posteriormente avaliada através de eletroforese em SDS-PAGE.

Anteriormente à solubilização, o conteúdo da fração insolúvel foi quantificado utilizando 0,5 mL de amostra, 0,5 mL de SDS 0,4% incubado por 30 minutos, a 200 rpm e 25 °C. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 16 000 x g, por 20 minutos a 4 °C e uma alíquota de 0,5 mL foi retirada para quantificação utilizando 1 mL do reagente de BCA. Essa quantificação foi realizada com o objetivo de se obter um rendimento do quanto de L-ASNase foi obtida desses corpos de inclusão após os ensaios de solubilização e purificação. De acordo com o Kit de Ensaio de Proteínas BCA Pierce (Thermo Fisher Scientific), o reagente não é afetado pela utilização de SDS, porém não é compatível com ureia em concentração acima de 3 M, portanto, após o ensaio de solubilização dos corpos de inclusão, 1 mL dessa amostra foi coletado e misturado a 9 mL de etanol gelado e mantido à temperatura de -20 °C para precipitação proteica. Em seguida, foi centrifugada a 10 000 x g, 4 °C por 20 minutos e mantida a temperatura ambiente para evaporação do etanol. Ao volume de 1 mL de amostra foi adicionado o mesmo volume de SDS 0,4% que foi submetido à agitação de 200 rpm, a 25 °C por 30 minutos, seguida de centrifugação a 16 000 x g, 4 °C por 20 minutos e o ensaio de BCA foi realizado normalmente como descrito no item 4.9. Esse processo foi repetido após a purificação para obtenção do rendimento parcial de L-ASNase.

#### **4.20 Purificação de L-ASNase\_*Fp* por cromatografia de afinidade**

A amostra que foi submetida a purificação foi previamente preparada utilizando um pré-inóculo contendo 30 mL de meio LB, 30 µL de canamicina (50mg/mL) e 50 µL de uma cultura do banco de células. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado à um Erlenmeyer de 2000 mL contendo 500 mL de meio LB e suplementado com 500 µL de canamicina (50mg/mL). Esse cultivo foi realizado seguindo as condições estabelecidas anteriormente e o volume de 500 mL foi estabelecido para obtenção de um maior rendimento celular. Ao final das 12 horas após indução o conteúdo celular resultante desse cultivo foi obtido através de centrifugação nas condições de 10.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C até concentrar os 500 mL de cultivo, e em seguida foi ressuscitado em 10 mL de tampão de lise para ser submetido a rompimento celular previamente determinado e seguiu-se com a solubilização dos corpos de inclusão, os quais foram concentrados em 10 mL utilizando Vivaspin 6, 10 kDa (Cytiva) conforme realizado no item 4.17 e por último o concentrado foi purificado.

A purificação de proteínas recombinantes é amplamente realizada através da cromatografia por afinidade, então a purificação da L-ASNase\_*Fp* foi realizada através dessa metodologia, utilizando tampões de mesma concentração de ureia, sem imidazol, apenas variando pH (purificação isocrática) e uma coluna *His-Trap* HP (Cytiva) de 5 mL carregada com sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>) 0,1 M, já que a proteína está fusionada a uma cauda de histidina na posição N-terminal. As 4 bombas foram lavadas com etanol 20% e os tampões de ligação, lavagem e eluição foram posicionados nas respectivas válvulas de entrada, seguindo as instruções do programa UNICORN (Cytiva) e a coluna *His-Trap* HP (Cytiva) foi posicionada no sistema de cromatografia AKTA pure (Cytiva). Os 10 mL de amostra foram injetados com auxílio de uma seringa utilizando um *Loop* de 10 mL e os parâmetros de equilíbrio, aplicação da amostra, lavagem e eluição foram ajustados de acordo com a Tabela 13. Além disso, frações de 10 mL de cada etapa foram coletadas em tubos de ensaio e a etapa de equilíbrio foi repetida ao final do ensaio nas mesmas condições anteriores.

Tabela 13. Etapas da purificação

<b>Etapa</b>	<b>Volumes de coluna (VC)</b>	<b>Fluxo</b>
<b>Equilíbrio</b>	5	5 mL/min
<b>Injeção da amostra</b>		0,250 mL/min
<b>Lavagem</b>	10	2 mL/min
<b>Eluição</b>	20	2 mL/min

Após a purificação, o conteúdo dos tubos de ensaio foi armazenado em tubos Falcon de 15 mL e alíquotas de 15 µL das fases de injeção, lavagem e eluição foram coletadas e adicionadas a um frasco contendo 5 µL de tampão de amostra e fervidos em banho-seco a 4 °C. Em seguida, foi realizada análise em gel de SDS-PAGE corado com Kit *PlusOne Silver Staining* (GE Healthcare).

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Transformação de *E. coli* BL21(DE3) – L-ASNase\_*Fp* com vetor pET-28a (+)

A transformação das cepas de *E. coli* DH10B e BL21 (DE3) foi confirmada através de gel de agarose 0,8% (Figura 9), onde o DNA plasmidial contendo o gene de L-ASNase\_*Fp* apresenta um tamanho de 6.607 pb. A metodologia de choque térmico auxilia no aumento da eficiência de transformação das células pelo mecanismo de criar artificialmente poros na membrana quando ocorre uma mudança de brusca de temperatura (DE-SOUZA; BRIGIDO; MARANHÃO, 2016). É possível observar na Figura 9 que em ambas as cepas o tamanho observado para o pET28-L-ASNase\_*Fp*, comparado ao marcador está abaixo de 6.000 pb, isso pode ser explicado pela tensão que é aplicada sobre a molécula de DNA quando este é submetido à ensaios de eletroforese em gel. De acordo com Gibson e colaboradores (2020), essa tensão pode levar tanto a diminuição quanto ao aumento do número de voltas que dupla hélice do DNA, formando torções super-helicoidais de aproximadamente 75% do seu tamanho original, ou seja, a estrutura do DNA fica mais compactada e pode passar mais facilmente pelos poros do gel de agarose. Por esse motivo também é possível visualizar outras bandas de tamanhos maiores. (GIBSON; OVIATT; OSHEROFF, 2020).

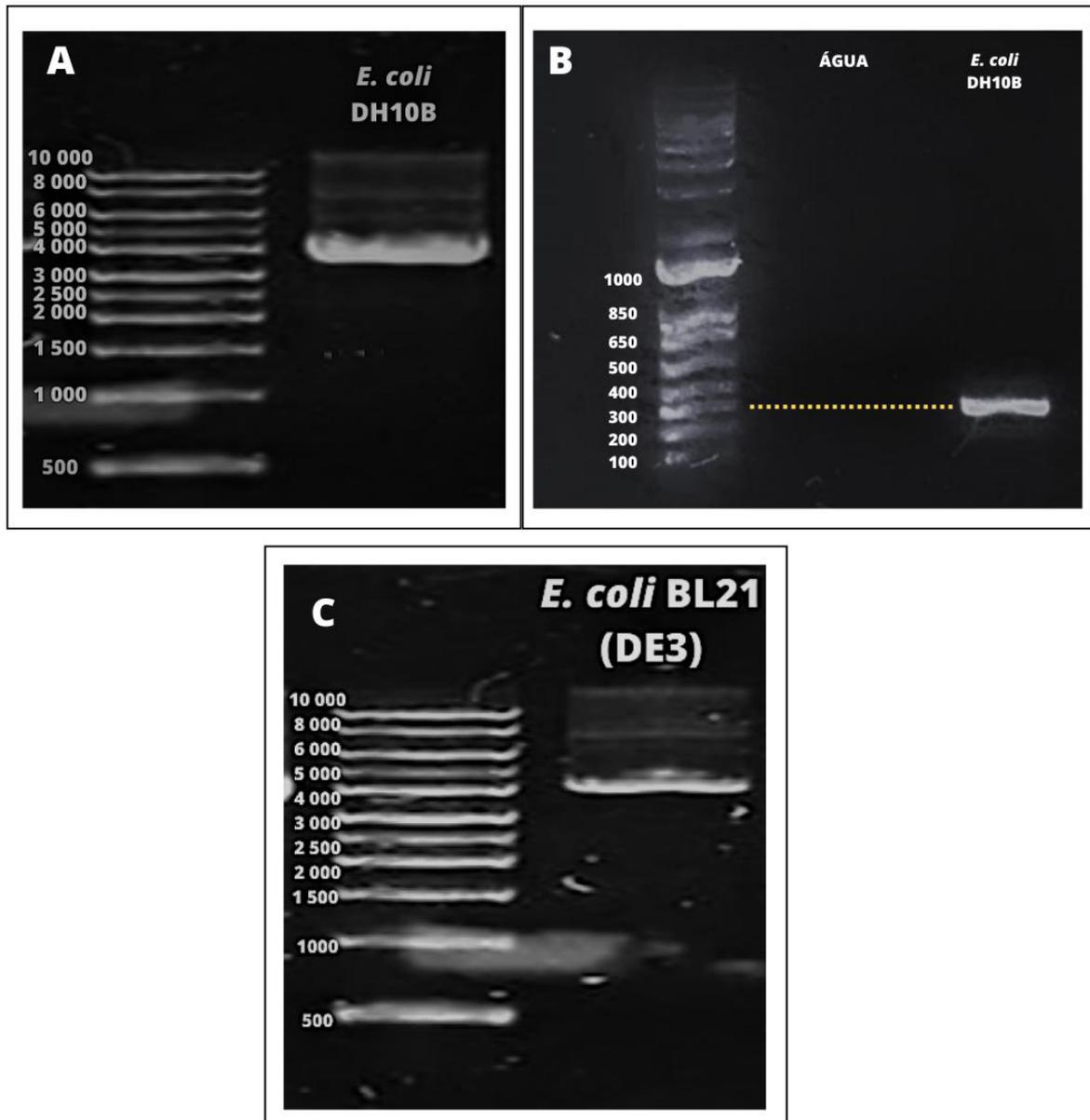


Figura 9. Gel de agarose 0,8% representando o tamanho do DNA plasmidial das cepas DH10B e BL21 (DE3) após serem transformadas utilizando vetor pET-28a (+), comparado ao marcador de fragmentos de DNA de 10.000 a 500 pb. (A) Plasmídeo da cepa DH10B, de tamanho correspondente ao esperado. (B) PCR da linhagem de *E. coli* DH10B de tamanho correspondente ao fragmento analisado. (C) Gel de agarose 1,2% confirmando por PCR a extração do plasmídeo na cepa de BL21(DE3).

Após o ensaio de extração do DNA plasmidial e confirmação da inserção do vetor em ambas as cepas, a reação de PCR foi utilizada como método de confirmação de que o gene presente no vetor utilizado é o gene de L-ASNase\_*Fp*. Através das Figuras 10 A e B é observado que tanto na cepa de DH10B e BL21 (DE3) as bandas se encontram na faixa esperada de 300 a 400 pb, já que o fragmento analisado utilizando os *primers* apresentam o tamanho esperado de 344 pb. Em

ambas as análises em gel de agarose também foram utilizados o vetor pET-28a (+) sem o gene de L-ASNase\_*Fp* e a cepa DH10B (Figura 10).

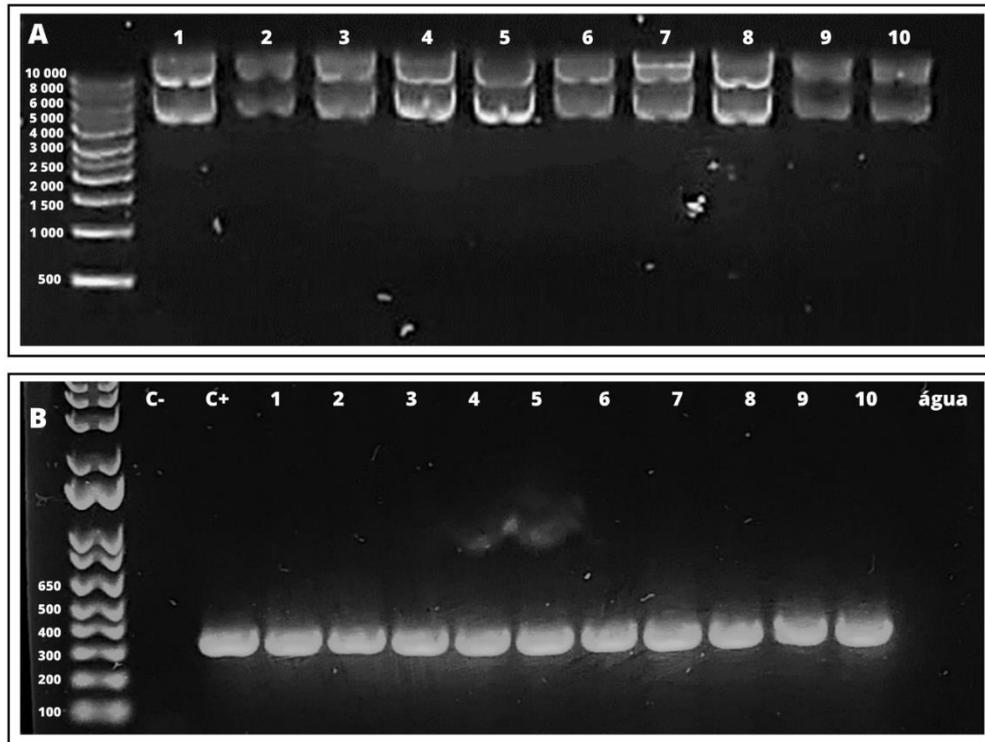


Figura 10. Gel de agarose 1,2% representando o tamanho dos clones transformados, confirmando a transformação através da análise de fragmento de PCR. (A) Gel de agarose após extração plasmidial dos 10 clones transformados, confirmando a etapa de extração através da análise do tamanho correspondente a aproximadamente 6.000 pb. (B) PCR dos 10 clones transformados, utilizando a cepa DH10B como controle positivo e o vetor pET-28<sup>a</sup> (+) como controle negativo, confirmados através da análise do fragmento de 344 pb.

## 5.2 Extração de proteína através de lise celular a partir da seleção de clones de *E. coli* BL21 (DE3) – L-ASNase\_*Fp*

Os clones transformados foram cultivados e submetidos a rompimento celular através da metodologia descrita por Lima et al., 2020, onde se utilizou um tempo de 15 minutos, sendo ele 1 segundo ON e 1 segundo OFF, com amplitude de 30%. Em uma revisão publicada por Chand et al. (2020), foram listados diversos microrganismos produtores de L-asparaginase, dentre eles fungos das espécies *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Nesse estudo, os tamanhos moleculares dos monômeros de L-ASNase produzidas por essas espécies de fungos variaram de 30 kDa a 91 kDa. Em outro estudo realizado por Saeed et al. (2018), o tamanho molecular de um monômero de L-asparaginase recombinante produzida por *Aspergillus terreus*

foi estimado em 42 kDa. Após ensaios de purificação, caracterização e estabilidade, El-Gendy et al. (2021) chegou a uma proteína extracelular produzida pelo fungo *Fusarium equiseti* com massa molecular de 45.7 kDa. Levando em consideração que a enzima está ativa quando sua estrutura forma um tetrâmero de quatro subunidades idênticas e o ensaio ocorreu em condições desnaturantes, foi utilizado um padrão de baixo tamanho molecular (*Low Molecular Weight* GE Healthcare) para analisar a presença do monômero da L-ASNase\_*Fp*. De acordo com Cardoso et al., 2023, após análises *in silico* da enzima fúngica produzida de forma recombinante por *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), a estrutura monomérica da L-ASNase\_*Fp* é de 46,4 kDa. Como demonstrado no item 4.3 o vetor utilizado possui cauda de histidina, sítio de trombina, que aumentam sua massa molecular, dessa forma, a massa total a ser analisada passaria de 46,4 kDa para 48,6 kDa. (CARDOSO et al., 2023; CHAND et al., 2020; EL-GENDY et al., 2021; LIMA et al., 2020; SAEED et al., 2018).

Subsequentemente, após os ensaios de rompimento celular, quantificação de proteínas totais e precipitação foi possível observar através da eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) que nas frações solúveis (Figura 11 A e B) não há bandas predominantes na altura de 45 kDa, enquanto nas frações insolúveis (Figura 11 B e C) há bandas intensas nessa altura, podendo-se presumir que foi obtida a L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* produzida por *E. coli* BL21 (DE3), e que esta está na sua forma insolúvel, em corpos de inclusão.

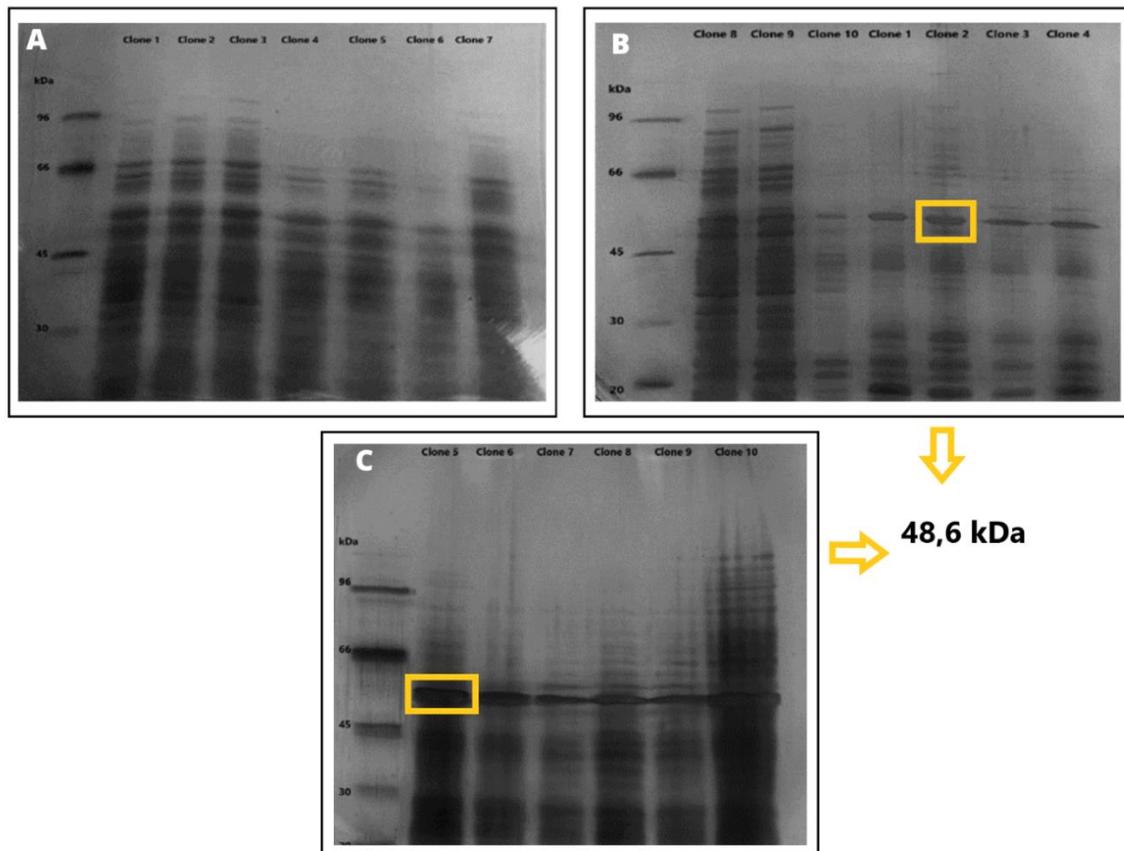


Figura 11. Géis de SDS-PAGE das frações solúveis (Gel A: clones 1-7 e gel B: clones 8 e 9) e insolúveis (gel B: clones 1-4 e gel C) de proteínas produzidas por *E. coli* BL21 (DE3) após indução com IPTG. (A) Ausência de bandas correspondentes à 45kDa na forma solúvel, indicando ausência da proteína de interesse. (B e C) As bandas representadas a partir do Clone 1 indicam a presença da proteína de interesse na forma de corpos de inclusão na altura de 45 kDa,

### 5.3 Confirmação da expressão de L-ASNase\_*Fp* por *Western blot*

A presença da sequência de histidina não apenas desempenha um papel significativo no processo de purificação, mas também facilita os procedimentos de detecção e quantificação das proteínas a ela vinculadas. A técnica qualitativa de *Western blot* é amplamente empregada como uma abordagem simplificada para a investigação da presença de proteínas, com foco nas interações intermoleculares, podendo contribuir de forma substancial para a detecção, purificação e isolamento de proteínas em uma matriz. Esse método, conforme relatado por Pillai-Kastoori et al., (2020), envolve a migração das proteínas separadas previamente por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) para uma membrana de nitrocelulose ou polivinilideno difluoreto (PVDF). A transferência

das bandas proteicas para a membrana é realizada mediante um processo de eletrotransferência, que envolve a imersão da membrana em um anticorpo específico (WALSH, 2015). Neste contexto, o anticorpo empregado no ensaio é o anticorpo 6x *His Tag Antibodies* (ThermoFisher Scientific), utilizado com o objetivo de reconhecer e se ligar à sequência de histidina presente na proteína. Isso, por sua vez, viabiliza a detecção das bandas proteicas na membrana no processo de revelação. (DENNIS-SYKES; MILLERY; MCALEERY, 1985; PILLAI-KASTOORI; SCHUTZGESCHWENDER; HARFORD, 2020).

Como é possível observar na Figura 12, os clones 5, 6 e 10 apresentaram bandas nas frações insolúveis acima do marcador que representa o tamanho molecular de 40 kDa, indicando a presença da enzima L-ASNase\_*Fp*. As amostras utilizadas como controle, contendo o vetor pET-28a (+) sem o gene de L-ASNase\_*Fp*, não apresentaram bandas tanto na fração solúvel como na fração insolúvel, o que justifica ainda mais a presença da enzima nos clones transformados de forma recombinante, já que apesar de o vetor possuir a sequência de 6 histidinas, ela não está sendo expressa devido a ausência do gene de L-ASNase\_*Fp*.

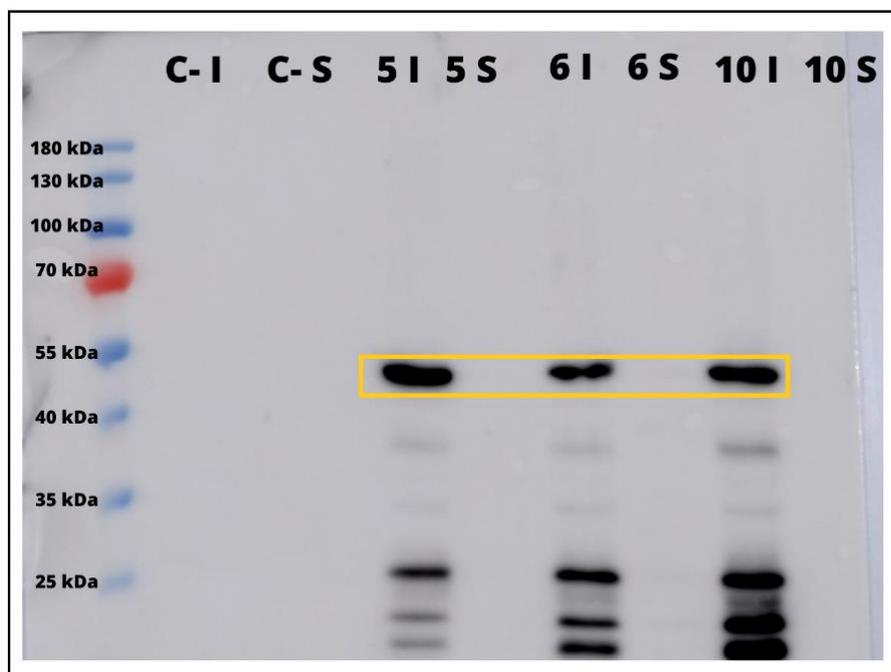


Figura 12 Análise da presença de L-ASNase\_*Fp* por *Western Blot* utilizando anticorpo Anti *His-Tag*. As bandas marcadas estão na altura entre 40 kDa e 55 kDa, confirmando a presença da enzima de 48,6 kDa, analisada a partir dos clones 5, 6 e 10, na sua forma solúvel e insolúvel. Não foram observadas bandas nas amostras utilizadas como controle negativo, tanto nas frações solúveis quanto nas frações insolúveis.

#### 5.4 Otimização das metodologias de rompimento celular

A partir do clone selecionado para dar prosseguimento ao trabalho, as metodologias de rompimento celular foram submetidas à análise por meio de eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12%. Na Figura 13 pode-se constatar que o método adaptado de Lima *et al.* (2020), nas condições de 15 minutos, 1 segundo ON, 1 segundo OFF a uma amplitude de 30%, exibiu uma banda de densidade eletroforética mais acentuada, sugerindo uma quantidade de proteínas superior com relação aos outros métodos. Pode-se notar também que a metodologia empregada nos experimentos iniciais, adaptada de Costa-Silva *et al.* (2020), método 2, revelou uma menor eficiência em relação à metodologia selecionada para dar continuidade aos ensaios, método 5, enfatizando a importância de serem exploradas diferentes técnicas de extração proteica (COSTA-SILVA *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2020)..

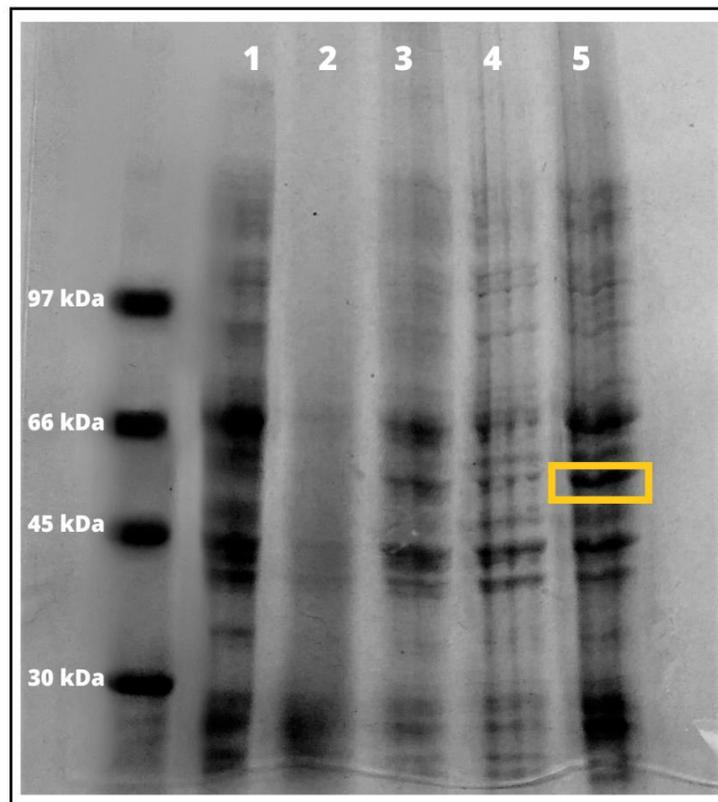


Figura 13. Gel de SDS-PAGE a 12% revelando perfil eletroforético das metodologias de rompimento celular. Método 1: 7 minutos, 35 segundos ON e 45 segundos OFF, com amplitude de 30%; Método 2: 10 minutos, 1 minuto ON e 1 minuto OFF, com amplitude de 30%; Método 3: 20 minutos, 1 minuto ON e 1 minuto OFF, com amplitude de 30%; Método 4: 10 minutos, 1 segundo ON e 1 segundo OFF, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo, amplitude de 30%; Método 5, de 15 minutos, 1 segundo ON e

1 segundo *OFF*, com amplitude de 30%. A última metodologia foi a que demonstrou maior intensidade de bandas, se destacando como método mais adequado para rompimento celular.

## 5.5 Curva de crescimento microbiano

Os parâmetros cinéticos de crescimento celular foram analisados com base na curva de crescimento representada na Figura 14. Até o período de 4 horas de cultivo, observa-se um aumento na medida da densidade ótica, indicando crescimento celular. Após esse ponto, se dá início a fase estacionária, caracterizada pela estabilidade do crescimento. Depois de se obter uma concentração elevada de células pode-se induzir a produção de determinada proteína recombinante, aprimorando seu rendimento, aumentando o nível de transcrição do seu gene (DONOVAN; ROBINSON; GLICK, 1996). Dessa forma, o momento em que ocorre a indução da expressão tem impacto direto na produção de proteínas, por isso se dá a importância de otimizar as condições de expressão da proteína.

Em alguns cenários, quando a indução ocorre no início da fase logarítmica, a taxa de crescimento pode ser aumentada. No entanto, se o momento de indução ocorrer mais próximo da fase estacionária o resultado pode ser um rendimento inferior devido à desaceleração do crescimento celular. Em experimentos conduzidos por Peng e colaboradores (2004) diferentes momentos de indução foram testados durante a fase exponencial, sendo observado um maior nível de biomassa nos cultivos induzidos na metade da fase exponencial. Portanto, esse período pode ser momento ideal para indução, como foi sugerido posteriormente também por Nor e colaboradores (2010). (NOR *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2004).

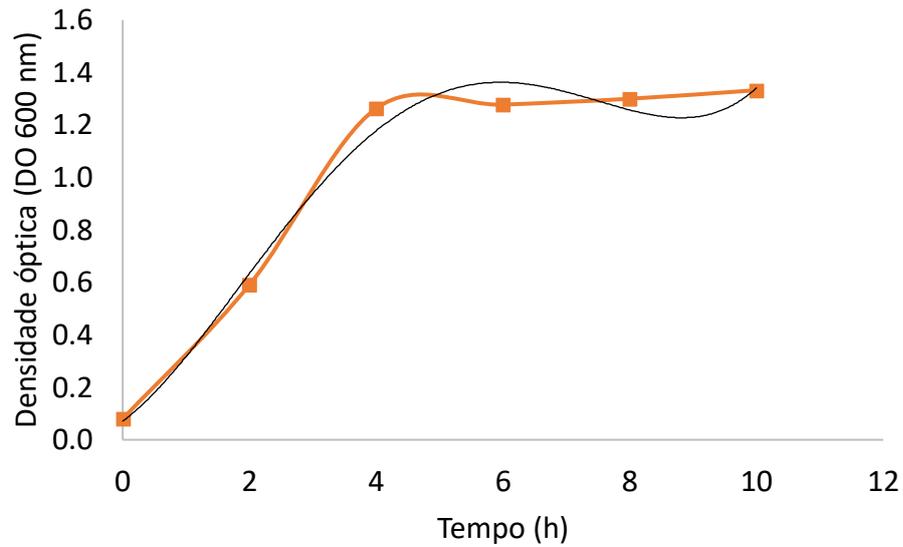


Figura 14. Curva de crescimento semilogarítmica da densidade óptica em função do tempo de amostras de *E. coli* BL21 (DE3) – L-ASNase\_ *Fp*. Os tempos de incubação variaram de 0 a 12 horas e a densidade óptica foi medida a cada 2 horas de cultivo.

Assim, por meio do cálculo do logaritmo natural dos valores de densidade óptica obtidos da curva de crescimento representada na Figura 14 foi plotada a curva logarítmica ilustrada pela Figura 15, linearizando os dados e facilitando a visualização de em qual tempo seria adequado para indução. Então, foi estabelecido um momento apropriado para indução da expressão de 2 horas e 30 minutos de cultivo, quando a cultura atinge metade da fase log, a uma densidade óptica de 0,9.

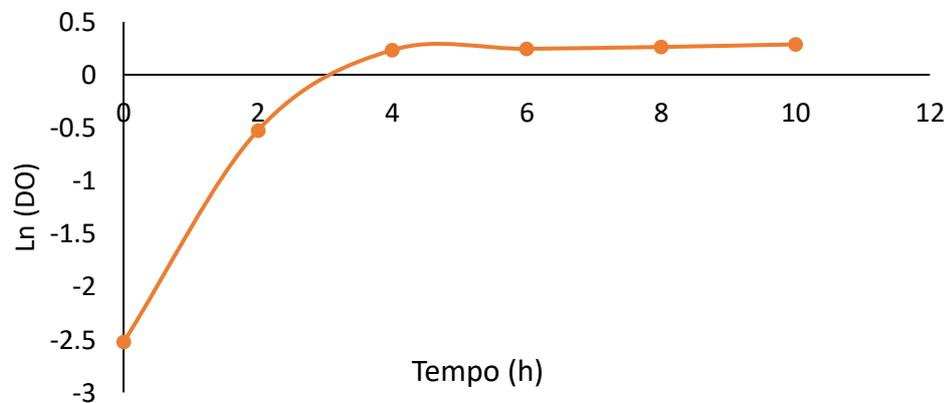


Figura 15. Curva logarítmica da densidade óptica em função do tempo. O momento de indução determinado na metade da fase estacionária é de aproximadamente 2 horas e 30 minutos.

## **5.6 Otimização das condições de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) – L-ASNase-Fp**

Após definidos os métodos de rompimento celular e tempo de indução da expressão com IPTG, foram otimizados os tempos de cultivo após indução, juntamente com a temperatura. Esses parâmetros foram avaliados por meio de eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12%.

### **5.6.1 Cultivo a temperatura de 37 °C**

Através da Figura 16, que representa as frações insolúveis em diferentes intervalos de cultivo após indução e distintas concentrações de IPTG, ressalta-se a presença de proteínas com tamanho molecular próximo de 45 kDa. É notável que as bandas solúveis, visualizadas na Figura 17, nessa mesma altura não apresentam a mesma intensidade, sugerindo que, sob essa condição de temperatura há formação de corpos de inclusão. Além disso, na Figura 16 é possível observar que a condição de 0.5 mM de IPTG e 12 horas após indução resultou em uma banda mais intensa, ou seja, com maior densidade de proteínas. No entanto, justamente por estarem na forma de corpos de inclusão típicos, a proteína de interesse encontra-se inativa, necessitando, portanto, passar por etapas de solubilização.

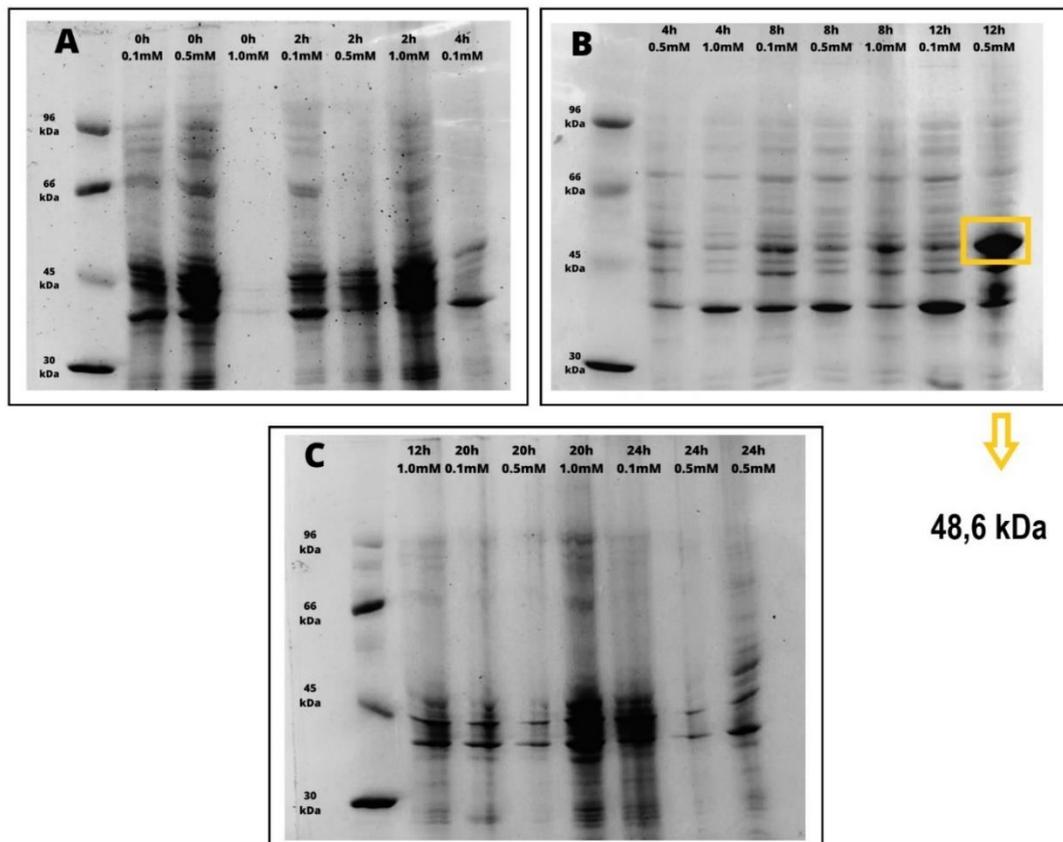


Figura 16. Perfil eletroforético das frações insolúveis cultivadas a 37 °C sob diferentes tempos após indução e concentrações de indutor. (A) 0 a 4 horas de cultivo, variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (B) 4 a 12 horas de cultivo variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (C) 12 a 24 horas de cultivo variando entre 0.1 e 1 mM de IPTG. Em todas as imagens se observa bandas na altura de 45 kDa, indicando a presença da enzima L-ASNase\_Fp de 48,6 kDa produzida por E. coli BL21 (DE3), onde o cultivo de 12 horas após indução com 0.5 mM de IPTG se destacou com maior produção de proteínas insolúveis.

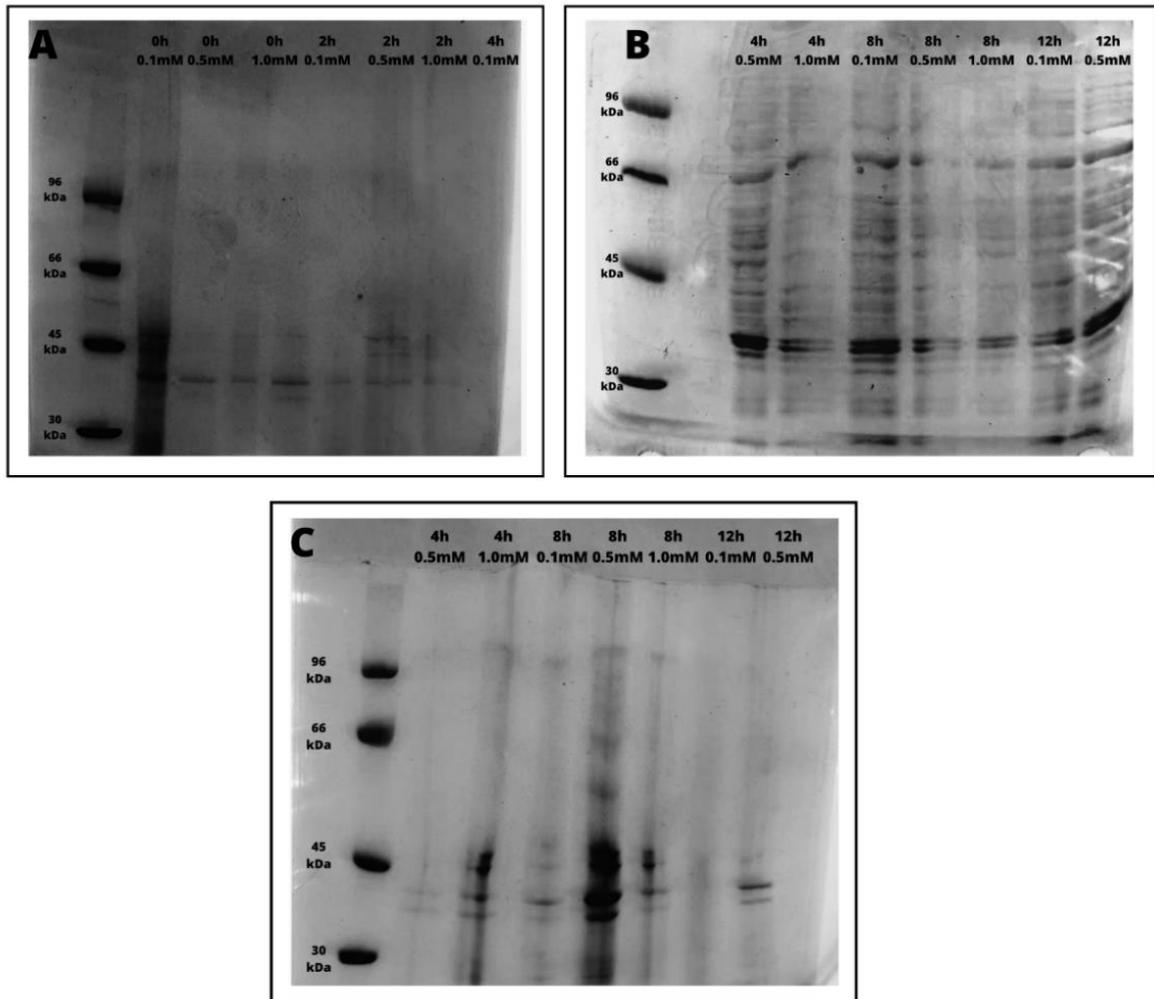


Figura 17. Perfil eletroforético das frações solúveis cultivadas a 37 °C sob diferentes tempos após indução e concentrações de indutor. (A) 0 a 4 horas de cultivo, variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (B) 4 a 12 horas de cultivo variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (C) 12 a 24 horas de cultivo variando entre 0.1 e 1 mM de IPTG. Não são observadas bandas na altura de 45 kDa, indicando a ausência da enzima L-ASNase\_*Fp* produzida por *E. coli* BL21 (DE3), indicando que a 37 °C não há formação de L-asparaginase solúvel.

Após essas análises, a condição de 0.5 mM de IPTG, 12 horas após indução, à temperatura de 37 °C foi selecionada para ser implementada nos ensaios subsequentes de solubilização e purificação, com o objetivo de se obter uma amostra de proteínas solúveis ativas.

### 5.6.2 Cultivo a temperatura de 20 °C

Quando se utiliza um indutor para aumentar a expressão de proteínas recombinantes deve-se atentar ao fato de que uma alta expressão de proteínas aumenta a carga metabólica da célula, gerando um estresse devido a esse aumento

na síntese, portanto, resultando em uma resposta rigorosa a esse estresse, podendo ocasionar a formação dos agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão (SANDÉN *et al.*, 2003). Dessa forma, a utilização de uma menor concentração de indutor associada à uma menor temperatura de cultivo pode contribuir para a expressão de proteínas recombinantes mais solúveis (LI *et al.*, 2022).

Conforme relatado por Donovan (1996), a produção de corpos de inclusão resultante da superexpressão é menos frequente quando as células são cultivadas à uma temperatura mais baixa, interferindo positivamente para o aumento da produção de proteínas solúveis. Isso sugere que, conseqüentemente, haverá um maior nível de pureza e atividade melhorada. (DONOVAN; ROBINSON; GLICK, 1996).

Dessa forma, um cultivo a 20 °C após indução foi preparado, avaliando as mesmas condições descritas a 37 °C, onde o início do cultivo se deu a essa temperatura que, em seguida, foi ajustada para 20 °C logo após indução com IPTG. Por meio de géis de poliacrilamida em condições desnaturantes representados pela Figura 18 é notável que a produção de proteínas insolúveis sofreu um decréscimo. Além disso, na Figura 19 é demonstrado que há uma maior densidade de proteínas expressas, confirmando o que foi apresentado por Donovan *et al.* (1996) anteriormente. (DONOVAN; ROBINSON; GLICK, 1996).

Apesar de se utilizar temperaturas reduzidas de cultivo com o objetivo de minimizar a agregação das proteínas por meio da redução das interações hidrofóbicas envolvidas nessa agregação e diminuir a degradação dessas proteínas devido à diminuição da atividade de proteases originadas de uma superprodução de proteínas por *E. coli*, essa estratégia se apresentou desvantajosa para a produção da proteína recombinante em questão, levando em consideração que, a redução na temperatura pode afetar as etapas de replicação, transcrição e tradução do DNA, levando a um menor crescimento microbiano e, conseqüentemente, a uma produção reduzida de proteínas (COSTA *et al.*, 2014).

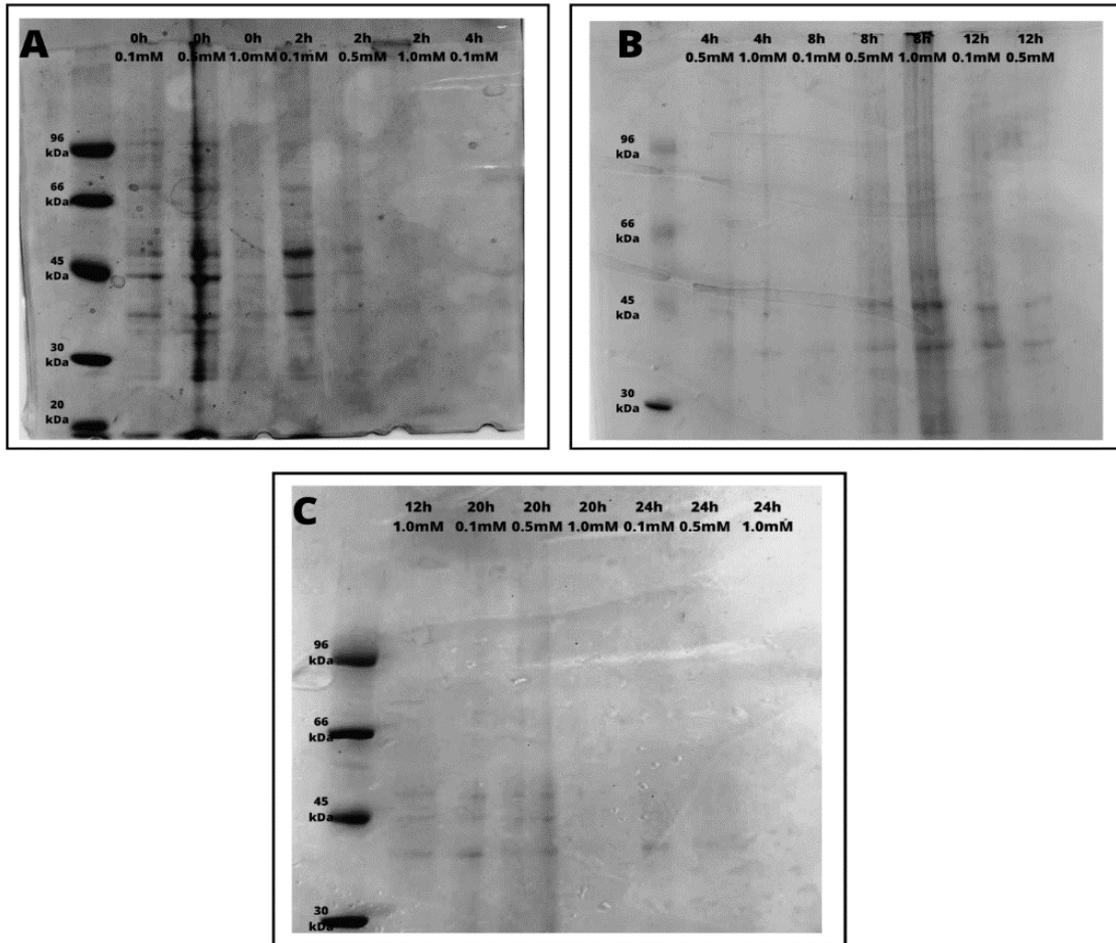


Figura 18. Perfil eletroforético das frações insolúveis cultivadas a 20 °C sob diferentes tempos após indução e concentrações de indutor. (A) 0 a 4 horas de cultivo, variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (B) 4 a 12 horas de cultivo variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (C) 12 a 24 horas de cultivo variando entre 0.1 e 1 mM de IPTG. Não são observadas bandas na altura de 45 kDa, demonstrando que com a diminuição da temperatura após indução, não houve formação de agregados insolúveis.

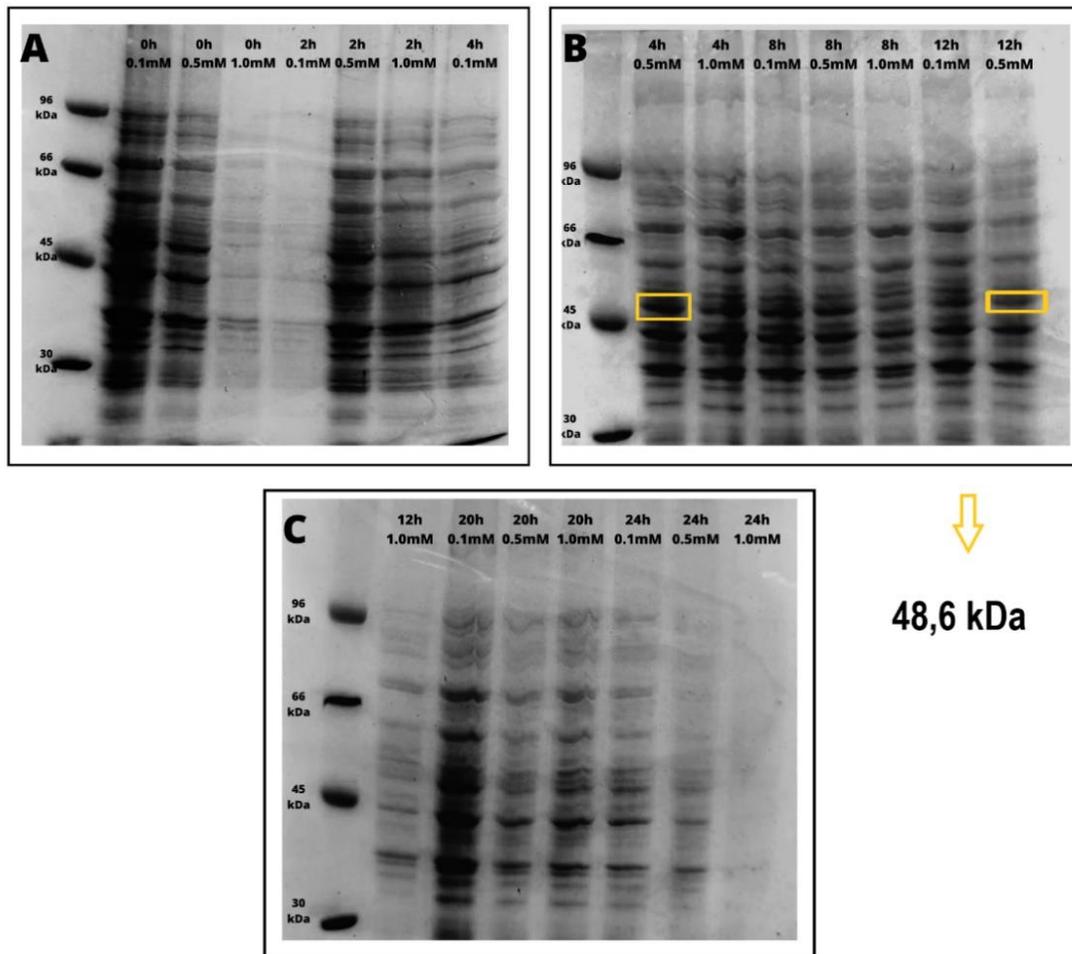


Figura 19. Perfil eletroforético das frações solúveis cultivadas a 20 °C sob diferentes tempos após indução e concentrações de indutor. (A) 0 a 4 horas de cultivo, variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (B) 4 a 12 horas de cultivo variando entre 0.1 mM e 1 mM de IPTG. (C) 12 a 24 horas de cultivo variando entre 0.1 e 1 mM de IPTG. São notadas bandas na altura de 45 kDa, indicando a presença da enzima L-ASNase\_*Fp* produzida por *E. coli* BL21 (DE3), reforçando que a diminuição da temperatura produziu proteínas solúveis.

Considerando os resultados observados nos géis de SDS-PAGE, algumas condições foram selecionadas para serem submetidas a concentração utilizando Vivaspin 6, 10 kDa (Cytiva), como descrito no item 4.18, para posterior avaliação da atividade enzimática das proteínas solúveis produzidas.

### 5.7 Concentração de proteínas solúveis cultivadas a 20 °C após indução

Considerando que o volume inicial do cultivo foi 200 mL, e ao término da centrifugação o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise, observou-se uma concentração amostral de 20 vezes. Utilizando a coluna de ultrafiltração

*Vivaspin* 6, 10 kDa (Cytiva) foi recuperado um volume de 5 mL, resultando em uma amostra concentrada 2 vezes. Posteriormente o ensaio da quantificação da atividade enzimática utilizando reagente de Nessler, descrito o item 4.15.2, não demonstrou resultados significativos de atividade visto que as absorvâncias medidas a 436 nm variaram de 0,079 a 0,097, não sendo possível considerar esses valores significativos. Assim, esse ensaio foi considerado apenas qualitativo.

De acordo com os resultados de ambas condições de cultivo realizados e analisados através da eletroforese e do ensaio de atividade correspondente às frações solúveis cultivadas a 20 °C, as frações insolúveis resultantes do cultivo de 12 horas após indução com 0.5 mM de IPTG a 37 °C foi selecionada para prosseguir com as etapas seguintes de solubilização e purificação.

## **5.8 Solubilização de corpos de inclusão**

Um dos hospedeiros mais utilizados para produção de proteínas recombinantes é a *E. coli*, porém, quase todas as proteínas produzidas nesse sistema de expressão têm como resultado a formação de agregados insolúveis (SINGHVI *et al.*, 2021). Esses agregados, conhecidos como corpos de inclusão, por sua vez, são subprodutos formados nos processos de síntese de proteínas bacterianas, formados principalmente no citoplasma, devido ao acúmulo de proteínas desenoveladas ou enoveladas de forma inadequada, que se depositam como massas amorfas insolúveis (GASSER *et al.*, 2008).

O resultado da solubilização dos corpos de inclusão de *E. coli* BL21 (DE3) – L-ASNase\_*Fp* representado pela Figura 20 demonstra que a partir de uma concentração de 6 M de ureia já são observadas bandas na altura de 48,6 kDa, indicando que as proteínas estão na sua forma solúvel e podem ser submetidas ao processo de purificação. A concentração selecionada para dar continuidade aos experimentos foi a de 6 M, já que não há diferença significativa em comparação com as bandas representadas pela concentração de 7 M e 8 M, além de que uma menor concentração de ureia pode melhorar o rendimento da proteína bioativa (SINGH *et al.*, 2015). Dessa forma, a proteína pode ser purificada utilizando a coluna de níquel para cromatografia de afinidade e etapas de renaturação podem ser aplicadas para recuperação da proteína na sua forma ativa. Entretanto, as etapas de renaturação podem resultar em

um baixo rendimento da proteína na sua forma bioativa, necessitando uma produção aumentada da proteína recombinante (PANDA, 2003). A etapa de solubilização e de renaturação são etapas cruciais para recuperação de uma proteína na sua conformação tetramérica, por isso, utilizar as mais baixas concentrações possíveis de desnaturantes é o ideal (UPADHYAY *et al.*, 2014).

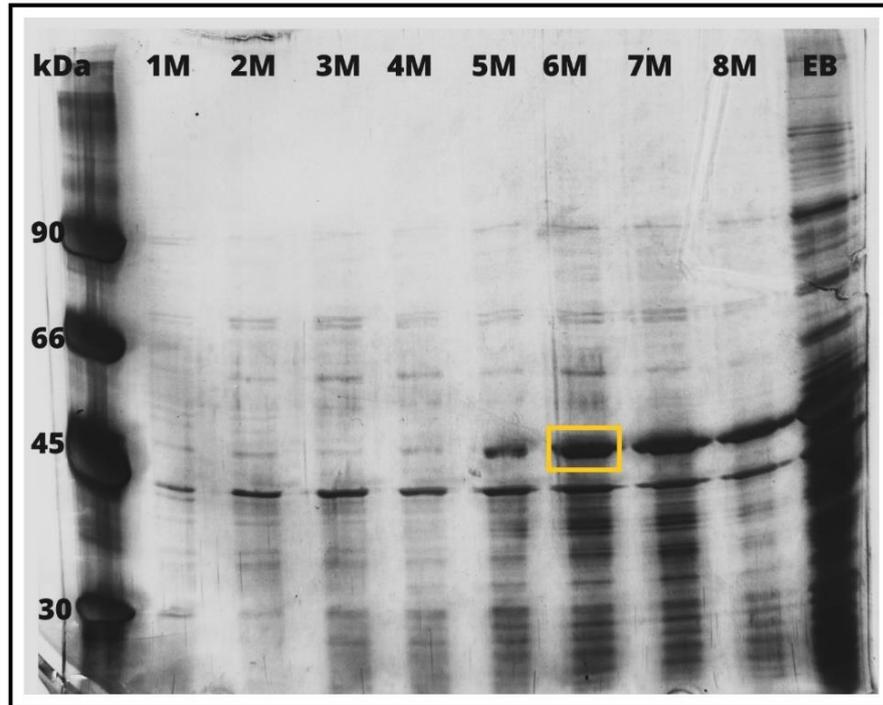


Figura 20. Gel de SDS-PAGE a 12% representando amostras de proteínas solubilizadas com diferentes concentrações de ureia. O extrato bruto foi comparado com as amostras solubilizadas e as bandas demarcadas representam a proteína recombinante, eficazmente solubilizada a partir de 6 M de ureia.

### 5.9 Purificação da L-ASNase\_*Fp* por cromatografia de afinidade

A purificação isocrática da enzima L-ASNase\_*Fp* através de cromatografia de afinidade utilizando *His-Tag* foi a técnica selecionada em condições desnaturantes. Isso decorre da incorporação de tampões contendo ureia a uma concentração de 8 M, com a finalidade principal de evitar a agregação da proteína, mantendo-a desnaturada, otimizando a sua interação com a coluna de níquel. Levando em consideração que, a mudança de pH do meio interfere na carga da proteína, a etapa inicial, que emprega um tampão de ligação com pH 8.0 resulta na modificação da

carga da proteína, tornando-a negativamente carregada, favorecendo, dessa forma, a sua interação com o íon metálico que possui carga positiva. Na etapa subsequente, a redução do pH é realizada utilizando tampão de lavagem com pH 6.3, a fim de eliminar quaisquer ligações inespecíficas com outras proteínas que possam estar presentes, visando manter estritamente a proteína de interesse associada a coluna.

Por fim, ao fazer uso tampão de eluição com pH 4.5, a carga da proteína é ajustada para uma polaridade positiva, não interagindo com a coluna e resultando na sua liberação. Dessa maneira, através da análise dos picos obtidos do cromatograma, conforme ilustrado na Figura 21, estão evidentes as etapas do processo descritas, com destaque para a etapa de eluição, onde foi avaliada a presença da L-ASNase\_*Fp* por eletroforese em gel de poliacrilamida. Através da análise do gel, é possível confirmar a presença da proteína de interesse purificada de maneira eficaz pela metodologia aplicada.

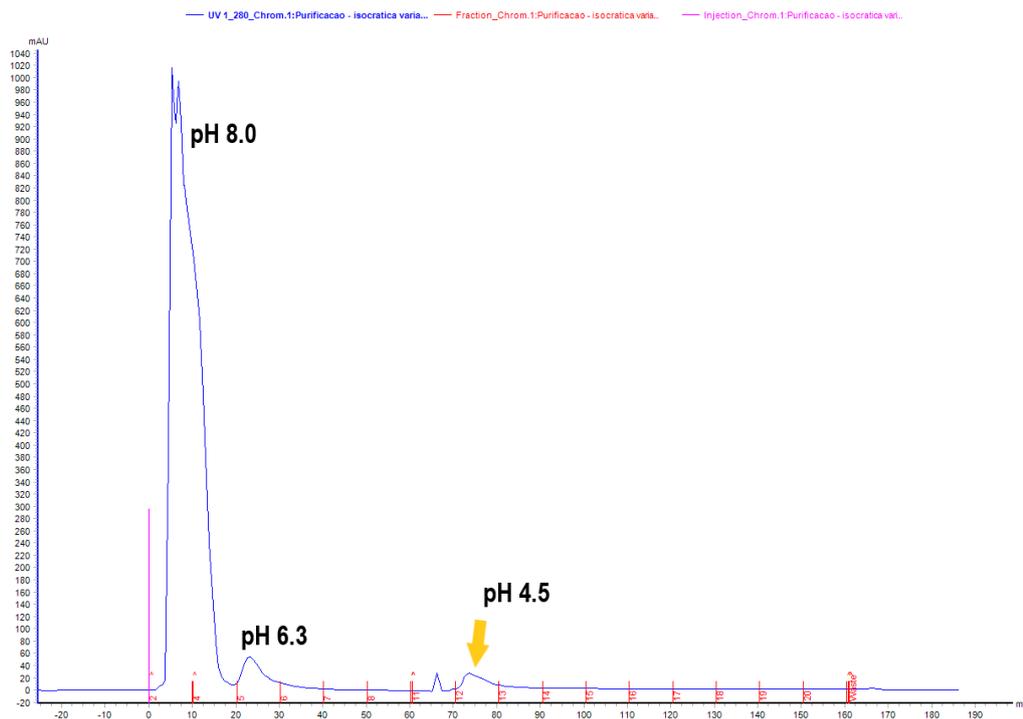


Figura 21. Cromatografia de afinidade (*HisTrap* HP 5 mL). Purificação isocrática da enzima L-ASNase\_*Fp*, indicando as diferentes condições de pH aplicadas em cada etapa, sem alteração na concentração dos tampões utilizados.

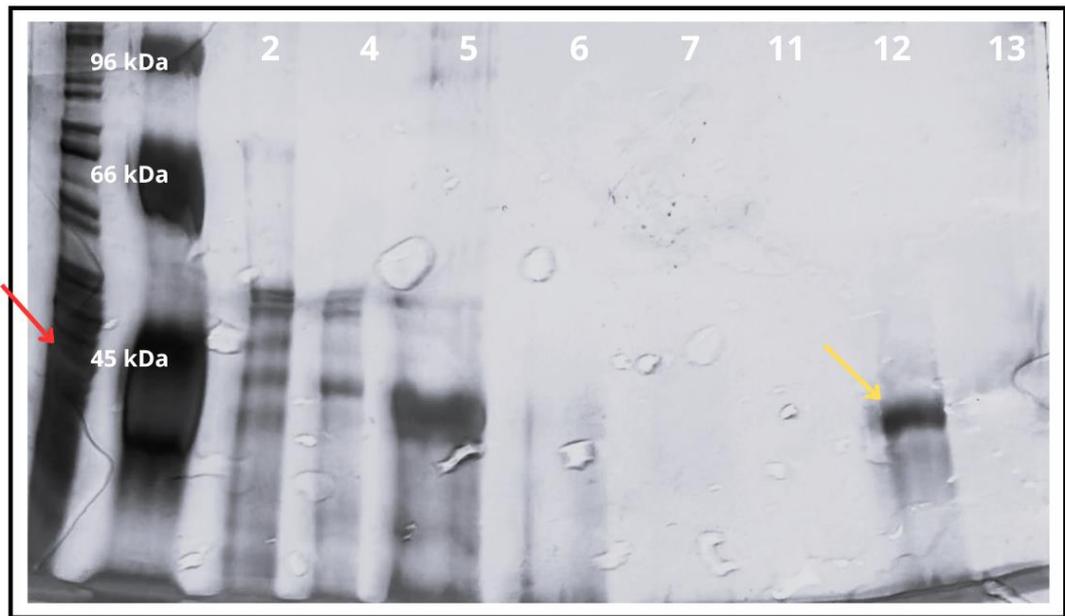


Figura 22. Gel de poliacrilamida de amostras coletadas após ensaio de purificação por cromatografia de afinidade. A seta em vermelho representa o extrato bruto contendo os corpos de inclusão solubilizados, enquanto a seta em amarelo representa a fração eluída purificada de L-ASNase\_*Fp*. As demais bandas, representam frações coletadas nas outras etapas da purificação, como ligação e lavagem.

Apesar de estar purificada, a proteína não apresentou resultados significativos quanto à sua atividade, após ser submetida a ensaios de quantificação de atividade utilizando as duas metodologias descritas neste trabalho no item 4.15. Esse resultado está associado também à conformação desnaturada da proteína, já que nas etapas de solubilização e purificação a mesma foi mantida sob condições desnaturantes com o objetivo de diminuir os agregados insolúveis. Dessa forma, para uma quantificação ideal da atividade da enzima seria necessário primeiramente submetê-la a etapas de renaturação, para atingir sua conformação tetramérica e bioativa.

Além disso, o teor de proteína foi calculado em cada etapa, anteriormente à solubilização, após solubilização e após purificação, para avaliar o quanto de proteína foi perdido durante os processos, com base nas concentrações inicial e final obtidas (Tabela 15).

Tabela 14. Teor de proteína L-ASNase\_Fp em diferentes processos

<b>Etapa</b>	<b>Teor de proteína (µg/mL)</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Corpos de inclusão (Pré-solubilização)</b>	1224,77	10	100
<b>Solubilização</b>	1118,43	10	91,3
<b>Purificação</b>	236,43	10	19,26

Um rendimento substancial de 19,26% foi alcançado por meio da aplicação da metodologia de quantificação de proteínas totais demonstrada no item 4.18.1, uma vez que a avaliação desse desempenho com base na atividade enzimática não foi viável devido à conformação desnaturada da proteína purificada. Um aspecto adicional a ser considerado é que, mesmo que na etapa de solubilização e o uso de tampões de purificação contendo ureia, a exposição completa da *His-Tag* pode não ter sido atingida devido a algumas proteínas que permaneceram agregadas, o que impediu a interação efetiva do marcador com a coluna de afinidade, potencialmente resultando em uma perda substancial da proteína de interesse. Além disso, o mal dobramento da proteína em amostras purificadas afeta sua atividade específica (SINGHVI *et al.*, 2020).

De acordo com Singh e Panda (2005) a principal razão para a baixa recuperação de proteínas bioativas a partir dos corpos de inclusão é atribuída principalmente à deterioração da estrutura secundária da proteína durante o processo de solubilização, sendo seu rendimento total permanecendo em torno de 15 a 25% do total de proteínas, o que futuramente constitui parte significativa do custo de produção de proteínas recombinantes a partir de *E. coli*, sendo um dos grandes desafios da produção de proteínas recombinantes (SINGH; PANDA, 2005). Apesar de diversos estudos demonstrarem que a presença do marcador de afinidade, como a *His-Tag* geralmente não afeta significativamente a função da proteína, podem acontecer alterações em sua estrutura geral e também influenciar na formação de agregados proteicos em proteínas recombinantes, sugerindo que seja interessante fazer uma análise da estrutura da proteína para confirmar ou excluir essa hipótese (ARAÚJO *et al.*, 2000; DONG; CHEN; SUN, 2009; GLICK; PATTEN, 2022; LIU; LI, 2022; ZUO *et al.*, 2005).

Uma abordagem que pode ser utilizada para melhorar a produção de proteínas bioativas seria a otimização de fatores como a utilização de engenharia genética na produção simultânea da proteína recombinante em conjunto com coadjuvantes

moleculares e moduladores de dobramento, que podem evitar a agregação das proteínas e mobilizar a catálise de eventos essenciais no processo de dobramento, como a formação das ligações dissulfeto, fundamentais para um correto enovelamento e produção de proteínas ativas (COSTA *et al.*, 2014; WALSH, 2014). Um coadjuvante molecular amplamente conhecido são as chaperonas bacterianas, que possuem impacto significativo na expressão de proteínas, desempenhando papel crucial do processo de enovelamento das proteínas recombinantes, auxiliando na formação da estrutura tridimensional durante sua síntese e promovendo uma maior estabilidade e funcionalidade proteica (ALLEN; PHAN; WAKSMAN, 2009; DONG; CHEN; SUN, 2009; LEFIN *et al.*, 2023; SINGH *et al.*, 2015; WALSH, 2014).

A forma de se obter uma L-asparaginase com atividade consiste então na necessidade de mantê-la na sua conformação tetramérica. Para isso técnicas de redobramento devem ser implementadas. O redobramento das proteínas é um processo que visa transformar essas proteínas desnaturadas em proteínas funcionais. Tradicionalmente, o processo conhecido como *refolding* é realizado por diluição ou diálise, que são os métodos mais aplicados em escala laboratorial, onde a proteína solubilizada pode ser diluída em um tampão de redobramento ou, no caso da diálise, há troca de solução em baixas concentrações ao longo de um período em intervalos regulares (RAJENDRAN; PUSHPAVANAM; JAYARAMAN, 2022; SINGHVI *et al.*, 2020). Ambos os métodos apresentam desafios em escala industrial, como a baixa recuperação durante a diluição, alto consumo de soluções durante a diálise, gerando rendimento reduzido. Portanto, é essencial conhecer e explorar diferentes condições de enovelamento de proteínas, métodos bioquímicos e também os fatores intrínsecos à proteína estudada que podem interferir nesse processo.

## 6 Conclusão e Perspectivas

O propósito do presente trabalho consistiu na avaliação do potencial biotecnológico de sintetizar uma proteína recombinante em um organismo alvo submetido a modificações genéticas, com o intuito de obter a enzima L-asparaginase, que possui elevado interesse no contexto industrial. A enzima foi produzida através da expressão do gene proveniente do fungo filamentosso *Fusarium proliferatum*, sendo inserido na linhagem de *Escherichia coli*, especificamente na cepa BL21(DE3), utilizando o plasmídeo pET-28a (+).

A transformação bacteriana conduziu à seleção de 10 clones transformados, os quais foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot*. Dessa triagem, um clone em particular foi selecionado para a totalidade do estudo. A otimização da produção da L-asparaginase em meio líquido contendo canamicina resultou na melhor condição de cultivo tanto a 20 °C, quanto a 37 °C, em um período de 12 horas após indução com IPTG a uma concentração de 0.5 mM. Apesar de uma tentativa de diminuir a formação dos corpos de inclusão aplicando um cultivo a temperatura reduzida de 20 °C, não se obteve uma proteína com atividade enzimática. As etapas de solubilização e purificação foram realizadas utilizando a condição de cultivo a temperatura de 37 °C, com 0.5 mM de IPTG, na tentativa de se obter a proteína recombinante a partir dos corpos de inclusão, que foram eficazmente solubilizados utilizando uma concentração relativamente baixa de ureia e purificado utilizando apenas o método de cromatografia de afinidade devido a presença da cauda de histidina fusionada a porção N-terminal da proteína.

Este estudo demonstrou que a proteína transformada foi produzida e purificada dentro das condições esperadas. Embora o rendimento tenha sido relativamente satisfatório, sugere-se a possibilidade de futuras otimizações no processo de cultivo e outras etapas, empregando diferentes abordagens no processo de expressão. Possíveis abordagens incluem o uso de meios enriquecidos para aumentar a densidade celular, a estabilidade plasmidial e exploração de diferentes plasmídeos da série pET com promotores menos potentes e a investigação de agentes indutores alternativos, como a lactose, para aumentar a produção de proteínas solúveis, além de modificações genéticas ou metabólicas e da utilização de coadjuvantes moleculares que possuem papel essencial nas etapas finais de obtenção da proteína. Isso ressalta a importância de se criar uma estratégia eficiente e economicamente

viável para produção de proteínas recombinantes, bem como do estudo da estrutura e das condições de produção dessas proteínas, que representam uma poderosa e eficaz alternativa para a produção de proteínas de interesse industrial, com relevância não apenas na área biotecnológica, mas também na saúde humana.

## **7 Referências**

ALLEN, W. J.; PHAN, G.; WAKSMAN, G. Chapter 3 - Structural Biology of Periplasmic Chaperones. 2009.

ARAÚJO, A. P. U. *et al.* Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 2, p. 480–484, 7 jun. 2000.

ARBER, W. **International Edition in English Restriction Endonucleases February 1978 Pages 73-140**. [s.l: s.n.].

ARIÉ, J. P. *et al.* Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 427–437, out. 2006.

ARIMA, K. *et al.* Production of Extracellular L -Asparaginases by Microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 356–361, mar. 1972.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of L -asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 212–220, mar. 2012.

BECKETT, A.; GERVAIS, D. **What makes a good new therapeutic L-asparaginase?** **World Journal of Microbiology and Biotechnology** Springer Netherlands, , 1 out. 2019.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. **Risk factors for acute leukemia in children: A review**. **Environmental Health Perspectives**, jan. 2007.

BHATWA, A. *et al.* **Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications**. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** Frontiers Media S.A., , 10 fev. 2021.

BORZANI, W. *et al.* **Biotechnologia Industrial**. Edgard Blucher Ltda. ed. [s.l: s.n.]. v. 8

BOWDEN, G. A.; PAREDES, A. M.; GEORGIU, G. Structure and Morphology of Protein Inclusion Bodies in *Escherichia Coli*. **Nature Biotechnology**, 1991.

BOYSE H A CAMPBELL G M DARIA, E. A. **Leukaemia-inhibiting Properties and L-Asparaginase Activity of Sera from Certain South American Rodents Isolation of a Murine Leukaemogenic Virus P-LLV**Amer. J. Path. [s.l.] Academic Press, 1953.

BROOME, J. D. **Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects.** [s.l: s.n.].

BROWN, R. E.; JARVIS, K. L.; HYLAND, K. J. **Protein Measurement Using Bicinchoninic Acid: Elimination of Interfering Substances**ANALYTICALBIOCHEMISTRY. [s.l: s.n.].

CACHUMBA, J. J. M. *et al.* **Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production.** **Brazilian Journal of Microbiology**Elsevier Editora Ltda, , 1 dez. 2016a.

CACHUMBA, J. J. M. *et al.* **Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production.** **Brazilian Journal of Microbiology**Elsevier Editora Ltda, , 1 dez. 2016b.

CARDOSO, S. L. *et al.* **I-Asparaginase Type II from *Fusarium proliferatum*: Heterologous Expression and In Silico Analysis.** **Pharmaceutics**, v. 15, n. 9, 1 set. 2023.

CASTRO, D. *et al.* **L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics.** **Appl Microbiol Biotechnol.**, p. 4515–4534, 2021.

CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. **Production of L-Asparaginase II by *Escherichia coli* L-Asparaginase II was synthesized at constant rates by *Escherichia coli* under anaerobic conditions. The enzyme was produced optimally by bacteria**JOURNAL OF BACTERIOLOGY. [s.l: s.n.].

CHAND, S. *et al.* **A comprehensive review on microbial I-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications.** **Biotechnology and Applied Biochemistry**Blackwell Publishing Ltd, , 1 jul. 2020.

COSTA, S. *et al.* **Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system.** **Frontiers in Microbiology**Frontiers Research Foundation, , 2014.

COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 8, p. 707–717, 14 set. 2018.

COSTA-SILVA, T. A. *et al.* **Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer.** **Blood Reviews** Churchill Livingstone, , 1 set. 2020.

CROWTHER, D. L-Asparaginase and Human Malignant Disease. **Nature**, p. 168–171, 1971.

DE MOURA, W. A. F. *et al.* Functional and structural evaluation of the antileukaemic enzyme l-asparaginase II expressed at low temperature by different Escherichia coli strains. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 11, p. 2333–2344, 1 nov. 2020.

DE-ANGELI, L. C. *et al.* Effect of L-Asparaginase from Aspergillus terreus on Ascites Sarcoma in the Rat. **Nature**, 1970.

DENNIS-SYKES, C. A.; MILLERY, W. J.; MCALEERY, W. J. **A quantitative Western Blot method for protein measurement\*** **Journal of Biological Standardization**. [s.l: s.n.].

DE-SOUZA, M. T.; BRIGIDO, M. DE M.; MARANHÃO, A. Q. **Técnicas Básicas Em Biologia Molecular**. 2. ed. [s.l.] EDU-UNB, 2016. v. 1

DONG, X. Y.; CHEN, L. J.; SUN, Y. Refolding and purification of histidine-tagged protein by artificial chaperone-assisted metal affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 27, p. 5207–5213, 3 jul. 2009.

DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. **Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter** **Journal of Industrial Microbiology**. [s.l: s.n.].

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Isolation and screening of l-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 1 dez. 2016.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. **Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus Aspergillus nidulans** **Journal of General Microbiology**. [s.l: s.n.].

DUMINA, M. V. *et al.* Comparison of Enzymatic Activity of Novel Recombinant L-asparaginases of Extremophiles. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 594–602, 1 set. 2021.

EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. **L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics** Medknow Publications, , 1 abr. 2016.

EL-GENDY, M. M. A. A. *et al.* Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 2540–2548, 1 abr. 2021.

EL-NAGGAR, N. E.-A.; EL-EWASY, S. M.; EL-SHWEIHY, N. M. Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: The pros and cons. **International Journal of Pharmacology**, p. 182–199, 2014.

FERNANDEZ, C. A. *et al.* Successful challenges using native *E. coli* asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated *E. coli* asparaginase. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 73, n. 6, p. 1307–1313, 2014.

FONSECA, M. H. G. *et al.* **Circumventing the side effects of L-asparaginase. Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson s.r.l., , 1 jul. 2021.

FREITAS, M. *et al.* Filamentous fungi producing l-asparaginase with low glutaminase activity isolated from brazilian savanna soil. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.

G., S.; MANAWADI, S. I. Isolation, screening, optimization and production of Anti-tumor L-Asparaginase by fungi from karwar coastal region. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 6, p. 1–7, 2017.

G1 TRIÂNGULO E ALTO PARANAÍBA. **Câmara de Uberlândia aprova abertura de crédito de mais de R\$ 1 milhão para área da saúde da UFU.**

GASSER, B. *et al.* **Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. Microbial Cell Factories**, 4 abr. 2008.

GIBSON, E. G.; OVIATT, A. A.; OSHEROFF, N. Two-Dimensional Gel Electrophoresis to Resolve DNA Topoisomers. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2020. v. 2119p. 15–24.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. 6. ed. [s.l.: s.n.].

**Global Cancer Observatory.**

GONÇALVES, A. B. *et al.* Fungal production of the anti-leukemic enzyme l-asparaginase: From screening to medium development. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 387–394, 2016a.

GONÇALVES, A. B. *et al.* Fungal production of the anti-leukemic enzyme l-asparaginase: From screening to medium development. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 387–394, 2016b.

GRAHAM, M. L. Pegaspargase: A review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 10, p. 1293–1302, 26 set. 2003.

HARCUM, S. W. Purification of protein solutions. Em: **Biologically Inspired Textiles: A volume in Woodhead Publishing Series in Textiles**. [s.l.] Elsevier Inc., 2008. p. 26–43.

HILL, J. M. *et al.* L-Asparaginase Therapy for Leukemia and Other Malignant Neoplasms. p. 882–888, 15 maio 1967.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541–1552, 15 out. 2015.

IMADA, A. *et al.* **Asparaginase and Glutaminase Activities of Microorganisms** *Journal of General Microbiologji*. [s.l.: s.n.].

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. **Acute lymphoblastic leukaemia**. *The Lancet* Elsevier B.V., , 1 jun. 2013.

INABA, H.; MULLIGHAN, C. G. **Pediatric acute lymphoblastic leukemia**. *Haematologica* Ferrata Storti Foundation, , 1 nov. 2020.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer (INCA)**.

KAFKEWITZ, D.; BENDICH, A. **Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function**<sup>13</sup>. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/37/6/1025/4690799>>.

KANE, J. F.; HARTLEY, D. L. **Formation of recombinant protein inclusion bodies in Escherichia coli***Trends Pharmacol. Sci.* [s.l.] Johnson Space Center 20 Morrison, 1988.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. **Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements.** *International Journal of Biological Macromolecules* Elsevier B.V., , 1 jan. 2018.

KAWEDIA, J. D.; RYTTING, M. E. **Asparaginase in acute lymphoblastic leukemia.** *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. Anais...* Elsevier Inc., 1 set. 2014.

KIDD, J. G. **REGRESSION OF TRANSPLANTED LYMPHOMAS INDUCED IN VIVO BY MEANS OF NORMAL GUINEA PIG SERUM I. COURSE OF TRANSPLANTED CANCERS OF VARIOUS KINDS IN MICE AND RATS GIVEN GUINEA PIG SERUM, HORSE SERUM, OR RABBIT SERUM\***. New York: [s.n.].

KLEINGESINDS, E. K. *et al.* Downstream process and evaluation of the concomitant impact of a recombinant glycosylated L-asparaginase on leukemic cancer cells and the bone marrow tumor microenvironment. *Process Biochemistry*, v. 131, p. 41–51, 1 ago. 2023.

KOONTZ, L. TCA precipitation. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2014. v. 541p. 3–10.

KUMAR ROY, V.; SENTHIL KUMAR, N.; GURUSUBRAMANIAN, G. **Proteins-structure, properties and their separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.sciencevision.org](http://www.sciencevision.org)>.

LEFIN, N. *et al.* **Current state of molecular and metabolic strategies for the improvement of L-asparaginase expression in heterologous systems.** *Frontiers in Pharmacology* Frontiers Media SA, , 2023.

LEW, G. Space for Calaspargase? A new asparaginase for acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research*, v. 26, n. 2, p. 325–327, 15 jan. 2020.

LI, L. *et al.* Expression and purification of soluble recombinant  $\beta$ -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2022.

LI, R. J. *et al.* FDA approval summary: Calaspargase Pegol-mknl for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Young Adults. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 2, p. 328–331, 15 jan. 2020.

LIMA, G. M. *et al.* Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, 15 abr. 2020.

LIU, S.; LI, W. **Protein Fusion Strategies for Membrane Protein Stabilization and Crystal Structure Determination**. **Crystals**MDPI, , 1 ago. 2022.

MACIEL, V. **Ministério da saúde enviou medicamento para teste de qualidade**.

MAESE, L. *et al.* **Can recombinant technology address asparaginase *Erwinia chrysanthemi* shortages?** **Pediatric Blood and Cancer**John Wiley and Sons Inc, , 1 out. 2021.

MARCELINO, L. H.; GROSSI DE SÁ, M. F. Detecção e análise de proteínas pela técnica de Western blot. Em: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Eds.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. 2. ed. [s.l.] EMBRAPA, 2015. p. 359–376.

MASHBURN, L. T.; WRISTON JR, J. C. **Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase from *Escherichia coli***. Newark, Delaware: [s.n.].

MIDDLEBERG, A. P. J. Large-scale Recovery of Recombinant Protein Inclusion Bodies Expressed in *Escherichia coli*. 1996.

MIERENDORF, R. C. *et al.* **Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System**. [s.l: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA À SAÚDE SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE PORTARIA CONJUNTA N°**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas->>.

MORAIS, R. **JUSTIÇA FEDERAL PROÍBE COMPRA E USO DE LEUGINASE DA CHINA EM TODA A REDE SUS.**

NATHANS, D.; SMITH, H. O. **RESTRICTION ENDONUCLEASES IN THE ANALYSIS AND RESTRUCTURING OF DNA MOLECULES** x883. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.annualreviews.org>.

NCI. **Nacional Cancer Institute.**

NILSSON, J. *et al.* Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification and Immobilization of Recombinant Proteins. **Protein Expression and Purification**, p. 1–16, 1997.

NOR, S. *et al.* Screening for the optimal induction parameters for periplasmic producing interferon-2b in Escherichia coli Screening for optimum induction parameters to improve the production of periplasmic interferon-2b. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6345–6354, 2010.

NORA, L. C. *et al.* **The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools.** **Microbial Biotechnology** John Wiley and Sons Ltd, , 1 jan. 2019.

OLLENSCHLAGER, G. *et al.* **Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side-effects** **European Journal of Clinical Investigation**. [s.l: s.n.].

PANDA, A. K. Bioprocessing of Therapeutic Proteins from the Inclusion Bodies of Escherichia coli. 2003.

PARASHIVA, J. *et al.* **Endophytic Fungi as a Promising Source of Anticancer L-Asparaginase: A Review.** **Current Microbiology** Springer, , 1 set. 2023.

PENG, L. *et al.* High-level expression of soluble human  $\beta$ -defensin-2 in Escherichia coli. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2199–2205, 29 out. 2004.

PIETERS, R. *et al.* **L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia.** **Cancer**, 15 jan. 2011.

PILLAI-KASTOORI, L.; SCHUTZ-GESCHWENDER, A. R.; HARFORD, J. A. **A systematic approach to quantitative Western blot analysis.** *Analytical Biochemistry* Academic Press Inc., , 15 mar. 2020.

POKROVSKAYA, M. V. *et al.* **Molecular Analysis of L-Asparaginases for Clarification of the Mechanism of Action and Optimization of Pharmacological Functions.** *Pharmaceutics* MDPI, , 1 mar. 2022.

PUI, C. H. *et al.* **Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how do we get there?** *Blood* American Society of Hematology, , 9 ago. 2012.

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 2006.

RAJENDRAN, V.; PUSHPAVANAM, S.; JAYARAMAN, G. Continuous refolding of L-asparaginase inclusion bodies using periodic counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1662, 11 jan. 2022.

RAMYA, L. N. *et al.* **L-asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, ago. 2012.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. **Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges.** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Research Foundation, , 2014.

SAEED, H. *et al.* Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* L. asparaginase in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 1041–1051, 1 jan. 2018.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. **Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, jan. 2008.

SANDÉN, A. M. *et al.* Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 2, p. 158–166, 20 jan. 2003.

SCHEETZ, R. W.; WHELAN, H. A.; WRISTON, J. C. **Purification and Properties of an L-Asparaginase from *Fusarium tricinctum***'ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS. [s.l: s.n.].

SCHWARTZ, J. H.; REEVES, J. Y.; BROOME, J. D. **TWO L-ASPARAGINASES FROM *E. COLI* AND THEIR ACTION AGAINST TUMORS\***. [s.l: s.n.].

SHAFIQUE, S.; TEHSIN, S. Acute lymphoblastic leukemia detection and classification of its subtypes using pretrained deep convolutional neural networks. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 17, p. 1–7, 1 jan. 2018.

SHILLING, P. J. *et al.* Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, 1 dez. 2020.

SHRIVASTAVA, A. *et al.* **Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. Critical Reviews in Oncology/Hematology**Elsevier Ireland Ltd, , 1 abr. 2016.

SINGH, A. *et al.* **Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. Microbial Cell Factories**BioMed Central Ltd., , 25 mar. 2015.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

SINGHVI, P. *et al.* **Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. Trends in Biotechnology**Elsevier Ltd, , 1 maio 2020.

SINGHVI, P. *et al.* Molecular Attributes Associated With Refolding of Inclusion Body Proteins Using the Freeze–Thaw Method. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 20 abr. 2021a.

SINGHVI, P. *et al.* Solubilization and refolding of variety of inclusion body proteins using a novel formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 2352–2364, 15 dez. 2021b.

SIQUEIRA, F. G. DE. **Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases**. Brasília-DF: Universidade de Brasília, 5 maio 2010.

- SMITH, P. K. *et al.* **Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid**<sup>1</sup>. [s.l: s.n.].
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–128, 26 jan. 2005.
- SOUZA, P. M. *et al.* **Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review**. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** Elsevier Ireland Ltd, , 1 dez. 2017.
- STUDIER, F. W. **Use of Bacteriophage T7 Lysozyme to Improve an Inducible T7 Expression System**. **J. Mol. BioE.** [s.l: s.n.].
- SU, X. *et al.* Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi. Em: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2012. v. 81p. 1–61.
- SUDHIR, A. P. *et al.* Characterization of a Recombinant Glutaminase-Free L-Asparaginase (ansA3) Enzyme with High Catalytic Activity from *Bacillus licheniformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 7, p. 2504–2515, 20 nov. 2014.
- TERPE, K. **Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, set. 2006.
- UPADHYAY, A. K. *et al.* Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 29 mar. 2012.
- UPADHYAY, A. K. *et al.* Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, 2014.
- VAN TRIMPONT, M. *et al.* **Novel Insights on the Use of L-Asparaginase as an Efficient and Safe Anti-Cancer Therapy**. **CancersMDPI**, , 1 fev. 2022.
- VICENTE AUGUSTO DE CARVALHO. **Temas em Psico-oncologia**. [s.l.] Summus Editorial, 2008.

VIMAL, A.; KUMAR, A. **Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** Taylor and Francis Ltd., , 2 jan. 2017.

WALSH, G. **Proteins: biochemistry and biotechnology**. Second Edition ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

WANG, Y. *et al.* **Microbial production, molecular modification, and practical application of L-Asparaginase: A review. International Journal of Biological Macromolecules** Elsevier B.V., , 1 set. 2021.

WHITEHEAD, T. P. *et al.* Childhood Leukemia and Primary Prevention. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 46, n. 10, p. 317–352, 1 out. 2016.

WRISTON, J. C.; YELLIN, T. 0; WASHINGTON, F. **L-ASPARAGINASE: A REVIEW**. [s.l: s.n.].

WURM, D. J. *et al.* The E. coli pET expression system revisited—mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8721–8729, 1 out. 2016.

ZUO, X. *et al.* Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in escherichia coli. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v. 6, n. 2–3, p. 103–111, set. 2005.