



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

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE DE *Fusarium proliferatum*  
EM *Escherichia coli***

**LETÍCIA SANTOS ABRUNHOSA**

BRASÍLIA – DF

2023

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

**LETÍCIA SANTOS ABRUNHOSA**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE DE**  
***Fusarium proliferatum* EM *Escherichia coli***

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

**Orientadora:**  
**Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães**

BRASÍLIA - DF

2023

Dedico este trabalho à minha mãe, meu maior exemplo.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de dedicar um especial agradecimento à minha mãe, que forneceu apoio e presença ao meu lado nos momentos difíceis. É uma fonte de força e inspiração para mim, e agradeço por sempre me incentivar a seguir o caminho que amo e por acreditar no meu potencial. Também gostaria de agradecer à minha avó pelo apoio, incentivo e encorajamento constante. Sou extremamente abençoada por ter o amor e o apoio de duas mulheres tão incríveis em minha vida. Obrigada por tudo que vocês fazem por mim. Amo vocês infinitamente.

Quero agradecer aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Ana Luisa, Ana Letícia, Artur, Joel, Diegue, Samuel, Paula Garcia, Sarah, Patrícia, Renata, Paula de Souza e Marina. Durante esses anos de trabalho, vocês foram uma fonte constante de risadas, companheirismo e apoio.

Quero agradecer à minha orientadora prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Pérola, por toda dedicação, sabedoria, paciência e confiança durante todo o processo do projeto. Por confiar no meu potencial desde 2016, ano que comecei a entrar na área da pesquisa. Quero agradecer também à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliane Noronha, por ceder parte do material necessário para a execução do estudo e por nos acolher em seu laboratório, e ao Joel, que, além de amigo, foi fundamental para a realização do projeto ao compartilhar seu conhecimento, experiência e habilidades.

Quero agradecer ao meu namorado Rauan, por toda a parceria, paciência, carinho e presença ao meu lado. Seu apoio emocional tem sido uma fonte constante de conforto e força para mim, obrigada por tudo. Te amo.

Agradeço aos membros da banca de avaliação, por aceitarem o convite.

Agradeço também ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A L-asparaginase é uma enzima utilizada para tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda, que atinge em sua maioria crianças e adolescentes, e possui a capacidade de hidrolisar a L-asparagina em L-aspartato e amônia. As preparações clínicas dessa enzima são derivadas de fonte procariota e seu uso está frequentemente associado a reações adversas graves. O Brasil vem, já há alguns anos, importando este medicamento para uso nacional devido à falta de produção no país. Uma alternativa para a enzima que se encontra no mercado seria a clonagem e expressão de L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* em *Escherichia coli*, com objetivo de atenuar os efeitos adversos produzidos por ser uma enzima de origem procariótica. Tendo isso em vista, o objetivo desse trabalho foi realizar a clonagem de L-asparaginase obtida por *Fusarium proliferatum* e expressá-la em *Escherichia coli* BL21(DE3). Foi realizada a síntese do gene da L-asparaginase de *F. proliferatum* em vetor pET-28a(+) com otimização de códons para *E. coli* e sítios de restrição NdeI/XhoI. Em sequência, foi realizada transformação para replicação em *E. coli* DH10B e transformação para expressão em *E. coli* BL21(DE3). Após a confirmação da inserção do vetor no sistema de expressão, foram selecionados clones para serem avaliados quanto à produção de L-asparaginase, com posterior avaliação do crescimento microbiano, métodos de rompimento celular e screening para avaliar algumas condições de cultivo, com variação da concentração do indutor IPTG, tempo pós indução e temperatura de indução. As frações solúvel e insolúvel foram utilizadas para a realização do ensaio enzimático, onde a atividade de L-asparaginase foi medida pelo método de Nessler e do  $\beta$ -hidroxamato aspártico. A melhor metodologia para lise celular consistiu em 10 ciclos de sonicação, sendo cada ciclo composto por 1 segundo ON e 1 segundo OFF, e intervalo de 1 minuto entre cada ciclo. Dentre as variáveis analisadas em relação ao cultivo e indução, o crescimento bacteriano a 37 °C por 2h30, com indução por IPTG 0,5 mM, temperatura de indução de 20 °C e tempo pós indução de 12 horas representou a melhor condição para expressão da enzima. Ambas metodologias de quantificação enzimática, após concentração das frações, apresentaram atividade de L-asparaginase na fração solúvel, sendo 0,449 UI/mL pelo método de Nessler e 0,082 UI/mL pelo método do AHA.

**Palavras Chave:** L-asparaginase, *Escherichia coli*, proteína recombinante, *Fusarium proliferatum*, expressão heteróloga

## ABSTRACT

L-asparaginase is an enzyme used for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia, which mainly affects children and adolescents, and it has the ability to hydrolyze L-asparagine into L-aspartate and ammonia. Clinical preparations of this enzyme are derived from prokaryotic source and its use is often associated with serious adverse reactions. For several years, Brazil has been importing this medication due to the lack of national production. An alternative to the enzyme available in the market would be cloning and expression L-asparaginase from *Fusarium proliferatum* in *Escherichia coli*, with the aim of attenuating the adverse effects of prokaryotic enzyme. The objective of this work was to clone L-asparaginase from *Fusarium proliferatum* and express in *Escherichia coli* BL21(DE3). The synthesis of the L-asparaginase gene from *F. proliferatum* was carried out in pET-28a(+) vector with codon optimization for *E. coli* and NdeI/XhoI restriction sites. Subsequently, transformation for replication in *E. coli* DH10B and transformation for expression in *E. coli* BL21(DE3) were performed. After confirming the vector insertion into the expression system, clones were selected to be evaluated for L-asparaginase production, with subsequent evaluation of microbial growth, cell disruption methods, and screening of cultivation conditions, with variation in IPTG inducer concentration, post-induction time and induction temperature. Soluble and insoluble fractions were used for enzymatic assay, where L-asparaginase activity was measured by Nessler and  $\beta$ -hydroxamate aspartic acid methods. The best methodology for cell lysis consisted of 10 cycles of sonication, each cycle composed of 1 second ON and 1 second OFF, and a 1-minute interval between each cycle. Among the variables analyzed regarding cultivation and induction, bacterial growth at 37 °C for 2h30, with induction by 0,5 mM IPTG, an induction temperature of 20 °C, and a post-induction time of 12 hours represented the best condition for enzyme expression. Both enzymatic quantification methodologies, after concentration of the fractions, showed L-asparaginase activity in the soluble fraction of 0,449 IU/mL using Nessler reagent and 0,082 IU/mL using AHA.

**Keywords:** L-asparaginase, *Escherichia coli*, recombinant protein, *Fusarium proliferatum*, heterologous expression.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APS</b>	Perssulfato de amônio
<b>ASNase</b>	L-asparaginase
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<b>LMW-SDS</b>	Padrão de baixo peso molecular
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

<b>TBS</b>	Tris-tampão salino (Tris Buffered Saline)
<b>TCA</b>	Ácido Tricloroacético
<b>TEMED</b>	Tetrametiletenodiamina
<b>TRIS</b>	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de células de leucemia linfoblástica aguda presentes no sangue .....	17
Figura 2 - Estrutura cristalográfica da enzima L-ASNase tipo 2 nativa de <i>E. coli</i> .....	21
Figura 3 - Vetor pET-28a(+) transformado contendo o gene para clonagem do cDNA da L-asparaginase e sua expressão em <i>E. coli</i> .....	45
Figura 4 - Sequência das camadas de papel de filtro, gel e membrana para transblotting.....	55
Figura 5 - Reação de hidroxilaminólise efetuada pela enzima L-asparaginase na presença de hidroxilamina .....	58
Figura 6 - Gel de agarose 0,8% de amostra plasmidial do clone DH10B (à esquerda) e gel de agarose 1,2% contendo produto de PCR do clone de DH10B (à direita) ....	62
Figura 7 - Gel de agarose 0,8% de amostra plasmidial dos 10 clones de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e controle positivo pET-28a(+) com gene de L-asparaginase de <i>F. proliferatum</i> (A) Gel de agarose 1,2% contendo produto de PCR dos 10 clones de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e <i>E. Coli</i> BL21 (DE3) sem plasmídeo como controle negativo (B).....	63
Figura 8 - Géis de SDS-PAGE 12% dos 10 clones de <i>E. Coli</i> BL21 (DE3) transformada, nas frações solúvel e insolúvel. (A) clones 1 ao 3, (B) clones 4 ao 7, (C) clones 8 ao 10 .....	65
Figura 9 - <i>Western Blot</i> contendo, respectivamente, C-: controle negativo (BL21 (DE3) sem plasmídeo) solúvel (S) e insolúvel (I); C2: clone 2, frações solúvel (S) e insolúvel (I); C5: clone 5, frações solúvel (S) e insolúvel (I); C10: clone 10, frações solúvel (S) e insolúvel (I).....	66
Figura 10 - SDS-PAGE dos 5 métodos de rompimento celular por sonicador de ponteira, utilizando amostra da fração insolúvel.....	69

Figura 11 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T0, T1 e T2, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM .....	71
Figura 12 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T2, T3 e T4, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM .....	72
Figura 13 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T4, T5 e T6, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM .....	72
Figura 14 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T0, T1 e T2, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM .....	73
Figura 15 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T2, T3 e T4, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM.....	73
Figura 16 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T4, T5 e T6, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM.....	74
Figura 17 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T0, T1 e T2, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM .....	74
Figura 18 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T2, T3 e T4, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM .....	75
Figura 19 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de <i>E. coli</i> transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T4, T5 e T6, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM .....	75

Figura 20 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T0, T1 e T2, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM.....76

Figura 21 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T2, T3 e T4, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM .....76

Figura 22 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T4, T5 e T6, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM.....77

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento do clone 10 de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada nos meios LB, definido e complexo.....	67
Gráfico 2 - Curva logarítmica do crescimento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada em meio LB.....	67
Gráfico 3 - Curva logarítmica do crescimento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada em meio definido.....	67
Gráfico 4 - Curva logarítmica do crescimento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada em meio complexo.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio Ágar Luria Bertani.....	32
Tabela 2 - Composição do caldo Luria Bertani.....	32
Tabela 3 - Composição dos elementos traço do meio definido.....	33
Tabela 4 - Composição da solução de sais do meio definido.....	33
Tabela 5 - Composição da solução de sulfato de magnésio do meio definido.....	34
Tabela 6 - Composição da solução de canamicina 50 mg/mL.....	34
Tabela 7 - Composição da solução de glicose do meio definido.....	35
Tabela 8 - Composição da solução de tiamina do meio definido.....	35
Tabela 9 - Formulação final do meio definido.....	35
Tabela 10 - Composição do tampão de Lise celular.....	36
Tabela 11 - Composição do tampão de amostra para gel de agarose 6X.....	36
Tabela 12 - Composição do tampão TAE 50x.....	36
Tabela 13 - Composição do tampão de amostra 2X para gel SDS-PAGE.....	37
Tabela 14 - Composição da solução corante Coomassie Blue R-350.....	37
Tabela 15 - Composição da solução descorante para SDS-PAGE.....	38
Tabela 16 - Composição do tampão de corrida 5X para SDS-PAGE.....	38
Tabela 17 - Composição da solução de bloqueio 5%.....	39
Tabela 18 - Composição do tampão TBSt.....	39
Tabela 19 - Composição do tampão Tris/Glicina 5X (pH 8,3).....	39
Tabela 20 - Composição da solução de incubação do anticorpo para <i>Western Blot</i> .....	40

Tabela 21 - Composição do tampão de transferência para <i>Western Blot</i> .....	40
Tabela 22 - Composição da solução de Hidroxilamina 2 M .....	41
Tabela 23 - Composição da solução de Hidroxilamina 1 M .....	41
Tabela 24 - Composição da solução de L-asparagina 0,1 M .....	41
Tabela 25 - Composição da solução de Cloreto Férrico/Ácido Tricloroacético/Ácido Clorídrico .....	42
Tabela 26 - Composição do tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,6).....	42
Tabela 27 - Composição da solução padrão de $\beta$ -hidroxamato aspártico 5 mM .....	43
Tabela 28 - Composição da solução de L-asparagina 189 mM .....	43
Tabela 29 - Reagentes utilizados para realizar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase .....	49
Tabela 30 - Reagentes utilizados para preparo do gel separador 4% .....	52
Tabela 31 - Reagentes utilizados para preparo do gel concentrador 12%.....	52
Tabela 32 - Proteínas presentes no marcador molecular <i>Low Molecular Weight Calibration Kit® for SDS Electrophoresis</i> (GE Healthcare®).....	54
Tabela 33 - Metodologias de lise celular por sonicação avaliadas no estudo .....	56
Tabela 34 - Variáveis avaliadas para otimização da indução de L-asparaginase .....	57

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
1.1	LEUCEMIA	16
1.1.1	<b>Leucemia Linfoblástica Aguda</b>	17
1.2	L-ASPARAGINASE	20
1.2.1	<b>Fontes de obtenção da enzima</b>	23
1.3	DNA RECOMBINANTE E EXPRESSÃO HETERÓLOGA	26
1.3.1	<b>Vetores</b>	27
1.3.2	<b>Principais sítios de expressão</b>	28
1.3.2.1	Leveduras	28
1.3.2.2	Bactérias	28
1.4	<i>Escherichia coli</i>	29
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	31
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	32
3.1	PREPARO DE SOLUÇÕES	32
3.2	VETOR	43
3.3	PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES	46
3.3.1	<b>Transformação por choque térmico</b>	46
3.3.2	<b>Confirmação da transformação e seleção de clones transformados</b>	47
3.3.3	<b>Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose</b>	48
3.3.4	<b>Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)</b>	49
3.4	SELEÇÃO DOS CLONES	50

3.4.1	<b>Cultivo</b> .....	50
3.4.2	<b>Quantificação de proteínas totais</b> .....	51
3.4.3	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)</b> .....	51
3.4.4	<b>Western Blot</b> .....	54
3.5	CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO .....	55
3.6	AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE ROMPIMENTO CELULAR .....	56
3.7	SCREENING DA INDUÇÃO DE ASNase RECOMBINANTE .....	57
3.8	ENSAIO ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE A PARTIR DO ÁCIDO L-ASPARTIL- $\beta$ -HIDROXÂMICO (AHA) .....	58
3.9	ENSAIO ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE UTILIZANDO REAGENTE DE NESSLER.....	59
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
4.1	TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i> DH10B E BL21 (DE3) E CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO .....	61
4.2	TRIAGEM DOS CLONES PARA A EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE ...	64
4.3	CURVA DE CRESCIMENTO .....	66
4.4	MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR POR SONICAÇÃO .....	68
4.5	ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DE INDUÇÃO .....	70
4.6	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE L-ASPARAGINASE .....	77
4.7	INÓCULO EM MEIO DEFINIDO.....	79
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>82</b>



## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 LEUCEMIA

A leucemia é uma doença maligna que afeta as células sanguíneas, especificamente as células que produzem os glóbulos brancos (leucócitos) na medula óssea (1).

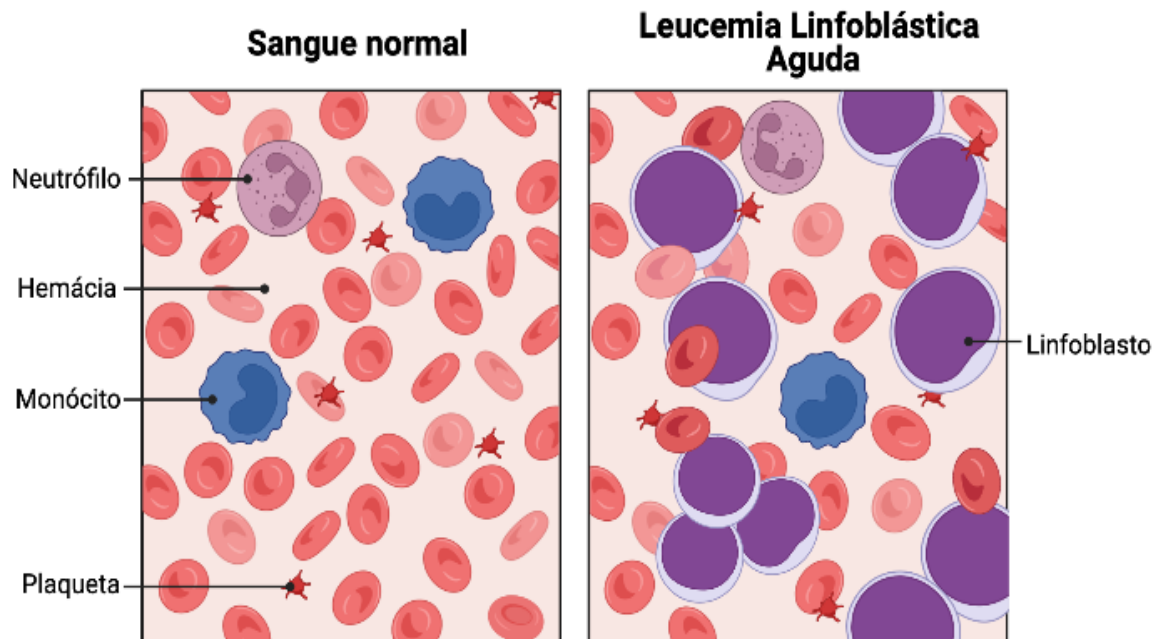
As células leucêmicas apresentam algumas características distintas em comparação às células sanguíneas normais (2), como:

1. Alta taxa de multiplicação celular, resistência à apoptose e acúmulo na medula óssea, prejudicando a produção adequada de células sanguíneas normais (3, 4).
2. Diferenciação hematopoiética incompleta, caracterizada pela ausência de formação funcional de leucócitos maduros. Essa condição resulta em uma redução na capacidade de defesa do organismo contra agentes patogênicos, tornando os indivíduos mais suscetíveis à infecção (5, 6).
3. Capacidade de invadir outros órgãos e tecidos, promovendo metástase e causando complicações sistêmicas (7).

Existem diferentes tipos de leucemia, incluindo leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC) (7). O diagnóstico é realizado através da avaliação das características das células leucêmicas presentes no sangue ou na medula óssea por meio de exames laboratoriais, como hemograma completo, citometria de fluxo e análise morfológica das células. O enfoque terapêutico está relacionado aos aspectos imunológicos, moleculares e citogenéticos, ao estágio clínico no qual o paciente se encontra, à idade e aos fatores de risco. Na grande maioria das vezes, o tratamento se dá por quimioterapia, radioterapia, transplante de medula óssea ou terapia alvo (7).

### 1.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é caracterizada pela produção maligna de linfócitos imaturos (linfoblastos) na medula óssea (6, 8, 9), conforme demonstrado na figura 1.



Created in BioRender.com bio

Figura 1 - Representação de células de leucemia linfoblástica aguda presentes no sangue. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

A incidência de leucemia em crianças e adolescentes com menos de 15 anos de idade corresponde à cerca de 30% de todos os casos de câncer nessa faixa etária. Dentre as diferentes formas de leucemia, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a mais prevalente em crianças, representando 80% dos casos (10).

De 2010 até 2016, a taxa de sobrevivência para todos os grupos etários foi de 72,1%, comparada com outros tipos de câncer. Em crianças e adolescentes com menos de 15 anos, a taxa de sobrevivência foi de 92,5%, enquanto para crianças abaixo de 5 anos, esse valor aumentou para 94,4% (11, 12).

A leucemia é uma das principais causas de morte por câncer entre crianças e adolescentes com menos de 20 anos, correspondendo a 26,1% de todas as mortes

relacionadas ao câncer nessa faixa etária. A maioria dos casos de LLA ocorre em crianças, mas a maioria das mortes (cerca 80%) ocorre em adultos (11-14).

Pacientes com leucemia podem apresentar sintomas como fadiga, anormalidades sanguíneas, susceptibilidade à infecções, perda de apetite, dor óssea e náuseas. Esses sintomas podem ser atribuídos à diminuição do número de células sanguíneas funcionais na circulação, resultando em uma série de complicações clínicas (15).

A causa exata dessa neoplasia não é completamente compreendida, mas acredita-se ter ligação com fatores genéticos e ambientais (7).

Algumas condições podem aumentar a probabilidade de desenvolver LLA, como:

- Exposição à produtos químicos (pesticidas e benzeno); radiação ionizante; vírus (vírus da imunodeficiência humana e o vírus Epstein-Barr)(13,16)
- Histórico familiar de leucemia; mutações genéticas adquiridas; idade avançada; distúrbios sanguíneos (13, 17).

No entanto, muitos casos ocorrem em pessoas sem fatores de risco conhecidos. A prevenção do surgimento da LLA, quando possível, envolve tomar medidas para evitar a exposição à fatores de risco conhecidos, além de buscar manter um estilo de vida saudável (18).

Dentre os tipos de tratamento, o mais utilizado é a quimioterapia (17), que consiste em 3 fases (7, 16):

- Indução: busca eliminar as células leucêmicas presentes no sangue e na medula óssea, com o objetivo de induzir a remissão completa e restaurar a produção de células sanguíneas saudáveis.
- Consolidação (intensificação): objetivo de eliminar células leucêmicas residuais, buscando prevenir relapso.
- Manutenção (pós-consolidação): fase responsável por prolongar a remissão e prevenir relapso.

A quimioterapia é administrada em ciclos, com cada período de tratamento seguido por um período de descanso para permitir que o corpo possa se recuperar (19).

Diferentes medicamentos são utilizados para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda, e sua escolha depende das características individuais da neoplasia, idade do paciente, estágio da doença, resposta inicial ao tratamento, entre outros fatores (19).

Os três medicamentos comumente utilizados na maioria dos tratamentos de quimioterapia de LLA, na etapa de indução, são a vincristina, esteroides (prednisona/dexametasona) e L-asparaginase (5). Em alguns casos, as antraciclinas são adicionadas à terapia para pacientes de alto risco ou com baixa resposta aos três medicamentos padrões (20-22). É fundamental o quanto antes a identificação da resistência de um paciente a qualquer um desses medicamentos para o bom funcionamento da terapia (5, 23).

Além dos listados acima, também podem ser utilizados os medicamentos metotrexato, 6-mercaptopurina, citarabina, decitabina, azacitidina, ciclofosfamida, 6-tioguanina, nelarabina, clofarabina, rituximabe, mesilato de imatinibe, entre outros, dependendo dos subtipos de LLA. É importante recordar que o tratamento pode variar de acordo com cada caso (13, 19, 24-26).

Os quimioterápicos não só atacam as células cancerígenas, mas também células normais (tratamento sistêmico), e, devido a isso, surgem inúmeras reações adversas (Pavlovic, 2019). As mais comuns derivadas da quimioterapia podem incluir (Gervasini, 2012):

- Febre (10, 28, 29)
- Queda de cabelo (10, 28, 29)
- Náusea e vômito (10, 28, 29)
- Reações alérgicas (10, 28, 29)
- Mielossupressão (10, 28, 29)
- Supressão do sistema imunológico (28, 29)

- Toxicidade hematológica (28, 29)
- L-asparaginase: pancreatite, dor abdominal intensa, toxicidade hepática, distúrbios metabólicos (ex. hiperglicemia e hiperlipidemia)(28).
- Vincristina: neuropatia periférica, constipação, dificuldade respiratória (10).
- Antraciclinas: aumento do risco de infertilidade, câncer secundário, toxicidade cardíaca, gastrointestinal e hepática (29).
- Esteróides: aumento de peso e do apetite, insônia, aumento da pressão arterial, fraqueza muscular, irritabilidade, hiperglicemia, osteoporose e catarata (10).
- Citarabina: toxicidade neurológica, problemas respiratórios, diarreia ou constipação, calafrios, fadiga, fraqueza e perda de apetite (10).
- Metotrexato: mucosite e toxicidade hepática, renal, respiratória e neurológica (10).

## 1.2 L-ASPARAGINASE

A L-asparaginase (ASNase, E.C. 3.5.1.1) é uma amino-hidrolase de estrutura tetramérica responsável pela hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (30)(figura 2).

Essa enzima ganhou atenção devido às suas importantes aplicações. Na indústria farmacêutica, ela é indicada para o tratamento de diferentes formas de câncer, como Leucemia Linfoblástica Aguda e doenças malignas do sistema linfático (32, 33).

Este biofármaco faz parte da fase de indução da terapia da LLA, no início do tratamento da doença. Nesta etapa, busca-se diminuir o número de células leucêmicas, o suficiente para que elas não sejam mais encontradas na medula óssea e as contagens no sangue periférico voltem ao normal. Os pacientes infantis têm mostrado uma alta taxa de remissão total do tumor (90%), diminuindo a necessidade de realizar transplante de medula óssea, enquanto os pacientes mais velhos apresentam menos de 20% (9).

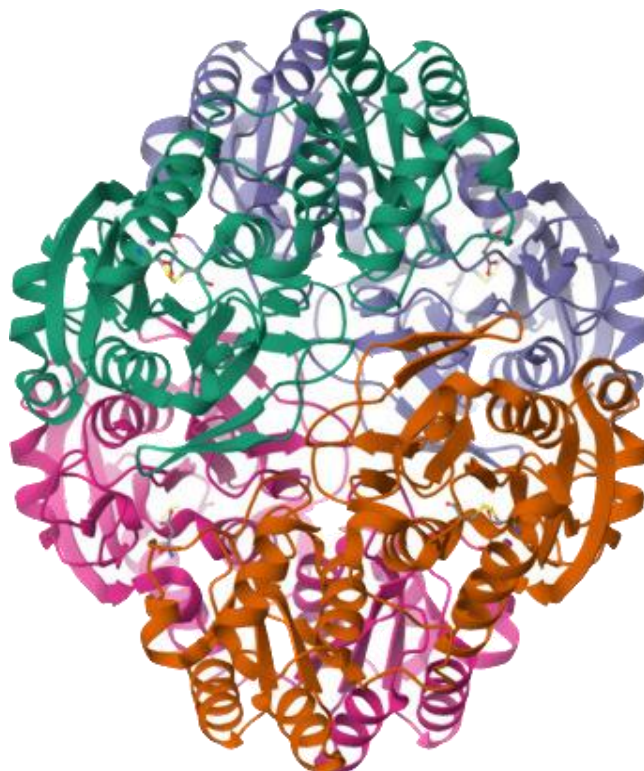


Figura 2 - Estrutura cristalográfica da enzima L-ASNase tipo 2 nativa de *E. Coli*.

Fonte: ARAÚJO et al., 2021 (31) PDB 6UOH

Kidd et al. inicialmente observou, em 1953, que o soro de porquinho-da-índia era eficaz para o tratamento de LLA, mas o que causava a diminuição das células leucêmicas ainda era desconhecido (33). Após anos de pesquisa, além de descobrirem a ação antineoplásica da L-asparaginase que estava presente no soro sanguíneo (32), a genética molecular foi capaz de produzir essa enzima em microorganismos, trazendo grande benefício industrial (20).

Diferentemente das células saudáveis, a célula linfoblástica não possui a enzima asparagina sintetase, responsável pela produção intracelular da L-asparagina. Como resultado, dependem da L-asparagina presente no sangue para sua sobrevivência e crescimento (34). A L-asparaginase vai agir na hidrólise da L-asparagina, impedindo que ela sirva de nutriente para a célula tumoral. Conseqüentemente, haverá redução da síntese de DNA, RNA e proteínas, gerando inibição do crescimento celular e, por fim, a ativação dos mecanismos de morte celular apoptótica (35-37).

Por outro lado, as células sanguíneas normais possuem a enzima L-asparagina sintetase, que catalisa a reação de síntese de asparagina a partir dos seus

precursores, o ácido aspártico e a amônia, na presença de ATP, liberando AMP e pirofosfato (38). Portanto, mesmo com a depleção desse aminoácido no sangue, as células sanguíneas normais não são afetadas (39).

A L-asparaginase comercializada é produzida a partir de *Escherichia coli* (Elspar®, Spectrila®) e *Erwinia chrysanthemi* (Erwinaze®, Rylaze®). No caso da enzima obtida pela *E. coli*, também há no mercado a pegaspargase (Oncaspar®), uma forma peguilada da enzima nativa que possui ligações covalentes ao polímero polietilenoglicol (PEG). Essa formulação foi desenvolvida para melhorar a eficácia do tratamento com a enzima, reduzindo a frequência e quantidade de doses administradas, preservando sua atividade, e diminuindo a toxicidade e imunogenicidade associadas ao tratamento (40-42).

Em bactérias Gram-negativas, a L-asparaginase produzida pode ser dividida em dois grupos: tipo 1 e tipo 2. A do tipo 1 é encontrada no citosol e apresenta afinidade pela L-asparagina e L-glutamina. Já a L-asparaginase do tipo 2 é encontrada nas proximidades do espaço periplásmico e possui alta afinidade específica pela L-asparagina (43). A L-asparaginase tipo 2 mostra uma atividade antitumoral precisamente maior e é utilizada como agente quimioterápico (38).

Além de sua atividade antitumoral, a L-asparaginase tipo 2 também possui aplicação na indústria alimentícia como agente enzimático para remoção de asparagina em ingredientes alimentares, com o objetivo de reduzir a formação de acrilamida. Essa substância, neurotóxica e carcinogênica, está presente em alimentos fritos e assados, principalmente os ricos em carboidratos (30, 44).

A produção em larga escala da enzima L-asparaginase enfrenta desafios significativos, incluindo a busca por micro-organismos mais adequados e moléculas com menor potencial de reações adversas. Nesse sentido, micro-organismos eucariotos, como fungos filamentosos e leveduras, têm sido estudados como possíveis fontes de obtenção dessa enzima devido à maior compatibilidade com o sistema humano (45).

No Brasil, o medicamento à base de L-asparaginase é fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) de forma gratuita, e faz parte do protocolo de tratamento para

a LLA (BRASIL - portaria 705/2014)(46). Desde 2017, a rede pública de saúde dispõe do medicamento L-asparaginase de *E. coli*, importado pelo Ministério da Saúde.

A falta de produção nacional deste insumo farmacêutico ativo deixa os pacientes brasileiros vulneráveis à falta de produto no mercado internacional. Este cenário torna a produção nacional dessa enzima relevante não apenas para reduzir custos devido à importação e conferir um maior controle de qualidade do produto, mas também para garantir o fornecimento do medicamento.

O investimento na obtenção da enzima por espécies nativas favorece o mercado nacional, diminui o custo causado pela importação desse medicamento, e estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos na área da biotecnologia.

Portanto, a busca por novas fontes produtoras de L-asparaginase está intrinsecamente ligada ao objetivo de promover um tratamento menos tóxico, mais seguro e eficaz, ao mesmo tempo em que se busca reduzir os custos associados. Essa pesquisa contínua desempenha um papel fundamental no avanço da área da saúde, trazendo benefícios aos pacientes e contribuindo para a melhoria da saúde pública como um todo.

### 1.2.1 Fontes de obtenção da enzima

A L-asparaginase é uma enzima natural presente em plantas, animais e micro-organismos, mas não no corpo humano (30, 37). Organismos produzem essa enzima pois usam como fonte de nitrogênio a amônia gerada pela hidrólise da L-asparagina. A utilização de micro-organismos para a produção dessa enzima é uma abordagem preferível em comparação ao uso de células vegetais ou animais. Micro-organismos oferecem vantagens significativas devido à facilidade de cultivo, manipulação genética e escalonamento de produção em larga escala. Essa estratégia também permite otimização de processos e controle de qualidade mais eficientes, além de oferecer uma fonte mais sustentável e economicamente viável a nível industrial (47).

As fontes de L-asparaginase para uso médico são produzidas a partir de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, sendo a L-asparaginase de *E. coli* a mais



amplamente utilizada. No entanto, em caso de hipersensibilidade à L-asparaginase proveniente de *E. coli* devido ao desenvolvimento de anticorpos antiasparaginase, a L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* é utilizada como uma alternativa viável (38).

A produção de L-asparaginase por bactérias Gram-positivas e negativas é amplamente conhecida na literatura científica (48). Entre as Gram-positivas, pode-se citar os gêneros *Staphylococcus sp.* (49), *Bacillus sp.* (50), e *Aeromonas sp.* (51).

Em relação às bactérias Gram-negativas, atualmente são utilizadas *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* para tratamento clínico da LLA (52, 53). A *E. coli* é a escolha mais comum e preferida na produção comercial da enzima devido à sua eficiência e níveis elevados de expressão, segurança e facilidade de cultivo e purificação (54). No entanto, o uso dessas enzimas pode levar à hipersensibilidade e inativação imunológica e desencadear reações adversas, como alergia, náusea, pancreatite, diabetes e anormalidades de coagulação devido à atividade de glutaminase (55).

Outras bactérias Gram-negativas também foram confirmadas como produtoras de L-asparaginase, incluindo *Pseudomonas sp.* (56), *Helicobacter pylori* (57), *Proteus vulgaris* (58), *Klebsiella pneumoniae* (59), *Citrobacter sp.* (60) e *Serratia marcescens* (61).

Tem havido um interesse crescente na busca por novas fontes para a produção de L-asparaginase com maior eficiência catalítica e menor toxicidade (62). Nesse contexto, diversos micro-organismos eucariotos têm sido estudados como alternativas para a obtenção dessa enzima, incluindo fungos, leveduras e algas. Esses micro-organismos apresentam como vantagem maior semelhança estrutural e funcional com as enzimas humanas, causando diminuição dos efeitos adversos quando comparada à enzima de fonte bacteriana (45). A diversidade desses micro-organismos oferece uma ampla gama de possibilidades para a descoberta de L-asparaginases com características aprimoradas (30).

As leveduras produzem proteínas com maior capacidade de glicosilação, o que pode melhorar a estabilidade proteica e atividade biológica. Adicionalmente, estudos têm demonstrado que enzimas fúngicas podem apresentar maior atividade catalítica

e maior estabilidade em diferentes condições, o que as torna potencialmente mais eficazes que as de origem bacteriana (63, 64).

Fungos filamentosos, em particular os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, têm sido explorados por sua capacidade de produzir L-asparaginase com características superiores (64).

Estudos recentes revelam importantes descobertas relacionadas à atividade dessa enzima em espécies do gênero *Fusarium*. Essas espécies de fungos filamentosos, além de serem em sua maioria fitopatogênicas, também representam risco para a saúde humana e animal devido à produção de micotoxinas. No entanto, possuem grande importância tanto na agricultura quanto na pesquisa em microbiologia devido sua capacidade de produzir enzimas industriais e outros compostos de interesse biotecnológico (65).

Estudos realizados por Freitas et. al (2021) indicaram atividade de L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* de 1,86 U/mL com cultivo em fermentação submersa. Outra característica importante dessa L-asparaginase foi a baixa atividade de glutaminase, o que pode levar à diminuição dos efeitos adversos oriundos do tratamento quimioterápico (66).

Um estudo conduzido por K. Ruma et al. (2017)(67) demonstrou atividade de L-asparaginase de 7.653 UI/mL de *Fusarium solani*, após ser realizada otimização das condições de cultivo em meio sólido utilizando casca de laranja como substrato. Da mesma forma, El-Gendy et al. (2021)(68) detectou atividade de 488,1 UI/mg após a purificação de L-asparaginase proveniente de *Fusarium equiseti* AHMF4, cultivado em fermentação submersa em meio Czapek's dox modificado. Além disso, foi observada atividade citotóxica contra células Hela, Hep-2, HepG-2 e HCT-116.

Yap et al. (2021)(69) relatou atividade de  $22,42 \pm 0,20$  UI/mL em *Fusarium proliferatum* após otimização do meio de cultivo e da produção de L-asparaginase. Também foi observada ação citotóxica contra células leucêmicas da linhagem Jurkat. Meghavarnam e Janakiraman (2017)(70) constataram atividade de L-asparaginase de 18,91 UI por grama de substrato seco a partir de *Fusarium culmorum*, bem como a inibição do crescimento e proliferação de células leucêmicas da linhagem T-cell.

Ali et al. (2018)(71) observou atividade de 143 UI/mL em *Fusarium oxysporum* utilizando um meio Czapek's dox modificado. De forma semelhante, Yousef (2021)(72)

relatou atividade de 220 UI/mL em *Fusarium sp.* utilizando também meio Czapek's Dox modificado, com incubação a 28 °C.

Além das mencionadas anteriormente, estudos científicos relatam a produção de L-asparaginase em outras espécies fúngicas, tais como *Aspergillus nidulans* (73), *Aspergillus niger* (74), *Aspergillus oryzae* (43), *Aspergillus terreus* (44), *Penicillium digitatum*, *Penicillium sp.* e *Penicillium brevicompactum* (30, 75, 76).

Para a produção industrial de L-asparaginase, muitos fatores precisam ser levados em consideração. A obtenção da enzima a partir de organismos eucariotos apresenta desafios devido à maior complexidade e custo dos processos de produção, além de menor produtividade em comparação às bactérias, o que pode limitar sua aplicabilidade em grande escala (77). O que se busca é um processo com métodos mais eficientes e economicamente viáveis. Devem ser considerados aspectos como o tipo e a quantidade de fontes de carbono e nitrogênio, pH, nível de oxigenação, temperatura, duração da fermentação e, sobretudo, seleção do micro-organismo produtor adequado (78-81). A análise dessas diversas variáveis é fundamental para atingir uma produção enzimática máxima, levando em consideração que cada espécie fúngica possui condições ótimas específicas (62). Os estudos envolvendo fungos, leveduras e algas como fontes de L-asparaginase contribuem para a compreensão da diversidade enzimática e das vias metabólicas envolvidas na síntese desse composto.

A expressão heteróloga para gerar L-asparaginase de origem eucariota é um caminho promissor, pois permite a utilização de sistemas de expressão geneticamente modificados para aumentar a produção da enzima utilizando genes de fungos, por exemplo, que são bons produtores, mas inviáveis em nível industrial (64). Além de diminuir o custo de produção, expressar essa proteína de origem fúngica poderia amenizar as reações adversas relacionadas ao uso de medicamentos a base de L-asparaginase produzida a partir de gene bacteriano (44).

### 1.3 DNA RECOMBINANTE E EXPRESSÃO HETERÓLOGA

O DNA recombinante é uma molécula de DNA construída artificialmente pela combinação de fragmentos de DNA de diferentes origens. Essa técnica permite a inserção de genes específicos em organismos, permitindo a produção de proteínas

recombinantes para diversas finalidades, como fins medicinais, industriais e estudos de função e estrutura de proteínas (82).

Para gerar DNA recombinante, o fragmento do gene de interesse é extraído a partir de enzimas de restrição e ligado ao vetor de expressão, como um plasmídeo ou vírus, que direciona a expressão da proteína recombinante no organismo hospedeiro (83, 84). Vetores plasmidiais são comumente usados para expressão em bactérias, enquanto os virais são utilizados em células de mamíferos (82).

A expressão heteróloga ocorre pela inserção do DNA recombinante em célula hospedeira competente utilizando metodologias de transformação, onde há criação de condições que permitem a entrada do vetor na célula do hospedeiro (82, 85). Em bactérias, um método comum é a eletroporação, que envolve a aplicação de pulsos elétricos para criar poros na membrana celular e permitir a entrada do DNA recombinante. Outra técnica utilizada é a transformação por choque térmico, que envolve a exposição das células bacterianas a uma solução contendo o DNA recombinante e subsequente aplicação abrupta de diferentes temperaturas. Esse aumento rápido e temporário de temperatura faz com que as membranas celulares das bactérias se tornem mais permeáveis, permitindo a entrada do DNA exógeno (86).

### 1.3.1 Vetores

Vetores são moléculas utilizadas para clonagem e manipulação de genes em estudos de biologia molecular. Os mais utilizados são de origem plasmidial, que consistem em uma molécula de DNA circular com uma origem de replicação (ori) e um sítio de restrição (por exemplo, EcoRI). Tais sítios são usados para inserir um DNA exógeno, bem como sequências de promoção e terminação de transcrição para controlar a expressão do gene heterólogo. Os vetores também podem conter sequências adicionais para facilitar a seleção e identificação de células transformadas, como genes de resistência à antibióticos (85, 87).

A escolha do vetor depende da manipulação genética desejada (82, 85), sendo os vetores pET os mais utilizados para expressão de proteínas recombinantes em células hospedeiras. Esses vetores possuem um promotor forte (T7) regulado pelo

indutor IPTG, permitindo a expressão em larga escala da proteína de interesse, além de genes de resistência à antibióticos (85, 88).

### 1.3.2 Principais sítios de expressão

#### 1.3.2.1 Leveduras

As leveduras são micro-organismos eucariotos unicelulares que possuem características atrativas como hospedeiros na expressão de proteínas recombinantes, especialmente devido à sua habilidade em realizar pós-traduições complexas, como glicosilação e formação de pontes dissulfeto. Em relação à expressão de proteínas eucariotas em micro-organismos procariotos, as leveduras demonstram maior sucesso na expressão de genes heterólogos oriundos de outros micro-organismos eucariotos (89). Sua manipulação genética facilitada, alta taxa de crescimento e capacidade de crescimento em meios de cultura de baixo custo, assim como micro-organismos procariotos, tornam-nas sistemas atraentes sob a perspectiva industrial (54, 64, 82, 90, 91). Outro aspecto positivo no uso desses hospedeiros é sua capacidade de secretar as proteínas recombinantes diretamente para o meio de cultivo, diminuindo a necessidade de rompimento celular (64).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente utilizada como hospedeira devido às suas características de segurança, não patogenicidade (GRAS) e amplo conhecimento genético, fisiológico e de processos de fermentação (64, 92, 93). No entanto, casos de hiperglicosilação de proteínas fazem com que outras espécies fúngicas sejam preferidas, como *Pichia pastoris* (64, 94), que apresenta um sistema de secreção de proteínas recombinantes mais eficiente (95). Contudo, o cultivo de *P. pastoris* enfrenta certas limitações, como a produção elevada de proteases e desafios associados ao estudo sistemático devido a efeitos específicos do produto (96).

#### 1.3.2.2 Bactérias

Bactérias são micro-organismos unicelulares procariotos que podem ser encontrados em quase todos os ambientes da Terra. São usadas como sistemas de

expressão devido à sua facilidade de cultivo e manipulação genética, com otimização de variáveis biomoleculares e possibilidade de alterar estruturalmente a proteína. Também são capazes de produzir grandes quantidades de proteínas recombinantes de forma rápida e econômica (82).

As proteínas recombinantes produzidas em bactérias possuem ampla aplicabilidade em diversos campos, como na fabricação de fármacos, vacinas, enzimas industriais e produtos alimentícios (97). Entretanto, o uso de bactérias como sistema de expressão também apresenta algumas limitações. A formação de corpos de inclusão e a ausência de mecanismos para realizar modificações pós-traducionais complexas são desafios encontrados, o que pode limitar a utilidade de certas proteínas produzidas em sistemas bacterianos de expressão (98). Além disso, é importante considerar que bactérias têm a capacidade de produzir endotoxinas, as quais podem afetar a funcionalidade de determinadas proteínas, bem como comprometer a saúde humana (99).

Ao introduzir o DNA exógeno, ocorre a transformação bacteriana, resultando em um micro-organismo geneticamente modificado capaz de sintetizar proteínas recombinantes. A seleção das bactérias transformadas é realizada com base em sua capacidade de resistência à um antibiótico específico presente no meio de cultura, permitindo o crescimento apenas das bactérias resistentes e a formação de colônias. Posteriormente, essas colônias podem ser isoladas e cultivadas em larga escala para a produção da proteína de interesse (86).

A maioria dos sistemas de expressão bacterianos utiliza *Escherichia coli* como hospedeiro devido à sua rápida taxa de crescimento e fácil manipulação genética (85). Outras espécies, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Lactococcus lactis*, também podem ser utilizadas como sistemas de expressão (94).

### 1.3.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* e é comumente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais (87, 89). É um micro-organismo amplamente utilizado na produção de proteínas recombinantes devido ao seu rápido crescimento, à capacidade de atingir

altas densidades celulares em meios de cultivos mais simples e ao alto rendimento de proteínas (82, 85). Quanto às características genéticas, a *E. coli* possui um genoma bem caracterizado e sistemas de regulação genética que permitem controlar a expressão do gene de interesse e um sistema eficiente de recombinação homóloga para a introdução de genes exógenos ou modificações genéticas (86, 100).

A produção de proteínas recombinantes em bactérias, como a *E. coli*, ocorre principalmente no citoplasma bacteriano. Uma vez sintetizada, a proteína pode permanecer no citoplasma ou ser direcionada para outros compartimentos celulares, como a membrana plasmática ou o periplasma, dependendo da presença de sinais de localização específicos. Esses sinais podem ser sequências peptídicas especiais que direcionam a proteína para um determinado sítio (101).

No citoplasma, a proteína recombinante pode ser dobrada, formando sua estrutura tridimensional funcional. No entanto, quando há produção excessiva dessa proteína, ela pode se agrupar e formar corpos de inclusão, que são aglomerados insolúveis de proteínas na forma inativa (85). Essa formação de agregados representa uma desvantagem significativa para aplicações industriais devido ao fato de se necessitar de etapas de solubilização e renaturação para fazer com que a proteína fique em sua forma ativa (101).

Embora os corpos de inclusão sejam frequentemente considerados indesejáveis na produção de proteínas recombinantes, eles podem apresentar vantagens, como alta expressão de proteínas e facilidade de purificação. Rajendran (2021)(102) e Upadhyay (2014)(103) realizaram estudos sobre solubilização e renaturação de L-asparaginase produzida por *E. coli* BL21 (DE3) recombinante, atingindo atividade de 180 UI/mg e 190 UI/mg após purificação por cromatografia de troca iônica.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral produzir uma proteína recombinante a partir da clonagem do gene da enzima L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* em *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Os objetivos específicos incluem:

- Realizar a clonagem e expressão de L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* em sistema de expressão heterólogo e *E. coli* BL21 (DE);
- Otimizar parâmetros de indução da expressão de L-asparaginase em sistema de expressão heterólogo;
- Avaliar diferentes metodologias para rompimento celular;
- Avaliar a expressão da enzima L-asparaginase heteróloga em meio líquido por *E. coli* BL21 (DE).



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PREPARO DE SOLUÇÕES

- Cultivo

Tabela 1 – Composição do meio Ágar Luria Bertani

<b>Ágar Luria Bertani (LB)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	5 g
Ágar	15 g
Água destilada	qsp 1L

Esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos, e mantido em refrigeração

Tabela 2 – Composição caldo Luria Bertani

<b>Caldo Luria Bertani (LB)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	5 g
Água destilada	qsp 1L

Esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos, e mantido em refrigeração

- Meio definido (Riesenberg, 1991)(104)

Tabela 3 – Composição dos elementos traço do meio definido

<b>Elementos traço</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Citrato de Ferro III	3 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,75 g
$Zn(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$	0,4 g
$H_3BO_3$	0,15 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,125 g
$CoCl_2 \cdot 2H_2O$	0,125 g
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,075 g
EDTA. $Na_2$	0,45 g
Água destilada	500 mL

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22  $\mu m$  e mantido em refrigeração

Tabela 4 – Composição da solução de sais do meio definido

<b>Solução de sais pH 6,8</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
$KH_2PO_4$	13,3 g
$(NH_4)_2HPO_4$	4 g

Ácido cítrico	1,7 g
Solução de elementos traço	10 mL
Água destilada	qsp 800mL

Esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos, e mantido em refrigeração

Tabela 5 – Composição da solução de sulfato de magnésio do meio definido

### Solução de sulfato de magnésio

Reagente	Quantidade
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2 g
Água destilada	20 mL

Esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos, e mantido em refrigeração

Tabela 6 – Composição da solução de canamicina

### Solução de canamicina

Reagente	Quantidade
Canamicina	750 mg
Água destilada	25 mL

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e armazenado a -20 °C

Tabela 7 – Composição da solução de glicose do meio definido

<b>Solução de glicose</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Glicose	5 g
Água destilada	80 mL

Esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos, e mantido em refrigeração

Tabela 8 – Composição da solução de tiamina do meio definido

<b>Solução de tiamina</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Tiamina.HCl	112,5 mg
Água destilada	25 mL

Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e armazenado a -20 °C

Tabela 9 – Formulação final do meio definido

<b>Formulação final do Meio Definido</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Solução de sais	900 mL
Solução de glicose	80 mL
Solução de sulfato de magnésio	20 mL

Mantido em refrigeração

Tabela 10 – Composição do tampão de Lise celular

<b>Tampão de Lise celular (pH 8,6)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Concentração final</b>
Tris-HCl	50 mM
PMSF	1 mM
EDTA	5 mM

Mantido em refrigeração

- Gel de agarose (DE-Souza, 2016)(105)

Tabela 11 – Composição do tampão de amostra para gel de agarose 6X

<b>Tampão de amostra para gel de agarose 6X (p/v)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Azul de bromofenol	0,25%
Sacarose	40%

Mantido em temperatura ambiente

Tabela 12 – Composição do tampão TAE 50x

<b>Tampão TAE 50x</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Tris Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,1 mL



Metanol	120 mL
Ácido acético 20%	qsp 200 mL

A solução foi filtrada antes da adição do ácido acético e mantida em temperatura ambiente

Tabela 15 – Composição da solução descorante para SDS-PAGE

### Solução descorante para SDS-PAGE

Reagente	Quantidade
Metanol	45 mL
Ácido Acético Glacial	10 mL
Água destilada	1L qsp.

Mantida em temperatura ambiente

Tabela 16 – Composição do tampão de corrida 5x para SDS-PAGE

### Tampão de corrida 5x para SDS-PAGE

Reagente	Quantidade	Concentração final
Tris-Base	15,1 g	125 mM
Glicina	72 g	960 mM
SDS	5 g	0,5%
Água destilada	q.s.p. 1000 mL	-

Mantido em refrigeração

- *Western Blot* (107)

Tabela 17 – Composição da solução de bloqueio 5%

<b>Solução de bloqueio 5%</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Leite em pó desnatado	1 g
TBSt 1x	20 mL

Tabela 18 – Composição do tampão TBSt

<b>Tampão TBSt (pH 7,6)</b>		
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração final</b>
Tris-base	2,4 g	20 mM
NaCl	8,8 g	150 mM
Tween-20	1 mL	0,1%
Água destilada	qsp 1 L	

Mantido em refrigeração

Tabela 19 – Composição do tampão Tris/Glicina 5x

<b>Tampão Tris/Glicina 5x (pH 8,3)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Tris-base	15,15 g
Glicina	72 g



Água destilada q.s.p. 1L

---

Mantido em refrigeração

Tabela 20 – Composição da solução de incubação do anticorpo para *Western Blot*

---

**Solução de incubação do anticorpo para *Western Blot***

<b>Reagente</b>	<b>Concentração final</b>
Leite em pó desnatado	5% (p/v)
TBSt	5 mL
Anticorpo monoclonal Anti-HisTag	1 $\mu$ L

Tabela 21 – Composição do tampão de transferência para *Western Blot*

---

**Tampão de transferência para *Western Blot***

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Metanol	20 mL
Tampão Tris/Glicina 5x	20 mL
Água destilada	60 mL

---

Mantido em refrigeração

- Avaliação da atividade de L-asparaginase a partir do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxâmico (AHA) segundo Drainas et al. (1977)(108).

Tabela 22 – Composição da solução de hidroxilamina 2M

**Solução de Hidroxilamina 2M**

Reagente	Quantidade
Hidroxilamina	13,89 g
Água destilada	100 mL
Mantida em refrigeração	

Tabela 23 – Composição da solução de hidroxilamina 1M

**Solução de Hidroxilamina 1M**

Reagente	Concentração
Hidroxilamina	2M
Hidróxido de sódio	2M
Proporção 1:1	

Tabela 24 – Composição da solução de L-asparagina 0,1 M

**Solução de L-asparagina 0,1 M**

Reagente	Quantidade
L-asparagina	0,66 g
Água destilada	50 mL

Tabela 25 – Composição da solução Cloreto Férrico/Ácido Tricloroacético/Ácido Clorídrico

<b>Solução de Cloreto Férrico/Ácido Tricloroacético/Ácido Clorídrico</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Solução A	
Cloreto férrico	10 mg
Água ultrapura	qsp 100 mL
Solução B	
HCl	5,45 mL
TCA	20 mL
Água ultrapura	qsp 100mL
Solução C (de uso) = solução A + solução B	
Mantida em refrigeração	

Tabela 26 – Composição do tampão Tris-HCl 50 mM

<b>Tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,6)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Tris-HCl	3,035 g
Água destilada	500 mL
Mantido em refrigeração	

Tabela 27 – Composição da solução padrão de  $\beta$ -hidroxamato aspártico 5 mM

<b>Solução padrão de <math>\beta</math>-hidroxamato aspártico 5 mM</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
$\beta$ -hidroxamato aspártico (Sigma-Aldrich®)	7,4 mg
Água ultrapura	10 mL

- Reagente de Nessler (Shirfrin, 1974)(109)

Tabela 28 – Composição da solução de L-asparagina 189 mM

<b>Solução de L-asparagina 189 mM</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
L-asparagina	49,9 mg
Água destilada	2 mL

### 3.2 VETOR

O fungo filamentoso isolado do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro *Fusarium proliferatum* foi identificado por Siqueira (2010) e encontra-se depositado na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho (110).

O vetor de expressão pET28a\_proliferatum foi construído utilizando sequência gênica códon usage da enzima L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* (NCBI OQ439985). Tal gene foi identificado pela Dr<sup>a</sup> Paula de Souza e Dr<sup>a</sup> Leila Favaro na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (111). O vetor pET-28a(+) contendo o gene tem o tamanho de 6.607 pb. O inserto possui 1.311 pb, massa molecular de 46,4 kDa, e sua sequência de nucleotídeos, sem íntrons, está descrita abaixo:

```

ATGCCAGCTTTAAACGGCTTCACGGCCGCGCCTTGATTGCTACTGCTCCGGTT
TACTGCTCCGGACCACGTGCTTCGTCGACCATCAAGATGACCCCTTCATCGGCT
TCTTGGATAACTTACCTGTGGCGAATCATCCTGAGTGTGTTGGCCCCTTCAACG
GCGCTGCTCCAGTTTGGTTCGTGGGCGCTTCGGTCTTGGGTCCTCCTGTTCA
CGAGCTGTATCTTCAACCACACTTCTCCGCACTGCAAAGGGCGCCAATACAGAC
AGGCATTCCCTTTGAAATCTCAACTACCCCTGAGTTCAACTGCTTCAGTCCGAAC
CTTCCAAATATCACCATCTATGCGACAGGGGGCACCATTGCTGGATCTGCTAGT
TCGGCTGACCAAACGACGGGATATCAATCAGCTGCGCTGAGTGTCCAATCCCT
CATTGATGCGGTGCCACAGCTTTGCAATGTTGCCAACGTGAGAGGCGTTCAATT
CGCCAACACAGACAGTATAGACATGAGTTCAGACATGTTACAGGCGTTGGTGG
GCAAATCCAGGCCGATCTCGACAATCCATCTACACAGGGCGCTGTTGTGACGC
ACGGAAGTACTGACTCTGGATGAGTCGGCTTTCTTCCTCGATCTCACGATCCAGA
GCGATAAGCCCGTGGTTGTGACGGGTTCTATGCGTCCTGCAACGGCTATAAGC
GCTGATGGACCCATGAATTTGCTGTCTTCAGTGACTTTGGCTGCTAATGAGAAC
GCCAGAGGCAGGGGAGTCATGATTGCCATTAACGACCGCATCGGATCTGCTCG
CTTCACGACAAAGGTGAACGCCAACACCTTGACGCTTTTCAAGCTCCTGATAG
CGGCTTATTGGGAACATTTGTCAATATCCAGCCAGTCTTCTTTTACCCGCCATCA
CGGCCCTGGGCCACCACATTTCAAATTACCGCCCCGACCTCCATCAGCAGC
AGCACTGCCTCAAGTGGACATACTCTACGCTTACCAGGAGCTCAGTGTGGCAT
GTTCAAGGCGGCTGTTGATCTTGGCGCACGAGGCATCGTCCTCGCAGGCCTTG
GTGCTGGATTCTGGACTTCCAAGGGCACTGAGGAGATCCGACGCATAGTCCGG
GAGACCAAGATCCCCGTGATAGTGAGCCGCCGACCAGAAGGCGGTTTTCGTGG
GACCCTGCCAGGCAGGAATCGGAGCTGGTTTCTCAACCCCAAAAAGCGAGG
ATCCAGCTCCAACCTCGCGCTTGAGACCAAGATGGACAACGACGCCATCCGAGC
TCTTTTTGAGCACGCGGGAGTGCACTAA

```

Os vetores pET-28a(+) contendo a sequência de L-asparaginase (figura 3) foram obtidos por meio da empresa Integrated DNA Technologies® e primeiramente clonados em *E. coli* DH10B para aumentar a quantidade de plasmídeo existente e possibilitar posterior transformação da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) para expressão da proteína recombinante.

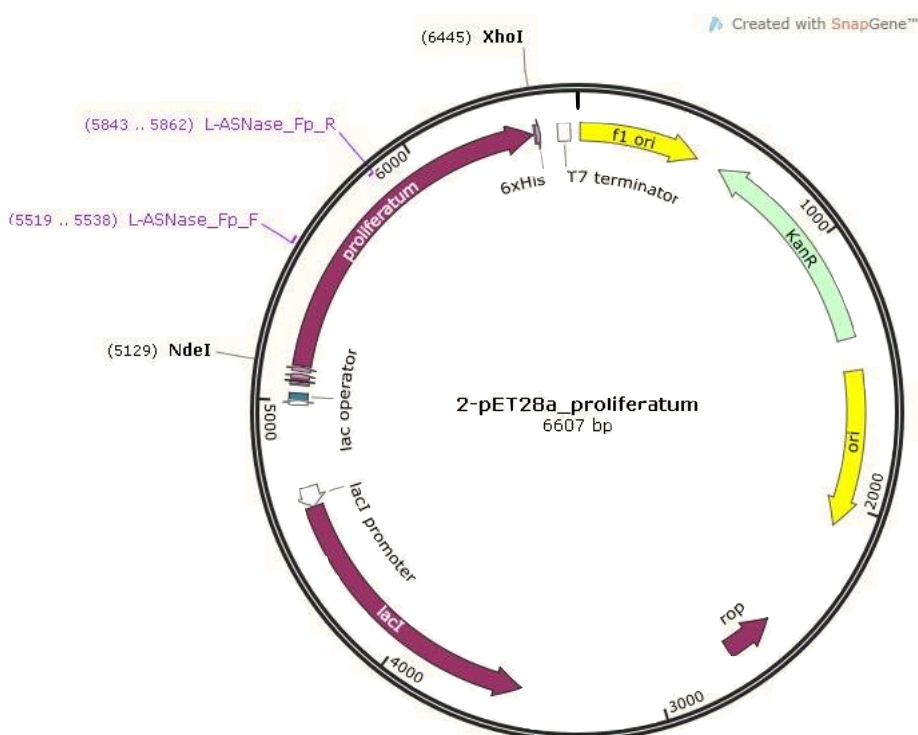


Figura 3 - Vetor pET-28a(+) transformado contendo o gene para clonagem do cDNA da L-asparaginase e sua expressão em *E. coli*

Esse vetor de expressão de genes possui promotor RNA polimerase do bacteriófago T7, indução da expressão com IPTG, gene de resistência à canamicina, permitindo a seleção de bactérias transformadas com o vetor em meio contendo este antibiótico, sítio de restrição NdeI/XhoI, otimização de códons e amplificação com a utilização do conjunto de primers FP/P\_ppic9\_F (AAA AGA ATT CAT GGG CAG CAG CCA TCA T)/FPppic9\_R (AAA AGC GGC CGC TTA GTG TAC ACC TGC GTG TTC G). Na porção N-terminal foi ligada uma cauda de histidina, uma sequência de aminoácidos com 6 histidinas consecutivas, que tem como objetivo facilitar a purificação por cromatografia de afinidade em colunas contendo níquel (112).

### 3.3 PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES (Chang, 2017)(113)

As cepas de *E. coli* BL21 (DE3) utilizadas na pesquisa foram gentilmente cedidas pela professora Dr<sup>a</sup> Eliane Noronha do Laboratório de Enzimologia, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, pesquisadora colaboradora deste projeto de pesquisa.

Uma colônia da linhagem de *E. coli* (DH10B ou BL21(DE3)) foi cultivada em 10 mL de meio LB a 37 °C, durante 16 horas e sob agitação a 200 rpm. Após o crescimento da cultura, 1 mL foi adicionado a 99 mL de meio LB e cultivado nas mesmas condições de agitação e temperatura descritas anteriormente, por 3 a 4 horas, até atingir a OD<sub>600</sub> 0,4.

Posteriormente, a cultura foi separada em dois tubos cônicos de centrifuga de 50 mL, mantida em banho de gelo por 20 minutos e submetida à centrifugação a 4 °C, 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet*, ressuspendido em 20 mL de solução de cloreto de cálcio 0,1 M, foi mantido em banho de gelo por 30 minutos. As mesmas condições de centrifugação mencionadas anteriormente foram repetidas, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspendido em 5 mL de cloreto de cálcio 0,1M + 15% de glicerol. Foram transferidas alíquotas de 200 µL para criotubos, que foram estocados a -80 °C.

#### 3.3.1 Transformação por choque térmico

Uma alíquota (200 µL) das células termocompetentes previamente preparadas foi retirada do freezer -80 °C e mantida em banho de gelo durante 10 minutos.

O DNA plasmidial (cerca de 20 ng) foi adicionado ao tubo, homogeneizado cuidadosamente e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Logo em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 42 °C por 90 segundos e colocados em banho de gelo por 1 a 2 minutos. Foram adicionados 800 µL de meio LB em cada tubo de centrífuga e a solução foi homogeneizada suavemente. Os tubos foram novamente incubados em banho-maria a 37 °C por 45 minutos e centrifugados a 14.000 rpm durante 30 segundos. 800µL do sobrenadante foram descartados, as células precipitadas foram ressuspendidas e plaqueadas em meio ágar LB contendo

canamicina 50 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e colônias foram observadas após 24 horas.

### 3.3.2 Confirmação da transformação e seleção de clones transformados

Colônias crescidas na placa contendo meio ágar foram aleatoriamente selecionadas e inoculadas em 15 mL de meio LB contendo 15 µL de canamicina 50 µg/mL. Para controle negativo foi cultivado um inóculo contendo 15 mL de meio LB, 15 µL de canamicina 50 µg/mL e *E. coli* BL21 (DE3) com pET-28a(+) vazio. Os meios foram incubados sob agitação a 200 rpm, 37 °C *overnight*. Após esse período, o DNA plasmidial foi isolado utilizando o Kit *Pure Link™ – Quick Plasmid Miniprep®* (Invitrogen) e as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%.

Aproximadamente 5 mL do cultivo foram centrifugados a 10.000 x g, 4 °C, por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado e homogeneizado em 250 µL do tampão de ressuspensão. Em seguida, foi adicionado 250 µL do tampão de lise e o tubo foi invertido suavemente até homogeneização da mistura. O tubo foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado 350 µL do tampão de precipitação e a solução foi homogeneizada novamente, sem uso do vórtex, seguida por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos.

O sobrenadante foi coletado e adicionado à uma coluna de centrifugação contida em um tubo de lavagem de 2 mL, que foi centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto. O filtrado foi descartado, e em seguida foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem com etanol na coluna, que foi incubada por 1 minuto em temperatura ambiente. Após a incubação, a coluna foi centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto. Novamente o filtrado foi descartado.

Foi adicionado à coluna 700 µL de tampão de lavagem com etanol, com posterior centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto. O líquido filtrado foi descartado e a coluna foi novamente centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto. Novamente o líquido filtrado foi descartado.

Em seguida, a coluna de centrifugação foi posta dentro de um tubo de eluição de 1,5 mL e adicionou-se 75 µL de solução de tampão TE pré-aquecido. O processo



foi inoculado por 1 minuto em temperatura ambiente, e centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos. Após a centrifugação, o DNA plasmidial purificado ficou contido no líquido presente no tubo de eluição. A coluna foi descartada e o plasmídeo foi armazenado a 4 °C.

Todos os tampões utilizados acima já vieram preparados no Kit *Pure Link™ – Quick Plasmid Miniprep®*.

### 3.3.3 Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose (105)

A eletroforese em gel de agarose é um processo que permite separar fragmentos de DNA ou RNA de diferentes tamanhos com base em sua mobilidade em um campo elétrico aplicado.

Para análise da integridade de DNA plasmidial, foi utilizado gel de agarose na concentração 0,8% (p/v), e para análise das amostras amplificadas por PCR, foi utilizado gel de agarose 1,2% (p/v), ambos preparados com tampão TAE 1X. A solução foi aquecida até completa homogeneização. Após diminuição da temperatura, ainda com o gel no estado líquido, foi adicionado o corante SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) na quantidade recomendada pelo fabricante, de 1 µL do corante para cada 100 mL de gel. A mistura contendo agarose, após homogeneização, foi vertida no molde para esfriar e solidificar. Após gelificação, foi adicionado tampão TAE 1X na cuba de corrida até submergir o gel.

O tampão de amostra na concentração 1X foi adicionado às amostras de DNA plasmidial e ao marcador de peso molecular. Foi utilizado o marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) em gel de agarose 0,8%, e 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) para gel de agarose 1,2%. As amostras foram aplicadas nos poços do gel, no volume de 15 µL, e submetidas à eletroforese como descrito por Sambrook (1989)(85), utilizando uma voltagem de 100 V por um período de 60 minutos. O gel foi exposto a uma câmara com incidência de luz ultravioleta para visualização da migração das proteínas

### 3.3.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (85, 105)

Para confirmar a transformação dos clones foi realizada a técnica chamada PCR, que consiste na amplificação de uma região específica de DNA e posterior avaliação em gel de agarose 1,2%. Durante a análise das amostras de PCR, buscou-se identificar a presença de bandas correspondentes a 345 kDa, tamanho do fragmento do gene de L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* definido para amplificação.

Foram usados os seguintes reagentes (tabela 29):

Tabela 29 – Reagentes utilizados para realizar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

Reagente	Volume
Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L) – <b>GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Polimerase</b> (Promega)	0,25 $\mu$ L
Tampão de reação (5x) – <b>5x Green or Colorless GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer</b> (Promega)	10 $\mu$ L
Solução de dNTPs 20 mM – <b>PCR Nucleotide Mix</b> (Promega)	1 $\mu$ L
<i>Primer forward</i> (10 $\mu$ M)	5 $\mu$ L
<i>Primer reverse</i> (10 $\mu$ M)	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) – <b>MgCl<sub>2</sub> Solution</b> (Promega)	3 $\mu$ L
q.s.p. água destilada autoclavada	q.s.p. 50 $\mu$ L
DNA molde	100 ng

Para controle negativo da reação, foi adicionado 1  $\mu$ L de água

As reações foram incubadas em termociclador (Veriti<sup>®</sup> 96-Well Fast Thermal Cycler, Applied Biosystems), seguindo as especificações abaixo:

1- Desnaturação: 95 °C, 5 minutos

2- Desnaturação: 95 °C, 30 segundos

3- Anelamento: 56 °C, 30 segundos

4- Amplificação: 72 °C, 30 segundos

5- Amplificação: 72 °C, 5 minutos

As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 30 vezes

### 3.4 SELEÇÃO DOS CLONES

#### 3.4.1 Cultivo

Primeiramente foi preparado um pré-inóculo das colônias criopreservadas, sendo 10 µL de cada clone de BL21 (DE3) inoculados em 15 mL de meio LB contendo canamicina 50 µg/mL com incubação *overnight* a 200 rpm e 37 °C. Após aproximadamente 16 horas foi medida a absorbância para calcular o volume do pré-inóculo necessário para realizar um inóculo com densidade óptica inicial próxima a 0,1 em 600 nm.

Assim que definido o volume do pré-inóculo, a quantia foi adicionada a um tubo cônico de 50 mL contendo 20 mL de meio LB suplementado com canamicina 50 µg/mL. O inóculo então foi incubado a 37 °C sob agitação a 200 rpm durante 6 horas para que houvesse crescimento celular. Em seguida, foi adicionado 0,45 mM de IPTG para induzir a expressão da enzima, mantendo a agitação a 200 rpm, 37 °C de temperatura por aproximadamente 16 horas.

O cultivo foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e 7 mL de tampão de lise foram adicionados. A solução foi homogeneizada e submetida, em banho de gelo, à lise celular para extração da proteína. Foi realizado o método de rompimento por ultrassom utilizando sonicador de ponta (Vibra Cell® VC 750 com ponteira de 6 mm) segundo Costa-Silva et al. (2018)(114), onde o cultivo foi sonificado durante 7 minutos, sendo 30 segundos ON e 45 segundos OFF com amplitude de 30%.

Após a sonicação, a suspensão foi centrifugada a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante e o pellet foram armazenados para posterior avaliação enzimática.

### 3.4.2 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi medida por meio do kit *Pierce BCA Protein Assay kit*® (ThermoFisher Scientific). 25 µL de cada amostra foram incubados em microplaca de 96 poços a 37 °C, seguida por agitação por 1 minuto e incubação por 30 minutos, com adição de 200 µL do reagente de trabalho presente no kit. A leitura da absorbância foi realizada no leitor de microplacas *EnSpire™ Multimode Plate Reader* (PerkinElmer) na OD500 nm. Para o cálculo da quantidade de proteínas, expressa em µg/µL, o valor da absorbância obtido foi substituído na equação linear resultante da curva padrão construída com solução padrão de Soro albumina bovino 2 mg/mL, nas concentrações: 0 (branco); 25 µg/mL; 125 µg/mL; 250 µg/mL; 500 µg/mL; 750 µg/mL; 1000 µg/mL; 1500 µg/mL; 2000 µg/mL.

### 3.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE é uma técnica amplamente utilizada para separar proteínas com base em seu tamanho molecular. O SDS é um detergente responsável por desnaturalizar as proteínas e atribuir uma carga negativa. Tal fato permite que haja segregação dos fragmentos com base no seu tamanho molecular através de um gel de poliacrilamida ao serem submetidos a um campo elétrico.

Primeiramente, as proteínas foram precipitadas segundo Migliolo et. al. (2014)(116), onde para cada 1.000 µL de amostra foram utilizados 133 µL de TCA 75%. Foram precipitados 40 µg de proteínas de cada amostra e mantidos em refrigeração por 1 hora ou overnight. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, 4 °C por 10 minutos para descarte do TCA, seguido por 3 lavagens com 1 mL de acetona gelada, realizando a centrifugação nas mesmas condições. Os tubos ficaram abertos até total evaporação da acetona remanescente. Após as lavagens, foram adicionados 20 µL de uma mistura contendo tampão de amostra e β-mercaptoetanol 1:1. Os tubos foram mantidos em banho seco a 100 °C durante 5 minutos e, em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer para uso posterior.

O gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi preparado segundo Laemmli (1970)(106). A composição do gel separador 4% está descrita na tabela 30. Ele foi

adicionado ao molde do gel até preencher aproximadamente 3/4 da altura total. Em seguida, uma pequena camada de butanol foi adicionada até cobrir totalmente a superfície desse gel, a fim de nivelá-lo e eliminar eventuais bolhas. Após se certificar da solidificação do gel separador, o butanol foi retirado da superfície com o auxílio de papel filtro.

Tabela 30 – Reagentes utilizados para preparo do gel separador 4%

<b>Gel separador 4%</b>	
<b>Soluções</b>	<b>Concentração 4%</b>
Água ultra purificada	3,65 mL
Tampão tris HCl 1,0 mol/L pH 6,8	1,25 mL
Acrilamida: Bis-acrilamida (29,2:0,8)	1 mL
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %	50 µL
TEMED	6 µL
APS 10 %	30 µL

Em seguida foi preparado o gel concentrador 12%, conforme tabela 31, e vertido acima do gel separador, cobrindo os outros 1/4 restantes. Antes de haver a solidificação, foi inserido o pente para formação dos poços onde as amostras seriam adicionadas.

Tabela 31 – Reagentes utilizados para preparo do gel concentrador 12%

<b>Gel concentrador 12%</b>	
<b>Soluções</b>	<b>Concentração 12%</b>
Água ultra purificada	3,34 mL
Tampão tris HCl 1,5 mol/L pH 8,8	2,5 mL

Tabela 31 – Reagentes utilizados para preparo do gel concentrador 12%

<b>Gel concentrador 12%</b>	
Acrilamida: Bis-acrilamida (29,2: 0,8)	4 mL
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %	1 µL
TEMED	10 µL
APS 10 %	50 µL

O aparato contendo o gel foi inserido na cuba de eletroforese, onde também houve adição de tampão de corrida 1X até preenchimento do reservatório. Após total solidificação do gel, o pente foi retirado e foram aplicados nos poços 10 µL do padrão de baixo peso molecular e 20 µL das amostras.

Para que ocorresse a migração das proteínas a partir do campo elétrico, foi aplicada uma corrente de 150 V e 50 mA até que a amostra percorresse o gel concentrador. Ao alcançar o gel separador, a voltagem e amperagem aumentaram para 250 V e 80 mA, respectivamente.

Após total migração das proteínas, o aparato contendo o gel foi desmontado e o gel foi corado com Coomassie blue ou nitrato de prata, seguindo o protocolo e as especificações do fabricante. No caso da coloração com Coomassie blue, o gel ficou incubado na solução de coloração por 24 horas e depois o excesso de corante foi retirado por submersão em solução descorante até que fosse obtida uma clara visualização das bandas das proteínas.

Para determinação do peso molecular na presença de SDS foi utilizado o padrão de baixo peso molecular *Low Molecular Weight Calibration Kit® for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare®), formado por uma mistura liofilizada de seis proteínas altamente purificadas e de massa molecular conhecida. A partir da comparação do tamanho das bandas do padrão com as observadas na amostra, é possível estimar a massa molecular da proteína de interesse.

Cada mistura liofilizada possui as seguintes proteínas:

Tabela 32 – Proteínas presentes no marcador molecular *Low Molecular Weight Calibration Kit® for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare®)

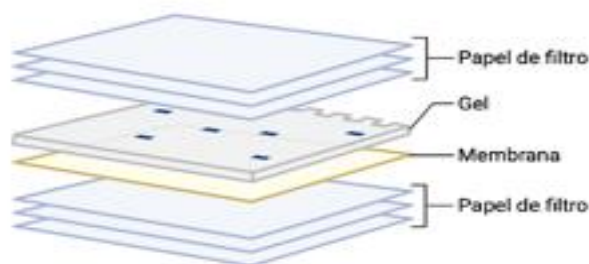
<b>Proteínas</b>	<b>Peso molecular</b>
Fosforilase b	97 kDa
Albumina	66 kDa
Ovalbumina	45 kDa
Anidrase carbônica	30 kDa
Inibidor de tripsina	20,1 kDa
$\alpha$ -Lactoalbumina	14,4 kDa

#### 3.4.4 **Western Blot** (107)

Foi preparado um gel de SDS-PAGE contendo o marcador de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder®* (Thermo Scientific). Uma membrana PVDF (Thermo Scientific) de 0,45  $\mu$ m foi cuidadosamente cortada nas dimensões do gel e imersa lentamente em metanol, seguida por lavagem em água destilada. Quatro pedaços de papel de filtro (dois grossos e dois finos) foram cortados nas mesmas dimensões do gel e embebidos em tampão de transferência. Utilizando um equipamento de transblot, foi montada uma sequência de camadas contendo os papéis de filtro, a membrana e o gel, seguindo a ordem representada pela figura 4.

Em cada etapa da montagem das camadas, as eventuais bolhas formadas foram removidas com o auxílio de uma espátula. O processo de *transblotting* ocorreu por 1 hora e 30 minutos a 14 V. Após o fim, a membrana foi retirada do aparelho e incubada *overnight* em solução de bloqueio a 4 °C com agitação constante entre 15-25 rpm. Em seguida, a membrana foi incubada em solução de incubação contendo Anticorpo monoclonal Anti-HisTag (Invitrogen®) na diluição de 1:5000 (1  $\mu$ L para cada 5 mL de solução de incubação). A incubação ocorreu durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Após a incubação com o anticorpo, a membrana foi

lavada três vezes, cada uma por 10 minutos, com solução de TBS contendo 0,1% de Tween-20. Por fim, a revelação da membrana foi realizada por meio de quimioluminescência.



Created in BioRender.com bio

Figura 4 – Sequência das camadas de papel de filtro, gel e membrana realizada para transblotting (adaptado de Tortora 2010)

### 3.5 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Para determinar o tempo ideal de crescimento bacteriano, foram preparados inóculos conforme o item 3.4.1 nos meios LB, meio definido e meio complexo (Barros, 2020)(115). O cultivo foi incubado sob agitação a 200 rpm e 37°C nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas.

Foi realizada a leitura da absorbância na OD<sub>600</sub> para avaliar a turbidez em cada intervalo de tempo, e os valores obtidos foram utilizados para construir um gráfico em escala logarítmica. Isso permitiu visualizar as fases de crescimento bacteriano lag (adaptação), log (exponencial) e estacionária nos 3 meios diferentes.

Dessa forma, foi possível determinar o tempo em que as células bacterianas atingiram a taxa máxima de crescimento, fornecendo informações importantes sobre o desenvolvimento da cultura bacteriana, e como os reagentes de cada meio podem influenciar nesse crescimento.

### 3.6 AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE ROMPIMENTO CELULAR



Após o cultivo, cada amostra foi avaliada quanto ao melhor método de rompimento celular por sonicação. Os tubos cônicos de centrifuga de 50 mL foram centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante, contendo o meio de cultivo, foi descartado e adicionou-se 7 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM + PMSF 1mM + EDTA 5mM, pH 8,6) para ressuspensão do precipitado. A solução foi vortexada até completa homogeneização.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à diferentes protocolos de lise celular por meio de sonicação (tabela 33), em banho de gelo, utilizando o aparelho sonicador Vibra Cell™ VC 750® com ponteira de 6 mm.

Tabela 33 - Metodologias de lise celular por sonicação avaliadas no estudo

<b>Método</b>	<b>Núm. de ciclos</b>	<b>Tempo (min) por ciclo</b>	<b>Pulso</b>	<b>Amplitude</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Referência</b>
1	1	7	30 s ON 45 s OFF	30%	30 °C	Costa-Silva et al. (2018)(111)
2	1	10	1 min ON 1 min OFF			Adaptado de Upadhyay et al. (2014)(100)
3	1	20	1 min ON 1 min OFF			Adaptado de Upadhyay et al. (2014)(100)
4	10	1 (com 1 min de espera entre cada ciclo)	1 seg ON 1 seg OFF			Adaptado de Singhvi et al. (2021)(113)

Tabela 33 - Metodologias de lise celular por sonicação avaliadas no estudo

Método	Núm. de ciclos	Tempo (min) por ciclo	Pulso	Amplitude	Temperatura	Referência
5	1	15	1 seg ON 1 seg OFF			Protocolo criado e utilizado pelo laboratório de enzimiologia

A amostra sonicada foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos e 4 °C, a frações solúvel (sobrenadante) e a fração insolúvel (pellet), após ressuspensa em 7 mL do tampão de lise celular, foram armazenadas a -80 °C.

### 3.7 SCREENING DA INDUÇÃO DE ASNase RECOMBINANTE

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.4.1, porém foi utilizado somente 10 mL de meio LB, com incubação em agitador a 200 rpm, 37 °C por 2 horas e 30 minutos. Após esse período, houve variação da concentração do indutor IPTG, temperatura e tempo de incubação pós indução, conforme descrito na tabela 34.

Tabela 34 – Variáveis avaliadas para otimização da indução de L-asparaginase

OD fase Log (h)	IPTG (mM)	Tempo (h) pós indução	Temperatura pós indução (°C)
0,9	0,1 0,5 1	T0: 0	20 37
		T1: 2	
		T2: 4	
		T3: 8	
		T4: 12	
		T5: 20	
		T6: 24	

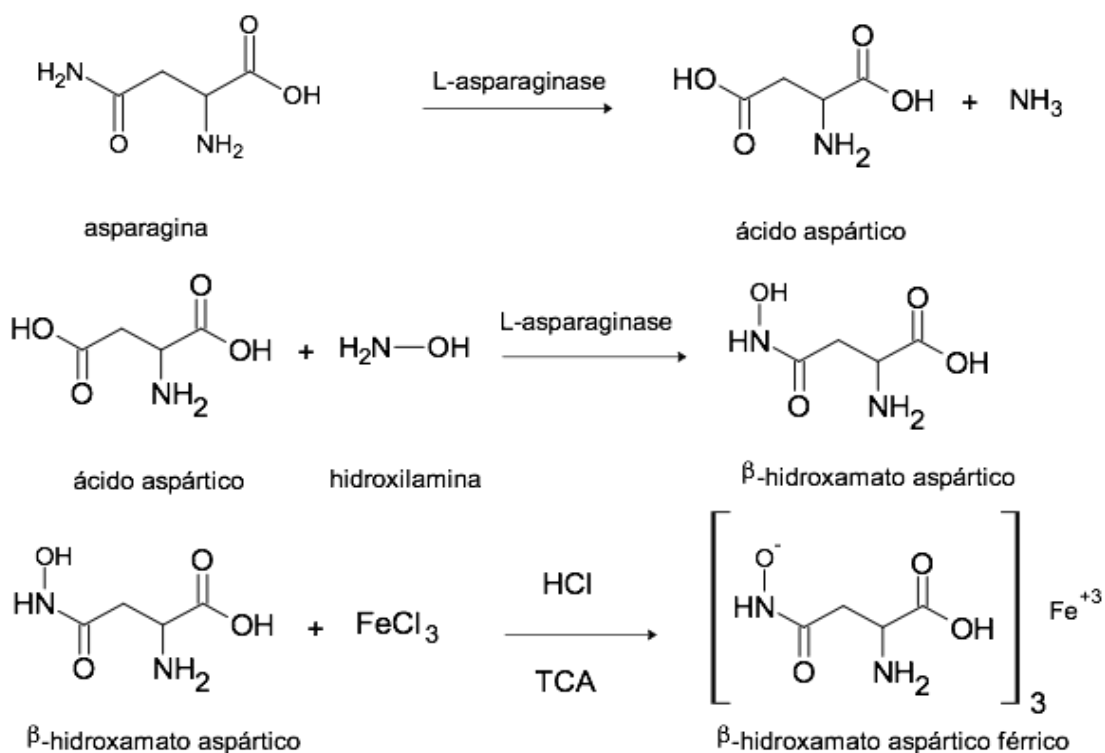
Ao final de cada tempo de indução, as amostras foram centrifugadas para remoção do meio de cultivo e, em seguida, foi adicionado 7 mL de tampão de lise celular. Prosseguiu-se com rompimento celular por sonicação, sendo aplicado o

método definido após o *screening* do rompimento celular. A amostra final foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e armazenado como fração solúvel, e o pellet, ressuspendido com tampão de lise, foi armazenado como fração insolúvel.

### 3.8 ENSAIO ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE A PARTIR DO ÁCIDO L-ASPARTIL-β-HIDROXÂMICO (AHA)

A atividade de L-asparaginase foi avaliada pela quantificação do β-hidroxamato aspártico produzido pela reação de hidroxilaminólise efetuada também pela enzima L-asparaginase na presença de hidroxilamina, adaptado de Drainas et al. (1977)(108), conforme demonstrado na figura 5.

Figura 5 - Reação de hidroxilaminólise efetuada pela enzima L-asparaginase na presença de hidroxilamina (Drainas 1977)



Em tubos cônicos de centrifuga de 5 mL foram adicionados 200 µL de amostra, 1,4 mL de tampão Tris HCl pH 8,6 (50 mM), 200 µL de solução de L-asparagina (100 mM) e 200 µL de solução de hidroxilamina pH 7 (1 M). Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos em banho-maria, e depois adicionou-se 0,5 mL da solução de FeCl<sub>3</sub>/TCA/HCl para interromper a reação. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (UV-1800 SHIMADZU) no comprimento de onda de 500 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Os brancos das amostras foram preparados com a finalidade de subtrair a absorbância obtida a partir da coloração do cloreto férrico. A única diferença em relação às etapas descritas anteriormente foi que, no caso dos brancos, a amostra foi adicionada somente após o período de incubação.

A reação entre o hidroxamato aspártico e o cloreto férrico produz uma coloração avermelhada, que absorve em comprimento de onda de 500 nm. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de β-hidroxamato aspártico por minuto. A atividade enzimática foi determinada segundo a equação abaixo (Drainas et al., 1977):

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

A curva padrão foi construída com solução padrão de β-hidroxamato aspártico (Sigma-Aldrich) 5 mM nas concentrações: 0 (branco); 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 e 3 µmol.

### 3.9 ENSAIO ENZIMÁTICO UTILIZANDO REAGENTE DE NESSLER

O ensaio de Nessler (Imada, 1973)(118) é um método colorimétrico utilizado para quantificar a amônia presente em uma solução. Pode ser usado para medir a atividade de L-asparaginase devido à capacidade da enzima de catalisar a conversão de L-asparagina em aspartato, que libera amônia como subproduto. Segundo adaptação de Shirfrin et al. (1974)(119), em tubos cônicos de centrifuga de 5 mL foram adicionados 1 mL de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,6; 0,1 mL de asparagina 189 mM; 0,9 mL de água ultrapura. As soluções foram incubadas em banho maria a 37 °C por

5 minutos. Foram adicionados 0,5 mL de amostra das frações solúvel e insolúvel, os tubos foram homogeneizados e incubados por mais 30 minutos. Para obtenção do branco, a amostra foi adicionada somente após o período de incubação.

Aos tubos foram adicionados 0,1 mL de TCA 1,5 M para parar a reação, as soluções foram homogeneizadas e centrifugadas por 2 minutos a 10.000 x g e 4 °C. 0,2 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifuga contendo 4,3 mL de água ultrapura e 0,5 mL do reagente de Nessler (Merck). A solução foi homogeneizada e a sua absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-1800 SHIMADZU) com comprimento de onda de 436 nm após 1 minuto.

Para se obter o valor de UI por mL de amostra, considerando que a atividade equivale à quantidade de  $\mu\text{mols}$  de amônia produzidos por minuto a 37°C, foi utilizada a equação abaixo:

$$\text{Atividade de } L - \text{asparaginase} \left( \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\mu\text{mol de amônia da amostra} \times V_{t1}}{V_s \times t_1 \times V_a}$$

$V_{t1}$ : volume total da etapa 1 (mL).

$V_s$ : volume do sobrenadante da etapa 1 que foi utilizado na etapa 2 (mL).

$t_1$ : tempo de reação da etapa 1 (min).

$V_a$ : volume da amostra adicionada na etapa 1 (mL).

A quantidade de  $\mu\text{mols}$  de amônia foi medida utilizando uma equação linear derivada da curva padrão. Essa curva foi construída relacionando o valor da absorbância com a concentração de amônia, em  $\mu\text{mol}$ , na etapa 2 do experimento.

Preparo do padrão:

Em tubos cônicos de centrifuga de 5 mL foram adicionados 1 mL de tampão Tris-HCl, sulfato de amônio nos volumes 0,1; 0,15; 0,25 e 0,5 mL e água ultrapura qsp 2,1 mL. No tubo de controle (branco) do padrão, não foi adicionado sulfato de amônio. Os tubos foram incubados em banho-maria por 35 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de TCA 1,5 M, as soluções foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 x g por 2 minutos, a 4 °C. 0,2 mL dos sobrenadantes foram transferido para tubos cônicos de centrifuga de 5 mL contendo 4,3 mL de água ultrapura e 0,5 mL do reagente de Nessler (Merck). As soluções foram homogeneizadas e suas

absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (UV-1800 SHIMADZU) em comprimento de onda de 436 nm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* DH10B E BL21 (DE3) E CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO

As células das linhagens de *E. coli* (DH10B e BL21 (DE3)) foram tornadas termocompetentes, e o vetor pET-28a(+), contendo a sequência de L-asparaginase sintetizado pela empresa *Integrated DNA Technologies®*, foi clonado inicialmente em *E. coli* DH10B para aumentar a quantidade de plasmídeo disponível e permitir posterior transformação da linhagem *E. coli* BL21 (DE3). O DNA plasmidial foi adicionado às células termocompetentes da linhagem e o choque térmico foi realizado, fazendo com que a membrana celular se tornasse mais fluida devido à formação de poros, permitindo a entrada do DNA com mais facilidade. A solução contendo as células transformadas foi plaqueada em meio ágar LB contendo canamicina 50 µg/mL e incubada em estufa a 37 °C. Após 24 horas foi observado crescimento de colônias.

As colônias obtidas foram denominadas clones, e apenas um clone da linhagem DH10B foi selecionado para confirmação da transformação. A partir dele foi realizado um cultivo em meio LB contendo canamicina 50 µg/mL para extrair o DNA plasmidial por miniprep utilizando o kit *Pure Link Quick Plasmid Miniprep®* (Invitrogen). O DNA extraído foi analisado em gel de agarose com concentração de 0,8% (figura 6), onde houve confirmação do inserto do vetor no DNA bacteriano por apresentar banda com tamanho de aproximadamente 4.622 pb, equivalente a 70% do peso molecular do pET-28a(+) sintetizado (6.607 pb, descrito no item 3.2). Para confirmar novamente a presença do inserto no DNA plasmidial extraído, foi realizado um ensaio de PCR, com restrição e amplificação de fragmento do gene da L-asparaginase contido no vetor, cujos resultados foram analisados em gel de agarose com concentração de 1,2%. A observação de banda de proteína com tamanho aproximadamente de 345 pb (descrito no item 3.3.4) também levou à confirmação do inserto (figura 6).

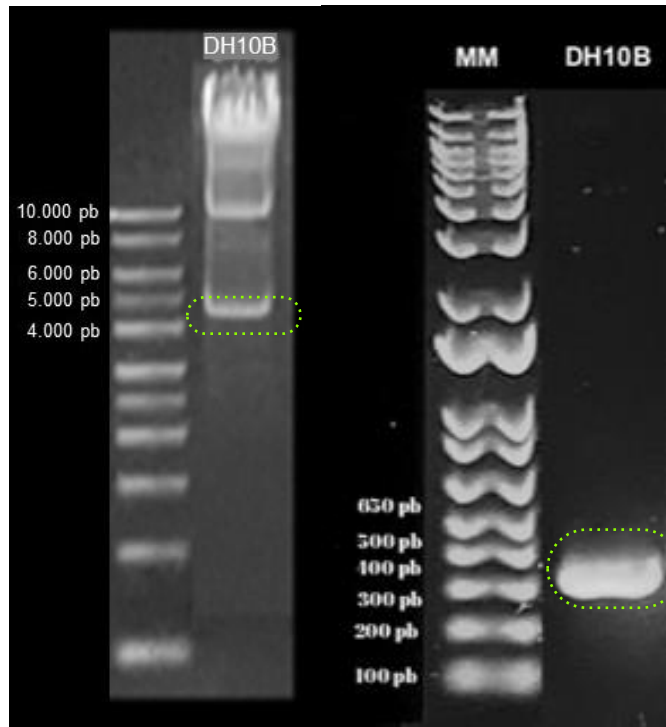


Figura 6 – Gel de agarose 0,8% de amostra plasmidial do clone DH10B (à esquerda) e gel de agarose 1,2% contendo produto de PCR do clone de DH10B (à direita)

O DNA plasmidial obtido da cepa de *E. coli* DH10B foi utilizado para transformar a *E. coli* BL21 (DE3), seguindo as mesmas etapas descritas anteriormente para transformação da DH10B, incluindo o choque térmico, plaqueamento da suspensão contendo as células em meio ágar LB contendo canamicina 50 µg/mL e seleção dos clones.

A transformação para expressão da proteína foi realizada na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) devido ao fato dela possuir o sistema de expressão T7 RNA polimerase, com alto nível de expressão, não produzir as proteases lon e ompT e ser capaz de gerar cultura bacteriana de grande densidade.

Após incubação das placas a 37 °C por 18 horas, foram selecionados aleatoriamente 10 clones de *E. coli* BL21 (DE3) transformada para avaliar a expressão da L-asparaginase. Com o objetivo de verificar se o vetor com o inserto estava presente nas células transformadas, foi realizado o método de extração de DNA plasmidial conhecido como miniprep, utilizando o kit *Pure Link Quick Plasmid Miniprep*® (Invitrogen). O DNA extraído dos 10 clones foi analisado em gel de agarose

0,8% e apresentou bandas próximas a 70% do peso molecular do pET-28a(+), de 6.607 pb (figura 7A), o que equivale a aproximadamente 4.622 pb. Após realização de PCR com análise em gel de agarose 1,2%, foi observada a presença de bandas de tamanho próximo a 345 pb (figura 7B). Tais valores são referentes ao tamanho do gene de L-asparaginase e do fragmento do gene utilizado para amplificação, citados, respectivamente, nos itens 3.2 e 3.3.4, confirmando assim a transformação. A linhagem DH10B transformada foi utilizada como controle positivo (figura 7A) e a BL21 (DE3) sem plasmídeo foi utilizada como controle negativo (figura 7B).

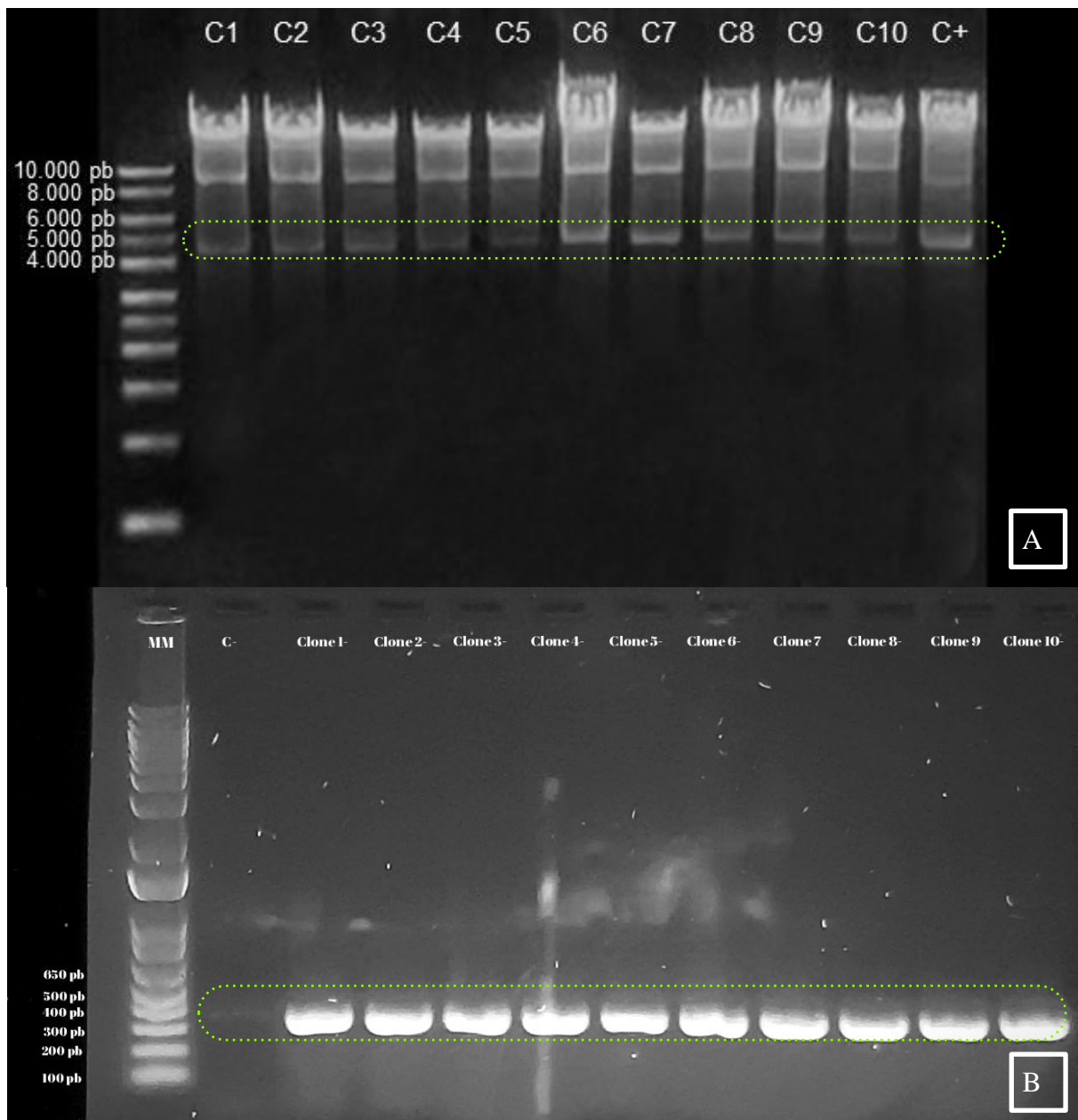


Figura 7 – Gel de agarose 0,8% de amostra plasmidial dos 10 clones de *E. coli* BL21 (DE3) e controle positivo DH10B transformada com gene de L-asparaginase de *F. proliferatum* (A) Gel de agarose 1,2%



contendo produto de PCR dos 10 clones de *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) sem plasmídeo como controle negativo (B)

#### 4.2 TRIAGEM DOS CLONES PARA EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE

Como os 10 clones de BL21 (DE3) foram transformados, então todos prosseguiram para a etapa de triagem, onde foram submetidos a um cultivo em 15 mL de meio LB suplementado com canamicina 50 µg/mL. O inóculo foi incubado em agitador a 200 rpm e 37 °C por 6 horas. Após este período, o indutor IPTG foi adicionado na concentração de 0,45 mM para indução da produção de L-asparaginase, e o cultivo foi mantido incubado, nas mesmas condições de agitação e temperatura, durante a noite.

Ao término do cultivo, os 10 clones foram submetidos ao rompimento celular conforme Costa-Silva (2018)(114) e as proteínas foram quantificadas. Analisando os valores obtidos, verificou-se que, nessa temperatura, a fração insolúvel apresentou uma absorbância significativamente maior em comparação com a fração solúvel, o que sugeriu que havia maior quantidade de proteínas naquela fração. No entanto, devido ao fato de ser uma fração onde a proteína se encontra na forma insolúvel, a amostra utilizada no ensaio se trata de uma suspensão. A presença de partículas pode causar dispersão, reflexão ou absorção da luz emitida pelo espectrofotômetro, gerando uma leitura imprecisa da absorbância. Isso ocorre devido à interação das partículas com o feixe de luz, o que altera sua trajetória e intensidade. Apesar disso, comparando-se a coloração resultante da reação das frações solúvel e insolúvel com o reagente do kit de quantificação de proteínas, ainda foi considerado que houve mais presença de proteínas na fração insolúvel quando comparada à solúvel. Tal resultado corrobora a ideia de que a proteína foi produzida na forma insolúvel, provavelmente em corpos de inclusão.

Após a precipitação das proteínas, as frações solúvel e insolúvel das 10 amostras foram submetidas à análise por SDS-PAGE (figura 8).

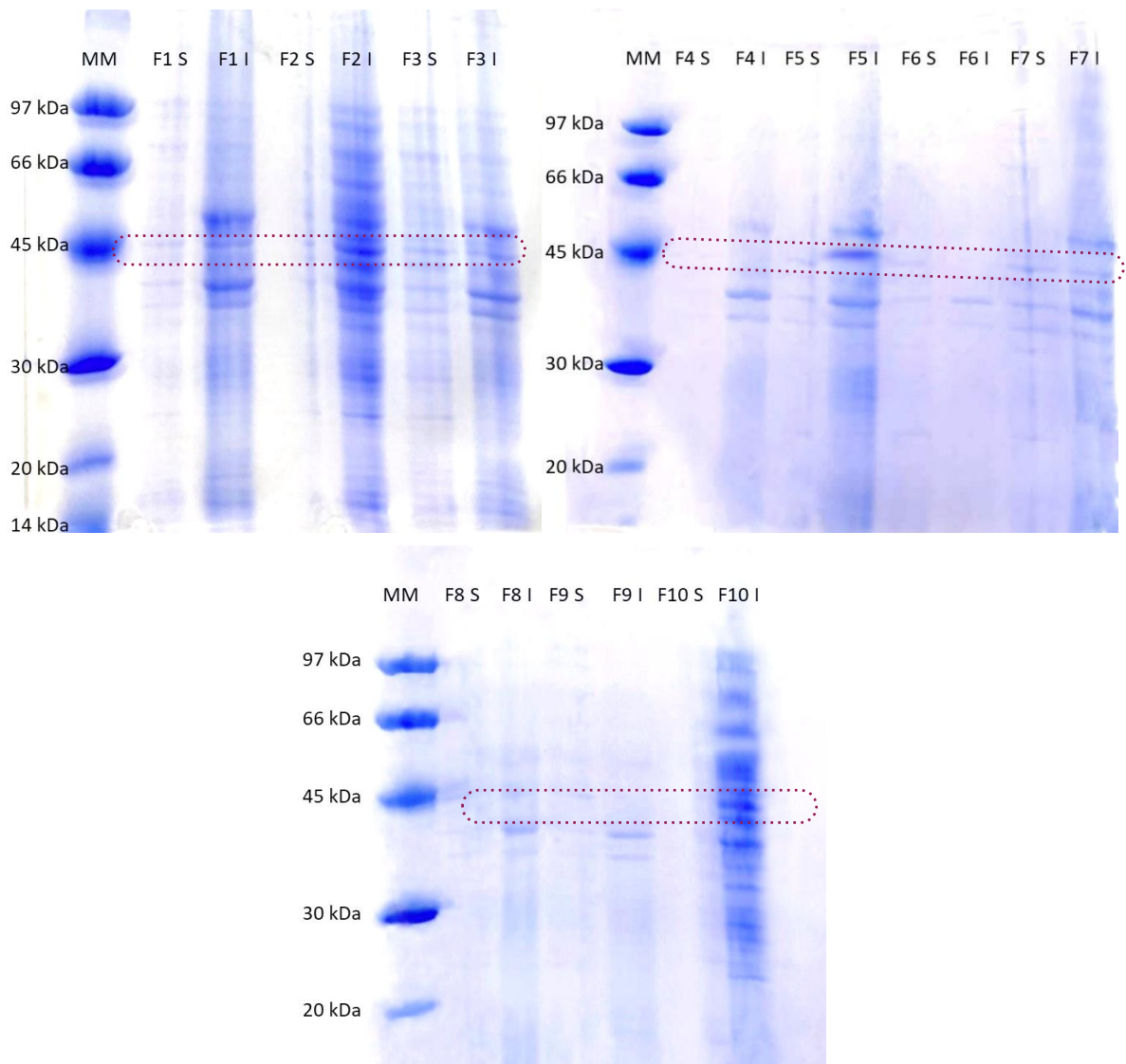


Figura 8 – Géis de SDS-PAGE 12% dos 10 clones de *E. coli* BL21 (DE3) transformada, nas frações solúvel e insolúvel. (A) clones 1 ao 3, (B) clones 4 ao 7, (C) clones 8 ao 10

Por terem apresentado uma banda mais forte com peso molecular de aproximadamente 46,4 kDa, tamanho da enzima L-asparaginase de *F. proliferatum*, os clones 2, 5 e 10 foram selecionados para confirmação da expressão de L-asparaginase a partir de ligação com anticorpo por meio do método *Western Blot*. Nos 3 clones foi observado que de fato as bandas vistas por SDS-PAGE na fração insolúvel correspondiam à enzima, e, como o clone 10 apresentou a banda mais intensa, ele foi selecionado para o desenvolvimento das demais metodologias (figura 9). Na figura do *Western blot* é possível observar a presença de outras bandas com peso molecular inferior ao da proteína de interesse. Essa ocorrência pode ser

atribuída ao fato de que, ao submeter as amostras analisadas ao SDS, a L-asparaginase tenha se fragmentado. Como alguns desses fragmentos continham cauda de histidina, foram então identificados na membrana por conta da ligação com o Anticorpo Anti-HisTag.

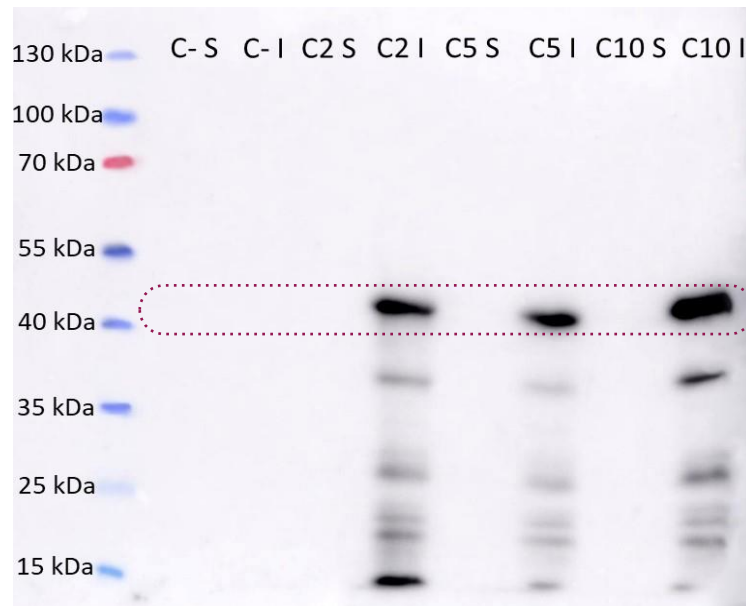


Figura 9 – *Western Blot* contendo, respectivamente, C-: controle negativo (BL21 (DE3) sem plasmídeo) solúvel (S) e insolúvel (I); C2: clone 2, frações solúvel (S) e insolúvel (I); C5: clone 5, frações solúvel (S) e insolúvel (I); C10: clone 10, frações solúvel (S) e insolúvel (I).

### 4.3 CURVA DE CRESCIMENTO

Foram coletadas amostras nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas de cultivo a fim de se obter uma curva de crescimento, indicada no gráfico 1.

A partir da curva de crescimento, foi observado que a fase estacionária foi alcançada após aproximadamente 3 horas de cultivo no meio LB (gráfico 2), 3 horas e 30 minutos no meio definido (gráfico 3) e 3 horas no meio complexo (gráfico 4).

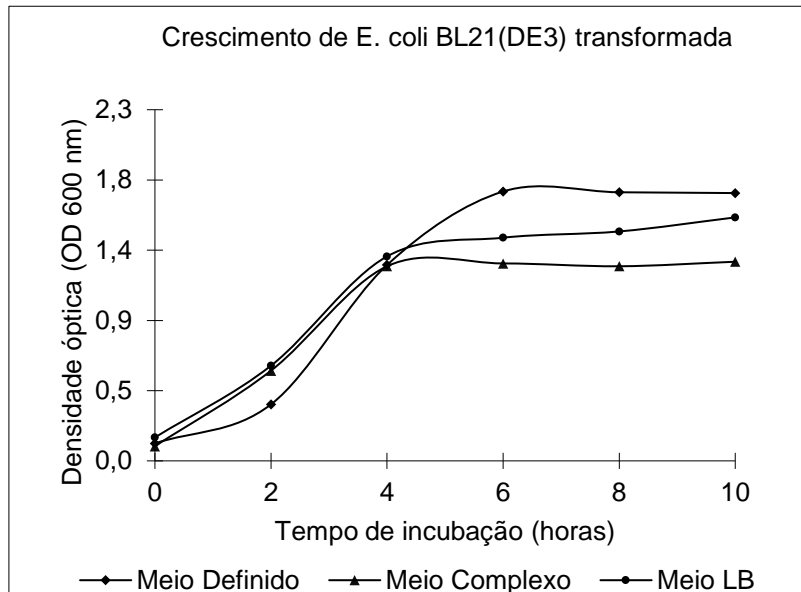


Gráfico 1 – Curva de crescimento do clone de *E. coli* BL21 (DE3) transformada nos meios LB, definido e complexo

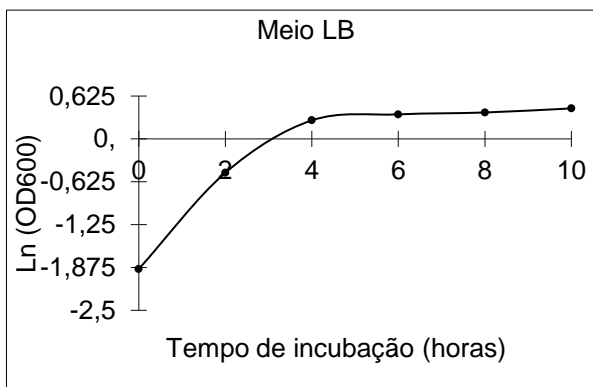


Gráfico 2 – Curva logarítmica do crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) transformada em meio LB

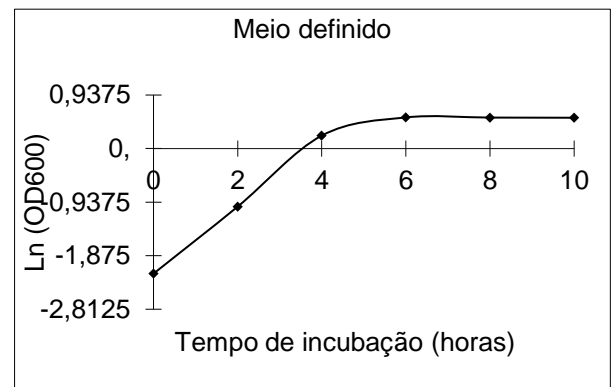


Gráfico 3 - Curva logarítmica do crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) transformada em meio definido

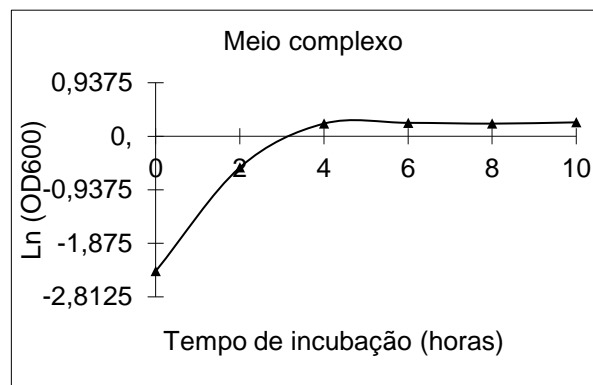


Gráfico 4 – Curva logarítmica do crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) transformada em meio complexo

De acordo com a literatura, o melhor tempo para iniciar a indução de uma proteína é na metade da fase logarítmica de crescimento bacteriano, também conhecida como mid-log. Nessa etapa, as células estão em um estado de crescimento ativo e a expressão gênica é alta, o que permite a produção de uma quantidade maior de proteínas recombinantes (85). A fase mid-log deste experimento se deu em menos de 2 horas de cultivo no meio LB e no meio complexo, e aproximadamente 2 horas de cultivo no meio definido, com a OD<sub>600</sub> de, respectivamente, 0,44, 0,34 e 0,37. Como não houve diferença significativa entre os 3 meios, optou-se então por utilizar o meio LB na sequência do estudo devido ao baixo custo e facilidade de preparo. Esses valores de absorvância foram considerados baixos, tendo em vista que estudos realizados por Studier et al. (1990)(88) e Sambrook (2001)(85) indicam que a indução com IPTG deve ser feita quando a cultura alcançar OD<sub>600</sub> entre 0,6 e 1. Decidiu-se então utilizar o valor de aproximadamente 3/4 da fase log de crescimento, com uma OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0,9, alcançada após cerca de 2h30 de cultivo.

Um estudo conduzido por Galloway et al. (2003)(120) comparou a solubilidade da proteína recombinante ACF64 expressa em *E. coli* em diferentes condições de indução. O autor observou que a expressão da proteína foi maior quando o crescimento da cultura bacteriana foi realizado a 37 °C e a indução ocorreu na fase pós-logarítmica, em comparação com a indução na fase mid log. Tal acontecimento, segundo o autor, pode ter sido atribuído à alta densidade celular e à síntese de metabólitos específicos que ocorrem nessa etapa do crescimento microbiano.

#### 4.4 MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR POR SONICAÇÃO

Foram preparados cinco cultivos do clone 10 de *E. coli* BL21 (DE3) transformada para que pudessem ser avaliadas as cinco metodologias distintas de rompimento celular por meio de sonicação. Esses cultivos foram incubados por 2 horas e 30 minutos, induzidos com IPTG a uma concentração de 0,5 mM, com tempo pós indução de 18 horas, a 37°C e sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, tais cultivos foram submetidos aos métodos de lise celular mencionados no item 3.6, e todo o processo foi realizado em banho de gelo a fim de preservar a estrutura tridimensional da proteína. A sonicação intensa aumenta a temperatura da amostra, trazendo risco de desnaturação e degradação da proteína recombinante (85).

As proteínas presentes na amostra foram quantificadas e submetidas à análise por SDS-PAGE com o objetivo de avaliar as bandas correspondentes às proteínas extraídas (figura 10). De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o método 4 apresentou maior banda próxima ao peso molecular da L-asparaginase, a partir de 10 ciclos de sonicação, sendo cada ciclo com duração de 1 minuto, alternando entre 1 segundo de pulso ON e 1 segundo de pulso OFF, com intervalo de 1 minuto entre cada ciclo. Essa metodologia de sonicação foi utilizada nas seguintes etapas da pesquisa.

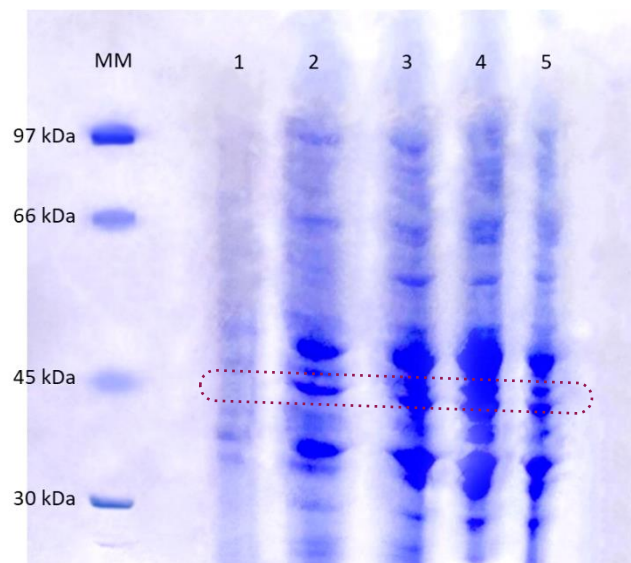


Figura 10 - SDS-PAGE dos 5 métodos de rompimento celular por sonificador de ponteira, utilizando amostra da fração insolúvel

Avaliar diferentes parâmetros de sonicação é fundamental na produção de proteínas recombinantes por expressão heteróloga. Ao romper a parede celular, as proteínas sintetizadas no citosol ou periplasma são liberadas para o meio. No entanto, uma desvantagem desse método é a baixa seletividade pela enzima de interesse, pois, ao lisar a célula, todas as proteínas, assim como proteases, são liberadas para o meio (114, 121).

A eficácia da sonicação depende de fatores como intensidade, tempo de sonicação e número de ciclos aos quais o micro-organismo é submetido. Um método que seja excessivo ou prolongado pode danificar a proteína, como causar desdobramento ou degradação, levando à diminuição de atividade enzimática (114, 121).

#### 4.5 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DE INDUÇÃO

É de extrema importância desenvolver uma metodologia com condições ótimas de biossíntese da proteína recombinante (122). Esse também é um fator relevante ao se trabalhar com proteínas produzidas a partir de expressão heteróloga utilizando *E. coli* como hospedeiro. Tal micro-organismo é conhecido por formar corpos de inclusão, que são agregados insolúveis de proteínas recombinantes mal dobradas. Embora a presença desses agregados auxilie na purificação, são necessárias etapas adicionais de solubilização e renaturação da proteína, tornando-a ativa e corretamente dobrada (97). Para minimizar a formação desses corpos de inclusão, promover a produção de proteínas solúveis e buscar níveis altos de expressão, podem ser realizados, por exemplo, o uso sistemas de expressão por indução (123, 124), diminuição da concentração do indutor (125), indução da expressão na fase pós log do crescimento bacteriano (120) e diminuição da temperatura pós indução (126, 127).

Por mais que seja desejada a produção de proteínas recombinantes em grande quantidade, tal fato pode exercer estresse significativo nas células hospedeiras (98), afetando fatores como a maquinaria de transporte da proteína, diminuição do crescimento e da lise celular (128).

Após realizado o screening variando as condições de indução, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE (figuras 11-22). Observou-se nas figuras 18 e 19 que uma banda mais intensa foi detectada na fração solúvel do clone 10 quando induzida com uma concentração de 0,5 mM e 1mM de IPTG, após 2 horas e 30 minutos de crescimento, com tempo total de indução de 12 horas, na temperatura pós indução de 20 °C. O fato de ter aparecido uma maior banda na fração solúvel provavelmente se deu devido à diminuição da temperatura pós indução, já que, em menores temperaturas, diminui-se a formação de corpos de inclusão e a proteína tem maior tendência a ficar na forma solúvel (126, 127).

Também foi observada presença de banda intensa na fração insolúvel do clone 10 em SDS-PAGE com temperatura pós indução de 37 °C (figura 16) utilizando 1 mM de IPTG e tempo pós indução de 24 horas. Analisando os géis das frações solúvel e insolúvel a 37 °C, foi possível observar que, nessa condição, a proteína foi produzida principalmente em sua forma insolúvel. Os géis da fração solúvel de 37 °C, diferentemente da fração insolúvel, tiveram que ser corados com prata devido à baixa

presença de proteínas, as quais não puderam ser visualizadas ao corar o gel com Coomassie Blue. Como a proteína na fração insolúvel ainda requer etapas de solubilização e renaturação, foi determinado que a condição mais favorável de cultivo para a continuação do estudo ocorreria a 20 °C. Nessa temperatura, a proteína já estava na forma solúvel, eliminando a necessidade das etapas de solubilização e renaturação. Também optou-se pela indução com 0,5 mM de IPTG devido ao alto preço do indutor.

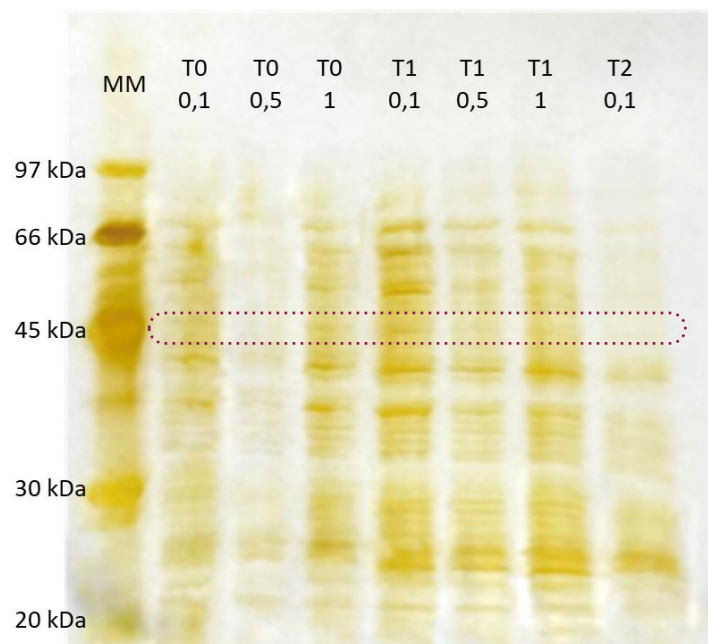


Figura 11 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T0, T1 e T2, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM



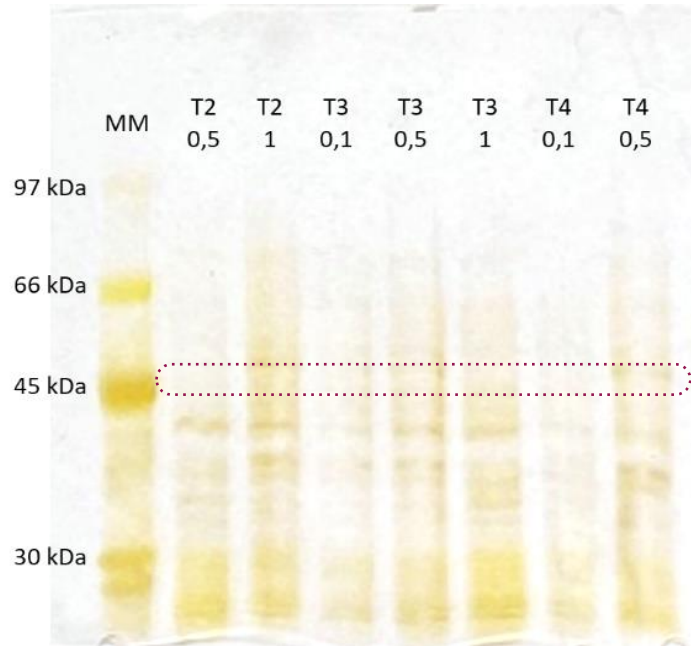


Figura 12 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T2, T3 e T4, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

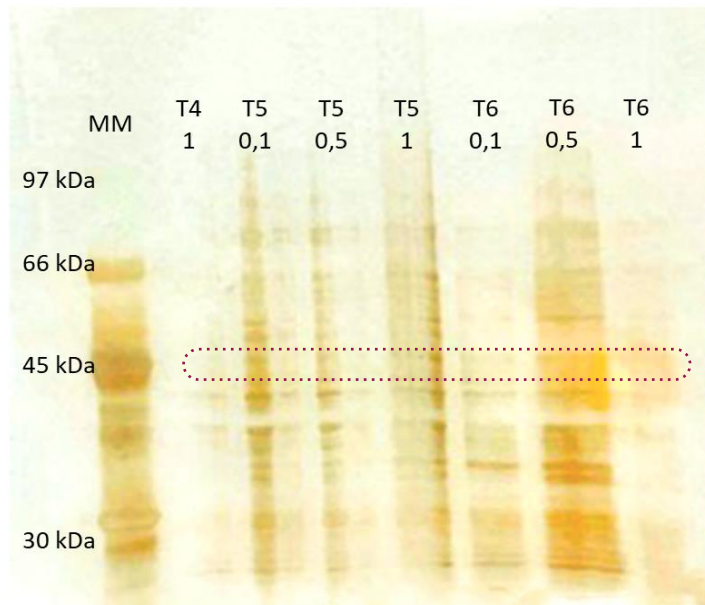


Figura 13 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T4, T5 e T6, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

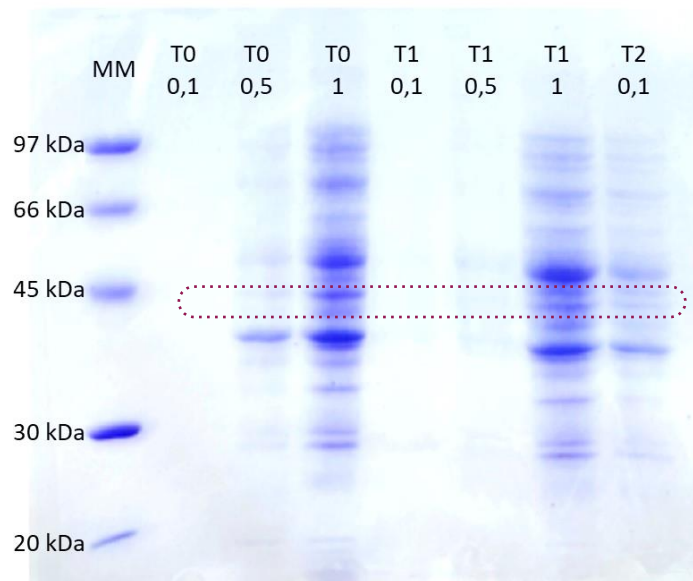


Figura 14 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T0, T1 e T2, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

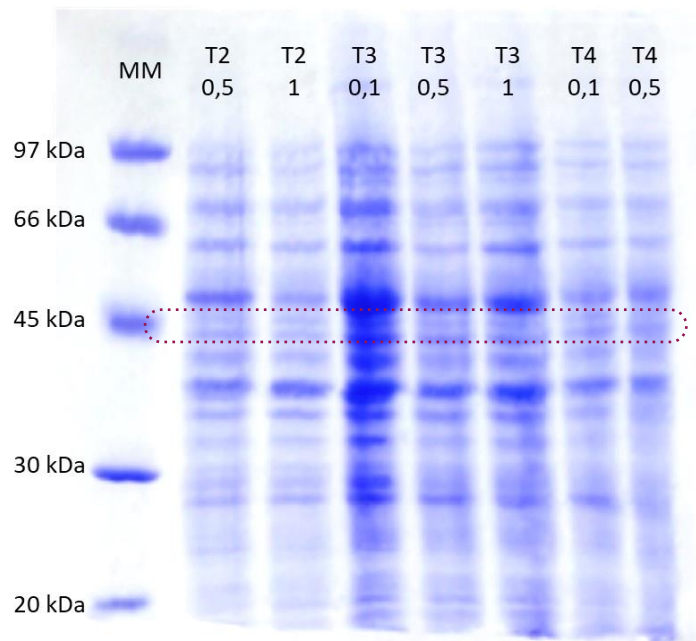


Figura 15 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T2, T3 e T4, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

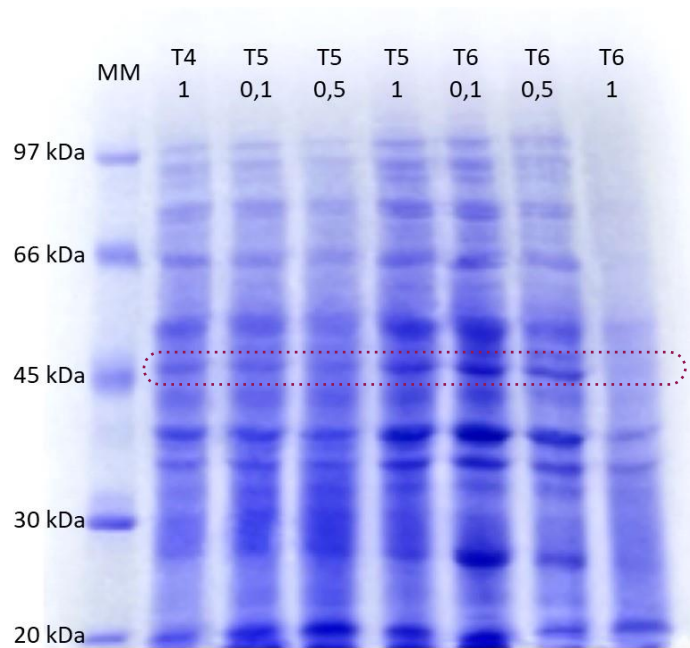


Figura 16 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 37 °C, nos tempos pós-indução T4, T5 e T6, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

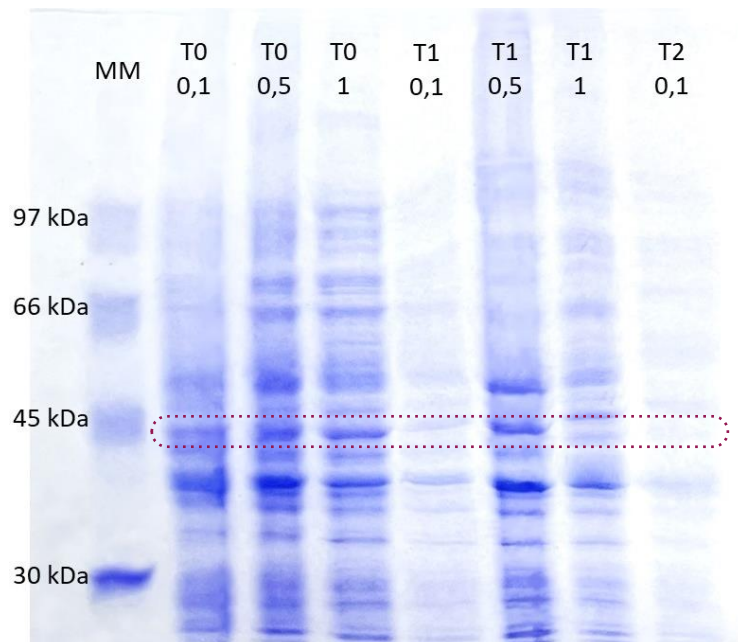


Figura 17 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T0, T1 e T2, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

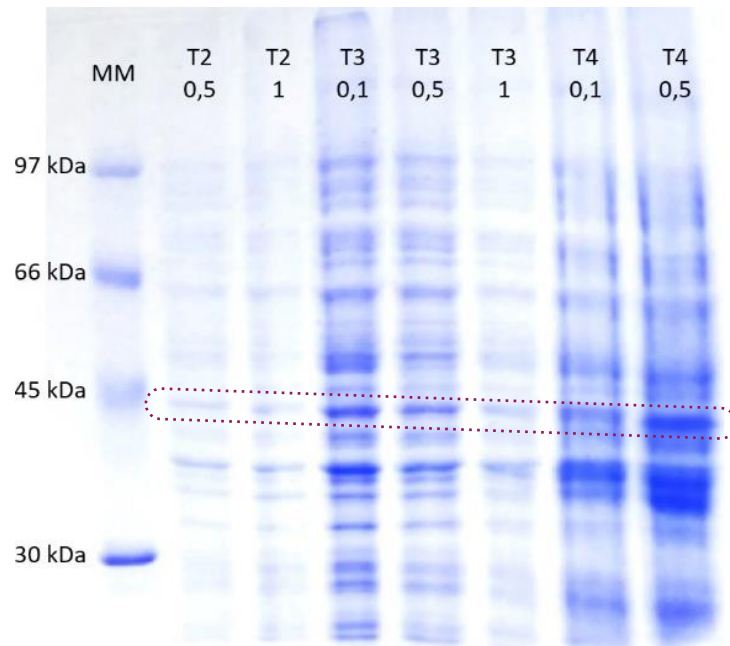


Figura 18 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T2, T3 e T4, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

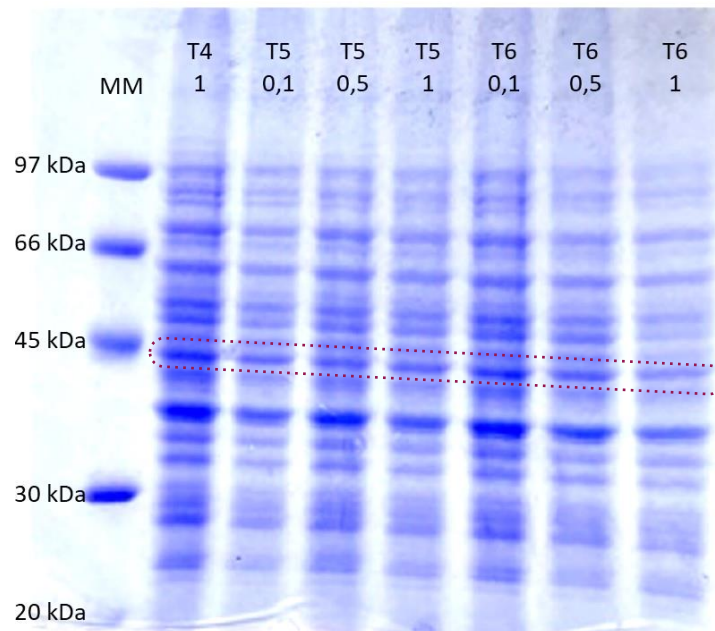


Figura 19 - SDS-PAGE contendo a fração solúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T4, T5 e T6, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

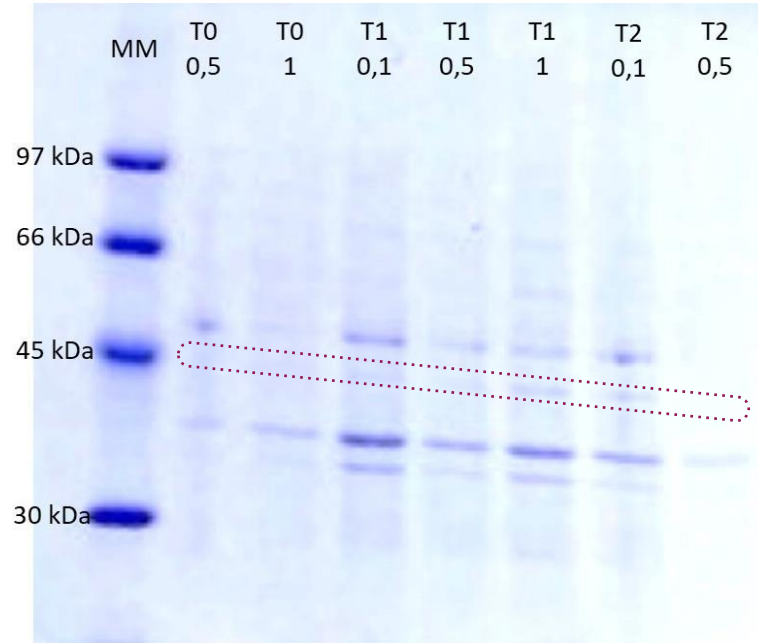


Figura 20 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T0, T1 e T2, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

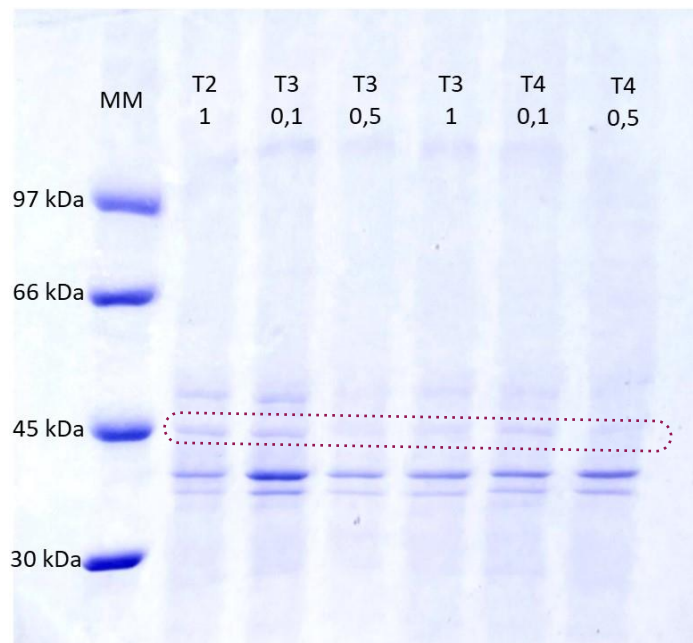


Figura 21 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T2, T3 e T4, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

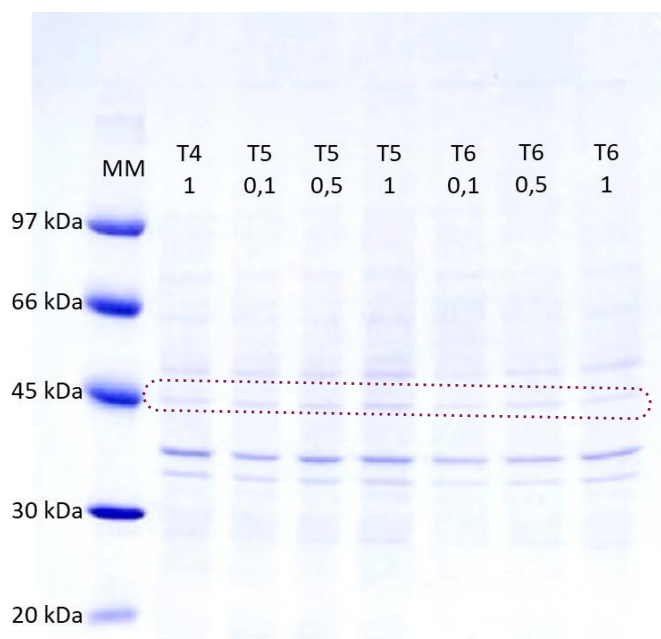


Figura 22 - SDS-PAGE contendo a fração insolúvel do clone 10 de *E. coli* transformada, com indução a 20 °C, nos tempos pós-indução T4, T5 e T6, com variação das concentrações do indutor IPTG em 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM

#### 4.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE L-ASPARAGINASE

A fração solúvel, obtida mediante indução na temperatura de 20 °C, com concentração de 0,5 mM do indutor IPTG e incubação pós-indução por 12 horas, foi avaliada quanto à atividade de L-asparaginase utilizando duas metodologias: Reagente de Nessler e AHA. A escolha do método depende das necessidades e objetivos específicos do estudo pois ambas apresentam vantagens e limitações distintas.

O método de Nessler baseia-se na formação de um complexo de cor amarela, resultado da ligação da amônia, produto da reação da L-asparagina com a L-asparaginase, ao reagente de Nessler. Esse complexo é detectado por espectrofotometria, e sua absorvância, em densidade óptica de 436 nm, é utilizada para quantificação indireta da atividade enzimática. É um método rápido, relativamente simples, e amplamente utilizado (129).

Utilizando o método de Nessler, a atividade enzimática observada foi de 0,068 UI/mL na fração solúvel, indicando atividade de L-asparaginase, porém com valor baixo. Na fração insolúvel não houve atividade. A amostra da fração solúvel foi então

concentrada aproximadamente 8 vezes através de coluna de centrifugação de ultrafiltração Vivaspin® de MWCO 30kDa, a 6.000 xg , atingindo atividade de 0,171 UI/mL. Já a fração insolúvel, mesmo concentrada nas condições acima, não apresentou atividade.

O método do  $\beta$ -hidroxamato aspártico é baseado na formação de um complexo de cor avermelhada resultado da interação entre o ácido  $\beta$ -hidroxamato aspártico, liberado a partir da reação entre L-asparagina, L-asparaginase e hidroxilamina, com a solução de FeCl<sub>3</sub>/TCA/HCl. Esse complexo também é detectado por espectrofotometria, em densidade óptica de 500 nm, e a absorbância é utilizada para quantificação da atividade enzimática (108, 129). No entanto, ao aplicar o método AHA tanto na amostra inicial quanto na concentrada, não foi possível detectar atividade enzimática.

Um estudo conduzido por Magri et al. (2018)(129) teve como objetivo comparar 3 diferentes metodologias de quantificação de L-asparaginase, incluindo os métodos de Nessler e AHA. Os dados obtidos foram relacionados à atividade obtida por análise utilizando CLAE.

Os resultados demonstraram que o método de quantificação utilizando o reagente de Nessler resultou em uma atividade superestimada, porém mais próxima aos valores de atividade obtidos pelo CLAE em comparação com as demais metodologias. Por outro lado, o método AHA apresentou uma atividade mais baixa em comparação com a atividade observada por CLAE. Segundo a autora, isso ocorreu devido à diferença de velocidade entre as reações de hidroxilaminólise e asparaginólise, bem como a possibilidade de ocorrer uma reação catalítica reversa, na qual o AHA, juntamente com a L-asparaginase, é convertido de volta em L-aspártico e hidroxilamina Magri et al. (2018).

Foram conduzidos estudos similares em relação à expressão e atividade de L-asparaginase recombinante de origem fúngica através de expressão em *E. coli* BL21 (DE3). Em pesquisa conduzida por Huang et al. (2014)(130), foi possível observar o sucesso da expressão do gene da L-asparaginase de *Rhizomucor miehei* em vetor de expressão pET-28a(+). Utilizando o método do reagente de Nessler, a atividade enzimática foi de 780 U/mg na fração solúvel bruta, com aumento para 1.984,8 U/mg após purificação por cromatografia de afinidade com níquel. A expressão do gene foi

induzida com IPTG 1 mM durante 12 horas a 30 °C, após o crescimento bacteriano atingir OD<sub>600</sub> de aproximadamente 3.0. Jebur et al. (2019)(131) obteve atividade de 69,1 U/mg ao expressar a L-asparaginase de *Aspergillus terreus* em *E. coli* BL21 (DE3) após realizar purificação por precipitação, diálise e filtração em gel utilizando Sephadex® G-100 (Sigma-Aldrich).

#### 4.7 INÓCULO EM MEIO DEFINIDO

Com base em estudos prévios conduzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Brasília, foi observado que a otimização do meio de cultura para expressão de L-asparaginase recombinante não só resulta em um maior crescimento microbiano, como também pode levar à uma maior atividade enzimática (115).

Em estudo conduzido por Barros (2020)(115), ao comparar os meios de cultivo definido, semi-definido e complexo, foi observado que o meio definido, composto pelos reagentes descritos no item 3.1, levou à uma maior atividade enzimática em comparação aos demais meios. Portanto, com o objetivo de aumentar a quantidade de proteínas produzidas, o inóculo foi preparado utilizando o meio definido, seguindo as mesmas condições de cultivo, sonicação e indução realizadas anteriormente utilizando meio LB.

Ao realizar a quantificação da atividade da enzima L-asparaginase nas frações solúvel e insolúvel, cultivadas em meio definido, pelo método de Nessler, os resultados obtidos foram de 0,093 e 0,023 UI/mL, respectivamente. Já ao concentrar a amostra, observou-se aumento da atividade enzimática, resultando nos valores de 0,449 e 0,038 UI/mL, respectivamente. Só foi possível obter atividade enzimática pelo método AHA após concentrar 10 vezes a amostra, cujo valor foi de 0,082 e 0,011 UI/mL, respectivamente.

Essas atividades obtidas foram maiores que as atividades observadas quando o inóculo foi realizado em meio LB (item 4.6). Como mencionado anteriormente, devido ao fato do meio definido ser uma fonte enriquecida em nutrientes, houve maior atividade devido ao maior crescimento celular.



Por mais que a diferença dos reagentes dos meios de cultivo avaliados no item 4.3 não tenha interferido de maneira relevante em relação ao cálculo da fase de indução, foi observado que o meio definido gerou mais massa celular. Conseqüentemente, houve uma maior atividade enzimática comparando-se com o meio LB, que é um meio simples desprovido de fonte de carbono.

## 5. CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado foi constatado que de fato houve transformação da cepa de *E. coli* BL21(DE3) para expressão de L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* em vetor pET-28a(+). A expressão heteróloga da L-asparaginase de origem fúngica em uma bactéria como a *E. coli* representa um avanço promissor no campo da terapia enzimática. Essa estratégia pode proporcionar a obtenção uma enzima com menor imunogenicidade, reduzindo as reações adversos que ocorrem durante o tratamento de pacientes com leucemia.

É fundamental destacar a importância de conduzir estudos adicionais para aprofundar o conhecimento sobre a enzima recombinante L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* e sua atividade antitumoral. Nesse sentido, a próxima etapa a ser realizada consiste na avaliação de metodologias de purificação da proteína recombinante, visando obter uma preparação enzimática altamente pura e com segurança terapêutica. Além disso, a otimização dos protocolos de purificação deve levar em consideração fatores como rendimento, estabilidade da proteína, custo e escalabilidade.

Também é imprescindível realizar ensaios de citotoxicidade para avaliar a capacidade da enzima recombinante de inibir o crescimento e a proliferação de células cancerígenas, empregando linhagens celulares tumorais cultivadas *in vitro*. Além disso, a avaliação da atividade antitumoral deve abranger testes de viabilidade celular, indução de apoptose e inibição do metabolismo tumoral, dentre outros parâmetros de relevância, permitindo uma análise mais abrangente do potencial terapêutico da enzima recombinante.

Dessa forma, investir em pesquisas e tecnologias que visem aprimorar os métodos de obtenção da L-asparaginase é fundamental para atender às demandas

clínicas e industriais. Tal abordagem contribui para o avanço da biotecnologia farmacêutica e proporciona benefícios significativos para a saúde humana.

## 6. REFERÊNCIAS

1. JULIUSSON, G.; HOUGH, R. Leukemia. **Progress in Tumor Research**, v. 43, p. 87–100, 2016.
2. 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, 2018.
3. COBALEDA, C.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I. Leukemia Stem Cells. **Methods in Molecular Biology**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2021. v. 2185.
4. MALOUF, C.; OTTERSBAACH, K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 3, p. 417–446, 2018.
5. REAMAN, G. H.; SMITH, F. O. **Childhood Leukemia - A Practical Handbook**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2011.
6. ANDREEFF, M. **Targeted Therapy of Acute Myeloid Leukemia**. New York, NY: Springer New York, 2015.
7. BOZZONE, D. M. **Leukemia**. New York, NY: Chelsea House, 2009.
8. INCA. **Leucemia**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/leucemia>>. Acesso em: 10 jun. 2023.
9. JULURI, K. R.; SIU, C.; CASSADAY, R. D. Asparaginase in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Current Evidence and Place in Therapy. **Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy**, v. Volume 12, n. May, p. 55–79, 2022.
10. PAVLOVIC, S. et al. Pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic profiling of childhood acute lymphoblastic leukemia: Paving the way to personalized treatment. **Genes**, v. 10, n. 3, 2019.
11. SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 12 jan. 2021.
12. THE LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY. **Facts - Updated Data on Blood Cancers**. Disponível em: <[www.lls.org/booklet/facts-updated-data-blood-cancers](http://www.lls.org/booklet/facts-updated-data-blood-cancers)>. Acesso em: 10 jun. 2023.
13. APPELBAUM, F. R. Acute Leukemias in Adults. In: **Abeloff's Clinical Oncology**. Sixth Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1783-1797.e1.
14. AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts and Figures**. Disponível em: <[www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2023/2023-cancer-facts-and-figures.pdf](http://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2023/2023-cancer-facts-and-figures.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2023.
15. ADVANI, A. S.; LAZARUS, H. M. **Adult Acute Lymphocytic Leukemia**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011.

16. HUANG, F. L. et al. Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments (Review). **Oncology Letters**, v. 20, n. 1, p. 448–454, 2020.
17. INABA, H.; MULLIGHAN, C. G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 105, n. 11, p. 2524–2539, 2020.
18. LOPES, G. C. Leucemia Linfoblástica Aguda - Entendendo a Leucemia Linfoblástica Aguda. **Centro Infantil Boldrini**, p. 1–40, 2013.
19. ABRALE. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA. Manual Abrale – Tudo sobre Leucemia Linfóide Aguda. p. 1–48, 2020.
20. SAHA, V.; KEARNS, P. **New Agents for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia**. New York, NY: Springer New York, 2011.
21. CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA COLLABORATIVE GROUP (CALLCG). Beneficial and harmful effects of anthracyclines in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Haematology**, v. 145, n. 3, p. 376–388, maio 2009.
22. THOMAS, D. et al. Anthracycline dose intensification in adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 116, n. 19, p. 4580–4589, 2010.
23. PUI, C.-H.; RELLING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 15, p. 1535–1548, 8 abr. 2004.
24. TOKSVANG, L. N. et al. Maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia: basic science and clinical translations. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1749–1758, 2022.
25. CANDONI, A.; LAZZAROTTO, D.; PETRUZZELLIS, G. Safety of nelarabine in adults with relapsed or refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 20, n. 7, p. 751–756, 2021.
26. XIE, J. et al. Optimization of a clofarabine-based drug combination regimen for the preclinical evaluation of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 67, n. 4, p. 1–10, 25 abr. 2020.
27. GERVASINI, G.; VAGACE, J. M. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. NOV, p. 1–11, 2012.
28. OHNUMA, T.; HOLLAND, J. F. Biochemical and Pharmacological Studies with Asparaginase in Man. **Cancer Research**, v. 30, n. 9, p. 2297–2305, 1970.
29. THIGPEN, JT. Innovations in anthracycline therapy: Overview. **Commun Oncol**, v. 2, p. 3-7, 2005.
30. CACHUMBA, J. J. M. et al. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 77–85, 2016.
31. KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–582, 1 dez. 1953.

32. BROOME, J. D. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. **Nature**, v. 191, n. 4793, p. 1114–1115, set. 1961.
33. DE ARAÚJO, T. S. et al. Biophysical characterization of two commercially available preparations of the drug containing Escherichia coli L-Asparaginase 2. **Biophysical Chemistry**, v. 271, n. January, 2021.
34. HOROWITZ, B. et al. Asparagine Synthetase Activity of Mouse Leukemias. **Science**, [s.l.], v. 160, n. 3827, p.533-535, 3 maio 1968. American Association for the Advancement of Science (AAAS)
35. MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 28, n. 2, p. 97-113, 1998.
36. NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, n. 3, p. 208–221, 2007.
37. BATOOL, T. et al. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900–923, 2016.
38. VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. **Leukemia and Lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168–178, 2011.
39. VERMA, N. et al. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.
40. HEO, Y. A.; SYED, Y. Y.; KEAM, S. J. Pegaspargase: A Review in Acute Lymphoblastic Leukaemia. **Drugs**, v. 79, n. 7, p. 767–777, 2019.
41. ASSELIN, B. L. et al. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 9, p. 1780–1786, 1993.
42. AVRAMIS, Vassilios I. et al. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children9s Cancer Group study. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 1986-1994, 2002.
43. HENDRIKSEN, H. V. et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from Aspergillus oryzae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4168–4176, 2009.
44. BASKAR, G. et al. Statistical screening of supplementary nitrogen source for enhanced production of L-Asparaginase By Aspergillus Terreus 1782. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, n. 4, p. 467–472, 2010.
45. SHRIVASTAVA, A. et al. Kinetic studies of L-asparaginase from Penicillium digitatum. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574–581, 2012.
46. BRASIL. Portaria n. 705, de 12 de agosto de 2014. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda do Adulto. Poder Executivo. Brasília, DF.

47. PATRO, K. R. Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 3, n. 3, p. 30–34, jun. 2012.
48. IZADPANA, F. et al. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, v. 208, n. February, p. 99–112, 2018.
49. MIKUCKI, J.; SZARAPINSKA KWASZEWSKA, J.; KRZEMINSKI, Z. Factors influencing L-asparaginase production by staphylococci. **Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Zweite Abteilung**, v. 132, n. 2, p. 135–142, 1977.
50. MOHAPATRA, B. R.; SANI, R. K.; BANERJEE, U. C. Characterization of L-asparaginase from *Bacillus* sp. isolated from an intertidal marine alga (*Sargassum* sp.). **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 380–383, 1995.
51. MUSLIM, S. N. Production, Purification and Characterization of a novel L-asparaginase from *Acinetobacter baumannii* with anticancerous activity. **International Journal of Current Engineering and Technology**, v. 644, n. 11, p. 6–11, 2014.
52. RADADIYA, A. et al. Improving the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Biochemistry**, v. 59, n. 35, p. 3193–3200, 2020.
53. NARAYANA, K. J. P.; KUMAR, K. G.; VIJAYALAKSHMI, M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 331–336, 2008.
54. KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 2018.
55. WOLTERS, B. O. et al. Asparaginase-associated pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: an observational Ponte di Legno Toxicity Working Group study. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1238–1248, 2017.
56. SINDHU, R.; MANONMANI, H. K. Expression and characterization of recombinant L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens*. **Protein Expression and Purification**, v. 143, p. 83–91, 2018.
57. STARK, R. M. et al. Amino acid utilisation and deamination of glutamine and asparagine by *Helicobacter pylori*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 793–800, 1997.
58. TOSA, T. et al. L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. **Applied microbiology**, v. 22, n. 3, p. 387–392, 1971.
59. REDDY, V. K., & REDD, S. M. Effect of carbon and nitrogen sources on L-asparaginase production by bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 81–83, 1990
60. BASCOMB, S. et al. The Properties and Large-scale Production of L-Asparaginase from *Citrobacter*. **Journal of General Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 1–16, 1 nov. 1975.
61. KHAN, A. A. et al. Studies on *Serratia Marcescens* L-Asparaginase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 41, n. 3, 1970.

62. SOUZA, P. M. et al. Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 120, n. May, p. 194–202, 2017.
63. GARCIA, P. H. D. et al. Anticancer Asparaginases: Perspectives in Using Filamentous Fungi as Cell Factories. **Catalysts**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2023.
64. BAGHBAN, R. et al. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365–384, 2019.
65. MA, L. J. et al. Fusarium pathogenomics. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 399–416, 2013
66. FREITAS, M. et al. Filamentous fungi producing l-asparaginase with low glutaminase activity isolated from Brazilian savanna soil. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1–20, 2021
67. RUMA, K. et al. Production and Optimization of Extra Cellular L-asparaginase by *Fusarium solani* Isolated from *Withania somnifera*. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 7, n. 2, p. 81–88, 2017.
68. 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, 2021.
69. YAP, L. S.; LEE, W. L.; TING, A. S. Y. Optimization of L-asparaginase production from endophytic *Fusarium proliferatum* using OFAT and RSM and its cytotoxic evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 191, n. August, p. 106358, 2021.
70. MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. May, p. 124–130, 2017.
71. ALI, D. et al. Optimization of L-Asparaginase production from some filamentous fungi with potential pharmaceutical properties. **Egyptian Journal of Botany**, v. 0, n. 0, p. 0–0, 2018.
72. AL YOUSEF, S. A. *Fusarium* sp. l-asparaginases: purification, characterization, and potential assessment as an antileukemic chemotherapeutic agent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 8, p. 11243–11254, 2022.
73. Saxena R.K., Sinha U. L-asparaginase and glutaminase activities in the culture filtrates of *Aspergillus nidulans*. **Current Science**, v. 50, p. 218-219, 1981
74. MISHRA, A. Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 33–42, 2006.
75. COSTA-SILVA, T. A. et al. Optimization of culture conditions and bench-scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 95–104, 2019.

76. MUNEER, F. et al. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 967–981, 2020.
77. SAKEKAR, A. A.; GAIKWAD, S. R.; PUNEKAR, N. S. Protein expression and secretion by filamentous fungi. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 1, p. 1–18, 2021.
78. LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82–99, 2017.
79. SALEEM BASHA, N. et al. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: Purification and characterisation. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, p. 353–360, 2009.
80. GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923–929, 2012.
81. ZIA, M. A. et al. Production of L-asparaginase from *Aspergillus niger* using agro wastes by-products in submerged fermentation process. **Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)**, v. 62, n. 2, p. 47–51, 2013.
82. COOPER, Geoffrey M.; HAUSMAN, Robert E. **A Célula: Uma Abordagem Molecular**. Artmed Editora, 2016.
83. YESILIRMAK, F.; SAYERS, Z. Heterologous expression of plant genes. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2009, 2009.
84. GLICK, B. R., PASTERNAK, J. J. & PATTEN, C. L. **Molecular biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2010.
85. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 3rd edition. [s.l.: s.n.].
86. COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods In Enzymology**. 1st. ed. California: Elsevier, 2013. v. 529
87. MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.
88. STUDIER, F. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.**, v. 185, p. 305-313, 1998.
89. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An Introduction**. 10<sup>a</sup> ed. [s.l.] Pearson Education, Inc., 2010.
90. FLETCHER, E.; KRIVORUCHKO, A.; NIELSEN, J. Industrial systems biology and its impact on synthetic biology of yeast cell factories. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 6, p. 1164–1170, 2016.
91. GOMES, A. M. V. et al. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. **Microorganisms**, v. 6, n. 2, 2018.
92. LLOPIS, S. et al. Pathogenic potential of *Saccharomyces* strains isolated from dietary supplements. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.



93. ÇELİK, E.; ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1108–1118, set. 2012.
94. MUNEER, F. et al. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 967–981, 2020.
95. SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 4, p. 363–372, 2004.
96. POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91–105, 2012.
97. POURESMAEIL, M.; AZIZI-DARGAHLU, S. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. **Archives of microbiology**, v. 205, n. 5, p. 212, 2023.
98. TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. December, 2019.
99. KLEINER-GROTE, G. R. M.; RISSE, J. M.; FRIEHS, K. Secretion of recombinant proteins from *E. coli*. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 8, p. 532–550, 2018.
100. ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, 2019.
101. SANDOMENICO, A.; SIVACCUMAR, J. P.; RUVO, M. Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody recombinant fragments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–39, 2020.
102. RAJENDRAN, V.; PUSHPAVANAM, S.; JAYARAMAN, G. Continuous refolding of L-asparaginase inclusion bodies using periodic counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1662, p. 462746, jan. 2022.
103. UPADHYAY, A. K.; SINGH, A.; MUKHERJEE, K. J.; PANDA, A. K. 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. Frontiers Research Foundation.
104. RIESENBERG, D. et al. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. **Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–27, 1991.
105. DE-Souza, M. T.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Técnicas básicas em biologia molecular. 2ª ed. Brasília: Editora UnB, 2016
106. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
107. THERMO SCIENTIFIC. Instructions - PVDF Transfer Membrane, 2017.

108. DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 493–501, 1977.
109. SHIFRIN, S.; PARROTT, C. L.; LUBORSKY, S. W. Substrate binding and intersubunit interactions in L asparaginase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 5, p. 1335–1340, 1974.
110. SIQUEIRA, F.G. d. (2010). “Siqueira, Félix Gonçalves de. Resíduos agroindustriais com potencial para a produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases. 2010. 277 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2010”.
111. SOUZA, P. M. et al, Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 120, n. May, p. 194–202, 2017.
112. KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 159–162, 2012.
113. CHANG, A. Y.; CHAU, V. W. Y.; LANDAS, J. A.; PANG, Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 1, n. June, p. 22–25, 2017. Disponível em: <[https://jemi.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/Chang et al JEMI-methods Vol 1 pg 22-25.pdf](https://jemi.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/Chang%20et%20al%20JEMI-methods%20Vol%201%20pg%2022-25.pdf)>.
114. 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, 2018.
115. BARROS, T. et al. Development of processes for recombinant L-asparaginase II production by *Escherichia coli* BL21 (De3): From shaker to bioreactors. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2021.
116. MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A. S. Precipitação de proteínas. In: Franco, O. L.; Gomes, C. P. C. G.; Dias, S. C. (org.) **Manual para estudo de proteínas**. 1ª Ed. Santa Catarina: BOOKESS. 2014. P. 63-72
117. SINGHVI, P.; VERMA, J.; PANWAR, N.; et al. Molecular Attributes Associated With Refolding of Inclusion Body Proteins Using the Freeze–Thaw Method. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 719, 2021. Frontiers Media S.A.
118. IMADA, A. et al. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms. **Journal of general microbiology**, v. 69, n. 3, p. 299–312, 1973.
119. SHIFRIN, S.; PARROTT, C. L.; LUBORSKY, S. W. Substrate binding and intersubunit interactions in L asparaginase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 5, p. 1335–1340, 1974.
120. GALLOWAY, C. A.; SOWDEN, M. P.; SMITH, H. C. Increasing the Yield of Soluble Recombinant Protein Expressed in *E. coli* by Induction during Late Log Phase. **BioTechniques**, v. 34, n. 3, p. 524–530, mar. 2003.

121. GOMES, T. A.; ZANETTE, C. M.; SPIER, M. R. An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, n. 7, p. 635–654, 2020.
122. GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, M. et al. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in Escherichia coli. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
123. QING, G. et al. Cold-shock induced high-yield protein production in Escherichia coli. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 877–882, 2004.
124. THUY LE, A. T.; SCHUMANN, W. A novel cold-inducible expression system for Bacillus subtilis. **Protein Expression and Purification**, v. 53, n. 2, p. 264–269, 2007.
125. WINOGRAD, E.; PULIDO, M. A.; WASSERMAN, M. Production of DNA-recombinant polypeptides by tac-inducible vectors using micromolar concentrations of IPTG. **Biotechniques**, v. 14, n. 6, p. 886, 890-886, 890, 1993.
126. SCHEIN, C. H.; NOTEBORN, M. H. M. Formation of Soluble Recombinant Proteins in Escherichia Coli is Favored by Lower Growth Temperature. **Nature Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 291–294, 1 mar. 1988.
127. VERA, A. et al. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 1101–1106, 15 abr. 2007.
128. ZERBS, S.; GIULIANI, S.; COLLART, F. **Small-scale expression of proteins in E. coli**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 536
129. MAGRI, A. et al. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 27, p. 6985–6990, 2018.
130. HUANG, L. et al. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from Rhizomucor miehei and its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1561–1569, 2014.
131. JEBUR, I. M. et al. Cloning and expression of L-Asparaginase gene from Aspergillus terreus in E. coli. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 11, n. 3, p. 961–965, 2019.