



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

LARISSE CADEIRA BRANDÃO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DA L-ASPARAGINASE ANS-Z
DE *BACILLUS SUBTILIS* E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS
HEMATOLÓGICAS

FORTALEZA

2026

LARISSE CADEIRA BRANDÃO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DA L-ASPARAGINASE ANS-Z DE
BACILLUS SUBTILIS E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM
LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HEMATOLÓGICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B818c Brandão, Larisse Cadeira.
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DA L-ASPARAGINASE ANS-Z DE *Bacillus subtilis* E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HEMATOLÓGICAS / Larisse Cadeira Brandão. – 2026.
86 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2026.

Orientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

1. L-asparaginase; . 2. enzima recombinante; 3. estrutura tridimensional; 4. aplicações biotecnológicas.. I. Título.

CDD 660.6

LARISSE CADEIRA BRANDÃO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DA L-ASPARAGINASE ANS-Z DE
BACILLUS SUBTILIS E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM
LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HEMATOLÓGICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 29/01/2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dr. Tarciana Oliveira Guedes
Instituto de Educação Médica (IDOMED)

À minha família: Eglantina, Neto, João Hugo
e Davi.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força, saúde e discernimento ao longo desta jornada, por me sustentar nos momentos de incerteza e pela paz que guiou meus passos até a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Antonia Antunes Brandão e João Cadeira Neto que me apoiarem durante toda minha trajetória acadêmica e por nunca medirem esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Além de apoio, agradeço por toda dedicação, cuidado, atenção e compreensão durante os anos dessa dessa intensa caminhada. Cada gesto, cada conversa e as palavras de incentivo nos momentos difíceis tornou esta jornada mais leve e possível. Esta conquista é nossa. Ao meu irmão, João Hugo Cadeira Brandão, por sempre mostrar orgulho e confiança por mim. A sua presença foi um porto seguro durante os desafios desta jornada. À Antonia Antunes Cavalcante, minha querida Tia Esmeralda, sem a senhora teria sido muito difícil alcançar esse título. Obrigada por me acolher como filha em sua casa durante os quatro anos, por cuidar de mim e me apoiar independente de qualquer coisa. A senhora me ensinou muitas coisas, inclusive a ser mais paciente, sua serenidade me inspira. Também não poderia deixar de falar do amor de madrinha, meu Davi, sua a alegria e amor sempre foram força pra que eu continuasse. E as minhas tias Ruth, Marta e Elielza, sempre de longe me apoiando. Minha querida família, amo vocês, todas as lutas são por vocês.

Agradeço à minha família, de ambos os lados, pelo apoio recebido, em suas diversas formas e intensidades, que me trouxe até aqui.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado, pela orientação, paciência incansável, confiança depositada em meu trabalho ao longo desta jornada e me ajudar a crescer como pessoa em muitos aspectos. Sua dedicação, rigor científico e sensibilidade acadêmica foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa e para meu crescimento enquanto pós-graduanda. Sou imensamente grata pelas discussões, disponibilidade constante e incentivo nos momentos mais desafiadores. Esta tese só se tornou possível graças ao seu compromisso e inspiração.

Nesse sentido, gostaria de agradecer a todos os integrantes e colegas do Grupo de Pesquisa em Engenharia de Proteínas e Soluções para Saúde da Fiocruz Ceará: Igor, João

Matheus, Daniel, Plácido, Ronny, Carol e Júlia. Também tenho profunda gratidão ao Marcus Rafael Lobo Bezerra e Larissa Pontes, por todos os ensinamentos e paciência que tiveram comigo desde o início dessa longa jornada. Ainda agradeço a Lari por todas as caronas para a Fiocruz, e por sempre me esperar com paciência quando me atrasava, por tudo isso, muito obrigada. Daniel, obrigada por toda paciência e por me conduzir nos experimentos realizados no laboratório das células, e ainda sou muito grata por todas as caronas que me deu, obrigada pela disponibilidade em me ajudar. João, obrigada por todas as caronas pra Fiocruz e para casa e pela paciência em me esperar quando me atrasava e também sou muito grata pois no final dessa jornada você deu todo suporte para realizar os experimentos que precisavam para que o artigo fosse finalizado.

Ao meu amigo, Igor, que ao longo dos anos deixou de ser apenas um colega de trabalho e se tornou um verdadeiro amigo. Seu apoio mesmo que distante e sua disposição em ajudar em fizeram toda a diferença nesta trajetória. Obrigada por compartilhar desafios, conquistas e por me oferecer força nos momentos em que precisei. Obrigada pela parceria, meu grande amigo!

Também gostaria de agradecer ao Laboratório de Biocristalografia (LABIC) e a todos os integrantes desse querido grupo de pesquisa da UFC, em especial aos amigos: Francisco Alves Santos, Leonardo Andrade Abreu Amorim e Roberta Cristiane Cavalcante Costa, vocês também foram fundamentais nessa jornada, obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

Ainda no LABIC, eu gostaria de agradecer imensamente ao meu amigo José Gabriel Gomes, minha dupla dos experimentos. Mais que um colega de trabalho, mais que um amigo, você foi um anjo que Deus me enviou. Amigo querido, agradeço por ter segurado minha mão em todos os momentos, por sempre me fazer acreditar em mim mesma e me apoiar para que eu não desistisse do meu sonho. Sou grata por tudo que compartilhamos juntos, no trabalho e fora dele. Ter conhecido você, foi um presente, sempre tão íntegro, honesto, inteligente, humilde, repleto de bondade no coração e ainda és um cantor maravilhoso! Ainda quero destacar uma qualidade, sua paciência comigo, pois repetia várias e várias vezes até que eu aprendesse. Enfim, eu poderia escrever um capítulo de livro sobre tudo que vivemos nesses últimos anos, só para deixar registrado como você foi importante para que este dia chegasse. Tenho muito orgulho de quem você é e onde tenho certeza que você um dia irá chegar. És muito competente e um cientista brilhante.

Gostaria de agradecer ao meu grupinho da 205/305 da Fiocruz: Maísa, Samuel, Virgínia, Lucas, Liandra, Darlyson, Nívian e Jucilene. Além de dividir os dias intensos no laboratório, compartilhamos também muitos momentos de alegria. Obrigada por cada conversa, apoio e riso compartilhado no meio do cansaço. Nossos almoços juntos foram essenciais, fortalecendo laços e tornando mais leve o percurso até aqui. Sou profundamente grata por ter caminhado ao lado de vocês. Obrigado ao Lucas que estava sempre ao meu lado, me explicando e ajudando na rotina do laboratório e várias vezes no início ficou comigo até tarde para me auxiliar e fazer companhia. Lembro do início da nossa amizade e guardarei no meu coração com muito carinho porque mais que um colega de trabalho se tornou um grande e querido amigo. Sempre me recordarei com muito afeto dos momentos que passamos juntos. Maísa, amiga querida! Desde o início me deu a oportunidade de te acompanhar no laboratório e isso fez toda diferença no meu aprendizado. Obrigada por várias vezes me ouvir e aconselhar pacientemente. Samuel, Deus muito gentilmente me enviou você pra dividir os dias no laboratório. Além de me ajudar diversas vezes, sempre tornou meus dias mais leves e felizes, sempre com palavras de apoio e motivação. Um homem admirável, inteligente, educado e competente. Você é luz na vida de todos que têm a sorte de te conhecer, tenho muito orgulho de ser sua amiga.

Aproveito a oportunidade para agradecer a Mayara, Rosa, Marcelo, Camila e Helen cujo suporte competente e dedicado foi essencial para a realização dos experimentos da minha pesquisa. Agradeço pelas conversas, sorrisos compartilhados e pela atmosfera acolhedora que tornaram o ambiente de trabalho mais leve e os desafios do dia a dia muito mais fáceis de enfrentar. O profissionalismo e a generosidade de vocês fizeram toda a diferença ao longo deste percurso. Mayara e Rosa, vocês foram muito mais do que companheiras de pesquisa: foram amparo, equilíbrio e luz nos momentos em que o caminho parecia pesado demais. Obrigada por cada conselho sincero, por cada gesto de cuidado, por se preocuparem comigo, e com meu bem-estar quando eu mesma não consegui fazê-lo. A presença de vocês tornou esta caminhada menos solitária e infinitamente mais humana. Levo comigo a amizade, a força e o carinho que vocês me ofereceram com tanta generosidade.

Agradeço aos meus queridos de Jaguaribe, que sempre estiverem do meu lado prestando apoio ao longo dos anos.

Também quero agradecer a minha querida amiga, Aline Almeida. Do mesmo programa de pós-graduação, sempre foi companheira desde o início, dividindo as

dificuldades, disciplinas e momentos agradáveis. Ainda do mesmo programa, também me lembro da Vânia com carinho, obrigada pelos momentos juntas e por ser sempre tão disponível em ajudar.

Agradeço aos meus queridos amigos de trabalho, Ângela e Gilcimar, pela parceria sincera e apoio incondicional ao longo desta jornada. Em diversos momentos decisivos, especialmente quando precisei me ausentar para me dedicar à apresentação deste trabalho, vocês não hesitaram em me substituir e garantir que tudo continuasse funcionando. A generosidade, a amizade verdadeira e o cuidado que sempre demonstraram fizeram toda a diferença. Sou imensamente grata por tê-los ao meu lado. Não menos importante, gostaria de agradecer a Vandinha e Lituany, por estarem comigo nessa reta final, me apoiando sempre com uma palavra amiga e motivadora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio do doutorado. À Fiocruz Ceará, instituição onde realizei os experimentos desta pesquisa e que se tornou, para mim, muito mais do que um ambiente de trabalho. A Fiocruz Ceará foi um espaço acolhedor, inspirador e repleto de profissionais dedicados, que contribuíram de forma decisiva para minha formação. Sou imensamente grata pela oportunidade de desenvolver meu projeto em um local tão comprometido com a ciência e com a excelência. A experiência vivida aqui me preparou como profissional e ampliou minha visão de pesquisa, deixando marcas que levarei para toda a vida acadêmica e pessoal.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), instituição que abriga o Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, pelo acolhimento, suporte acadêmico e científico durante todo o período desta pesquisa.

A todos que de outras maneiras estiveram envolvidos com este trabalho e que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

“Tudo o que fizer, fazei-o de todo coração, como se estivesse servindo ao Senhor e não as pessoas”. (Colossenses 3.23)

RESUMO

A L-asparaginase catalisa a hidrólise da L-asparagina em ácido aspártico e amônia, sendo encontrada em animais, plantas e microrganismos, e integra uma estratégia terapêutica baseada na restrição de aminoácidos essenciais, assim como outras enzimas, que explora a dependência das células cancerosas desses nutrientes para sobreviver, por isso, fontes microbianas são preferidas para produção em larga escala devido à sua eficiência e facilidade de cultivo. Neste estudo, produzimos de forma recombinante e caracterizamos uma L-asparaginase de *Bacillus subtilis* (Asp-Z). A Asp-Z foi expressa heterologicamente em *Escherichia coli* e purificada por cromatografia de afinidade, resultando em proteína solúvel com atividade ótima a 55°C e pH 7,5. Os parâmetros cinéticos nessas condições foram um Km de 0,47 mM e um Vmax de 52,13 U/mg. A Asp-Z mostrou-se específica para L-asparagina, não apresentando atividade glutaminase detectável, e exibiu efeitos antiproliferativos contra linhagens de células cancerígenas hematológicas, particularmente RAJI e JURKAT, com valores de IC₅₀ na faixa micromolar. Análises *in silico* revelaram epítomos imunogênicos distintos entre a Asp-Z e a L-asparaginase comercial de *E. coli*, sugerindo perfis antigênicos divergentes, enquanto os dados cristalográficos revelaram uma estrutura tetramérica conservada, com uma alça do sítio ativo altamente flexível. Em conjunto, essas descobertas destacam a Asp-Z como uma enzima termoestável, livre de atividade glutaminásica e pouco imunogênica, o que representa uma estrutura promissora para otimização por meio de engenharia de proteínas, visando aplicações terapêuticas e biotecnológicas.

Palavras-chave: L-asparaginase; enzima recombinante; estrutura tridimensional; aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

L-asparaginase catalyzes the hydrolysis of L-asparagine into aspartic acid and ammonia. It is found in animals, plants, and microorganisms and is part of a therapeutic strategy based on the restriction of essential amino acids, as are other enzymes that exploit the dependence of cancer cells on these nutrients to survive. Therefore, microbial sources are preferred for large-scale production due to their efficiency and ease of cultivation. In this study, we recombinantly produced and characterized an L-asparaginase from *Bacillus subtilis* (Asp-Z). Asp-Z was heterologously expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography, resulting in a soluble protein with optimal activity at 55 °C and pH 7.5. The kinetic parameters under these conditions were a K_m of 0.47 mM and a V_{max} of 52.13 U/mg. Asp-Z proved specific for L-asparagine, showing no detectable glutaminase activity, and exhibited antiproliferative effects against hematologic cancer cell lines, particularly RAJI and JURKAT, with IC_{50} values in the micromolar range. *In silico* analyses revealed distinct immunogenic epitopes between Asp-Z and commercial *E. coli* L-asparaginase, suggesting divergent antigenic profiles, while crystallographic data revealed a conserved tetrameric structure with a highly flexible active site loop. Taken together, these findings highlight Asp-Z as a thermostable enzyme, free of glutaminase activity and with low immunogenicity, representing a promising structure for optimization through protein engineering, targeting therapeutic and biotechnological applications.

Keywords: L-asparaginase; recombinant enzyme; three-dimensional structure; biotechnological applications.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Enzimas e suas aplicações	14
1.2	Leucemia Linfóide Aguda	16
1.3	L-asparaginases, L-asparagina características e aplicações	19
1.3.1	<i>L-asparaginases bacterianas e importância da cristalização de enzimas para aplicações no desenvolvimento de biofármacos</i>	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Clonagem Molecular	30
4.2	Expressão heteróloga em sistema bacteriano	30
4.3	Purificação da L-asparaginase recombinante	31
4.4	Comparação das estruturas primárias de Asp-Z e Asp-B	32
4.5	Dicroísmo Circular	32
4.6	Atividade enzimática	32
4.7	Efeitos da variação de pH e temperatura na atividade enzimática	33
4.8	Estudos de cinética e inativação enzimática	34
4.9	Ensaio de viabilidade celular	35
4.10	Previsão de imunogenicidade <i>in silico</i>	36
4.11	Obtenção de cristais e determinação da estrutura	36
4.12	Simulações de acoplamento molecular e alinhamento estrutural	37
4.13	Análise estatística	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Expressão e purificação das enzimas recombinantes Asp-B e Asp-Z	38
5.2	Perfil de atividade enzimática em diferentes pHs e temperaturas	44
5.3	Parâmetros cinéticos e inibição iônica	46
5.4	Ensaio de viabilidade celular	53
5.5	Avaliação da termoestabilidade	55
5.6	Previsão de imunogenicidade	58
5.7	Estrutura 3D geral	64

6	CONCLUSÕES.....	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas e suas aplicações.

A enzimologia, uma área significativa da bioquímica, abrange o estudo da estrutura, função, regulação e cinética das enzimas (Srinivasan, 2021). Enzimas, em sua grande maioria, consistem em um tipo especializado de proteína que age como catalisadores biológicos aumentando a velocidade de reações químicas em organismos vivos (Leksmono et al., 2018). A maioria das enzimas são proteínas compostas por sequências dos 20 aminoácidos naturais (David L Nelson; Michael M. Cox, 2013). As ligações asseguram a conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas (Carlsson et al., 2018), de modo que algumas condições ambientais, como pH, temperatura, pressão e outros fatores podem afetar sua estrutura e atividade catalítica (Grahame; Bryksa; Yada, 2015). As enzimas estão classificadas em 7 classes gerais, baseado em sua principal função catalítica, podendo ser oxidorreduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases ou translocases (Ann Benore, 2019). Em uma enzima existe uma porção chamada de “sítio ativo” que se liga ao substrato, essa ligação é específica, ou seja, a molécula possui certas características estereoquímicas que proporcionam o seu encaixe com o substrato (Callender; Dyer, 2015).

Na proporção que a concentração do substrato aumenta, o número de reações catalisadas por enzimas inicialmente aumenta devido a uma maior chance de moléculas do substrato interagirem com os sítios ativos das enzimas. A saturação pelo substrato ocorre quando o sítio ativo da enzima é totalmente ocupado e resulta na atividade enzimática máxima. Além disso, a atividade enzimática atinge um platô, isto é, a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), que acontece porque as enzimas ficam saturadas e não conseguem processar substratos mais rápido que aquela velocidade. Em contrapartida, baixas concentrações de substrato podem limitar a atividade enzimática pela falta de moléculas de substrato disponíveis para reações enzimáticas. Dessa forma, entender a relação entre concentração de substrato e atividade enzimática é decisivo para otimizar processos biocatalíticos, garantindo sua eficiência para diversas aplicações industriais (Hu et al., 2023).

A partir disso, um ponto importante para ser estudado é a cinética enzimática que fornece um meio de avaliar a especificidade do substrato de uma enzima. Na cinética do estado estacionário, as taxas iniciais de reações são medidas de modo que cada molécula de enzima se liga ao substrato e catalisa sua conversão em produto várias vezes. Nesse processo, o pH, a temperatura e a concentração do substrato são relevantes e influenciam as reações (Lorsch, 2014).

Antes mesmo de conhecerem a natureza, propriedade e funcionamento das enzimas, elas já eram utilizadas pela humanidade por estarem presentes em microrganismos, vegetais, animais e no corpo humano (Silpa Somavarapu et al., 2021). Em meados do século XX, aumentaram significativamente os estudos e conhecimentos sobre as enzimas, determinando suas estruturas e mecanismos de atuação (Yan; Chen, 2022). Esse progresso proporcionou o emprego dessas proteínas, permitindo sua exploração em diversos campos, como diagnóstico, desenvolvimento de medicamentos, tratamento do câncer, vacinas, biotecnologia agrícola, e outros (Hamley, 2017).

No setor de biocombustível, as enzimas são fundamentais na conversão de biomassa em biocombustíveis, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa e da dependência de combustíveis fósseis (Victorino da Silva Amatto et al., 2022). São amplamente utilizadas também na produção de muitos produtos alimentícios, incluindo pão, queijo e bebidas alcoólicas, interferindo no melhoramento do sabor, textura e perfis nutricionais. Além disso, elas desempenham papel relevante na indústria de detergentes, facilitando a decomposição de manchas e matéria orgânica, com intuito de uma limpeza mais eficaz. São empregadas também no enriquecimento do solo, processamento têxtil e reciclagem de papel, e várias outras áreas. Um destaque das enzimas é sua aplicação na indústria farmacêutica, onde são amplamente empregadas na síntese de moléculas complexas com alta eficiência e especificidade, com a finalidade de proporcionar medicamentos aprimorados (Victorino da Silva Amatto et al., 2022). O tratamento enzimático tem sido também bastante promissor na área do câncer, pois essas biomoléculas estão envolvidas em várias vias celulares metabólicas e proliferativas das células cancerosas (Kumari; Bansal, 2021).

Os aminoácidos são primordiais para o crescimento de células normais e doentes, ou seja, ajudando na sua proliferação e nas demandas fisiológicas. As células malignas necessitam de mais energia e aminoácidos para seu rápido crescimento em comparação com células saudáveis normais. Dessa forma, para interromper o crescimento das células

cancerosas, podem ser aplicadas estratégias para alterar seu metabolismo celular ou o microambiente ao redor delas. Interferir nas atividades das células cancerosas por escassez de aminoácidos já é um tratamento estabelecido e estudado para as enzimas asparaginases, metionase, glutaminase e arginase. Essas terapêuticas enzimáticas dependem da necessidade das células malignas de serem supridas por aminoácidos como asparagina, metionina, glutamina e arginina, respectivamente. O tratamento que consiste em cessar a disponibilidade natural desses aminoácidos é preciso, pois não afeta a função celular normal (Caldwell et al., 2015; Kumari; Bansal, 2021; Lukey; Katt; Cerione, 2017; Oberkersch; Santoro, 2019).

1.2 Leucemia Linfóide Aguda

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia primária da medula óssea, caracteriza-se como um câncer heterogêneo em que elementos medulares e sanguíneos normais são substituídos por células imaturas, ou seja, por linfoblastos B e/ou T que se acumulam em outros tecidos (Gomes et al., 2020; Lobo-Alves et al., 2024). Dessa maneira, a LLA constitui-se de rápida produção de blastos imaturos anormais, representando o câncer infantil mais comum, cerca de um terço de todos os cânceres que ocorrem antes dos 15 anos de idade, de maneira que as chances de sobrevivência aumentaram com os avanços nas modalidades de tratamento anticâncer (De Moraes et al., 2014; Gomes et al., 2020; Lobo-Alves et al., 2024).

Na faixa etária de 0 a 14 anos, 80% dos casos de Leucemia aguda são de linhagens linfoblásticas (LLA) enquanto 15% são de linhagem mieloide (LMA) (Blanco-Lopez et al., 2023). A maioria das leucemias linfoblásticas agudas surge em indivíduos saudáveis, ou em indivíduos com fatores predisponentes, como suscetibilidade genética herdada ou exposição ambiental à radiação, produtos químicos e infecções (De Moraes et al., 2014; Florent Malard; Mohamad Mohty, 2020). Dessa maneira, as células B e T possuem alterações diferentes que caracterizam o tipo celular que caracteriza a neoplasia. A LLA de linfócito B é a mais comum, apresentado mais de 20 subtipos com diferentes perfis gênicos, sendo as alterações mais relevantes as aneuploidias, rearranjos cromossômicos que alteram oncogenes, fatores de transcrição e mutações pontuais. Essas modificações alteram diversos processos celulares, como diferenciação, regulação do ciclo celular e da

cromatina, além de sinalização (Inaba; Mullighan, 2020; Lilljebjörn et al., 2016; Roberts; Mullighan, 2020).

Em contrapartida, a LLA de linfócitos T é menos comum, existindo 10 principais vias que são afetadas por alterações mais recorrentes nesse subtipo de leucemia. Dessas vias, 3 são desreguladas com maior frequência, sendo elas, as vias de fatores de transcrição específico da linhagem de células T; sinalização da via de expressão de NOTCH1/MYC e vias de controle de ciclo celular (Gianni; Belver; Ferrando, 2020; Inaba; Mullighan, 2020; Liu et al., 2017).

A LLA é utilizada como um paradigma para o estudo e tratamento bem-sucedido do câncer infantil (Pui et al., 2018). Os estudos genômicos de linha germinativa ampliaram substancialmente o entendimento sobre os fatores genéticos do hospedeiro que influenciam o risco de LLA. Em sua maioria, as condições predisponentes decorrem de variantes patogênicas germinativas que afetam genes críticos envolvidos em processos como diferenciação e proliferação celular, apoptose, reparo de danos ao DNA e sinalização intracelular (Bloom et al., 2020). À medida que cresce a identificação de crianças com predisposição de origem germinativa, torna-se urgente desenvolver diretrizes de manejo clínico não apenas para aquelas já acometidas pela neoplasia, mas também para familiares portadores assintomáticos de variantes germinativas predisponentes (Bloom et al., 2020).

A leucemia é clinicamente dividida em leucemia aguda e crônica, e a forma aguda pode ser fatal em poucos dias (Lim; Kim, 2014). Os primeiros sinais da leucemia podem ocorrer na cavidade oral, principalmente na fase aguda do câncer, que são caracterizados por sangramento gengival, hiperplasia, infecções oportunistas e alterações ósseas (Soares et al., 2023). Outras manifestações clínicas adquiridas no quadro da doença é o baixo número de glóbulos vermelhos que acarreta anemia, fadiga e fraqueza, o indivíduo ainda pode apresentar trombocitopenia associada à facilidade de hematomas e manchas vermelha na pele e leucopenia, causando febre e infecções frequentes (Francisconi et al., 2016; SY Cho; AC Cheng; MCK Cheng, 2000).

Quando diagnosticada, a primeira forma de tratamento da doença é a quimioterapia, que é dividido em fase da indução da remissão, consolidação e manutenção. Ainda que a quimioterapia apresente vários efeitos colaterais associados aos medicamentos utilizados, ao longo do tempo houve um aumento das taxas de

sobrevivência e uma melhora nas respostas pelos pacientes (Inaba; Mullighan, 2020; Kato; Manabe, 2018; Radadiya et al., 2020).

A indução da remissão, a primeira fase do tratamento, consiste em tentar reduzir a proliferação e provocar apoptose das células cancerígenas, restaurando a produção de células hematopoiéticas saudáveis. Para essa etapa do tratamento são administrados glicocorticoides (Prednisona ou Dexametasona), vincristine e L-asparaginase. Nesse período há forte incidência de reações adversas que resultam em alterações de doses ou descontinuação do tratamento convencional (Aldoss; Stein, 2018). Logo após, tem-se a fase de consolidação do tratamento em que são utilizados ciclofosfamida, citarabina/metotrexato e mercaptopurina, sendo o principal objetivo desse estágio, manter os baixos níveis de células cancerígenas, impedindo sua proliferação e intrusão do sistema nervoso central, mantendo o paciente em remissão. Para concluir, a fase de manutenção aplica doses menores e mais esparsas de metotrexato e diárias de mercaptopurina. Se houver recidiva do câncer durante a fase de consolidação e manutenção, o paciente é submetido a um intenso tratamento com os medicamentos da fase de indução a remissão (Inaba; Mullighan, 2020; Kato; Manabe, 2018; Tosta Pérez et al., 2023).

A terapia padrão de indução de remissão para LLA inclui L-asparaginase, uma enzima capaz de hidrolisar a L-asparagina em L-aspartato e amônia. A administração desse medicamento é justificada por uma característica importante quanto ao conteúdo gênico das células leucêmicas que se refere à expressão de asparagina sintetase (ASNS), uma aminotransferase responsável pela conversão de L-aspartato em L-asparagina. Dessa forma, as células leucêmicas não possuem atividade da asparagina sintetase e requerem asparagina exógena para sua proliferação (Chiu et al., 2020; Jiang; Batra; Zhang, 2021; Katharine S. Worton; Robert S. Kerbel; Irene L. Andrulis, 1991; Lazarus et al., 1969; LI et al., 2014). Desde sua descoberta e do seu potencial anticancerígeno, a L-asparaginase está sendo empregada nos tratamentos quimioterápicos de LLA com a finalidade da redução dos níveis séricos de L-asparagina, promovendo a apoptose das células cancerígenas pela falta desse aminoácido essencial para elas (Short; Kantarjian; Jabbour, 2021).

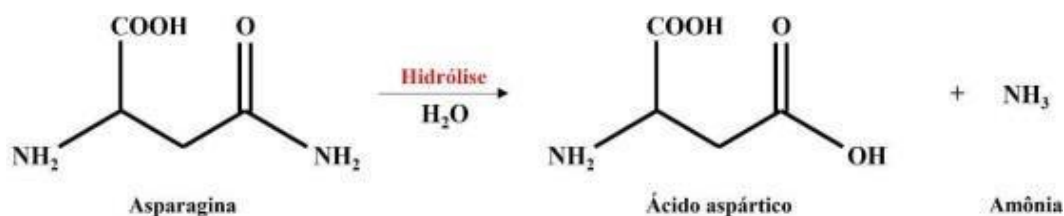
Mais de 85% das crianças com LLA sobrevivem sem recidivas após terapias contemporâneas, porém a sobrevivência após recidiva é baixa (Hunger; Raetz, 2020). Algumas reações adversas como hipersensibilidade, trombose, pancreatite e hepatite, podem ser apresentadas pelos pacientes tratados com L-asparaginase, o que pode levar à

alteração da dose ou interrupção do tratamento com a enzima (Hijiya; Van der Sluis, 2016; Lanvers-Kaminsky, 2017). Entretanto, a interrupção da L-asparaginase é um fator de péssimo prognóstico quanto à taxa de sobrevivência do paciente (Ishida et al., 2023).

1.3 L-asparaginases, L-asparagina características e aplicações.

As L-asparaginases (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1, L-ASNase) são enzimas da classe das hidrolases que catalisam a reação de hidrólise do aminoácido asparagina (Asn), produzindo o aminoácido L-aspartato (Asp) e amônia (NH_3) (Batoool et al., 2016). (Figura 1).

Figura 1- Hidrólise da L-asparagina



Fonte: a autora. Representação da reação de hidrólise da Asn.

A L-asparagina é um aminoácido polar, não carregado e considerado não-essencial para os humanos devido as células possuírem a capacidade para produzirem o aminoácido a partir de outros precursores, no qual, sua síntese é realizada pela enzima asparagina sintetase (Gaufichon et al., 2010). Além de ser importante como componente das estruturas primárias de diversas proteínas, a Asn possui relevante papel no metabolismo dos organismos, como ser ponto de glicosilação *N*-ligada em proteínas, ser utilizado como molécula para transporte e armazenamento de nitrogênio em plantas e exercer a função de regulação dos níveis de aminoácidos intracelulares. (Gaufichon; Rothstein; Suzuki, 2016; Krall et al., 2016; Sieciechowicz; Joy; Ireland, 1988; Steliarova-Foucher et al., 2017).

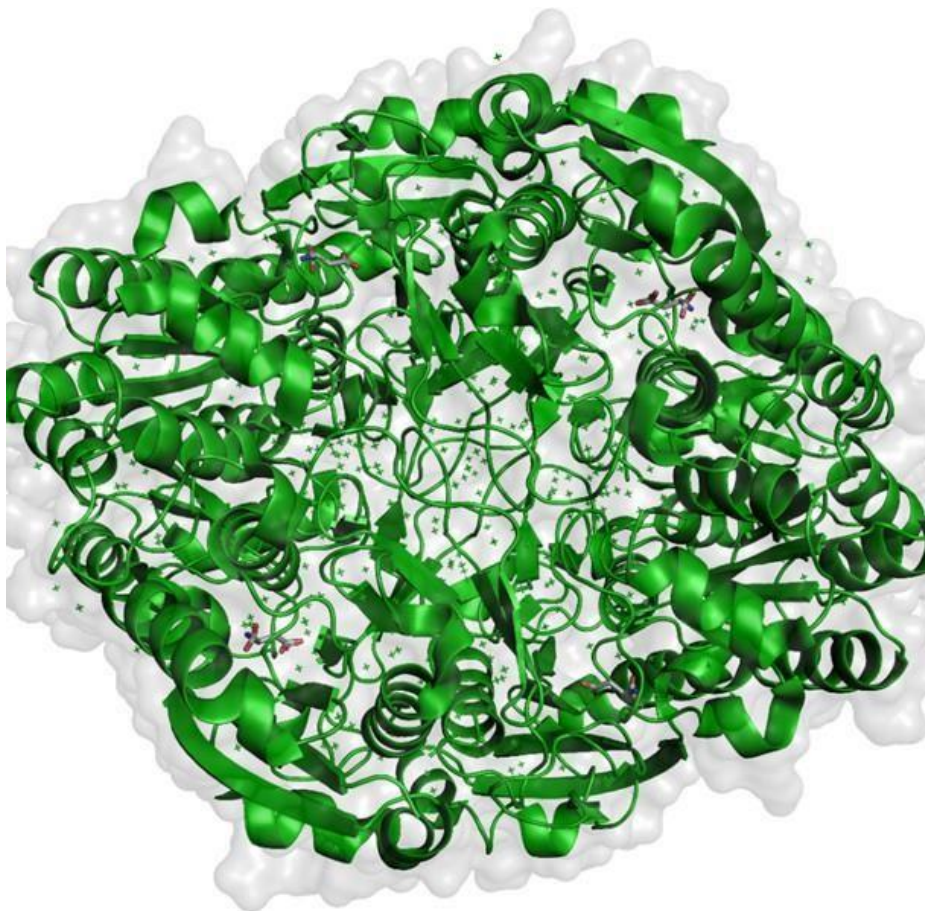
As L-ASNases também apresentam atividade catalítica contra outros aminoácidos e moléculas afins, como a L-glutamina (Gln), D-asparagina, D-glutamina, ácido succínico e o ácido β -hidroxamato L-aspartático, mas em níveis inferiores em relação à atividade asparaginásica (Cachumba et al., 2016; Lanvers et al., 2002; Lubkowski et al., 2020). Além dessas funções mencionadas, a asparagina está envolvida em reações e mecanismos

de interesse humano, especialmente na área da saúde e na indústria alimentícia. Um exemplo, é a presença desse aminoácido em alimentos superaquecidos (acima de 120° C), promovendo a formação da acrilamida, um composto tóxico, ocasionando efeitos cancerígenos e neurotóxicos, sendo formadas principalmente em pães, biscoitos, batatas e café, que são alimentos ricos em carboidratos e aminoácidos livres, principalmente a asparagina (Claus; Carle; Schieber, 2008; Da Cunha et al., 2019; Lea et al., 2007; Wang et al., 2021). A L-asparagina também participa de processos neoplásicos, no qual sua síntese e presença do microambiente tumoral favorece a proliferação das células malignas. Dessa forma, a inibição de asparagina sintetase e depleção dos níveis séricos da asparagina, reduzem o crescimento das células neoplásicas (Knott et al., 2018).

Tanto os microrganismos, como os vegetais e também os animais possuem a capacidade de produzir L-ASNases com eficiência catalítica variada. Na classificação atual que é baseada nas sequências dos aminoácidos, nas características bioquímicas, homologias estruturais e funcionais que consideram a diferenciação evolutiva, as L-ASNases são divididas em três grandes grupos: as classes 1, 2 e 3, a classe 1 é a antiga classe bacteriana, a classe 2 é antiga classe vegetal, e a 3 a de *Rhizobium etli*. (Da Silva et al., 2022). As L-ASNases de origem bacteriana, em geral, são subdivididas em tipos I, II e III (Jia et al., 2021).

Os dos tipos I e II diferem pela afinidade por Asn ou Gln e também pela localização celular. As L-ASNases bacterianas do tipo I são citosólicas, possuem afinidade reduzida pela Asn (K_M na faixa de milimolar), atividade glutaminásica específica alta e se apresenta na forma de dímeros em sua conformação nativa, com um sítio ativo. Já as bacterianas do tipo II são enzimas periplasmáticas ou associadas à membrana celular, possuindo alta afinidade pela Asn (K_M na faixa de milimolar). Baixa atividade glutaminática, apresentando-se como um homotetrâmero na sua forma nativa, possuindo quatro sítios ativos (Figura 2) (Castro et al., 2021; Yao et al., 2005). As L-ASNAases tipo III, são dímeros de heterodímeros (heterotetrâmeros) em sua forma nativa com subunidades designadas de α e β (Michalska; Hernandez-Santoyo; Jaskolski, 2008). Quanto as L-ASNases do tipo rizóbias, estão como homodímeros, assim como as L-ASNases bacterianas do tipo I, entretanto não possuem relação filogenética com as enzimas das outras duas classes (Loch et al., 2021).

Figura 2 – Estrutura tridimensional de L-asparaginase tipo 2 de *Escherichia coli*



Nota: Fonte: (SWAIN et al., 1993). Tetrâmero da L-asparaginase de *E. coli* com o produto da reação catalítica presente no sítio ativo. O aspartato está representado na figura com carbonos em branco. Cada monômero possui um sítio ativo, e é possível visualizar que cada um possui uma molécula de L-aspartato presente.

Como falado anteriormente, a presença da L-asparagina no ambiente tumoral propicia a proliferação das células malignas, dessa forma, em decorrência da alta afinidade pela Asn, as L-ASNases do tipo II são as mais estudadas e utilizadas para aplicação devido seu potencial anticancerígeno (Jalaja Vidya et al., 2011; Maria Celeste Emerick, 2017). Seu primeiro relato aconteceu no início do século XX, mas somente na década de 50 foi demonstrada sua capacidade de inibir a proliferação de linfocarcinoma e carcinoma mamário, uma vez que foi identificada no soro de porcos da Índia por Kidd (1953). Atualmente, têm-se duas L-asparaginases bacterianas do tipo II que se destacam no tratamento do câncer: *Escherichia coli* (EcAII) e *Dickeya chrysanthemi* (ErA) (Beckett; Gervais, 2019; Jalaja Vidya et al., 2011; Maria Celeste Emerick, 2017).

A asparaginase de *E. coli* (EcAII) possui 326 resíduos por monômero que se associam em uma estrutura quaternária de ~140 kDa (tamanho do tetrâmero). Essa característica é compartilhada por outras asparaginases homólogas, inclusive *D. chrysanthemi* (Batoool et al., 2016; Swain et al., 1993). Ao longo do tempo, algumas teorias a respeito do mecanismo de catálise das L-asparaginases foram formuladas e testadas utilizando a enzima de *E. coli* e por mais que não haja um detalhamento completamente exato do mecanismo de catálise das L-asparaginases, a obtenção de estruturas moleculares através de cristalografia de raios-X, estudos funcionais, experimentais e computacionais, foram capazes de estabelecer mecanismos de catálise mais prováveis para essas enzimas (Anishkin et al., 2015; Gesto et al., 2013; Schalk et al., 2016).

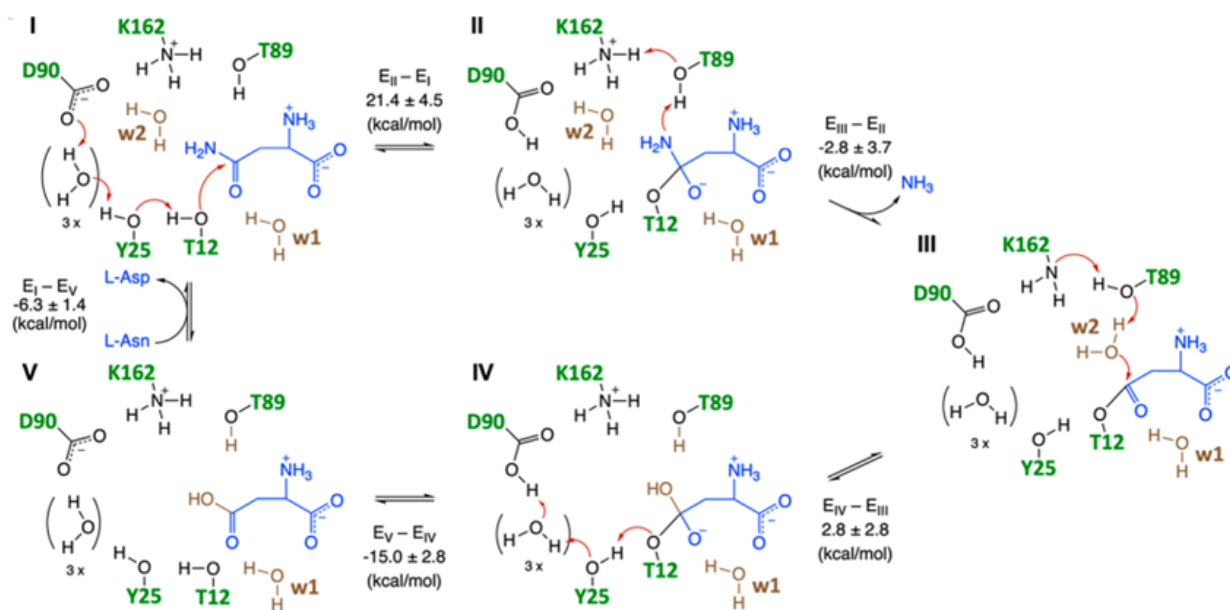
A estrutura em alta resolução de EcAII, foi publicada pela primeira vez em 1993, na qual, foi detalhado sua estrutura, em especial o sítio ativo (Figura 2). Por meio da co-cristalização da enzima interagindo com o ligante, foi possível indicar alguns aminoácidos presentes no sítio ativo como, Thr12, Ser58, Gln59, Thr89, Asp90, Ala114 e Glu283, sendo também possível a hipótese de catálise através de um ataque nucleofílico de um desses aminoácidos ao grupo β -amida da Asn (Swain et al., 1993). A partir desse momento, vários estudos *in silico* e *in vitro* foram desenvolvidos para esclarecer os mecanismos de catálise da EcAII, nos quais, foram descobertos outros resíduos de aminoácidos participantes da catálise (Tyr25, Lys162 e Asn248), de modo que esse processo catalítico também pode ser empregado para a maioria das outras L-ASNases (Anishkin et al., 2015; Lubkowski et al., 2020).

Duas teorias foram defendidas como prováveis mecanismos de ação dessas enzimas: a do desacoplamento único, ou direto, e a do desacoplamento duplo (ping-pong). A teoria do desacoplamento único, possui uma menor quantidade de passos para finalização do ciclo catalítico, de modo que ambas as moléculas de amônia e aspartato são liberadas juntas, sem qualquer ligação forte entre as moléculas e a enzima, não havendo formação de um intermediário (Gesto et al., 2013; Schalk et al., 2016).

Na segunda teoria, amônia e aspartato são liberados do sítio ativo da enzima em momentos distintos, sendo a principal diferença de uma teoria para outra, é que nesta existe a presença de um intermediário acil-enzima. Sendo a mais defendida, a teoria do desacoplamento duplo foi comprovada experimentalmente com estruturas de mutantes da asparaginase II de *E. coli*. Uma troca de elétrons é realizada entre o Asp90 e Thr12 através

de uma cadeia de 3 águas e a Tyr25 (Figura 3). Essa troca possibilita a ligação covalente entre a Thr12 e o substrato. Dessa forma, o substrato adquire um elétron do resíduo nucleofílico, Thr89, e a amônia é liberada da molécula para o meio, formando, assim, o intermediário acil-enzima. Sendo assim, o resíduo de treonina fica livre, ou seja, sem um átomo de hidrogênio, que permite receber um hidrogênio da Lys162, ficando com uma carga líquida neutra por instantes. A partir disso, uma água entra no processo e doa um elétron para Thr89, que devolve da Lys162, e a hidroxila restante da molécula de água é ligada ao substrato. Com isso, a ligação covalente com a Thr12 é enfraquecida, a qual obtém seu elétron novamente do Asp90 pela mesma cadeia de água e Tyr25. Isso retorna o resíduo de aspartato ao seu estado de carga líquida negativo, liberando o aspartato do sítio ativo. Dessa forma, a enzima é restabelecida para um novo ciclo de catálise (Lubkowski et al., 2020; Palm et al., 1996).

Figura 3 – Mecanismo de reação da L-asparaginase



Fonte: adaptado de Lubkowski et al. (2020). Representação do mecanismo de catálise das L-asparaginases bacterianas. (I) doação de um hidrogênio da Thr12 para o Asp90 e consequente formação de ligação covalente entre Thr12 e o substrato; (II) ataque nucleofílico realizado pela Thr89, a qual perde um hidrogênio para a amônia formada com o grupo amina do substrato. Esse hidrogênio da Thr89 é repostado com um doado pela Lys162, que fica com carga neutra. (III) a Lys162 recupera seu hidrogênio e a Thr89 obtém um de uma molécula de água. A hidroxila restante dessa molécula se liga ao substrato. (IV) a ligação da hidroxila ao substrato enfraquece a ligação covalente com a Thr12, a qual recupera seu hidrogênio do Asp90 e desfaz a ligação covalente. (V) desfeita a ligação covalente, a enzima encontra-se pronta para outro ciclo de catálise e o produto é liberado do sítio ativo.

Mediante a reação catalisada pelas L-ASNases, a maioria dos métodos utilizados para estimar sua atividade atuam através da medida de um dos produtos formados, aspartato ou amônia. O método colorimétrico no Nessler é um dos mais utilizados para a quantificação de atividade das L-ASNases, mediante a concentração de amônia, de modo que, o tetraiodomercurato (II) de potássio (K_2HgI_4), presente na solução do reagente de Nessler, irá reagir com NH_3 , produzindo uma substância coloidal de cor amarelada cuja absorbância a 436 nm pode ser medida em espectrofotômetro (IMADA et al., 1973; Sidney Shifrin; Catherine L Parrott, 1974; Simas et al., 2021).

Como foi mencionado anteriormente, duas L-asparaginases bacterianas do tipo II que se destacam no tratamento do câncer: *Escherichia coli* (EcAII) e *Dickeya chrysanthemi* (ErA). Ambas as enzimas bacterianas possuem ótima atividade catalítica e são consideradas modelos para o estudo e engenharia de enzimas aprimoradas, em especial a EcAII, devido a sua alta atividade específica, representada por um baixo valor de K_M e ótima estabilidade. Devido possuírem essas características, elas são habitualmente empregadas na combinação medicamentosa utilizada no tratamento quimioterápico da LLA. Diferentes fabricantes produzem a enzima comercial com diferentes níveis de pureza e atividade (Schnuchel et al., 2023). No Brasil, ainda não há a produção desse medicamento, sendo adquirido por importação, de modo que se houver emergências pode gerar desabastecimento. Uma das dificuldades que já prejudicou pacientes durante um certo período foi a troca de fabricantes desse medicamento, visto que uma nova marca (Leuginase[®]), que substituiu Aginasa[®] e Eslpar[®], não apresentou eficiência terapêutica esperada e manifestando uma maior imunogenicidade (Michalowski et al., 2021). Contudo, diversos efeitos colaterais decorreram dessa administração dessas L-asparaginases. Essas reações ocorreram por fatores como, a imunogenicidade e atividade residual elevada contra L-glutamina. Essas razões interferem no tratamento e resposta do paciente, de modo que a gravidade dos efeitos colaterais pode inviabilizar o uso dessas enzimas (Baral et al., 2021; Barbosa et al., 2019; Beckett; Gervais, 2019; Burke; Zalewska-Szewczyk, 2022).

O termo imunogenicidade se refere a capacidade de um patógeno ou substância danosa, como uma proteína, induzir uma resposta de defesa específica quando exposta ao sistema imune (Darren R. Flower, 2007). Proteínas usadas em terapias medicamentosas podem possuir um certo potencial imunogênico, ocasionando prejuízos e redução na eficiência do tratamento (Ahmad; Eweida; El-Sayed, 2016; Wan, 2016). Além da

imunogenicidade, sua administração pode causar efeitos adversos, como reações de hipersensibilidades tipo anafilaxia, ou seja, reação alérgica aguda, acompanhada de edema, febre e urticária (Albertsen et al., 2002; Woo et al., 2000). Esses sintomas acontecem em cerca de 30% dos pacientes que utilizaram a enzima de *E. coli*, principalmente durante os regimes terapêuticos de reindução e intensificação (Eduard H. Panosyan et al., 2004). Pensado nisso, a busca por enzimas substitutas que não estimulem reações de hipersensibilidade e outros efeitos colaterais levou a elaboração da PEG-Asparaginase de *E. coli*, que apresenta menor imunogenicidade, mas não tanto suficiente para eliminar as reações adversas que os pacientes manifestam (Hijiya; Van der Sluis, 2016; Lanvers-Kaminsky, 2017). Devido essas razões, a comunidade científica trabalha em busca de outras fontes de L-asparaginase que produzam enzimas que possam substituir as comercializadas atualmente (Beulah; Hemalatha, 2019; Dias; Santos Aguilar; Sato, 2019; Izadpanah Qeshmi et al., 2018).

Uma potencial alternativa para essa problemática é a L-ASNase do tipo II de *Bacillus subtilis* (BsAII), que vêm atraindo mais atenção recentemente por apresentar condições de atuação, como o pH ideal próximo da neutralidade e temperatura ideal para sua atividade, similares à enzima de *E. coli*, embora apresente uma afinidade pelo substrato mais baixa (K_M maior) (Jia et al., 2013; Onishi et al., 2011).

1.3.1 L-asparaginases bacterianas e importância da cristalização de enzimas para aplicações no desenvolvimento de biofármacos

As bactérias são fontes ricas de L-ASNases, possuindo interesse médico considerável devido a possibilidade de controle do carbono e nitrogênio, temperatura, pH, e níveis de oxigênio. Também é importante o estudo dos fatores bioquímicos e farmacológicos já que são eles que influenciam a presença de atividade antileucêmica (Sanches; Krauchenco; Polikarpov, 2007; Vidya et al., 2017). Alguns trabalhos evidenciam o isolamento da L-ASNase com atividade anticâncer a partir de diferentes espécies bacterianas (Tabela 1).

Tabela 1 – Bactérias gram-negativas e gram-positivas produtoras de L-ASNases.

Bactérias gram-negativas	Referência	Bactérias gram-positivas	Referência
<i>Citrobacter sp.</i>	BASCOMB <i>et al.</i> , 1975	<i>Bacillus subtilis</i>	FISHER <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i>	NETRVAL, 1977	<i>Bacillus circulans</i>	HYMAVATHI <i>et al.</i> , 2009
<i>E. chrysanthemi</i>	MOOLA <i>et al.</i> , 1994	<i>Streptococcus albus</i>	REDDY <i>et al.</i> , 1990
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	REDDY <i>et al.</i> , 1990	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	MESAS <i>et al.</i> , 1990
<i>Zymomonas mobilis</i>	PINHEIRO <i>et al.</i> , 2001		

Fonte: a autora, adaptado de BATOOL *et al.*, 2016.

Como já mencionado, as L-ASNases bacterianas são classificadas em dois subtipos, I e II. Como exemplo de L-ASNases do tipo II, temos a codificada pelo gene *ansB*, em *Escherichia coli*, e pelo gene *ansZ* pela gram-positiva *Bacillus subtilis*. Essas, possuem um K_m aparente na ordem micromolar (μM), apresentando uma alta afinidade pelo substrato e alta atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* relatada, em razão disso elas são empregadas nas formulações de quimioterápicos para tratamento da leucemia, atuando junto com outros fármacos como a vincristina e os glicocorticoides (Kotzia; Labrou, 2007; Yun *et al.*, 2007).

A produção dessas enzimas para indústria farmacêutica são desenvolvidas com a utilização da tecnologia do DNA recombinante, que possibilita a obtenção de resultados mais rápidos e precisos, aumentando principalmente o nível de produção (Aditya M. Nair; Anslet Mary; Saanya Yadav, 2021). A técnica do DNA recombinante baseia-se na inserção de sequências gênicas codificadoras em vetores de clonagem, de modo que esse vetor seja transferido a uma plataforma de expressão, isto é, um organismo hospedeiro que poderá multiplicar o vetor ou expressar a proteína de interesse (Aditya M. Nair; Anslet Mary; Saanya Yadav, 2021).

A partir da obtenção da proteína de interesse, é possível sua cristalização, etapa fundamental para o estudo detalhado de sua estrutura molecular, de modo que existe um crescente interesse no desenvolvimento de formulações cristalinas de proteínas confiáveis para aplicações médicas e biotecnológicas. Apesar da cristalização de proteínas ser um

processo complexo e influenciado por inúmeros fatores que governam a nucleação e o crescimento cristalino, estratégias inovadoras são desenvolvidas para enfrentar os desafios associados à formulação de partículas cristalinas em larga escala, particularmente para proteínas frágeis, terapêuticas e de relevância industrial (Jaison et al., 2025).

A manipulação e o aproveitamento de cristais de proteínas para o desenvolvimento de biofármacos estáveis têm apresentado avanços significativos, embora ainda persistam incertezas quanto à formação final da estrutura cristalina funcional. Além disso, investigações científicas e estratégias de otimização estrutural estão sendo direcionadas para a engenharia de sistemas proteicos com a finalidade de superar as limitações tradicionais de formação de cristais (Jaison et al., 2025).

2 JUSTIFICATIVA

Em uma perspectiva mundial do sistema público de saúde brasileiro (SUS), o governo federal pode atuar como comprador ativo no mercado de medicamentos, dessa forma, com o aumento das negociações dos preços e a aquisição desses produtos por instituições governamentais, é estabelecido acesso para instalação de Parcerias de Desenvolvimento Produtivo (PDP), no qual o objetivo é mediar a transferência de tecnologia necessária ao desenvolvimento e fabricação nacional de medicamento para o SUS (Denis Borges Barbosa, 2013). Essa estratégia tem como intuito mitigar a necessidade que o governo estiver passando, através do incentivo da produção nacional de medicamentos. Esse método diminuiria a vulnerabilidade do país, no que se refere aos custos e burocracias do abastecimento de produtos de saúde à população e dependência da produtividade dos laboratórios internacionais.

À vista disso, a L-asparaginase II é uma proteína terapêutica utilizada no tratamento da Leucemia Linfóide Aguda, de modo que, sua principal formulação utilizada nos tratamentos quimioterápicos é oriunda da bactéria, *Escherichia coli*, que mesmo sendo eficiente, pode causar efeitos de hipersensibilidade (Müller, 1998; Rosano; Ceccarelli, 2014; Ulu; Ates, 2017). Até o final de 2013, 104 projetos de PDP receberam aprovação de comitê especializado do Ministério da Saúde, sendo que 16 eram referentes a medicamentos oncoaterápicos, inclusive a L-ASNase II (Sundfeld; Souza, 2013). Embora

houvesse tentativas para nacionalização da produção para garantir o abastecimento nacional, o projeto de PDP da L-ASNase está caminhando a passos lentos desde 2014 (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2020). Apesar da importância do medicamento, a oferta de L-asparaginase não tem suprido a demanda imposta pelo mercado brasileiro. Em um estudo realizado na América Latina, foi observado no período entre 2010 e 2024, 578 pacientes com LLA, no qual 65,7% desse número são do Brasil (Silva et al., 2025). Outro estudo realizado na população pediátrica de Hong Kong com LLA e que era submetida ao tratamento com L-asparaginase, foi possível observar custos de tratamentos que variaram em média de R\$11.000 à R\$431.736, essa variação nos valores variaram de acordo com os pacientes, se eram de baixo ou intermediário grau de risco, se precisaram de doses adicionais da medicação, se era L-asparaginase ou PEG-asparaginase ou ainda se os pacientes apresentaram hipersensibilidade ou reação adversa à L-asparaginase (JTS Li; CK Li; F Cheng, 2022).

A partir disso, o Brasil passa por desafios burocráticos na aquisição da L-ASNases II, gerando crise de abastecimento e impactos negativos nos protocolos de tratamento dos pacientes atingidos por leucemias, visto que seu uso é fundamental para sobrevida em casos mais graves. Para tentar amenizar a situação, o governo brasileiro começou a fornecer através do SUS a Leuginase[®], um biofármaco de origem chinesa, contendo um melhor preço. Entretanto, casos de baixa eficiência e insatisfação da comunidade médica, geraram debates entre os oncologistas e o governo brasileiro sobre sua utilização, levando a seu afastamento do mercado nacional (Zenatti et al., 2018). Assim, é imprescindível que o Brasil administre as etapas de produção deste biofármaco, além disso é necessários a busca de L-asparaginases de novas fontes com propriedades e imunogenicidade melhoradas.

Com base nas informações anteriores, este trabalho justifica-se sobre a proposta de produzir e caracterizar bioquimicamente a L-ASNases II de *Bacillus subtilis*, como etapa preliminar para avaliação de sua eficiência como biofármaco antineoplásico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar as propriedades bioquímicas e terapêuticas da L-asparaginase II recombinante de *Bacillus subtilis*, fazendo uma comparação com a enzima comercial de *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos Específicos

- Expressar e purificar as L-ASNases II de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.
- Determinar a temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e parâmetros cinéticos das L-ASNases.
- Avaliar a atividade citotóxica das L-ASNases em linhagens de células tumorais e determinar a CI₅₀.
- Avaliar e comparar a imunogenicidade das L-asparaginases de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.
- Cristalizar e determinar a estrutura tridimensional da L-ASNase de *Bacillus subtilis*.

4 METODOLOGIA

4.1 Clonagem Molecular

O gene *ansZ* foi amplificado por PCR utilizando DNA cromossômico de *Bacillus subtilis* 168 (ATCC 23857) como molde. Os primers 5'-ATATGCTAGCCCTGAAACAAAAGAATCC-3' (direto) e 5'-ATCGGATCCTTAATACTCATTGAAATAAGC-3' (reverso) foram projetados para flanquear a sequência de interesse de Asp-Z, excluindo a sequência do peptídeo sinal nativo (aminoácidos 1–23) e introduzindo sítios de restrição *NheI* e *BamHI* (sublinhados). O gene amplificado foi digerido e ligado ao vetor pET-28a(+) para gerar a construção *ansZ*-pET-28a, que foi então transformada em células de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta por choque térmico. Uma abordagem semelhante foi utilizada para a clonagem do gene *ansB* de *E. coli* (Asp-B), empregando os primers 5'-AGTATGCTAGCTTACCCAATATCACCATT-3' e 5'-ATCGGATCCTTAGTACTGATTGAAGAT-3', que contêm os mesmos sítios de restrição e também excluem a sequência do peptídeo sinal nativo (aminoácidos 1–22). Nesse sistema de expressão, o vetor pET-28a direciona a expressão intracelular, produzindo enzimas recombinantes com uma extensão N-terminal de 23 aminoácidos contendo uma sequência 6xHis e um sítio de clivagem para trombina (Figura 7). Como essa sequência não interferiu na atividade enzimática ou no correto enovelamento da proteína, ela não foi removida após a purificação.

4.2 Expressão heteróloga em sistema bacteriano

Colônias de *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta abrigando construções *ansB*-pET-28a e *ansZ*-pET-28a foram inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol (34 µg/mL) e canamicina (40 µg/mL) e incubadas durante a noite a 37°C sob agitação a 200 rpm. A cultura noturna foi utilizada para inocular 500 mL de meio LB contendo os mesmos antibióticos, que foi incubado a 37 °C e 230 rpm até atingir uma densidade óptica (DO600) de 0,6. A expressão proteica foi induzida pela adição de 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), seguida de incubação a 17 °C, overnight. A cultura foi então centrifugada a 8.000 × g durante 10 minutos, e o sedimento bacteriano resultante foi coletado para processamento posterior.

4.3 Purificação da L-asparaginase recombinante

O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 15 mL de tampão de lise (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0) suplementado com 1% de Triton X-100 e 1 mM de PMSF. A ruptura celular foi realizada utilizando um sonicador QSonica Q700 equipado com uma microponteira, aplicando pulsos de 20 s ON e 40 s OFF durante 20 min com amplitude de 30%. A fração solúvel foi recuperada por centrifugação a $10.000 \times g$ durante 30 minutos a 4 °C e filtrada através de uma membrana de 0,22 μm para remoção de detritos celulares. O lisado clarificado foi submetido à cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) utilizando uma coluna de níquel-sepharose de 1 mL (HisTrap HP, Cytiva) em um sistema Äkta Pure 25 (Cytiva®) a uma vazão de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Após a equilibração da coluna com o tampão de lise, as proteínas foram retidas seletivamente e os contaminantes foram removidos por lavagem com 20 volumes de coluna de tampão de lise contendo 20 mM de imidazol. As proteínas ligadas foram então eluídas utilizando o mesmo tampão contendo 300 mM de imidazol, e as frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE (12,5%) para avaliar a pureza. As frações contendo as enzimas purificadas foram dialisadas contra tampão Tris 50 mM e NaCl 300 mM para remover o imidazol. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando um espectrofotômetro Nanodrop® a 280 nm, e as concentrações foram determinadas com base no coeficiente de extinção molar de cada enzima (Asp-B: $23.505 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Asp-Z: $16.390 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A proteína eluída foi analisada por SDS-PAGE e Western Blot utilizando um anticorpo anti-His tag (Sigma-Aldrich®, A5588) e um anticorpo anti-asparaginase de *E. coli* (Biorbyt® orb20991), seguindo protocolos padrão. A massa molecular nativa das enzimas foi determinada por filtração em gel em uma coluna Sephacryl S-200 HR 16/60 acoplada a um sistema Akta (Cytiva). Uma alíquota de 200 μL contendo 0,5 mg/mL de Asp-Z ou Asp-B, dissolvida em tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 300 mM NaCl), foi aplicada na matriz e a proteína foi eluída a uma vazão de $0,50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ utilizando eluição isocrática. Álcool desidrogenase (150 kDa), conalbumina (75 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e albumina de ovo (44 kDa) foram utilizadas como padrões de proteína. Para avaliar a distribuição das proteínas recombinantes ao longo do processo de purificação, os lisados bacterianos foram separados em frações solúveis e insolúveis. Amostras dessas frações, bem como de cada

etapa subsequente de IMAC, foram analisadas por SDS-PAGE a 12,5% e quantificadas utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, nº 23227).

4.4 Comparação das estruturas primárias de Asp-Z e Asp-B

As sequências primárias de Asp-Z e Asp-B foram alinhadas para comparar regiões homólogas e identificar resíduos-chave. A ferramenta de alinhamento de múltiplas sequências Multalin (Corpet, 1988) foi usada para realizar o alinhamento das sequências e preparar a imagem resultante.

4.5 Dicroísmo Circular

Para determinar o estado de dobramento e a temperatura de fusão (T_m) de Asp-Z e Asp-B, foi utilizado um espectropolarímetro Jasco® J-815 (Jasco International Co., Japão). Antes da análise, as enzimas foram dialisadas contra tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,0) e diluídas para uma concentração final de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Asp-Z e Asp-B foram analisadas na região do ultravioleta distante (190–240 nm) utilizando uma cubeta com caminho óptico de 5 mm, largura de banda de 1 nm e velocidade de varredura de $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ a 20°C . O espectro do tampão foi utilizado para correção da linha de base. Para a determinação de T_m , as medições foram realizadas a 220 nm em uma faixa de temperatura de 20–95 $^\circ\text{C}$, com velocidade de varredura de $3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Os dados obtidos foram analisados usando o algoritmo SELCON3, com o conjunto de dados 4 como referência, no servidor web DichroWeb (Sreerama; Woody, 1993; Sreerama; Venyaminov; Woody, 2000; Whitmore; Wallace, 2008).

4.6 Atividade enzimática

A atividade da L-asparaginase foi medida utilizando o método de Nesslerização, baseado em relatos anteriores com pequenas adaptações (Gomes et al., 2024; Magri et al., 2018; Shifrin; Parrott; Luborsky, 1974). Para a medição da atividade, 50 μL de cada enzima foram incubados em 700 μL de tampão Tris 50 mM, NaCl 300 mM (pH 8,0) e 250 μL de asparagina 94,5 mM por 30 minutos a 37°C . Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M. Em seguida, 125 μL da mistura reacional foram adicionados a uma solução contendo 1,75 mL de água destilada e 125 μL do reagente de Nessler. A absorbância foi medida a 436 nm utilizando

um espectrofotômetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, salvo indicação em contrário. A concentração de amônio liberado pela reação enzimática foi determinada por regressão linear usando uma curva padrão de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) com concentrações variando de 0,375 a 12 mM. Uma unidade (U) de atividade enzimática da L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de amônia por minuto a 37 °C.

Alternativamente, a atividade enzimática foi medida usando o método Indooxina, baseado em protocolos descritos anteriormente com pequenas adaptações (Magri et al., 2018). Resumidamente, 10 μL de L-aspartil β-hidroxamato (AHA) 20 mM preparado em tampão Tris 50 mM (pH 8,0) contendo NaCl 0,3 M foram misturados com 180 μL do mesmo tampão (concentração final de AHA: 1 mM). Posteriormente, 10 μL de solução enzimática foram adicionados à mistura. As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, 40 μL da mistura reacional foram transferidos para 160 μL de solução de 8-hidroxiquinolina (preparada na proporção de 1:3 em volume de 2% (p/v) de 8-hidroxiquinolina em etanol 100% e Na₂CO₃ 1 M), seguida de incubação a 100 °C por 1 minuto para permitir o desenvolvimento da cor. A absorbância foi medida a 710 nm usando um leitor de microplacas. A atividade enzimática foi calculada quantificando-se o produto da reação usando seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 17.000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) a 710 nm (Derst; Henseling; Röhm, 2000). Uma unidade (U) de atividade de ASNase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de indooxina por minuto a 37 °C.

4.7 Efeitos da variação de pH e temperatura na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado utilizando o ensaio colorimétrico de Nessler, seguindo o protocolo descrito na Seção 4.6. Para este ensaio, as enzimas foram incubadas em diferentes soluções tampão com valores de pH variando de 2,6 a 10,0, utilizando-se tampão citrato-fosfato (0,3 M) para pH 2,6 a 8,0, tampão Tris-HCl (50 mM) para pH 8,0 a 9,0 e tampão glicina (50 mM) para pH 9,0 a 10,0. A temperatura ótima para a atividade enzimática foi determinada utilizando o mesmo método, com a mistura reacional incubada em temperaturas variando de 30 °C a 70 °C, em pH 7,4. A termoestabilidade da enzima foi avaliada incubando-se as enzimas a 60 °C por diferentes intervalos de tempo, e a atividade enzimática foi medida em cada ponto de

tempo seguindo o protocolo descrito na Seção 4.6. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8 Estudos de cinética e inativação enzimática

As propriedades cinéticas foram determinadas por meio do ensaio com indooxina e do ensaio de Nesslerização, conforme os respectivos métodos. Os parâmetros cinéticos das enzimas foram determinados em duas temperaturas, 37 °C e 55 °C, com base em um método previamente descrito com adaptações (Gomes et al., 2024). O ensaio com indooxina foi empregado devido à sua maior sensibilidade. As reações foram realizadas utilizando concentrações variáveis de AHA, mantendo-se a concentração da enzima constante. A Asp-B foi utilizada em concentrações finais de 2,5 nM a 37 °C e 1,25 nM a 55 °C, enquanto a Asp-Z foi utilizada a 5,0 nM em ambas as condições. Todas as reações foram realizadas em pH 7,4 em tampão fosfato de sódio 50 mM. As concentrações de AHA variaram de 10 µM a 1 mM para Asp-B e Asp-Z a 37 °C, e de 10 µM a 1,5 mM para Asp-B e Asp-Z a 55 °C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados resultantes foram ajustados à equação de Michaelis-Menten usando o software SigrafW (Leone et al., 2005), e os gráficos foram gerados usando o GraphPad Prism versão 8.0.

No ensaio de Nessler, os parâmetros cinéticos das enzimas foram determinados em duas temperaturas, 37°C e 55°C, seguindo um método relatado anteriormente com adaptações (Gomes et al., 2024). Diferentes concentrações de L-asparagina foram usadas, mantendo uma concentração fixa de enzima de 0,5 µM para ambas as enzimas e nas duas temperaturas, exceto para Asp-Z a 37° C que foi ajustando a concentração de 1,0 µM. As reações foram conduzidas em pH 7,4 usando tampão de fosfato de sódio 50 mM. As concentrações finais de L-asparagina a 37°C variaram de 0,25 a 10 mM para Asp-B e 0,125 a 14 mM para Asp-Z. A 55°C, as concentrações de L-asparagina variaram de 0,125 a 16 mM para Asp-B e 0,125 a 20 mM para Asp-Z. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os dados obtidos foram ajustados à equação de Michaelis Menten usando o software SigrafW (Leone et al., 2005), enquanto os dados foram plotados usando o software GraphPad Prism versão 8.0. Além disso, para avaliar a atividade não específica da glutaminase, 8 µM de cada enzima foi incubado com L-glutamina em concentrações de 10 e 20 mM, seguindo o ensaio de Nesslerização descrito na Seção 4.6. A atividade específica foi calculada em unidades por miligrama de proteína (U/mg), usando a massa molecular dos monômeros da proteína para os cálculos.

A dependência da enzima em relação aos metais foi avaliada seguindo um protocolo previamente relatado com pequenas adaptações (Gomes et al., 2024). Resumidamente, Asp-B e Asp-Z foram incubados por 1 h a 4 °C com MnCl_2 , CuSO_4 , $\text{C}_2\text{H}_3\text{LiO}_2$, NiSO_4 , KCl , CaCl_2 , NaCl e MgCl_2 . Todos os reagentes foram utilizados na concentração final de 10 mM em tampão Tris 50 mM (pH 8,0). As enzimas Asp-B e Asp-Z foram utilizadas nas concentrações finais de 25 nM e 100 nM, respectivamente. Antes do experimento, ambas as enzimas foram extensivamente dialisadas contra tampão Tris 50 mM (pH 8,0) para remover os sais residuais. Além disso, para avaliar a influência de potenciais interferentes na atividade enzimática, ureia (2 mM), EDTA (2 mM) e β -mercaptoetanol (7 mM) também foram incubados com Asp-B e Asp-Z nas mesmas concentrações enzimáticas descritas acima. A atividade enzimática foi posteriormente medida a 55 °C utilizando o método da indoxina descrito na Seção 4.6.

4.9 Ensaio de viabilidade celular

A atividade antiproliferativa de Asp-B e Asp-Z em células tumorais foi avaliada utilizando um ensaio colorimétrico baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cristais de formazan púrpura por células metabolicamente ativas (Mosmann, 1983). As linhagens de células tumorais utilizadas neste estudo foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As linhagens de células tumorais RAJI (linfoma de Burkitt), JURKAT (leucemia linfoblástica aguda) e K562 (leucemia mieloide crônica) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U mL^{-1} de penicilina e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2 . Essas linhagens celulares foram selecionadas com base em seus níveis de expressão da asparagina sintetase (ASNS), sendo que RAJI e JURKAT exibem expressão de ASNS consideravelmente menor do que K562, em concordância com estudos anteriores (Irina et al., 2004; LI et al., 2014; Pontén; Jirstrom; Uhlen, 2008; Uhlen et al., 2017) e confirmado por experimentos de PCR em tempo real (Figura 12). Para o ensaio MTT, as células foram semeadas em placas de 96 poços a 4×10^5 células mL^{-1} para RAJI e JURKAT e 3×10^5 células mL^{-1} para K562. Asp-Z e Asp-B foram diluídos em meio RPMI e adicionados aos poços em concentrações finais variando de 1,9 a 250 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas por 72 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após a incubação, 20 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço, seguidos por uma incubação adicional de 4 horas. As placas

foram então centrifugadas e os cristais de formazan foram dissolvidos em 150 μL de DMSO. A absorbância foi medida a 570 nm. Os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) para cada amostra foram calculados por regressão não linear com base nos valores de absorbância medidos, utilizando o software GraphPad Prism® 8.0. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata em três experimentos independentes.

4.10 Previsão de imunogenicidade *in silico*

A imunogenicidade de Asp-B e Asp-Z foi prevista e comparada usando ferramentas online disponíveis no Banco de Dados de Epítomos Imunológicos (IEDB). Para esta análise, foram utilizadas as sequências completas das proteínas recombinantes. A previsão de epítomos de MHC classe II foi realizada usando o NetMHCIIpan 4.1 EL, selecionando os alelos HLA-DRB107:01, HLA-DQA102:01 e HLA-DQB1*02:02, pois eles foram associados a reações adversas relacionadas à asparaginase (Fernandez et al., 2014; Kutszegi et al., 2017; Reynisson et al., 2020). Nesta ferramenta, pontuações mais baixas indicam maior imunogenicidade. Para a previsão de epítomos de células T CD4, a análise focou em HLA-DRB1*07:01, seguindo o método descrito por (Dhanda et al., 2018), onde pontuações mais altas indicam maior imunogenicidade. A previsão de epítomos de células B foi conduzida usando o Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 (Jespersen et al., 2017). Adicionalmente, a predição de epítomos de anticorpos baseada em estrutura foi realizada utilizando o DiscoTope 2.0 (Kringelum et al., 2012) com o modelo estrutural Asp-Z (PDB ID 9BAD) e a estrutura cristalográfica Asp-B (PDB ID: 3ECA). Limiares padrão foram aplicados para todas as ferramentas, exceto para a predição de epítomos de MHC classe II, na qual apenas percentis ≤ 1 foram considerados na análise.

4.11 Obtenção de cristais e determinação da estrutura:

Inicialmente, a Asp-Z pura foi concentrada a 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em Tris 50 mM, pH 8, e centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 min a 4 °C. A enzima concentrada foi então utilizada para o crescimento de cristais através do método de difusão de vapor em gota suspensa (Jancarik; Kim, 1991). A triagem de cristalização foi realizada utilizando o kit JBScreen Wizard (Jena Bioscience, Alemanha) misturando 1 μL de proteína pura com 1 μL de solução de cristalização e pipetando 300 μL no reservatório em placas VDX a 293 K. Os

cristais foram obtidos em HEPES 0,1 M (pH 8,0), NaCl 0,1 M e PEG 400 25% (v/v) seguindo os mesmos procedimentos. Todos os cristais adequados foram criopreservados em glicerol a 25% e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido usando alças metálicas. A coleta de dados de difração de raios X foi realizada na linha de luz MANACÁ do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) em um comprimento de onda de 0,97718 Å, utilizando um detector (PILATUS 2M) a 125 mm do cristal. Um conjunto de 3600 imagens (oscilação de 0,1°) foi registrado. Os dados obtidos foram processados utilizando o pipeline MncAutoProc, que incorpora XDS, CCP4 e PHENIX (Kabsch, 2010; Liebschner et al., 2019; Winn et al., 2011). O refinamento molecular por substituição foi realizado utilizando o MOLREP (Vagin; Teplyakov, 1997) com um modelo de Asp-Z obtido a partir de sua estrutura primária utilizando o Alphafold 2 (Mirdita et al., 2022). Uma reconstrução inicial automática foi realizada com o BUCCANEER (Cowtan, 2006). Os refinamentos posicionais foram conduzidos utilizando o COOT, enquanto os refinamentos restritos foram realizados utilizando o REFMAC5 (Emsley; Cowtan, 2004; Murshudov; Vagin; Dodson, 1997). A estereoquímica da estrutura de Asp-Z foi avaliada usando análise do gráfico de Ramachandran pelo Molprobity, que permitiu a avaliação dos ângulos phi e psi, bem como o RMSD das ligações (Chen et al., 2010). As figuras da estrutura resolvida final foram geradas usando PyMOL (Schrödinger) (Delano, 2002). As coordenadas atômicas para a estrutura tridimensional de Asp-Z foram depositadas no Protein Data Bank (PDB) com o código 9BAD.

4.12 Simulações de acoplamento molecular e alinhamento estrutural

Simulações de acoplamento molecular foram realizadas para Asp-Z (PDB ID: 9BAD) e Asp-B (PDB ID: 3ECA) (Swain et al., 1993) usando o AutoDock Vina (Trott; Olson, 2010). Os preparos da proteína e do ligante L-asparagina foram conduzidos usando o AutoDock Tools 1.5.7. Os parâmetros da caixa de grade para Asp-Z foram definidos com coordenadas centrais (X: 13,694, Y: -34,667, Z: -12,167) e dimensões (X: 10, Y: 10, Z: 12). Para Asp-B, as dimensões da caixa de grade permaneceram as mesmas, mas as coordenadas centrais foram ajustadas para X: 72,833, Y: 16,792, Z: 35,750. Esses parâmetros foram validados inicialmente por redocking. O parâmetro de exaustividade do acoplamento foi definido como 8 para ambas as proteínas. As simulações de acoplamento molecular foram executadas usando o AutoDock Vina, mantendo a proteína

rígida e permitindo a flexibilidade do ligante, e as interações proteína-ligante resultantes foram analisadas usando o PyMOL.

4.13 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram plotados e analisados utilizando o GraphPad Prism, versão 8.0. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o Student's t-test e/ou ANOVA de uma via, com $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Expressão e purificação das enzimas recombinantes Asp-B e Asp-Z

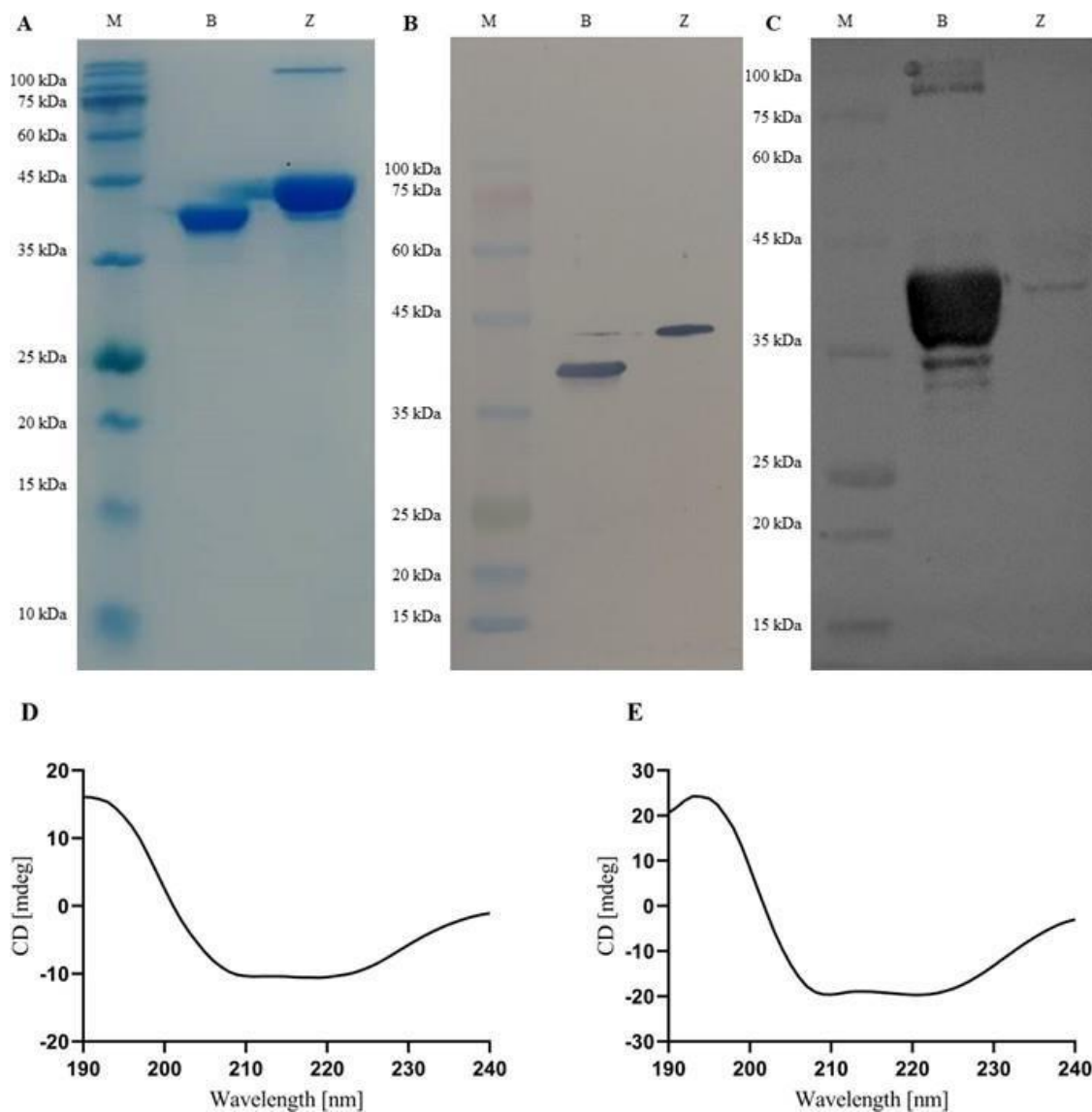
As condições de expressão produziram com sucesso proteínas solúveis, que foram purificadas em uma única etapa cromatográfica utilizando cromatografia de afinidade com Ni^{2+} (Figura 4A). A Tabela 2 resume as atividades enzimáticas e os parâmetros de purificação da L-asparaginase de *B. subtilis* (Asp-Z) e de *E. coli* (Asp-B) antes e depois da cromatografia (Figuras 5A e 5B). Após a purificação, Asp-Z foi obtida com uma concentração final de $2,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e Asp-B com $2,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ambas as enzimas mantiveram sua atividade catalítica, com o processo de purificação resultando em um aumento de aproximadamente 11 vezes na pureza e uma recuperação de 60% do rendimento proteico. A massa molecular calculada de Asp-Z foi de $39.915,73 \text{ g/mol}$ e a de Asp-B foi de $37.046,57 \text{ g/mol}$. Ambos os valores incluem uma sequência N-terminal de 23 aminoácidos contendo uma sequência de seis histidinas (*His-tag*), introduzida por meio de expressão recombinante utilizando o plasmídeo pET28a (Figura 7). No entanto, em suas formas tetraméricas nativas, Asp-Z e Asp-B exibiram massas moleculares aparentes de aproximadamente 160 kDa e 150 kDa, respectivamente (Figura 6). Além disso, a espectroscopia de dicroísmo circular (DC) confirmou que ambas as proteínas estavam corretamente enoveladas (Figuras 4D e 4E). A presença de Asp-Z e Asp-B nas amostras purificadas foi verificada por Western blotting utilizando um anticorpo anti-His (Figura 4B). Para avaliar a antigenicidade cruzada, o ensaio de Western blotting foi realizado utilizando um anticorpo policlonal anti-L-asparaginase de *E. coli*. Asp-Z exibiu um sinal notavelmente fraco em comparação com Asp-B (Figura 4C), o que é consistente

com a divergência antigênica esperada entre as enzimas de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. A diferença observada no reconhecimento de anticorpos provavelmente reflete a variação na sequência primária entre as duas enzimas e pode indicar um menor grau de reatividade cruzada entre elas, corroborando a presença de perfis antigênicos distintos para as duas L-asparaginases.

Tabela 2 - Parâmetros de purificação para Asp-B e Asp-Z.

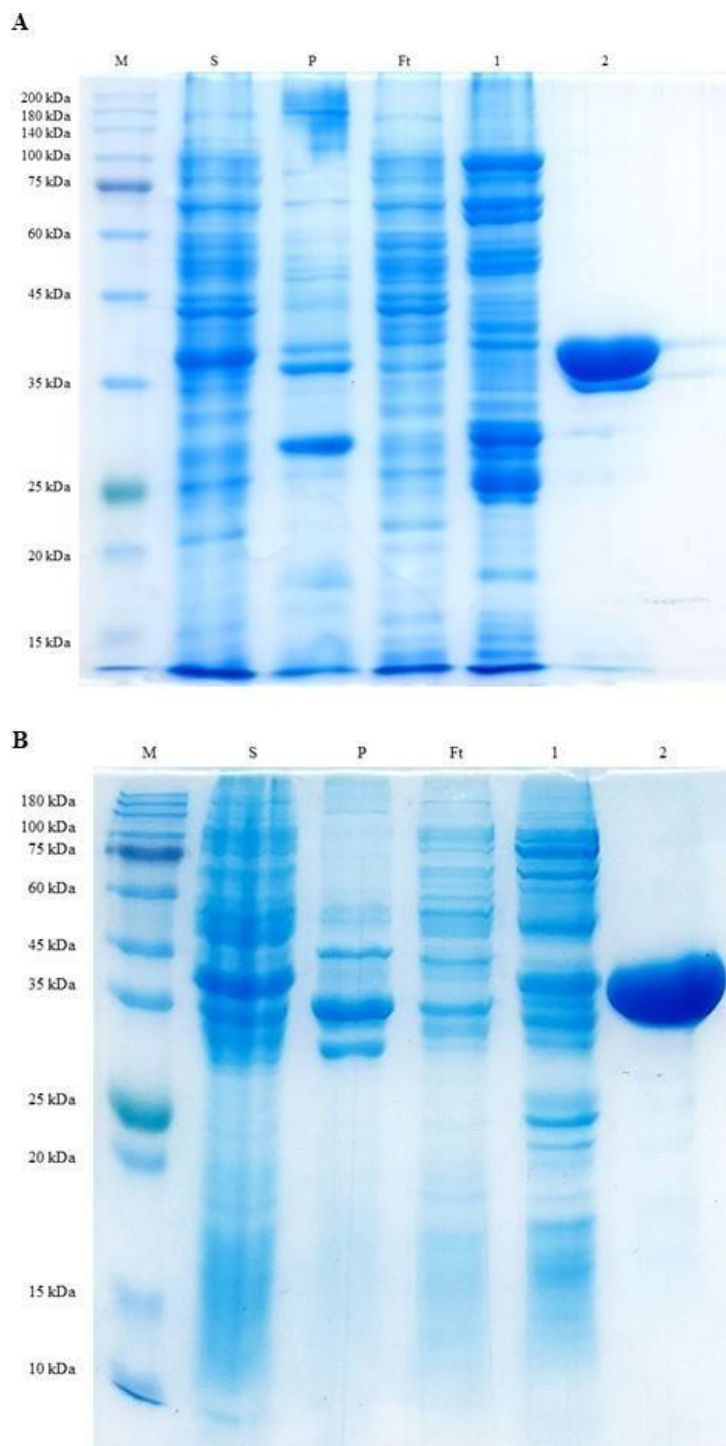
Enzima	Amostras	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade _e ⁻¹ (U mg ⁻¹)	Grau de purificação	Rendimento (%)
	Extrato bruto	1225.49	160.50	7.63	1	100
	Afinidade com Ni ²⁺	807.84	9.60	84.15	11.02	65.92
AspZ	Extrato bruto	1021.24	180.0	5.67	1	100
	Afinidade com Ni ²⁺	619.60	9.90	62.58	11.03	60.67

Figura 4 - Massa molecular aparente, Western blot e análise de estrutura secundária de Asp-B e Asp-Z.



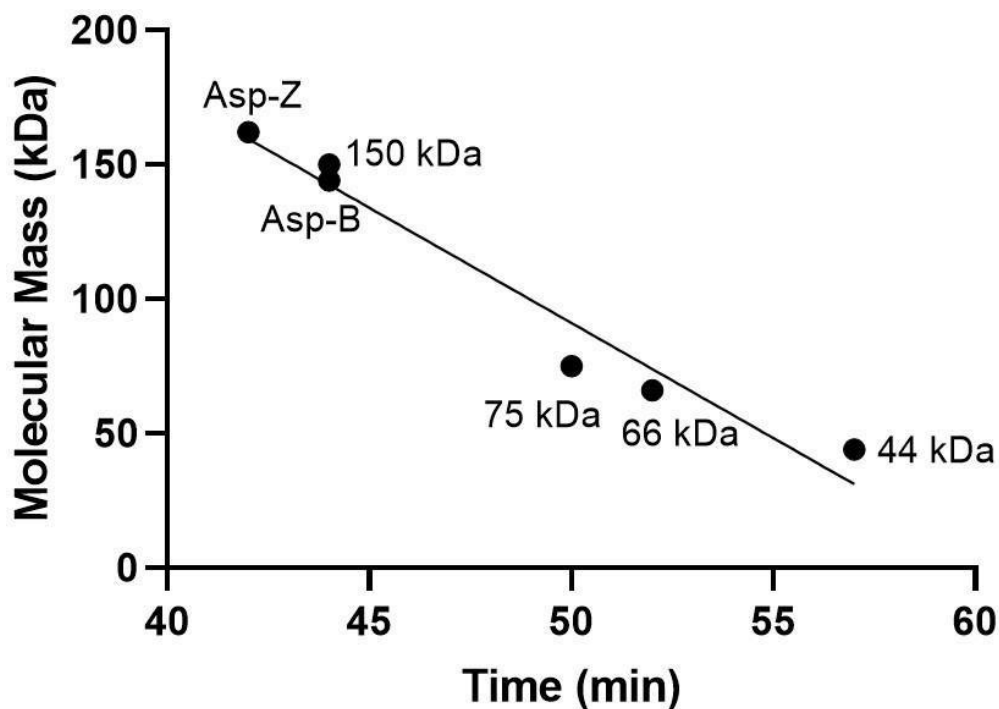
Fonte: a autora. (A) SDS-PAGE (12,5%) de Asp-B e Asp-Z purificadas. M: marcador de peso molecular; B: Asp-B (~37 kDa); Z: Asp-Z (~39 kDa). (B) Western blot utilizando um anticorpo anti-His tag. M: marcador de peso molecular; B: Asp-B; Z: Asp-Z. Ambas as enzimas recombinantes foram detectadas, confirmando sua identidade. (C) Western blot utilizando um anticorpo anti-asparaginase de *E. coli* (EcAII). M: marcador de peso molecular; B: Asp-B; Z: Asp-Z. Asp-B exibiu forte ligação, enquanto Asp-Z mostrou apenas fraco reconhecimento, sugerindo reatividade cruzada reduzida dos anticorpos anti-EcAII com Asp-Z. (D) Espectro de dicroísmo circular (DC) de Asp-B, confirmando o dobramento correto. (E) Espectro de dicroísmo circular (DC) de Asp-Z, indicando dobramento correto.

Figura 5 - Análise por SDS-PAGE das etapas de purificação de Asp-B e Asp-Z.



Fonte: a autora. (A) Perfil de purificação de Asp-B. (B) Perfil de purificação de Asp-Z. M: marcador de peso molecular; S: fração proteica solúvel após lise celular; P: fração proteica insolúvel após lise celular; Ft: fração não ligada (proteínas não ligadas) da cromatografia de afinidade por imidazol (IMAC); 1: fração de lavagem com imidazol 100 mM; 2: fração eluída com imidazol 300 mM. A análise confirma a expressão solúvel e a purificação eficiente de Asp-B e Asp-Z, resultando em altos rendimentos.

Figura 6 - Massa molecular de proteínas nativas calculada por cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: a autora. A cromatografia de exclusão molecular foi realizada em uma coluna Sephacryl S-200 e calibrada com álcool desidrogenase (150 kDa), conalbumina (75 kDa), BSA (66 kDa) e albumina de ovo (44 kDa) como padrões de proteína.

Figura 7- Sequências de aminoácidos das L-asparaginases recombinantes de *Bacillus subtilis* (Asp-Z) e *Escherichia coli* (Asp-B).



Fonte: a autora. A sequência N-terminal adicionada pelo vetor pET-28a(+), contendo a etiqueta His e o sítio de clivagem da trombina, está destacada em azul. A sequência nativa de Asp-Z é mostrada em verde e a de Asp-B em cinza. Ambos os construtos foram clonados sem suas sequências originais de peptídeo sinal e expressos com a etiqueta His N-terminal, que não foi removida após a purificação.

Em escala industrial, a L-asparaginase pode ser facilmente produzida e purificada a partir de microrganismos, particularmente bactérias e fungos, que representam as principais fontes dessa enzima (Cachumba et al., 2016; DEBAJIT BORAH et al., 2012). Desde a década de 1970, várias cepas microbianas têm sido relatadas como potenciais produtoras de L-asparaginase. As aplicações práticas da enzima estão diretamente relacionadas às suas propriedades bioquímicas, e as L-asparaginases microbianas têm sido extensivamente estudadas para uso nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Dani Benchamin et al., 2019; Nabeel Ahmad; Nitin Prakash Pandit; Sanjiv Kumar Maheshwari, 2012). Em oncologia, elas são empregadas como parte de regimes de quimioterapia combinada, enquanto no processamento de alimentos são aplicadas para reduzir a formação de acrilamida, um subproduto carcinogênico gerado durante o cozimento em alta temperatura de alimentos ricos em amido. Assim, a identificação e a caracterização de novas L-asparaginases bacterianas permanecem cruciais para expandir suas aplicações industriais e clínicas.

As bactérias do gênero *Bacillus* são particularmente atraentes para a produção em larga escala devido à sua adaptabilidade a ambientes hostis e à sua frequente associação com enzimas que apresentam características bioquímicas com características desejáveis do ponto de vista biotecnológico. Notavelmente, cepas de *Bacillus subtilis* isoladas de esponjas marinhas demonstram produzir L-asparaginases livres de atividade glutaminásica, com atividades antioxidantes e antibacterianas adicionais (Mirghasemi et al., 2023). Em consonância com essas evidências, o presente estudo forneceu uma caracterização estrutural, bioquímica e funcional da L-asparaginase II recombinante, destacando seu potencial para aplicações biotecnológicas.

A Asp-Z foi expressa com sucesso em um sistema bacteriano e purificada usando uma única etapa cromatográfica. O sinal fraco detectado para Asp-Z no ensaio de Western blot, quando revelado com o anticorpo anti-L-asparaginase de *E. coli*, é consistente com a divergência antigênica esperada entre as enzimas e indica baixa reatividade cruzada entre elas. Embora o mapeamento de epítomos *in silico* tenha revelado regiões antigênicas

distintas entre Asp-B e Asp-Z, essas descobertas por si só não comprovam diferenças no potencial imunogênico. Uma avaliação definitiva da reatividade cruzada e da imunogenicidade exigiria ensaios mais robustos, como os testes sorológicos usando soros de pacientes tratados com formulações de asparaginase derivadas de *E. coli* (Zalewska-Szewczyk et al., 2009).

A enzima exibe uma massa molecular de aproximadamente 160 kDa em sua forma tetramérica nativa (Figura 6) e contém uma sequência rica em histidina (His-tag) em sua região N-terminal, facilitando o processo de purificação. Sob condições de desnaturação, a análise por SDS-PAGE revelou uma massa molecular de aproximadamente 40 kDa (a enzima é tetramérica e a massa aparente retrata um monômero), consistente com o tamanho esperado da Asp-Z, conforme mostrado na Figura 4A e relatado anteriormente (Jia et al., 2013).

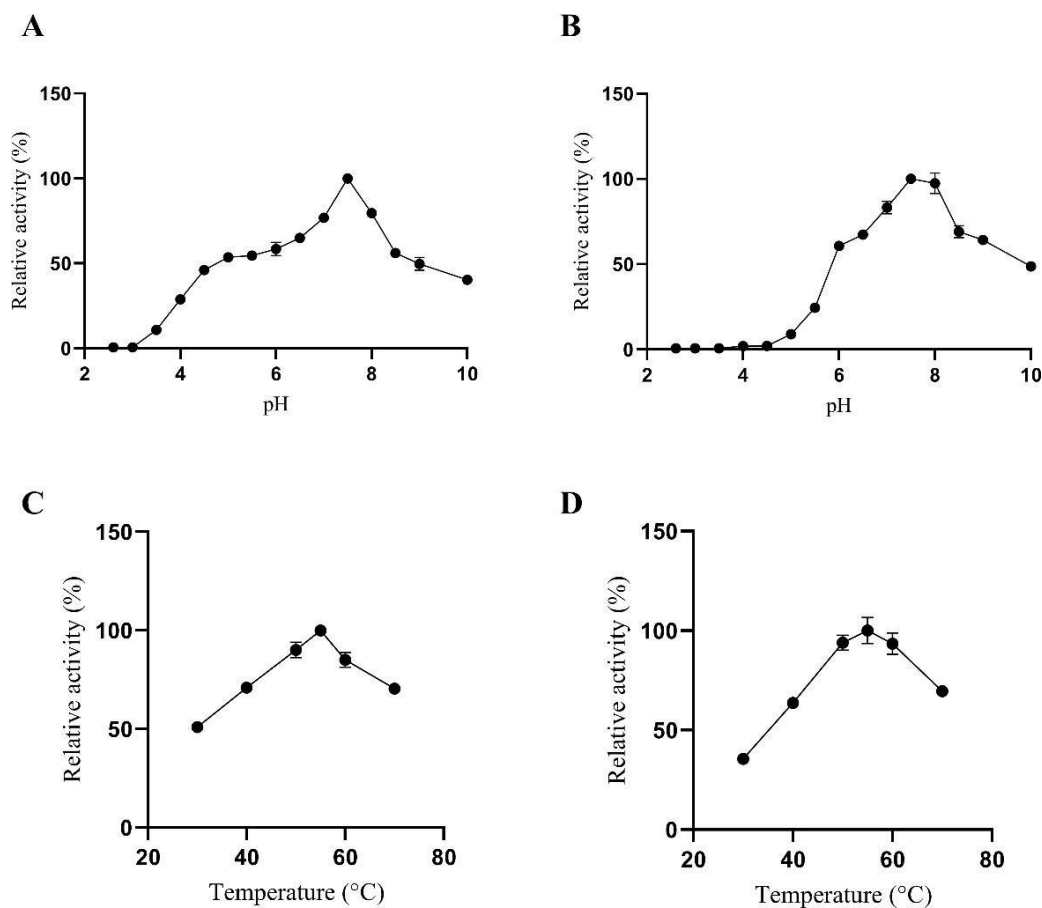
Os experimentos de dicroísmo circular obtidos para as duas enzimas analisadas apresentaram perfis semelhantes, indicando estabilidade conformacional e que ambas as proteínas encontram-se corretamente dobradas, com a presença de elementos estruturais secundários organizados, como α -hélices e folhas β . A correta conformação estrutural observada é um fator essencial para a manutenção da atividade catalítica das enzimas, uma vez que o dobramento adequado é diretamente responsável pela formação do sítio ativo e pelo posicionamento correto dos resíduos catalíticos.

5.2 Perfil de atividade enzimática em diferentes pHs e temperaturas

Dadas as potenciais aplicações biotecnológicas da L-asparaginase, é essencial determinar a temperatura e o pH nos quais essas enzimas exibem atividade máxima. Esses parâmetros são cruciais para avaliar sua viabilidade para aplicações industriais e terapêuticas. Os perfis de atividade em função do pH da Asp-B e da Asp-Z foram avaliados em uma ampla faixa de pH. A Asp-B apresentou atividade enzimática detectável a partir de pH 3,5, enquanto a Asp-Z exibiu atividade mensurável a partir de pH 5,0. No entanto, ambas as enzimas atingiram sua atividade máxima em pH 7,5, indicando uma preferência por um ambiente neutro próximo ao pH fisiológico humano. Em condições alcalinas, a atividade de ambas as enzimas diminuiu gradualmente. Em pH 10,0, a Asp-B reteve apenas 40% de sua atividade inicial (uma redução de 60%, Figura 8A), enquanto a Asp-Z exibiu estabilidade ligeiramente maior, mantendo 49% de sua atividade inicial

(uma redução de 51%, Figura 8B). Além disso, a composição da solução tampão influenciou o desempenho enzimático. Em pH 8,0, ambas as enzimas apresentaram maior atividade específica em tampão citrato-fosfato 0,3 M em comparação com Tris 50 mM, com aumentos de 23,53% e 25% para Asp-B e Asp-Z, respectivamente. Em relação à dependência da temperatura, a temperatura ótima para a atividade enzimática foi de 55 °C para ambas as asparaginases em seus respectivos valores ótimos de pH. Acima dessa temperatura, a atividade enzimática diminuiu progressivamente, embora não tenha sido completamente abolida (Figuras 8C e 8D).

Figura 8 - Perfis ótimos de pH e temperatura de Asp-B e Asp-Z.



Fonte: a autora. (A) Perfil de atividade da Asp-B em função do pH, mostrando atividade na faixa de 3,5 a 10,0, com atividade máxima em pH 7,5. (B) Perfil de atividade da Asp-Z em função do pH, mostrando atividade mensurável entre pH 5,0 e 10, com atividade máxima em pH 7,5. (C) Perfil de atividade da Asp-B em função da temperatura, com atividade enzimática máxima a 55 °C. (D) Perfil de atividade da Asp-Z em função da temperatura, também mostrando atividade enzimática máxima a 55 °C.

A atividade máxima da Asp-Z foi observada em pH 7,5, indicando que a enzima favorece um ambiente relativamente neutro, semelhante ao pH fisiológico humano. Um resultado comparável ao obtido para a Asp-B e consistente com as descobertas de Shafqat et al. (2023), que relataram a maior atividade da L-asparaginase de *Bacillus* em pH 7,0 (Shafqat et al., 2023a). Essa preferência por um pH neutro é uma característica favorável à aplicação terapêutica da asparaginase, visto que o pH fisiológico humano é de aproximadamente 7,4 (Beckett; Gervais, 2019). Nossos resultados mostraram que, em sua temperatura ótima, a atividade enzimática específica da Asp-Z foi menor que a da Asp-B. No presente estudo, tanto a Asp-Z quanto a Asp-B apresentaram uma temperatura ótima de 55 °C, um resultado consistente com relatos anteriores que descrevem uma temperatura ótima de aproximadamente 50 °C para a L-asparaginase de *Bacillus subtilis* (Agrawal; Jana; Kango, 2021; Onishi et al., 2011; Yano et al., 2008). A temperatura ótima das asparaginases recombinantes pode variar dependendo da fonte bacteriana e do hospedeiro de expressão (Shishparenok; Gladilina; Zhdanov, 2023).

5.3 Parâmetros cinéticos e inibição iônica

Os parâmetros cinéticos da Asp-Z foram avaliados a 37 °C e 55 °C em pH 7,5 e comparados com os da Asp-B, que foi avaliada nas mesmas condições. Para essas análises, foram utilizados dois métodos distintos: ensaio com a Indooxina e reagente de Nessler. No ensaio com indooxina, os resultados estão resumidos na Tabela 3. A 37 °C, a Asp-Z apresentou um K_m de 0,33 mM e um V_{max} de 44,61 U/mg (Figura 9B), correspondendo a uma atividade específica aproximadamente 1,6 vezes menor que a da Asp-B (Figura 9A), que apresentou um K_m de 0,21 mM e um V_{max} de 71,85 U/mg. Em contraste, a 55 °C, a diferença no K_m entre as duas enzimas tornou-se mais pronunciada, com a Asp-Z apresentando um K_m de 0,47 mM (Figura 9D) e a Asp-B um K_m de 0,17 mM (Figura 9C). Adicionalmente, observou-se um ligeiro aumento no V_{max} de Asp-Z, atingindo 52,13 U/mg, enquanto Asp-B apresentou um V_{max} de 99,90 U/mg.

Para o ensaio de Nessler, os parâmetros cinéticos de Asp-Z também foram avaliados a 37°C e 55°C, em pH 7,5, e comparados a Asp-B, que foi submetida às mesmas condições. A 37°C, Asp-Z exibiu um K_m de 4,35 mM e um V_{max} de 4,76 U·nmol⁻¹ (Figura 10B), valor de atividade específica aproximadamente 1,6 vezes menor que aqueles de Asp-B (Figura 10A), que teve um K_m de 2,72 mM e um V_{max} de 8,13

$\text{U} \cdot \text{nmol}^{-1}$. Em contraste, a 55°C , a diferença em K_m entre as duas enzimas diminuiu, com Asp-Z exibindo um K_m de 3,82 mM (Figura 10D) e Asp-B um K_m de 2,47 mM (Figura 10C). Além disso, um aumento significativo no V_{\max} de Asp-Z foi observado, atingindo $8,17 \text{ U} \cdot \text{nmol}^{-1}$, o que representa um aumento de quase duas vezes em comparação com seu valor a 37°C . Enquanto isso, Asp-B exibiu uma redução no V_{\max} para $7,72 \text{ U} \cdot \text{nmol}^{-1}$.

O ensaio com substrato de L-glutamina revelou que Asp-Z não apresenta atividade de glutaminase detectável nas condições testadas. Isso contrasta com Asp-B, que apresentou atividades específicas de 0,128 U/mg e 0,222 U/mg em concentrações de L-glutamina de 10 mM e 20 mM, respectivamente.

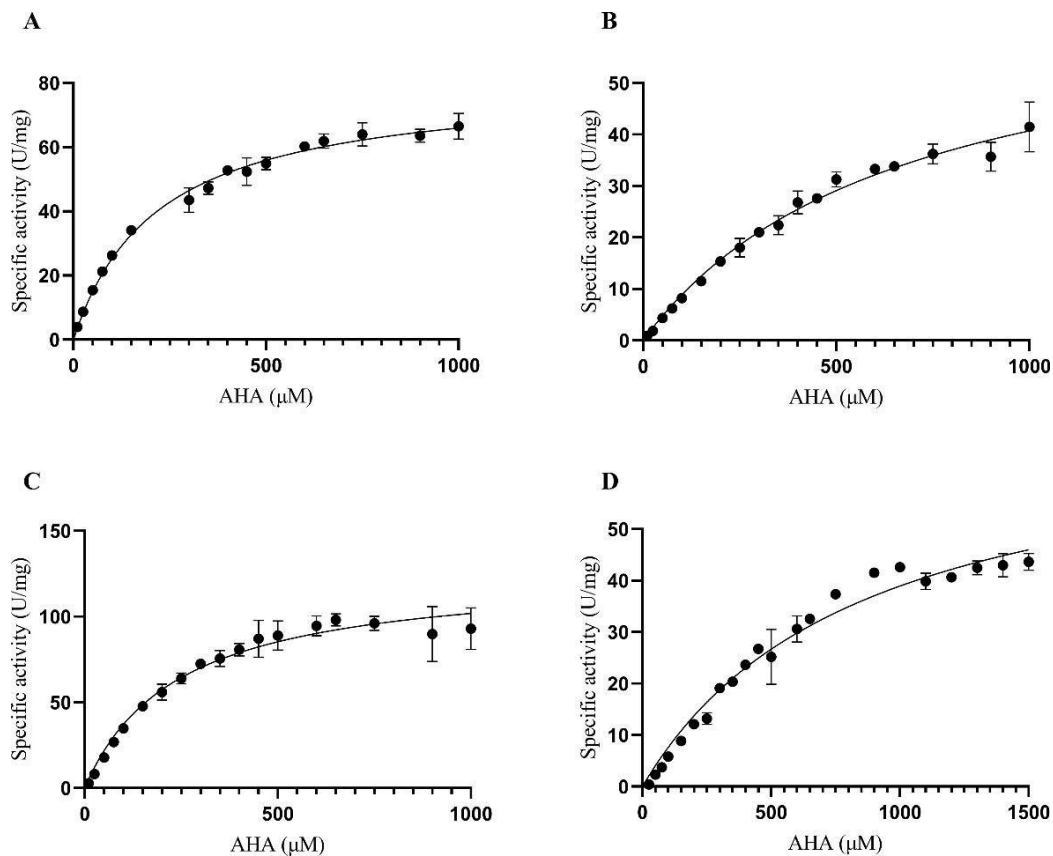
Ensaio de atividade enzimática na presença de diferentes íons revelaram efeitos distintos entre as duas proteínas (Figura 11). Os íons de manganês aumentaram a atividade de Asp-Z, enquanto cálcio, potássio, níquel, lítio e cobre a inibiram em graus variados. Em contraste, o manganês não estimulou a atividade de Asp-B e o lítio não inibiu Asp-B, como observado para Asp-Z. Além disso, tanto Asp-B quanto Asp-Z não foram afetados pela ureia e pelo EDTA; no entanto, ambos foram inibidos pelo β -mercaptoetanol, com um efeito mais pronunciado em Asp-Z do que em Asp-B, apresentando reduções de atividade de 59% e 36%, respectivamente.

Table 3 - Parâmetros cinéticos das L-asparaginases Asp-B e Asp-Z purificadas a 37°C e 55°C

Enzima	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	V_{\max} (U/mg)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Asp-B	37°C	71.85 ± 3.00	0.21 ± 0.02	44.37 ± 1.90	211.29
	55°C	99.90 ± 9.70	0.17 ± 0.03	61.68 ± 5.90	362.82
Asp-Z	37°C	44.61 ± 5.80	0.33 ± 0.07	27.55 ± 3.60	83.48
	55°C	52.13 ± 3.10	0.47 ± 0.04	32.19 ± 1.90	68.49

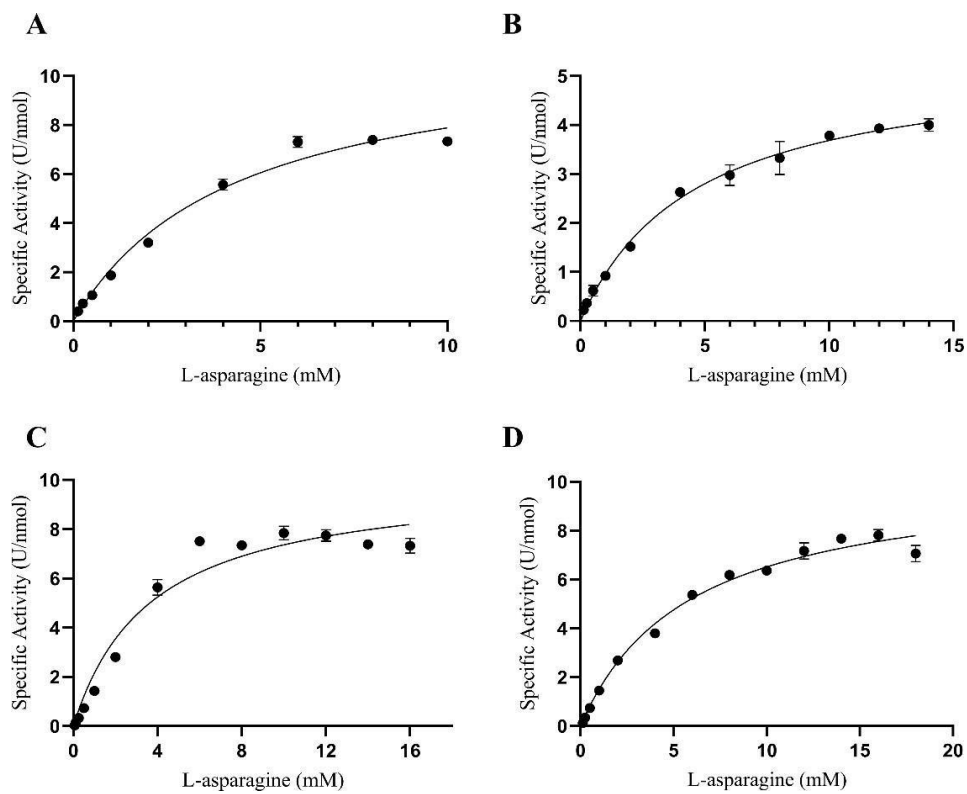
Fonte: a autora. Os valores representam a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos. A atividade específica (U/mg) foi calculada usando a massa molecular dos monômeros da proteína.

Figura 9 - Parâmetros cinéticos de Asp-B e Asp-Z em diferentes temperaturas. Os ensaios cinéticos foram realizados a 37 °C e 55 °C para ambas as enzimas, utilizando o método da Indooxina.



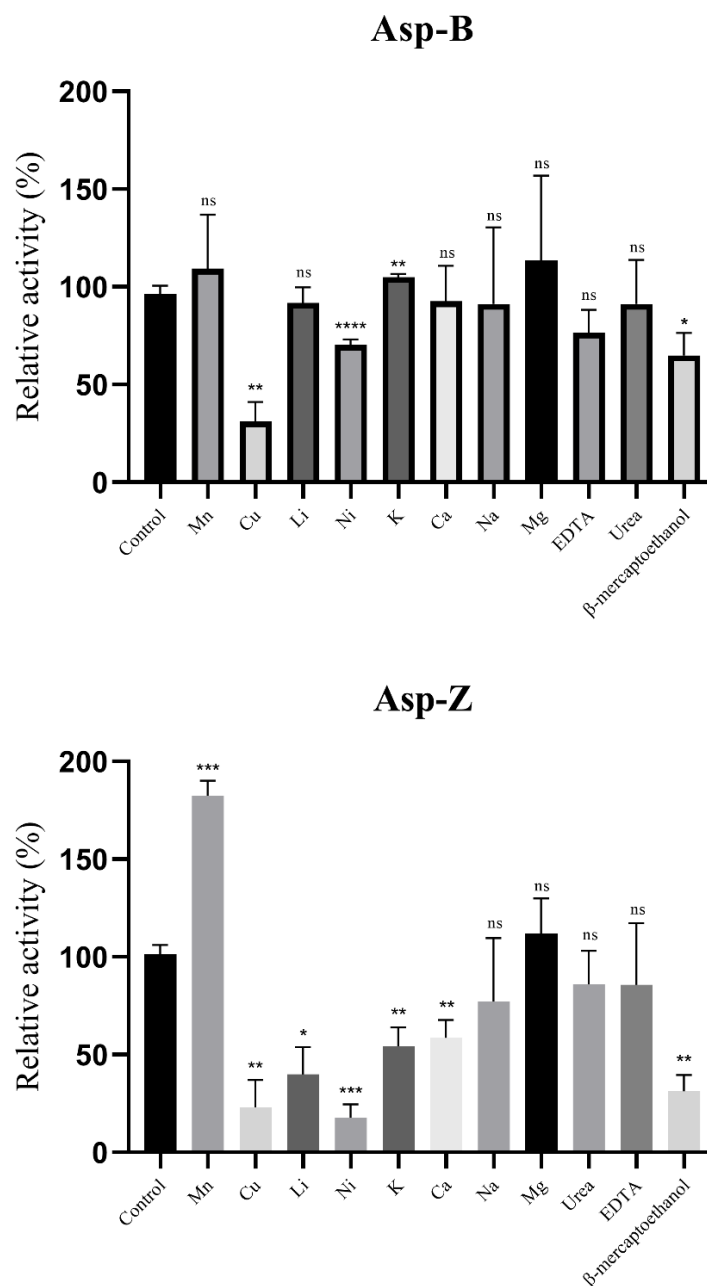
Fonte: a autora. A 37 °C (temperatura fisiológica), Asp-B (A) apresentou um Km menor (210,10 μM) e um Vmax maior (71,85 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) em comparação com Asp-Z (B), que apresentou um Km de 330,40 μM e um Vmax de 44,61 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$. A 55 °C (temperatura ótima), observou-se uma mudança no comportamento cinético. Asp-B (C) apresentou uma ligeira diminuição no Km (170,40 μM) e um aumento no Vmax (99,90 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Em contraste, Asp-Z (D) apresentou um aumento no Vmax (52,13 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) juntamente com um Km maior (466,10 μM), indicando uma afinidade reduzida pelo substrato em temperaturas elevadas.

Figura 10 - Parâmetros cinéticos de Asp-B e Asp-Z em diferentes temperaturas, utilizando o método do reagente de Nessler.



Fonte: a autora. Os ensaios cinéticos foram realizados a 37°C e 55°C para ambas as enzimas. A 37°C (temperatura fisiológica), a Asp-B (A) apresentou um K_m menor (2,72 mM) e um V_{max} maior (8,139 $U \cdot nmol^{-1}$) em comparação com a Asp-Z (B), que apresentou um K_m de 4,35 mM e um V_{max} de 4,76 $U \cdot nmol^{-1}$. A 55°C (temperatura ótima), foi observada uma mudança no comportamento cinético. A Asp-B (C) não apresentou grandes alterações nos parâmetros cinéticos em comparação a 37°C, mas foi observada uma ligeira redução tanto no K_m quanto no V_{max} . Em contraste, Asp-Z (D) exibiu um aumento de aproximadamente duas vezes em V_{max} (8,17 $U \cdot nmol^{-1}$) e um K_m ligeiramente menor (3,82 mM) a 55°C, indicando melhor eficiência catalítica em temperaturas elevadas.

Figura 11 - Efeito de íons metálicos e interferentes nas atividades enzimáticas de Asp-B e Asp-Z.



Fonte: a autora. O controle indica a atividade medida na ausência de qualquer íon metálico ou aditivo. Os íons de manganês aumentaram a atividade da Asp-Z sem afetar a Asp-B. Níquel e cobre reduziram a atividade de ambas as enzimas, com um efeito mais pronunciado sobre a Asp-Z. Potássio e cálcio diminuíram a atividade da Asp-Z, mas não alteraram a da Asp-B. Ureia e EDTA não tiveram efeito sobre nenhuma das enzimas, enquanto o β -mercaptoetanol inibiu ambas, principalmente a Asp-Z.

Os resultados obtidos indicaram que, embora ambos os métodos tenham sido capazes de detectar a atividade enzimática, o método da indooxina apresentou maior sensibilidade quando comparado ao método de Nesslerização, essa diferença pode ser atribuída, primeiramente, ao princípio químicos de cada técnica e também o fato que o método de Nessler baseia-se na detecção indireta da liberação de amônia, sendo suscetível a interferências de compostos nitrogenados presentes na reação. Os parâmetros cinéticos da Asp-Z foram avaliados em pH 7,5 a 37 °C e 55 °C e comparados com os da Asp-B nas mesmas condições. Na cinética com AHA, A 55 °C, tanto o Vmax quanto o Km aumentaram para a Asp-Z, com valores de Km na faixa micromolar para ambas as temperaturas (330 e 470 µM). Tais valores são favoráveis para certas aplicações biotecnológicas, embora valores de Km mais baixos sejam geralmente necessários para a atividade terapêutica das L-asparaginases (Costa-Silva et al., 2020).

Nossos resultados indicam que a Asp-Z exibe uma maior afinidade pelo substrato em comparação com outras L-asparaginases de *Bacillus*. Por exemplo, Sundaram et al. (2024) relataram um Km de 1,579 mM para a L-asparaginase de *B. subtilis* usando o método de Nesslerização e a análise de Lineweaver-Burk (Sundaram et al., 2024). De forma semelhante, a Asp-Z apresentou um Km inferior ao da L-asparaginase de *B. licheniformis* e ao seu mutante ILRAC, que apresentaram valores de Km de 2,33 e 1,45 mM, respectivamente (Zhou et al., 2022). Aktar e colaboradores caracterizaram dez L-asparaginases bacterianas e de levedura pertencentes às classes tipo I e tipo II, obtendo valores de Km que variam de 0,63 a 11,67 mM e valores de kcat de 6,43 a 312,45 s⁻¹ (Aktar et al., 2013). Entre estas, a L-asparaginase de *L. thermotolerans* (Lt) exibiu a maior eficiência catalítica (kcat/Km), de 26,77 s⁻¹ mM⁻¹. Em nosso estudo, a eficiência catalítica de Asp-Z atingiu 83,48 s⁻¹ mM⁻¹ a 37 °C, indicando uma boa capacidade de converter substrato em produto, uma propriedade desejável para aplicações biotecnológicas.

É importante destacar que nossos resultados mostraram um Km de 210 µM para a L-asparaginase de *E. coli* (Asp-B), que é aproximadamente 10 vezes maior do que os 15 µM relatados por Nguyen; Su; Lavie, 2016. Essa discrepância provavelmente reflete diferenças metodológicas, já que a determinação de Km é altamente dependente da sensibilidade do ensaio, especialmente para enzimas que operam na faixa micromolar. No presente estudo, empregamos dois métodos: da indooxina, que é mais sensível e do Nessler que possui uma sensibilidade menor (Derst; Henseling; Röhm, 2000). Nguyen et al., por sua vez, usaram um ensaio contínuo acoplado à oxidação de NADH (Nguyen; Su;

Lavie, 2016). Variáveis adicionais também podem contribuir para essas diferenças, incluindo a presença de marcadores de purificação, a pureza dos reagentes e os modelos de regressão aplicados à análise cinética. É importante ressaltar que o valor de k_{cat} obtido para Asp-B ($44,37 \text{ s}^{-1}$) foi o mesmo relatado por Nguyen et al. ($44,4 \text{ s}^{-1}$), demonstrando que a enzima estava totalmente ativa em nossas condições experimentais.

A ausência de atividade glutaminásica pode ser uma característica favorável da Asp-Z em comparação com a asparaginase de *Escherichia coli*, uma vez que a atividade dupla em L-asparaginases bacterianas frequentemente limita sua aplicação terapêutica (Lopes et al., 2017). Isso ocorre porque a atividade da L-glutaminase das asparaginases utilizadas clinicamente contribui para muitos efeitos colaterais do tratamento, incluindo imunossupressão, hepatotoxicidade, pancreatite, disfunção e distúrbios de coagulação (Nguyen; Su; Lavie, 2016). Além disso, a depleção enzimática da glutamina circulante ajuda a manter a taxa de crescimento de linhagens celulares malignas, como carcinoma colorretal, carcinoma mamário e adenocarcinoma de cólon, enquanto a falta de glutamina aboliu o crescimento das três cepas testadas *in vitro* (Kumar et al., 2024). Compreender as principais características da seletividade de substrato da L-asparaginase é, portanto, uma etapa essencial no desenvolvimento de variantes enzimáticas com propriedades aprimoradas para fins biotecnológicos.

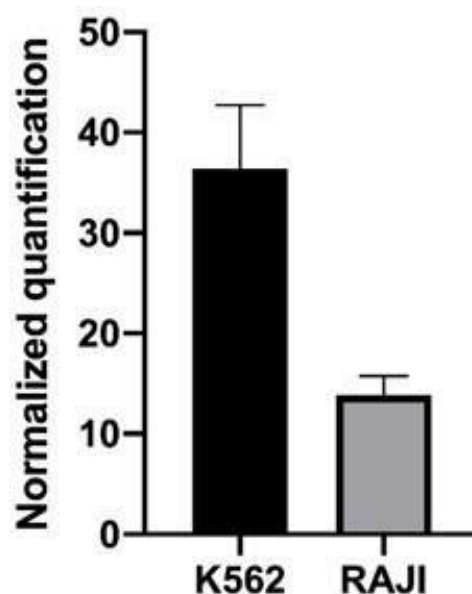
A atividade da Asp-Z aumentou quase duas vezes na presença de íons de manganês, um efeito não observado para a Asp-B. Este resultado pode indicar que os íons de manganês estabilizam a proteína ou seu sítio ativo, sugerindo uma possível dependência de manganês para a Asp-Z. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar essa relação. Curiosamente, os íons de manganês aboliram completamente a atividade enzimática da L-asparaginase de *B. subtilis* CH11 (Arredondo-Nuñez et al., 2023), enquanto a enzima de *B. subtilis* B11-06 foi apenas ligeiramente inibida (Jia et al., 2013). Essas discrepâncias destacam que a influência dos íons de manganês nas L-asparaginases de *B. subtilis* é dependente da cepa. Em contraste, a L-asparaginase de *B. halotolerans* ASN9 também exibiu um leve aumento na atividade na presença de íons de manganês, sugerindo uma maior similaridade com a Asp-Z (Shafqat et al., 2023b). Além disso, ureia e EDTA não afetaram significativamente nem a Asp-B nem a Asp-Z, demonstrando ainda mais sua estabilidade na presença de agentes caotrópicos. Por outro lado, o β -mercaptoetanol inibiu ambas as enzimas, com um efeito mais forte sobre o Asp-Z, sugerindo que os resíduos envolvidos na catálise são sensíveis à redução, prejudicando

assim a atividade. Para comparação, o EDTA inibiu a atividade das asparaginases de *B. halotolerans* ASN9 e *B. subtilis* CH11 em mais de 40% (Arredondo-Nuñez et al., 2023; Shafqat et al., 2023a), enquanto nenhum efeito semelhante foi observado para *B. subtilis* B11-06 (Jia et al., 2013). Da mesma forma, a ureia não afetou a asparaginase de *Cladosporium sp.* e causou apenas uma pequena inibição de *B. subtilis* CH11 (Arredondo-Nuñez et al., 2023; Mohan Kumar; Manonmani, 2013). Esses achados indicam que muitas L-asparaginases são resistentes a agentes caotrópicos, embora sua sensibilidade a íons metálicos possa variar amplamente entre espécies e cepas.

5.4 Ensaio de viabilidade celular

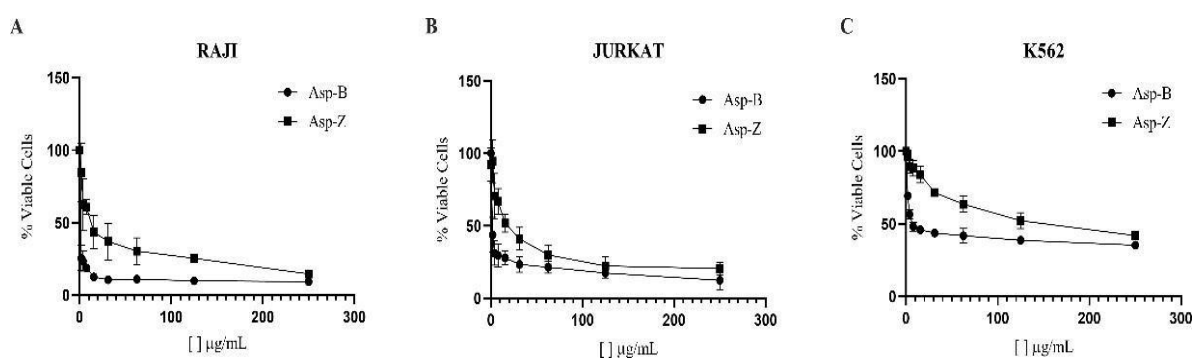
O ensaio MTT foi realizado para avaliar os efeitos de Asp-Z e Asp-B na viabilidade celular e determinar seus valores de IC_{50} em três linhagens celulares com diferentes perfis de expressão de ASNS: RAJI e JURKAT (baixa expressão de ASNS) e K562 (alta expressão de ASNS) (Figura 12). Os resultados mostraram que ambas as enzimas reduziram a viabilidade celular em todas as linhagens celulares testadas após 72 horas de tratamento. Na maior concentração testada (250 $\mu\text{g/mL}$), Asp-B e Asp-Z produziram reduções comparáveis na viabilidade, indicando que Asp-Z mantém atividade biológica mensurável nesse contexto (Figura 13). As células RAJI e JURKAT, que apresentam menor expressão de ASNS, foram mais responsivas, com valores de IC_{50} de $0,324 \pm 0,201 \mu\text{g/mL}$ para Asp-B e $13,71 \pm 0,381 \mu\text{g/mL}$ para Asp-Z em RAJI, e valores de IC_{50} de $1,064 \pm 0,415 \mu\text{g/mL}$ para Asp-B e $20,76 \pm 1,945 \mu\text{g/mL}$ para Asp-Z em JURKAT (Tabela 4). Em contraste, nas células K562, caracterizadas pela alta expressão de ASNS, os valores de IC_{50} foram substancialmente maiores, atingindo $14,05 \pm 0,755 \mu\text{g/mL}$ para Asp-B e $154,5 \pm 16,27 \mu\text{g/mL}$ para Asp-Z. Notavelmente, mesmo nas concentrações enzimáticas mais elevadas testadas, as células K562 mantiveram cerca de 50% de viabilidade após 72 h de tratamento. Essa observação confirma que a elevada expressão de ASNS confere maior resistência ao tratamento com asparaginase, resultando em um efeito antiproliferativo reduzido.

Figura 12 - Quantificação normalizada dos níveis de expressão gênica relativa de ASNS por qPCR nas linhagens celulares K562 e RAJI.



Fonte: a autora. GAPDH e β -actina foram usados como genes de referência. Os cálculos foram realizados utilizando o método da curva padrão. Os dados representados no gráfico correspondem à média \pm erro padrão da média (n=2).

Figura 13 - Atividade citotóxica de Asp-B e Asp-Z em linhagens celulares tumorais RAJI, JURKAT e K562.



Fonte: a autora. Atividade citotóxica de Asp-B e Asp-Z nas linhagens de células tumorais RAJI (A), JURKAT (B) e K562 (C), avaliada pelo ensaio MTT após 72 h de tratamento. Os dados são expressos como média \pm DP de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Tabela 4 - Atividade citotóxica de Asp-B, expressa em *E. coli*, e Asp-Z, expressa em *B. subtilis*, em três linhagens de células tumorais (RAJI, JURKAT e K562) com diferentes perfis de expressão de ASNS, avaliada pelo ensaio MTT após 72 horas de tratamento.

MTT - IC₅₀ values - 72h

	RAJI (Burkitt's lymphoma)	JURKAT (acute lymphoblastic leukemia)	K562 (chronic myeloid leukemia)
AspB	0,324 ± 0,201 (0,0046)	1,064 ± 0,415 (0,0152)	14,05 ± 0,755 (0,2009)
AspZ	13,71 ± 0,381 (0,1593)	20,76 ± 1,945 (0,2412)	154,5 ± 16,27 (1,7953)

Fonte: a autora. Os dados são representados em valores de IC₅₀ em µg/mL e (U/mL) e correspondem à média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes realizados em duplicata, determinados por regressão não linear usando o software GraphPad Prism® 8.0.

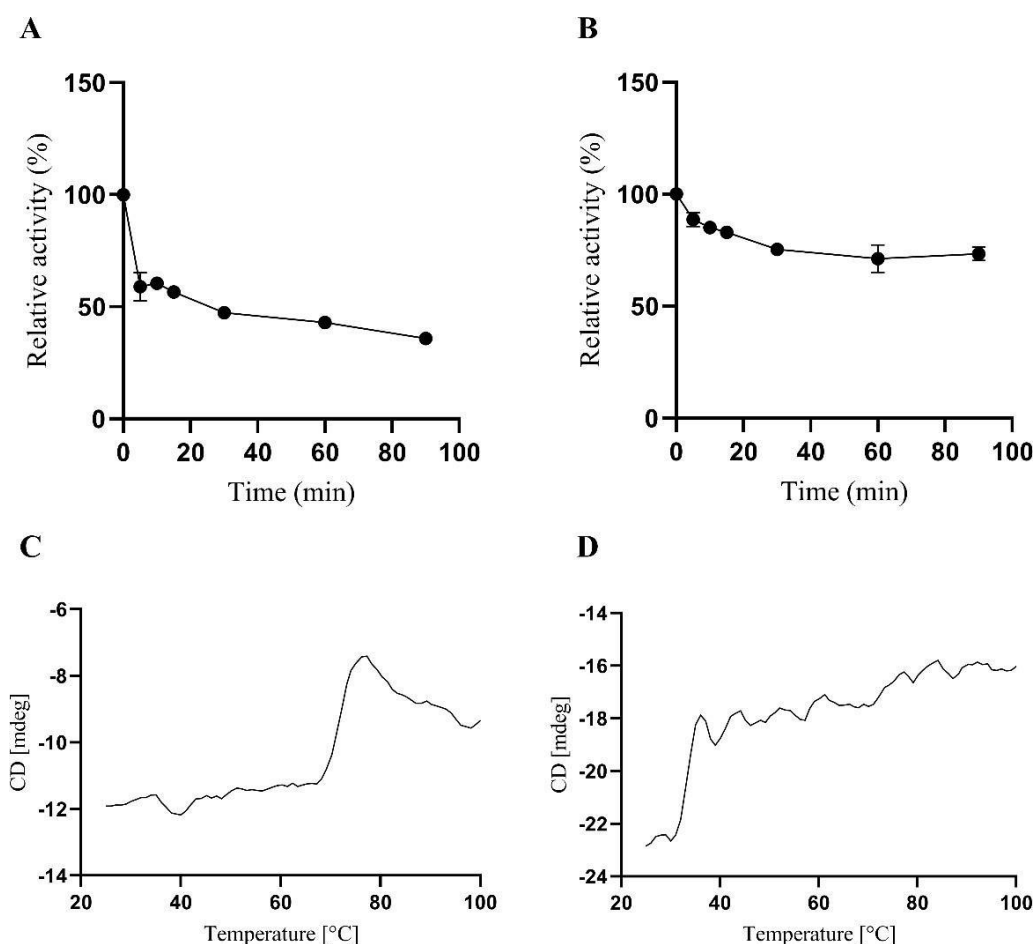
As L-asparaginases são bem reconhecidas por sua atividade antitumoral, particularmente contra linhagens celulares com baixa expressão de asparagina sintetase (ASNS). Por exemplo, Sharma; Mishra, 2023 demonstraram que a L-asparaginase de *Bacillus indicus* reduziu efetivamente a viabilidade de células de leucemia linfoblástica aguda MOLT-4 após 24 horas de tratamento, com uma IC₅₀ de 1,21 µM. Este achado é consistente com os dados obtidos em nosso estudo, no qual baixos valores de IC₅₀ foram observados para as células RAJI (0,34 µM) e JURKAT (0,52 µM) após 72 horas de tratamento, reforçando a potencial eficácia da Asp-Z contra células linfóides. No entanto, é importante enfatizar que o ensaio MTT reflete alterações na atividade metabólica e proliferação celular, e não citotoxicidade direta. Consequentemente, os resultados aqui relatados indicam uma redução na viabilidade celular, mas não permitem distinguir entre mecanismos antiproliferativos e citotóxicos. Apoiando o potencial mais amplo das enzimas derivadas de *Bacillus*, Yasser et al. (2019) demonstraram a atividade antiproliferativa da L-asparaginase de *Bacillus velezensis* em linhagens de células de câncer de mama, sugerindo ainda que essas enzimas são promissoras contra outros tipos de tumores (Mostafa et al., 2019).

5.5 Avaliação da termoestabilidade

Para avaliar a estabilidade térmica de Asp-B e Asp-Z, ambas as enzimas foram incubadas a 60 °C por diferentes intervalos de tempo. Os resultados revelaram que Asp-Z apresentou maior termoestabilidade do que Asp-B, mantendo 73% de sua atividade

após 90 minutos, enquanto Asp-B reteve apenas 35% de sua atividade inicial (Figuras 14A e 14B). Essa maior estabilidade térmica de Asp-Z foi confirmada pela análise de dicroísmo circular (DC), que mostrou que Asp-Z não sofreu desnaturação significativa com o aumento da temperatura (Figura 14D). Em contraste, Asp-B apresentou desnaturação térmica, com uma temperatura de fusão (T_m) calculada de 70,62 °C (Figura 14C). Notavelmente, não foi possível determinar um valor de T_m para Asp-Z, sugerindo uma maior resistência ao desdobramento induzido pelo calor. A análise NanoDSF (fluorimetria diferencial de varredura em nanoescala) corroborou esses resultados, indicando uma T_m de 65 °C para o Asp-B. Em consonância com os dados de CD, o Asp-Z não apresentou uma T_m mensurável, reforçando sua maior estabilidade estrutural sob estresse térmico (Figura 15).

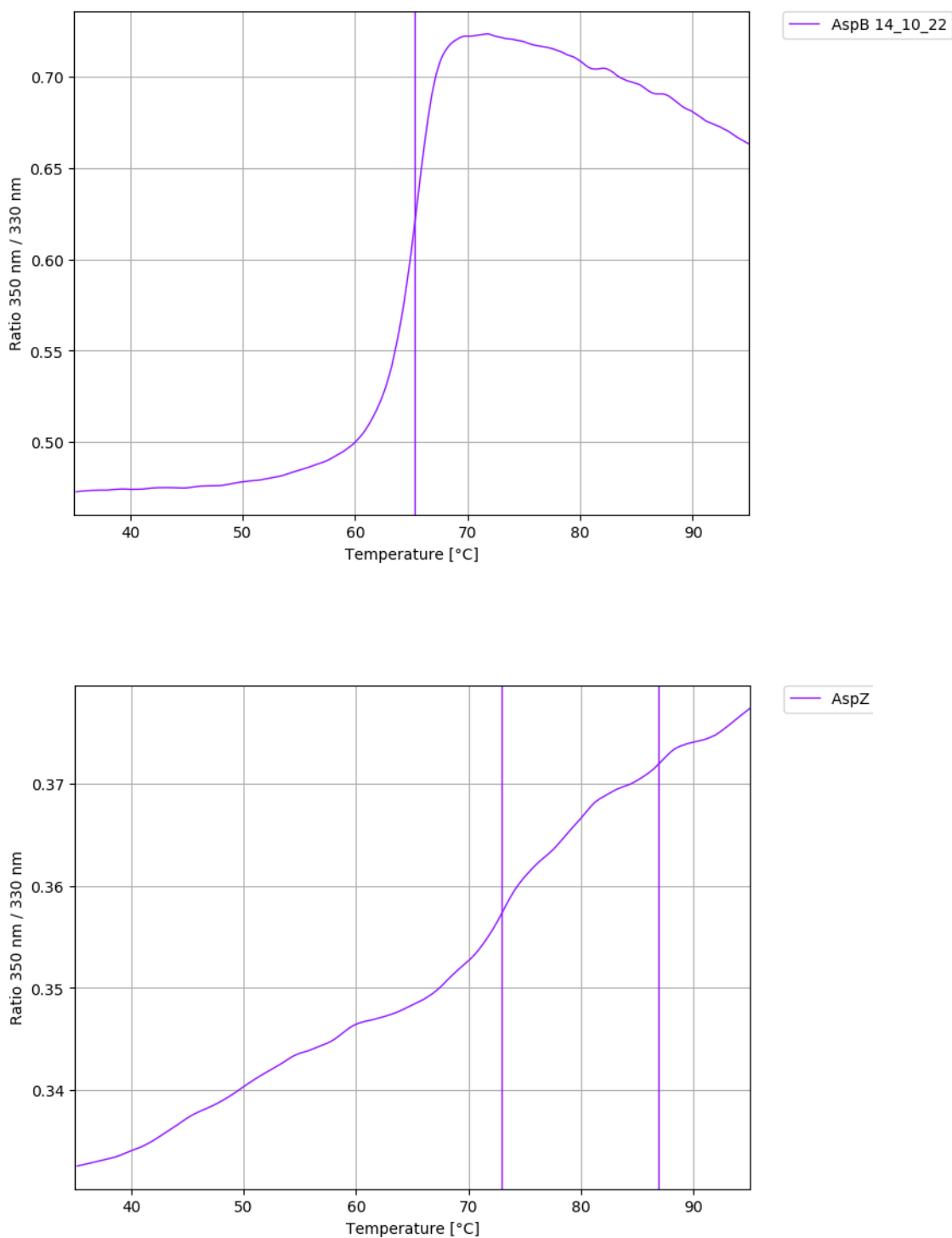
Figura 14 - Análise de termoestabilidade e dicroísmo circular de Asp-B e Asp-Z.



Fonte: a autora. (A) Estabilidade térmica da Asp-B incubada a 60 °C por diferentes intervalos de tempo, mostrando uma perda acentuada de atividade nos primeiros 5 minutos e uma redução de 65% após 90 minutos. (B) Estabilidade térmica da Asp-Z incubada a 60 °C por diferentes intervalos de tempo,

demonstrando maior termoestabilidade do que a L-asparaginase II de *E. coli*, retendo 75% de sua atividade após 90 minutos. (C) Espectro de dicroísmo circular (DC) da Asp-B, mostrando alterações na estrutura secundária em resposta a mudanças de temperatura entre 20 °C e 95 °C. (D) Espectro de dicroísmo circular (DC) da Asp-Z, mostrando alterações na estrutura secundária em resposta a mudanças de temperatura entre 20 °C e 95 °C.

Figura 15 - Análise da termoestabilidade de Asp-B e Asp-Z por NanoDSF.



Fonte: a autora. (A) Perfil de desdobramento térmico do Asp-B registrado em uma rampa de temperatura de 35 °C a 95 °C, resultando em uma T_m de 65 °C. (B) Perfil de desdobramento térmico do Asp-Z registrado na mesma faixa de temperatura, não mostrando nenhuma transição discernível e, portanto, nenhuma T_m calculável. No geral, o Asp-Z apresentou maior estabilidade térmica do que o Asp-B, sem evidências de desdobramento induzido por temperatura na faixa testada.

Em relação à termoestabilidade, a Asp-Z demonstrou ser altamente termoestável, uma característica vantajosa para potenciais aplicações. Essa propriedade aumenta a vida útil da proteína e confere maior resistência a condições de armazenamento e transporte prolongados, melhorando assim suas perspectivas de uso prático. A termoestabilidade da Asp-Z, demonstrada por dicroísmo circular, NanoDSF e ensaios de termotolerância, está de acordo com resultados previamente relatados para asparaginases de bactérias termofílicas (Sundaram et al., 2024). Na perspectiva biotecnológica, a estabilidade térmica demonstrada por essa enzima amplia significativamente seu potencial de aplicação. Processos industriais frequentemente operam em temperaturas mais altas, seja para aumentar a velocidade das reações, reduzir riscos de contaminação microbiana ou melhorar a solubilidade de substratos (Ravindran; Jaiswal, 2016). Nesse contexto, uma enzima que mantém sua conformação e funcionalidade em temperaturas elevadas representa uma vantagem estratégica, além disso, sua capacidade de manter a atividade catalítica em temperaturas elevadas destaca uma potencial aplicação na indústria alimentícia, particularmente na redução dos níveis de acrilamida em alimentos processados (Feng et al., 2019; Maqsood et al., 2020).

5.6 Previsão de imunogenicidade

Asp-Z apresenta um potencial imunogênico previsto ligeiramente menor em comparação com Asp-B. Análises *in silico* indicaram que Asp-Z contém menos peptídeos imunogênicos previstos para reconhecimento de MHC classe II e apresentou pontuações de ligação mais altas do que Asp-B para ambos os alelos testados (Tabela 5). Asp-B exibiu um peptídeo altamente imunogênico para o alelo HLA-DQA102:01/DQB102:02, com uma pontuação de ligação prevista de 0,06, sugerindo forte reconhecimento de MHC-II. Em contraste, Asp-Z exibiu pontuações de peptídeos previstos acima de 0,4 para o mesmo alelo, consistente com imunogenicidade prevista reduzida. A modelagem estrutural corroborou ainda mais essa observação, uma vez que Asp-Z apresentou motivos estruturais com pontuações imunogênicas mais baixas (Figura 16).

Em relação à previsão de epítomos de células B, nenhuma sobreposição completa foi observada entre os epítomos de Asp-B e Asp-Z, com apenas dois peptídeos exibindo similaridade de sequência parcial (Tabela 6). No entanto, previu-se que Asp-Z continha mais epítomos de células T CD4 do que Asp-B (Tabela 7). Alguns desses peptídeos previstos compartilhavam regiões homólogas com os peptídeos de Asp-B, mas apresentavam pontuações de ligação mais baixas, provavelmente devido a diferenças na composição de aminoácidos. Além disso, Asp-Z continha peptídeos previstos exclusivos não identificados em Asp-B, com pontuações de ligação chegando a 63. Contudo, esses peptídeos exclusivos com pontuações mais altas podem estar localizados em regiões estruturalmente ocultas da enzima e, portanto, não foram destacados na predição de epítomos estruturais de células B do DiscoTope.

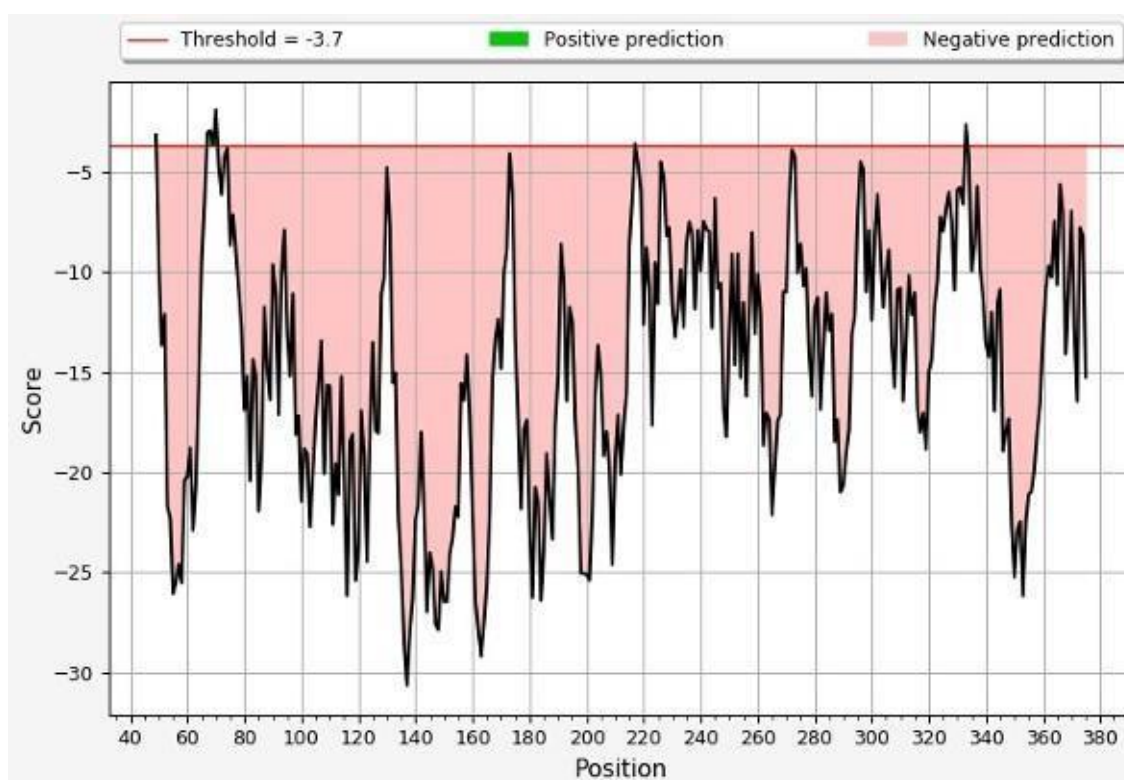
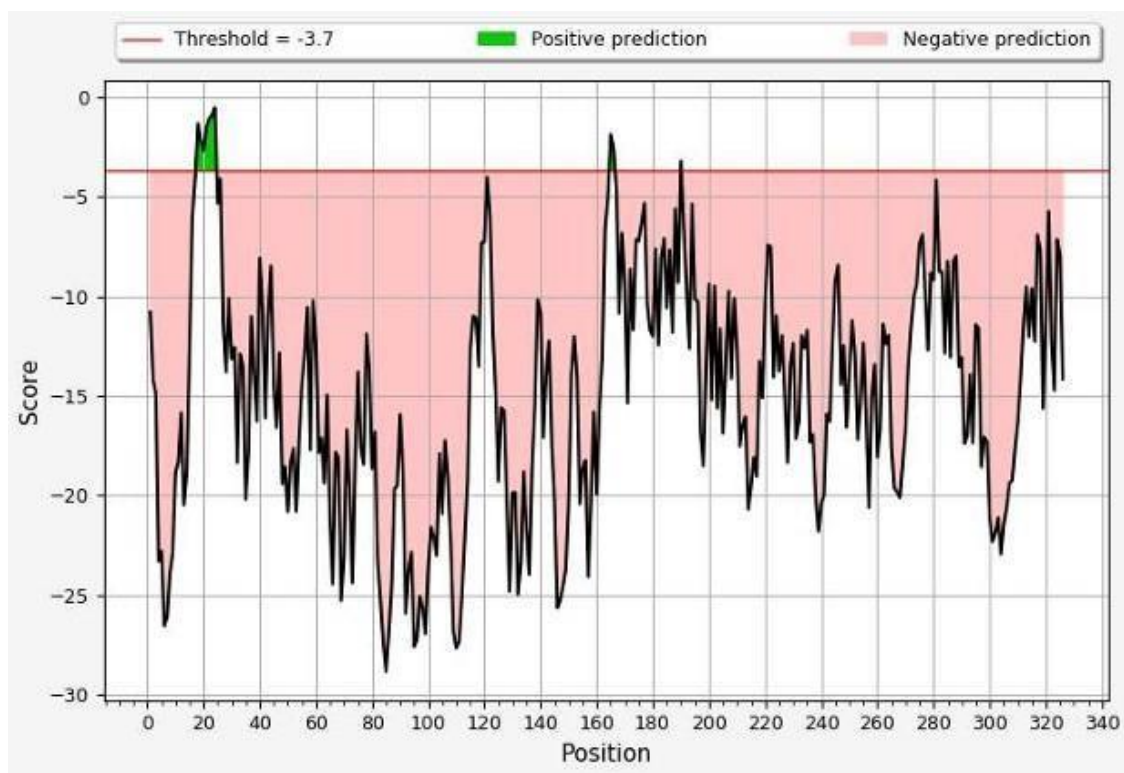
Tabela 5 - Os peptídeos imunogênicos Asp-B e Asp-Z foram previstos para o reconhecimento do MHCII.

HLA-DQA1*02:01/DQB1*02:02			
Asp-B		Asp-Z	
Predicted peptide	Percentage score	Predicted peptide	Percentage score
295 VPTGATTQDAEVDDA	0.06	227 EMGFVGTIADDIYFN	0.42
309 -	-	241 212 VTKTNTTTTDTFKSE	0.45
-	-	226 124 NHLLASDDVDGIVVT	0.75
		138	
HLA-DBR1*07:01			
Asp-B		Asp-Z	
Predicted peptide	Percentage score	Predicted peptide	Percentage score

308	0.14	100	0.13
DAKYGFVASGTLNPQ		GEQIVNVGSTNIDNK	
322		114	
237	0.21	227	0.78
GIVYNYANASDLPAK		EMGFVGTIADDIYFN	
251		241	
84	0.21	164	0.82
NDNVWLTLAKKINTD		VGSMRPSTAISADGP	
98		178	
102	0.35	91	0.96
TDGFVITHGTDTMEE		EMKDIANVSGEQIVN	
116		105	
255	0.45	-	-
DAGYDGIVSAGVGNG			
269			
63	0.45	-	-
QLKDIAANVKGEQVVN			
77			

Fonte: a autora. O limiar ≤ 1 foi usado nesta previsão e apenas peptídeos não redundantes nessa faixa de pontuação foram incluídos. Pontuações mais baixas significam maior imunogenicidade nesta análise específica.

Figura 16 - Previsão de reconhecimento de anticorpos estruturais.



Fonte: a autora. (A) Análise do monômero Asp-B (PDB 3ECA). (B) Análise da cadeia A de Asp-Z usando a estrutura resolvida. Asp-Z apresenta menos regiões positivas com pontuações mais baixas do que Asp-B, indicando menor imunogenicidade.

Tabela 6 - Peptídeos lineares previstos para Asp-B e Asp-Z para reconhecimento de células B

B-cell linear epitopes	
Asp-B	Asp-Z
140 STSMSAD 146	170 STAISAD 176
336 KDPQQIQQI 344	364 DPQKIQAY 371
299 ATTQDAEVDDA 309	328 VVTPNQDYAE 337
184 KTNTTDVATFKS 195	103 IVNVGSTNIDN 113
74 QVVNIGSQDMNDN 86	214 KTNTTTTDTFKSEE 227

Fonte: a autora. As sequências de ambas as enzimas recombinantes foram utilizadas nesta análise. Apenas peptídeos com 7 a 15 resíduos de comprimento foram incluídos.

Tabela 7 - Peptídeos previstos de Asp-B e Asp-Z para resposta imunogênica mediada por células T CD4

HLA-DRB1*07:01			
Asp-B		Asp-Z	
Predicted peptide	Allele score	Predicted peptide	Allele score
1	2.9	111	14.0
MEFFKKTALAALVMG		IDNKILLKLAKRINH	
15		125	
146	26.0	116	17.0
DGPFNLYNAVVTAAAD		LLKLAKRINHLLASD	
160		130	
166	65.0	146	40.0
RGVLVVMNDTVLDGR		ETAYFLNLTVKSDKP	
180		160	
201	19.0	176	18.0
LGYIHNGKIDYQRTP		DGPSNLYNAVKVAGA	
215		190	
236	16.0	196	44.0
VGIVYNYANASDLPA		KGTLVVLNDRIASAR	
250		210	

-	-	201	30,0
		VLNDRIASARYVTKT	
		215	
-	-	236	63.0
		DDIYFNNEITRKHTK	
		250	
-	-	271	36.0
		YQNDGSYLFDAAVKA	
		285	
-	-	276	33.0
		SYLFDAAVKAGAKGI	
		290	
-	-	351	23.0
		ARMLLMLALTKTNDP	
		365	

Fonte: a autora. Nesta análise, pontuações mais altas significam maior imunogenicidade. Apenas peptídeos não redundantes foram incluídos.

Uma das principais desvantagens das L-asparaginases disponíveis comercialmente é a sua alta imunogenicidade, que frequentemente causa reações adversas em pacientes (Burke; Zalewska-Szewczyk, 2022; Hijiya; Van der Sluis, 2016; Lee et al., 2023; Silva et al., 2020). Além disso, a produção de anticorpos neutralizantes pode reduzir a atividade da enzima a níveis subterapêuticos, comprometendo a eficácia do tratamento (Saeed et al., 2022). Nesse contexto, uma enzima com imunogenicidade reduzida, ou que pelo menos apresente epítomos distintos em comparação com as L-asparaginases comerciais, representaria uma vantagem significativa. Nossas análises *in silico* previram que a Asp-Z geralmente apresenta menor potencial imunogênico do que a Asp-B, com menos peptídeos de ligação ao MHC de classe II e menor probabilidade de reatividade cruzada. Essa característica sugere que a Asp-Z poderia ser especialmente valiosa para pacientes que desenvolvem resistência ou hipersensibilidade à ASNase de *E. coli* comercial (Zalewska-Szewczyk et al., 2009). No entanto, é importante ressaltar que esses achados se limitam a previsões computacionais e a confirmação definitiva da imunogenicidade reduzida requer validação *in vivo* em modelos animais apropriados ou sistemas derivados de pacientes. Além disso, como as respostas imunes são multifatoriais,

estudos futuros devem combinar mapeamento de epítomos, ensaios de imunogenicidade e, possivelmente, abordagens de PEGilação ou engenharia de proteínas para avaliar e otimizar completamente o perfil imunológico do Asp-Z.

5.7 Estrutura 3D geral

A estrutura cristalina de raios X da L-asparaginase II (Asp-Z) de *B. subtilis* foi determinada com uma resolução de 1,3 Å, pertencendo ao grupo espacial ortorrômbico P2₁2₁2₁. O experimento foi conduzido em parceria com o grupo liderado pelo professor Bruno Anderson Matias da Rocha, do departamento de Bioquímica da UFC, que possui grande experiência na área de cristalografia de proteínas. A estrutura foi resolvida na ausência de ligantes, como asparagina ou aspartato, e revelou um arranjo tetramérico na unidade assimétrica (Figura 17). Apesar da alta resolução, vários resíduos não puderam ser modelados em todos os quatro monômeros devido à falta de densidade eletrônica, particularmente em uma alça que abrange os resíduos 64–80, bem como na região N-terminal. No entanto, em uma cadeia (cadeia A), havia densidade eletrônica suficiente na região da alça, permitindo que todos os resíduos, exceto dois, fossem modelados.

No geral, a Asp-Z adota uma dobra estrutural semelhante a outras L-asparaginases bacterianas do tipo II, incluindo as de *Escherichia coli* e *Dickeya carotovora*. O domínio N-terminal é composto por uma folha β de 8 fitas, constituída por fitas paralelas e antiparalelas, e quatro α-hélices. O domínio C-terminal é comparativamente pequeno, semelhante ao de Asp-B, e é composto por quatro α-hélices e quatro fitas β. Quando as estruturas monoméricas de Asp-Z e Asp-B (PDB ID: 3ECA) foram sobrepostas, obteve-se um baixo valor de RMSD de 0,542 Å, indicando um alto grau de similaridade estrutural. Os resíduos Thr61 e Thr141 de Asp-Z alinharam-se bem com os resíduos Thr12 e Thr89 de Asp-B, que foram relatados como resíduos-chave do sítio ativo, indicando que os resíduos do sítio ativo de Asp-Z são Thr61 e Thr141, sendo este último o resíduo nucleofílico. As principais diferenças estruturais foram localizadas em regiões desordenadas e flexíveis (Figura 18).

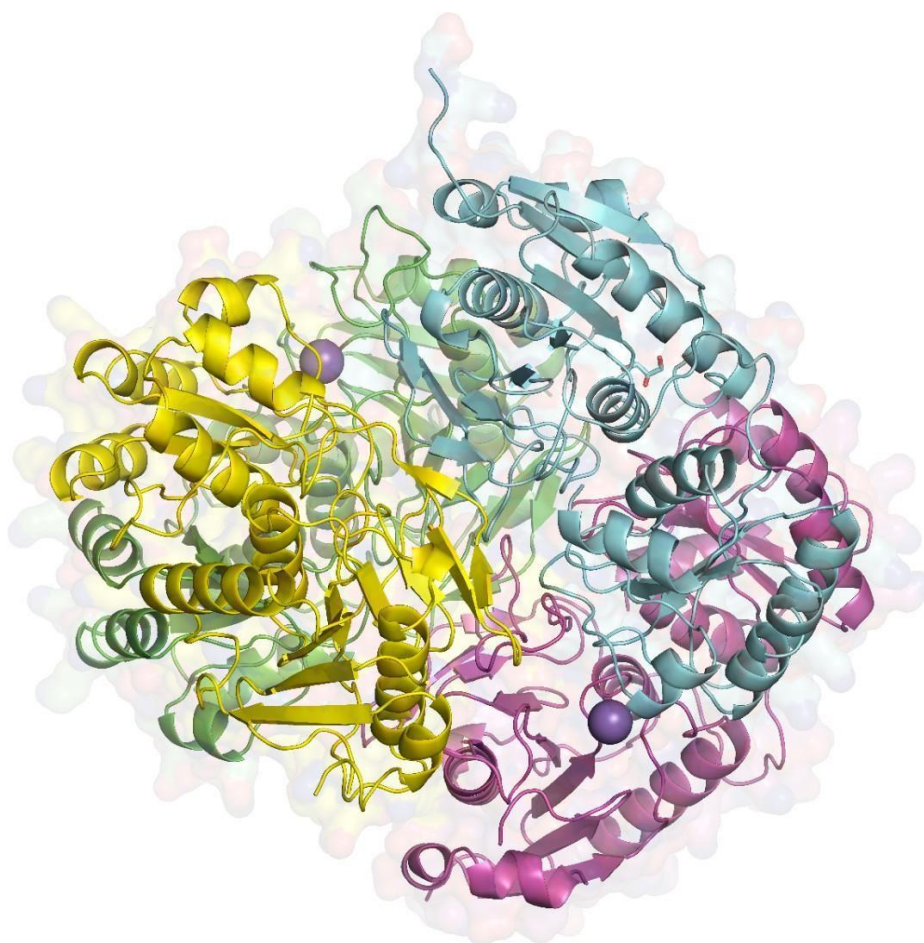
Curiosamente, a análise dos supostos sítios ativos em diferentes cadeias de Asp-Z revelou que a alça na região 64–80, que foi melhor resolvida em uma cadeia, adotou uma conformação muito semelhante à de Asp-B, enquanto as três cadeias restantes exibiram um posicionamento de alça mais distante, com um deslocamento máximo de até 10,4 Å

entre as cadeias laterais de Thr61 (Figura 19). Essas descobertas sugerem que essa alça é altamente flexível e alterna entre dois estados conformacionais em solução na ausência de substrato.

Apesar da falta de substratos no bolso catalítico, duas cadeias (A e C) continham átomos de sódio modelados dentro do sítio catalítico. Na cadeia C, o átomo de sódio interagiu principalmente com moléculas de água, embora estivesse posicionado próximo aos resíduos do sítio ativo. É provável que, na conformação aberta, a alça flexível comprometa a interação com o átomo de sódio e possivelmente com o substrato. Em contraste, a alça flexível da cadeia A estava em uma conformação fechada, onde o átomo de sódio interagia com os resíduos Thr61 e Asp142, ocupando um sítio que, de outra forma, seria acessado pelo substrato.

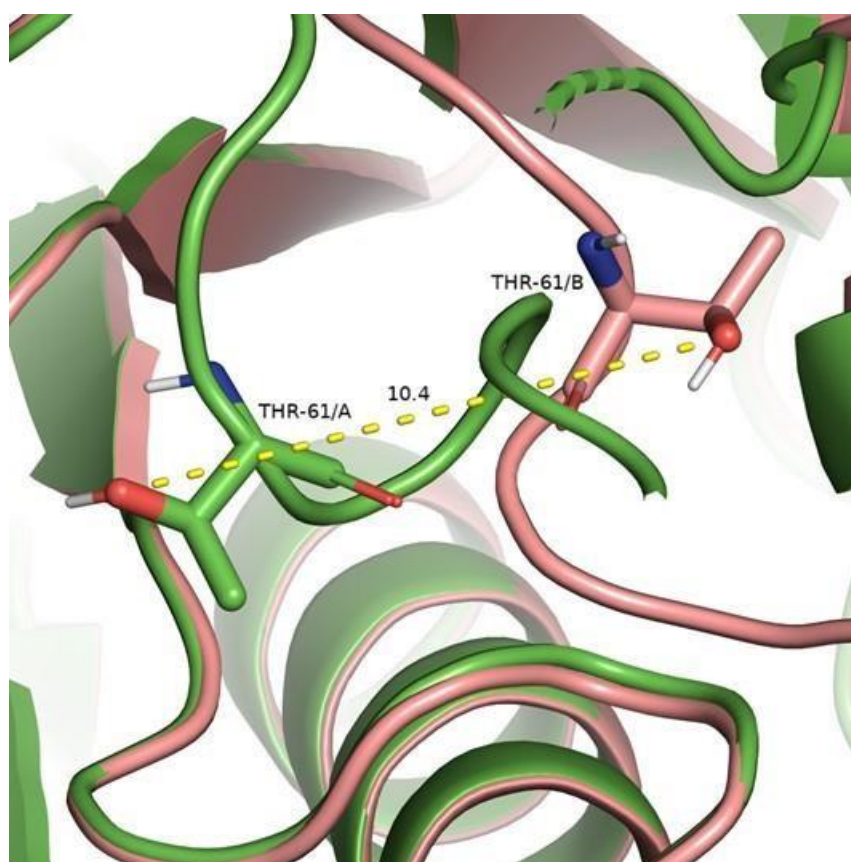
Simulações de acoplamento molecular permitiram uma análise comparativa da ligação da asparagina a Asp-Z e Asp-B. Os resultados demonstraram que a asparagina interage mais extensivamente com Asp-B do que com Asp-Z, formando um número maior de ligações de hidrogênio. Em Asp-B, a asparagina estabeleceu seis ligações de hidrogênio com os resíduos Gly11, Thr12, Ser58, Gln59 e Thr89, resultando em uma energia de ligação de $-4,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Em contraste, em Asp-Z, a asparagina formou apenas cinco ligações de hidrogênio, interagindo com os resíduos Ser108 e Thr141, resultando em uma energia de ligação mais alta de $-2,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 20).

Figura 17 - Estrutura cristalina de Asp-Z.



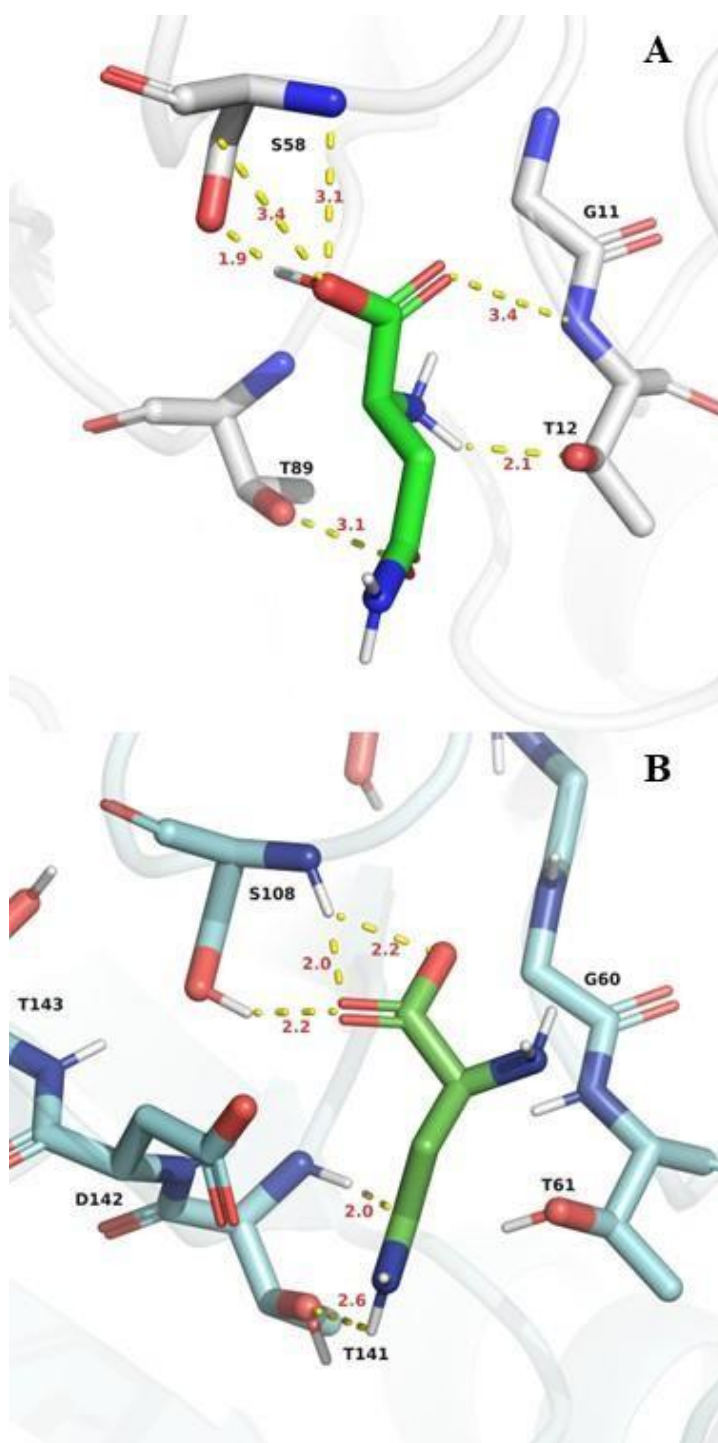
Fonte: a autora. Estrutura cristalina de Asp-Z. Estrutura cristalina tetramérica de raios X da L-asparaginase II de *B. subtilis* (Asp-Z), resolvida a 1,3 Å de resolução na ausência de ligantes ligados. Cada protômero é mostrado em uma cor diferente (amarelo, verde, rosa e azul claro). Uma molécula de glicerol da solução crioprotetora é representada por bastões com átomos de carbono em verde. Esferas roxas representam átomos de sódio da solução de cristalização, localizados próximos ao sítio catalítico entre Thr61 e Thr141.

Figura 19 - Distância entre as cadeias laterais de Thr61 nos protômeros Asp-Z



Fonte: a autora. Sobreposição de dois protômeros de Asp-Z mostrando as diferentes conformações do laço 64-80 (“tampa”). A distância entre as duas cadeias laterais de Thr61 é de 10,4 Å (linha tracejada amarela). Apenas um dos protômeros de Asp-Z apresentou a conformação mostrada em verde, enquanto os outros três apresentaram a outra, considerada a conformação de “tampa” aberta.

Figura 20 - Interações previstas da L-asparagina com Asp-B e Asp-Z



Fonte: a autora. Interações previstas da L-asparagina com Asp-B e Asp-Z. Posições de ligação da L-asparagina com Asp-B (A) e Asp-Z (B). As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas amarelas. Asp-B (cadeia proteica em verde) forma mais ligações de hidrogênio e envolve um número maior de resíduos em comparação com Asp-Z (cadeia proteica em azul claro). Essa diferença se reflete nas energias de ligação, $-4,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para Asp-B e $-2,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para Asp-Z. A atividade catalítica quase duas vezes maior de Asp-B em comparação com Asp-Z, observada em experimentos cinéticos, é consistente com esses resultados.

Estruturalmente, a Asp-Z não apresenta grandes diferenças em relação a outras L-asparaginases bacterianas do tipo II. A associação quaternária tetramérica e o sítio ativo localizado em regiões de alça flexíveis são características conservadas desta enzima (Borek et al., 2014; Papageorgiou et al., 2008; Timofeev; Zhukhlistova; Kuranova, 2020). As diferenças estruturais entre a Asp-Z e a Asp-B são relativamente sutis, como indicado pelos baixos valores de RMSD obtidos a partir de sua sobreposição, mas essas variações sutis podem contribuir para as discrepâncias cinéticas observadas. Não foi possível modelar a região N-terminal da Asp-Z devido à ausência de densidade eletrônica, provavelmente refletindo sua alta flexibilidade. Esse fenômeno também foi observado em várias outras estruturas de asparaginase bacteriana depositadas, que similarmente carecem de modelagem N-terminal completa (Lubkowski et al., 2020; Lubkowski; Wlodawer, 2019; Maggi; Scotti, 2022; Strzelczyk et al., 2020). A presença de uma etiqueta de histidina no N-terminal pode aumentar ainda mais a desordem e a flexibilidade dessa região (Carson et al., 2007).

Além da extremidade N-terminal, o laço que abrange os resíduos Gly64 a Val80 não pôde ser modelado em três das quatro cadeias de Asp-Z, indicando outra região altamente flexível. Curiosamente, uma cadeia apresentou uma conformação distinta que permitiu a modelagem quase completa, faltando apenas dois resíduos. O posicionamento desse laço influencia fortemente a orientação de resíduos cataliticamente importantes, particularmente Thr61, sugerindo que ele atua como uma “tampa”, um elemento dinâmico que estabiliza o sítio ativo após a ligação do substrato.

A observação de ambas as conformações (aberta e fechada) dentro da mesma estrutura cristalina sugere que Asp-Z alterna entre esses estados em solução na ausência de substrato (Cerofolini et al., 2019; Maggi et al., 2021; Swain et al., 1993). Foi relatado que a flexibilidade do laço influencia significativamente a afinidade do substrato e a atividade catalítica em L-asparaginases (Pokrovskaya et al., 2022) e, portanto, essa região representa um alvo potencial para mutagênese racional ou outras abordagens de engenharia de proteínas com o objetivo de melhorar a ligação do substrato e diminuir os valores de K_m .

6 CONCLUSÕES

A Asp-Z é uma L-asparaginase tipo II termoestável e pouco imunogênica, com atividade antiproliferativa demonstrável contra linhagens de células leucêmicas. Sua estrutura tridimensional apresenta forte semelhança com a Asp-B, ao mesmo tempo que revela alta flexibilidade em regiões de alça chave associadas ao sítio ativo. Essa plasticidade estrutural provavelmente contribui para as diferenças cinéticas observadas entre as duas enzimas.

No geral, as características intrínsecas da Asp-Z, como a ausência de atividade glutaminase, imunogenicidade reduzida e um pH ótimo próximo às condições fisiológicas, a destacam como uma candidata promissora para aplicações biotecnológicas. No entanto, seu K_m relativamente alto em comparação com as ASNases usadas clinicamente permanece uma limitação para o uso terapêutico direto. É importante ressaltar que os dados estruturais e bioquímicos apresentados aqui fornecem uma forte justificativa para abordagens de engenharia de proteínas. Mutagênese racional ou engenharia na região de alça podem ser empregadas para melhorar a afinidade pelo substrato e a eficiência catalítica, preservando as propriedades favoráveis da Asp-Z. Nesse sentido, o Asp-Z pode ser considerado não como um agente terapêutico de aplicação imediata, mas como uma estrutura para o desenvolvimento de ASNases de próxima geração, com potencial valor tanto em contextos clínicos quanto industriais.

REFERÊNCIAS

ADITYA M. NAIR; ANSLET MARY; SAANYA YADAV. A meta-review on principles of recombinant DNA technology. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Bengaluru, Índia, v. 10, 2021.

AGRAWAL, Sarika; JANA, Uttam Kumar; KANGO, Naveen. Heterologous expression and molecular modelling of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* ETMC-2. **International Journal of Biological Macromolecules**, Madhya Pradesh, Índia, v. 192, p. 28–37, dez. 2021.

AHMAD, Tarek A.; EWEIDA, Amrou E.; EL-SAYED, Laila H. T-cell epitope mapping for the design of powerful vaccines. **Vaccine Reports**, Alexandria, Egito, v. 6, p. 13–22, dez. 2016.

ALBERTSEN, Birgitte Klug *et al.* Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with *Erwinia asparaginase**. **Medical and Pediatric Oncology**, Aarhus, Dinamarca, v. 38, n. 5, p. 310–316, 22 maio 2002.

ALDOSS, Ibrahim; STEIN, Anthony S. Advances in adult acute lymphoblastic leukemia therapy. **Leukemia & Lymphoma**, Califórnia, USA, v. 59, n. 5, p. 1033–1050, 4 maio 2018.

ANISHKIN, Andriy *et al.* Catalytic Role of the Substrate Defines Specificity of Therapeutic l-Asparaginase. **Journal of Molecular Biology**, Maryland, EUA, v. 427, n. 17, p. 2867–2885, ago. 2015.

ANN BENOIRE, Marilee. What is in a name? (or a number?): The updated enzyme classifications. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, Michigan, EUA, v. 47, n. 4, p. 481–483, 7 jul. 2019.

ARREDONDO-NUÑEZ, Annsy *et al.* Characterization of a Type II L-Asparaginase from the Halotolerant *Bacillus subtilis* CH11. *Life*, Lima, Peru, v. 13, n. 11, p. 2145, 31 out. 2023.

AKTAR, Berin Yilmazer *et al.* Comparative structural and kinetic study for development of a novel candidate L-asparaginase based pharmaceutical. **Biochemical Engineering Journal**, Istanbul, Turquia, v. 191, p. 108806, 2023.

BARAL, Adesh *et al.* Selection of the Optimal L-asparaginase II Against Acute Lymphoblastic Leukemia: An In Silico Approach. **JMIRx Med**, Katmandu, Nepal, v. 2, n. 3, p. e29844, 8 set. 2021.

BARBOSA, Khrisna Fiuza *et al.* Reações adversas ao medicamento L-asparaginase em pacientes oncopediátricos. **Vigilância Sanitária em Debate**, Bahia, Brasil, v. 7, n. 2, p. 46–50, 31 maio 2019.

BATOOL, Tahira *et al.* A Comprehensive Review on l-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Pahang, Malásia, v. 178, n. 5, p. 900–923, 7 mar. 2016.

BECKETT, Angela; GERVAIS, David. What makes a good new therapeutic l- asparaginase? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Salisbury, Reino Unido, v. 35, n. 10, p. 152, 24 out. 2019.

BEULAH, K.; HEMALATHA, K. P. J. Screening of Medicinal Plants for Potential Source of l-Asparaginase and Optimization of Conditions for Maximum Extraction and Assay of l-Asparaginase from *Asparagus racemosus*. **Iranian Journal of Science and Technology**, Visakhapatnam, Índia, Transactions A: Science, v. 43, n. 1, p. 1–6, 14 fev. 2019.

BLANCO-LOPEZ, Jessica *et al.* Role of Maternal Diet in the Risk of Childhood Acute Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Zaragoza, Espanha, v. 20, n. 7, p. 5428, 6 abr. 2023.

BLOOM, Mackenzie *et al.* Recent advances in genetic predisposition to pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Expert Review of Hematology**, Tennessee, EUA, v. 13, n. 1, p. 55–70, 2 jan. 2020.

BOREK, Dominika *et al.* Crystal structure of active site mutant of antileukemic l-asparaginase reveals conserved zinc-binding site. **The FEBS Journal**, Poznań, Polónia, v. 281, n. 18, p. 4097–4111, 28 set. 2014.

BURKE, Michael J.; ZALEWSKA-SZEWZYK, Beata. Hypersensitivity Reactions to Asparaginase Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia: Immunology and Clinical Consequences. **Future Oncology**, Milwaukee, EUA, v. 18, n. 10, p. 1285–1299, 2 mar. 2022

CACHUMBA, Jorge Javier Muso *et al.* Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, Brasil, v. 47, p. 77–85, dez. 2016.

CALDWELL, Ruth B. *et al.* Arginase: an old enzyme with new tricks. **Trends in Pharmacological Sciences**, Geórgia, EUA, v. 36, n. 6, p. 395–405, jun. 2015.

CALLENDER, Robert; DYER, R. Brian. The Dynamical Nature of Enzymatic Catalysis. **Accounts of Chemical Research**, Nova York, EUA, v. 48, n. 2, p. 407–413, 17 fev. 2015.

CARLSSON, Anna-Carin C. *et al.* Increasing Enzyme Stability and Activity through Hydrogen Bond-Enhanced Halogen Bonds. **Biochemistry**, Colorado, EUA, v. 57, n. 28, p. 4135–4147, 17 jul. 2018.

CARSON, Mike *et al.* His-tag impact on structure. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, Alabama, EUA, v. 63, n. 3, p. 295–301, 1 mar. 2007.

CASTRO, Daniel *et al.* L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Aveiro, Portugal, v. 105, n. 11, p. 4515–4534, 1 jun. 2021.

CEROFOLINI, Linda *et al.* Characterization of PEGylated Asparaginase: New Opportunities from NMR Analysis of Large PEGylated Therapeutics. **Chemistry – A European Journal**, Florença, Itália, v. 25, n. 8, p. 1984–1991, 6 fev. 2019.

CHEN, Vincent B. *et al.* *MolProbity* : all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, Durham, EUA, v. 66, n. 1, p. 12–21, 1 jan. 2010.

CHIU, Martina *et al.* Asparagine Synthetase in Cancer: Beyond Acute Lymphoblastic Leukemia. **Frontiers in Oncology**, Parma, Itália, v. 9, 9 jan. 2020.

CLAUS, Achim; CARLE, Reinhold; SCHIEBER, Andreas. Acrylamide in cereal products: A review. **Journal of Cereal Science**, Stuttgart, Alemanha, v. 47, n. 2, p. 118–133, mar. 2008.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, Toulouse, França, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 25 nov. 1988.

COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. **Blood Reviews**, São Paulo, Brasil, v. 43, p. 100651, set. 2020.

COWTAN, Kevin. The *Buccaneer* software for automated model building. 1. Tracing protein chains. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, York, Inglaterra, v. 62, n. 9, p. 1002–1011, 1 set. 2006.

DA CUNHA, Marília Crivelari *et al.* Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. **Food Research International**, Campinas, Brasil, v. 126, p. 108658, dez. 2019.

DA SILVA, Leonardo Schultz *et al.* Structural and functional diversity of asparaginases: Overview and recommendations for a revised nomenclature. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, São Paulo, Brasil, v. 69, n. 2, p. 503–513, 19 abr. 2022.

DANI BENCHAMIN *et al.* Anti-proliferative activity of L-Asparaginase enzyme from fungi on breast cancer. **Journal Pharmacogn Phytochem**, Kollam, Índia, v. 8, n. 1, p. 407–410, 2019.

DARREN R. FLOWER. Predicting immunogenicity in silico. In: *Methods in Molecular Biology - Immunoinformatics*. **S.I: Humana Press**, Totowa, EUA, 2007. v. 409

DAVID L NELSON; MICHAEL M. COX. **Lehninger principles of biochemistry**. 6. ed. New York: W.H.Freeman and Company: [S.n.], 2014.

DE MORAIS, Everton Freitas *et al.* Oral manifestations resulting from chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, Natal, Brasil, v. 80, n. 1, p. 78–85, jan. 2014.

DEBAJIT BORAH *et al.* Production, purification and process optimization of asparagines (an anticancer enzyme) from e.coli, isolated from sewage water. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Dehradun, Índia, v. 5, p. 202–204, 2012.

DELANO, Warren. Pymol: an open source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter Protein Crystallography**, San Carlos, EUA, v. 40, n. 1, p. 82–92, 2002.

DENIS BORGES BARBOSA. **A geração de tecnologia de fármacos e medicamentos através de mecanismos de compra estatal voltado ao desenvolvimento de alternativas**. Belo Horizonte: Fórum, 2013.: Parecerias público privadas de medicamentos (PDPS)., 2013. p. 101-170.

DERST, Christian; HENSELING, Johannes; RÖHM, Klaus-Heinrich. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. **Protein Science**, Witten, Alemanha, v. 9, n. 10, p. 2009–2017, 31 jan. 2000.

DHANDA, Sandeep Kumar *et al.* Predicting HLA CD4 Immunogenicity in Human Populations. **Frontiers in Immunology**, La Jolla, EUA, v. 9, 14 jun. 2018.

DIAS, Fernanda Furlan Gonçalves; SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves dos; SATO, Helia Harumi. l-Asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotech**, Campinas, Brasil, v. 9, n. 7, p. 289, 27 jul. 2019.

EDUARD H. PANOSYAN *et al.* Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG 1961. **J Pediatr Hematol Oncol**, Los Angeles, EUA, v. 26, n. 4, p. 217–226, 2004.

EMSLEY, Paul; COWTAN, Kevin. *Coot* : model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, York, Reino Unido, v. 60, n. 12, p. 2126– 2132, 1 dez. 2004.

FENG, Yue *et al.* Gene cloning and expression of the l-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Wuxi, China, v. 127, n. 4, p. 418–424, abr. 2019.

FERNANDEZ, Christian A. *et al.* HLA-DRB1*07:01 is associated with a higher risk of asparaginase allergies. **Blood**, Memphis, EUA, v. 124, n. 8, p. 1266–1276, 21 ago. 2014.

FLORENT MALARD; MOHAMAD MOHTY. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, Paris, França, v. 395, n. 10230, p. 1146–1162, 2020.

FRANCISCONI, Carolina Favaro *et al.* Leukemic Oral Manifestations and their Management. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, São Paulo, Brasil, v. 17, n. 3, p. 911–915, 11 abr. 2016.

GAUFICHON, Laure *et al.* Biological functions of asparagine synthetase in plants. **Plant Science**, Versalhes, França, v. 179, n. 3, p. 141–153, set. 2010.

GAUFICHON, Laure; ROTHSTEIN, Steven J.; SUZUKI, Akira. Asparagine Metabolic Pathways in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Versalhes, França, v. 57, n. 4, p. 675–689, abr. 2016.

GESTO, Diana S. *et al.* Unraveling the Enigmatic Mechanism of α -Asparaginase II with QM/QM Calculations. **Journal of the American Chemical Society**, Porto, Portugal, v. 135, n. 19, p. 7146–7158, 15 maio 2013.

GIANNI, Francesca; BELVER, Laura; FERRANDO, Adolfo. The Genetics and Mechanisms of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Nova York, EUA, v. 10, n. 3, p. a035246, mar. 2020.

GOMES, Camila de Carvalho *et al.* Nutritional status and appetite-regulating hormones in early treatment of acute lymphoblastic leukemia among children and adolescents: a cohort study. **Sao Paulo Medical Journal**, Natal, Brasil, v. 138, n. 2, p. 118–125, mar. 2020.

GOMES, José Gabriel da Silva *et al.* Kinetics characterization of a low immunogenic recombinant L-asparaginase from *Phaseolus vulgaris* with cytotoxic activity against leukemia cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Fortaleza, Ceará, v. 275, p. 133731, ago. 2024.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. Factors affecting enzyme activity. *In: Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality. [S.l.]: Elsevier, Amsterdã, 2015. p. 11–55.*

HAMLEY, I. W. Small Bioactive Peptides for Biomaterials Design and Therapeutics. **Chemical Reviews**, Washington, EUA, v. 117, n. 24, p. 14015–14041, 27 dez. 2017.

HIJIYA, Nobuko; VAN DER SLUIS, Inge M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, Londres, Reino Unido, v. 57, n. 4, p. 748–757, 2 abr. 2016.

HU, Yunzi *et al.* Recent advances in substrate-enzyme interactions facilitating efficient

biodegradation of lignocellulosic biomass: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Guangzhou, China, v. 180, p. 105594, maio 2023.

HUNGER, Stephen P.; RAETZ, Elizabeth A. How I treat relapsed acute lymphoblastic leukemia in the pediatric population. **Blood**, Nova York, EUA, v. 136, n. 16, p. 1803–1812, 15 out. 2020.

IMADA, A. *et al.* Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, Osaka, Japão, v. 76, n. 1, p. 85–99, 1 maio 1973.

INABA, Hiroto; MULLIGHAN, Charles G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, Memphis, EUA, v. 105, n. 11, p. 2524–2539, 10 set. 2020.

IRINO, Tamotsu *et al.* Establishment of Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Quantitative Analysis of Asparagine Synthetase Expression. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Tóquio, Japão, v. 6, n. 3, p. 217–224, ago. 2004.

ISHIDA, Hisashi *et al.* Impact of asparaginase discontinuation on outcomes of children with acute lymphoblastic leukaemia receiving the Japan Association of Childhood Leukaemia Study <scp>ALL</scp> -02 protocol. **British Journal of Haematology**, Quioto, Japão, v. 201, n. 6, p. 1200–1208, 9 jun. 2023.

IZADPANA QESHMI, Fatemeh *et al.* Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, Bandar Abbas, Irã v. 208, p. 99–112, mar. 2018.

JAISON, Nevin *et al.* Biocrystallization: Harnessing natural scaffolds for stable protein crystal formulations. **New Biotechnology**, Cochi, Índia, v. 90, p. 257–267, dez. 2025.

JALAJA VIDYA *et al.* Cloning, Functional Expression and Characterization of L-Asparaginase II from E. coli MTCC 739. **Food Technol. Biotechnol**, Curitiba, Brasil, v. 49, n. 3, p. 286–290, 2011.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, Berkeley, EUA, v. 24, n. 4, p. 409–411, 1 ago. 1991.

JESPERSEN, Martin Closter *et al.* BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, Lyngby, Dinamarca v. 45, n. W1, p. W24–W29, 3 jul. 2017.

JIA, Mingmei *et al.* Cloning, Expression, and Characterization of <scp>l</scp> - Asparaginase from a Newly Isolated Bacillus subtilis B11–06. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Wuxi, China, v. 61, n. 39, p. 9428–9434, 2 out. 2013.

JIA, Ruiying *et al.* Microbial L-asparaginase for Application in Acrylamide Mitigation from Food: Current Research Status and Future Perspectives. **Microorganisms**, Wuxi, China, v. 9,

n. 8, p. 1659, 3 ago. 2021.

JIANG, Jie; BATRA, Sandeep; ZHANG, Ji. Asparagine: A Metabolite to Be Targeted in Cancers. **Metabolites**, Indianapolis, EUA, v. 11, n. 6, p. 402, 19 jun. 2021.

JTS LI; CK LI; ·F CHENG. EE153 Cost From Asparaginase Utilization in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukaemia in Hong Kong Paediatrics Population According to CCCG-2015 Protocol. **VALUE IN HEALTH**, Hong Kong, v. 25, n. 12, p. S82–S83, 2022.

KABSCH, Wolfgang. *XDS*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, Heidelberg, Alemanha, v. 66, n. 2, p. 125–132, 1 fev. 2010.

KATHARINE S. WORTON; ROBERT S. KERBEL; IRENE L. ANDRULIS. Hypomethylation and Reactivation of the Asparagine Synthetase Gene Induced by l-Asparaginase and Ethyl Methanesulfonate. **Cancer research**, Toronto, Canadá, v. 51, n. 3, p. 985–989, 1991.

KATO, Motohiro; MANABE, Atsushi. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatrics International**, Tóquio, Japão, v. 60, n. 1, p. 4–12, 21 jan. 2018.

KNOTT, Simon R. V. *et al.* Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. **Nature**, Cambridge, Reino Unido v. 554, n. 7692, p. 378–381, 15 fev. 2018.

KOTZIA, Georgia A.; LABROU, Nikolaos E. l-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. **Journal of Biotechnology**, Atenas, Grécia, v. 127, n. 4, p. 657–669, jan. 2007.

KRALL, Abigail S. *et al.* Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. **Nature Communications**, Los Angeles, EUA. v. 7, n. 1, p. 11457, 29 abr. 2016.

KRINGELUM, Jens Vindahl *et al.* Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. **PLoS Computational Biology**, Lyngby, Dinamarca, v. 8, n. 12, p. e1002829, 27 dez. 2012.

KUMAR, Monish *et al.* Enzymatic depletion of circulating glutamine is immunosuppressive in cancers. **iScience**, Houston, EUA, v. 27, n. 6, p. 109817, jun. 2024.

KUMARI, Neha; BANSAL, Saurabh. Arginine depriving enzymes: applications as emerging therapeutics in cancer treatment. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Solan, Índia, v. 88, n. 4, p. 565–594, 26 out. 2021.

KUTSZEKI, Nóra *et al.* HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*02:02 haplotype is associated with a high risk of asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, Budapeste, Hungria. v. 102, n. 9, p. 1578–1586, set.

2017.

LANVERS, Claudia *et al.* Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of l-asparaginase in human serum. **Analytical Biochemistry**, Muenster, Alemanha, v. 309, n. 1, p. 117–126, out. 2002.

LANVERS-KAMINSKY, Claudia. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Muenster, Alemanha, v. 79, n. 3, p. 439–450, 14 mar.2017.

LAZARUS, H. *et al.* Nutritional requirements of human leukemic cells. **Experimental Cell Research**, Boston, EUA, v. 57, n. 1, p. 134–138, set. 1969.

LEA, P. J. *et al.* Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, Campinas, Brasil, v. 150, n. 1, p. 1–26, 14 fev. 2007.

LEE, Angela *et al.* Treatment and outcomes of symptomatic hyperammonemia following asparaginase therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, Missouri, EUA, v. 139, n. 3, p. 107627, jul. 2023.

LEKSMONO, Cattleya S. *et al.* Measuring Lactase Enzymatic Activity in the Teaching Lab. **Journal of Visualized Experiments**, Reading, Reino Unido n. 138, 6 ago. 2018.

LEONE, Francisco Assis *et al.* SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, Ribeirão Preto, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 399–403, 3 nov. 2005.

LI, YAQING *et al.* Asparagine synthetase expression and its potential prognostic value in patients with NK/T cell lymphoma. **Oncology Reports**, Zhengzhou, China, v. 32, n. 2, p. 853–859, ago. 2014.

LIEBSCHNER, Dorothee *et al.* Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in *Phenix*. **Acta Crystallographica Section D Structural Biology**, Berkeley, EUA, v. 75, n. 10, p. 861–877, 1 out. 2019.

LILLJEBJÖRN, Henrik *et al.* Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4- rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Communications**, Lund, Suécia, v. 7, n. 1, p. 11790, 6 jun. 2016.

LIM, Hyun-Chang; KIM, Chang-Sung. Oral signs of acute leukemia for early detection. **Journal of Periodontal & Implant Science**, Seoul, Coreia do Sul, v. 44, n. 6, p. 293, 2014.

LIU, Yu *et al.* The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, Memphis, EUA, v. 49, n. 8, p. 1211–1218, 1 ago. 2017.

- LOBO-ALVES, Sara Cristina *et al.* Long noncoding RNA expression in acute lymphoblastic leukemia: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Porto Alegre, Brasil, v. 196, p. 104290, abr. 2024.
- LOCH, Joanna I. *et al.* Crystal structures of the elusive *Rhizobium etli* L-asparaginase reveal a peculiar active site. **Nature Communications**, Polônia, v. 12, n. 1, p. 6717, 18 nov. 2021.
- LOPES, André Moreni *et al.* Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, São Paulo, Brasil, v. 37, n. 1, p. 82–99, 2 jan. 2017.
- LORSCH, Jon R. **Practical Steady-State Enzyme Kinetics**. San Diego: Editora: Academic Press, 2014. p. 3–15.
- LUBKOWSKI, Jacek *et al.* Mechanism of Catalysis by L-Asparaginase. **Biochemistry**, Frederick, EUA, v. 59, n. 20, p. 1927–1945, 26 maio 2020.
- LUBKOWSKI, Jacek; WLODAWER, Alexander. Geometric considerations support the double-displacement catalytic mechanism of L-asparaginase. **Protein Science**, Frederick, EUA v. 28, n. 10, p. 1850–1864, 29 out. 2019.
- LUKEY, Michael J.; KATT, William P.; CERIONE, Richard A. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, Nova York, EUA v. 22, n. 5, p. 796–804, maio 2017.
- MAGGI, Maristella *et al.* Revealing *Escherichia coli* type II L-asparaginase active site flexible loop in its open, ligand-free conformation. **Scientific Reports**, Pavia, Itália v. 11, n. 1, p. 18885, 23 set. 2021.
- MAGGI, Maristella; SCOTTI, Claudia. Structural Aspects of *E. coli* Type II Asparaginase in Complex with Its Secondary Product L-Glutamate. **International Journal of Molecular Sciences**, Pavia, Itália, v. 23, n. 11, p. 5942, 25 maio 2022.
- MAGRI, Agnes *et al.* A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Araraquara, Brasil, v. 410, n. 27, p. 6985–6990, 29 nov. 2018.
- MAQSOOD, Beenish *et al.* Characterization of a thermostable, allosteric L- asparaginase from *Anoxybacillus flavithermus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Paquistão, v. 152, p. 584–592, jun. 2020.
- MICHALOWSKI, Mariana Bohns *et al.* Influence of different asparaginase formulations in the prognosis of children with acute lymphocytic leukaemia in Brazil: a multicentre, retrospective controlled study. **British Journal of Haematology**, Porto Alegre, Brasil, v. 194, n. 1, p. 168–173, 15 jul. 2021.
- MICHALSKA, Karolina; HERNANDEZ-SANTOYO, Alejandra; JASKOLSKI,

Mariusz. The Mechanism of Autocatalytic Activation of Plant-type L-Asparaginases.

Journal of Biological Chemistry, Poznań, Polónia, v. 283, n. 19, p. 13388–13397, maio 2008.

MIRDITA, Milot *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, Göttingen, Alemanha, v. 19, n. 6, p. 679–682, 30 jun. 2022.

MIRGHASEMI, Seyed *et al.* Exploring bacillus subtilis isolated from soil as a promising alternative for Lasparaginase enzyme production. **Health Biotechnology and Biopharma**, Gorgan, Irã, v. 7, n. 2, p. 577–58, 2023.

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular l-asparaginase produced by Cladosporium sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Mysore, Índia, v. 29, n. 4, p. 577–587, 24 abr. 2013.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Palo Alto, EUA, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOSTAFA, Yasser *et al.* Enhanced production of glutaminase-free l-asparaginase by marine Bacillus velezensis and cytotoxic activity against breast cancer cell lines. **Electronic Journal of Biotechnology**, México, v. 42, p. 6–15, nov. 2019.

MÜLLER, H. Use of l-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Amsterdã, Holanda v. 28, n. 2, p. 97–113, ago. 1998.

MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, Chester, Reino Unido v. 53, n. 3, p. 240–255, 1 maio 1997.

NABEEL AHMAD; NITIN PRAKASH PANDIT; SANJIV KUMAR MAHESHWARI. L-asparaginase gene - a therapeutic approach towards drugs for cancer cell. **International Journal of Biosciences**, Bangladesh, Rockville, EUA v. 2, n. 4, p. 1–11, 2012.

NGUYEN, Hien Anh; SU, Ying; LAVIE, Arnon. Design and Characterization of Erwinia Chrysanthemi l-Asparaginase Variants with Diminished l-Glutaminase Activity. **Journal of Biological Chemistry**, Amsterdã, Holanda, v. 291, n. 34, p. 17664–17676, ago. 2016.

OBERKERSCH, Roxana E.; SANTORO, Massimo M. Role of amino acid metabolism in angiogenesis. **Vascular Pharmacology**, Padova, Itália, v. 112, p. 17–23, jan. 2019.

ONISHI, Yohei *et al.* Expression in Escherichia coli of a gene encoding type II l- asparaginase from Bacillus subtilis, and characterization of its unique properties. **Annals of Microbiology**, Kagawa, Japão, v. 61, n. 3, p. 517–524, 7 set. 2011.

PALM, Gottfried J. *et al.* A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase : Crystal structure of a Thr-89-Val mutant. **FEBS Letters**, Berlim, Alemanha, v.

390, n. 2, p. 211–216, 22 jul. 1996.

PAPAGEORGIU, Anastassios C. *et al.* Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* -asparaginase. **The FEBS Journal**, Turku, Finlândia, v. 275, n. 17, p. 4306–4316, 7 set. 2008.

POKROVSKAYA, Marina V. *et al.* Molecular Analysis of L-Asparaginases for Clarification of the Mechanism of Action and Optimization of Pharmacological Functions. **Pharmaceutics**, Sochi, Rússia, v. 14, n. 3, p. 599, 9 mar. 2022.

PONTÉN, F.; JIRSTRÖM, K.; UHLEN, M. The Human Protein Atlas—a tool for pathology. **The Journal of Pathology**, Estocolmo, Suécia, v. 216, n. 4, p. 387–393, 13 dez. 2008.

PUI, Ching-Hon *et al.* Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet Child & Adolescent Health**, Memphis, EUA, v. 2, n. 6, p. 440–454, jun. 2018.

RADADIYA, Ashish *et al.* Improving the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Biochemistry**, Índia, v. 59, n. 35, p. 3193–3200, 8 set. 2020.

RAVINDRAN, Rajeev; JAISWAL, Amit. Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. **Bioengineering**, Dublin, Irlanda, v. 3, n. 4, p. 30, 16 nov. 2016.

REYNISSON, Birkir *et al.* NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Research**, Kongens Lyngby, Dinamarca, v. 48, n. W1, p. W449–W454, 2 jul. 2020.

ROBERTS, Kathryn G.; MULLIGHAN, Charles G. The Biology of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Memphis, EUA, v. 10, n. 7, p. a034835, jul. 2020.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, Rosario, Argentina, v. 5, 17 abr. 2014.

SAEED, Hesham *et al.* L-asparaginase from *Dickeya chrysanthemi* : expression, purification and cytotoxicity assessment. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, Alexandria, Egito, v. 52, n. 6, p. 668–680, 1 jul. 2022.

SANCHES, Mario; KRAUCHENCO, Sandra; POLIKARPOV, Igor. Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases. **Current Chemical Biology**, São Carlos, Brasil, v. 1, n. 1, p. 75–86, 1 jan. 2007.

SCHALK, Amanda M. *et al.* Experimental Data in Support of a Direct Displacement Mechanism for Type I/II l-Asparaginases. **Journal of Biological Chemistry**, Chicago, EUA, v. 291, n. 10, p. 5088–5100, mar. 2016.

SCHNUCHEL, Arndt *et al.* Quality comparison of a state-of-the-art preparation of a recombinant L-asparaginase derived from *Escherichia coli* with an alternative asparaginase product. **PLOS ONE**, Berlim, Alemanha, v. 18, n. 6, p. e0285948, 15 jun. 2023.

SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE (SCTIE). **Projetos de Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP)**, D&I - Extintas - Medicamentos, Vacinas e Hemoderivados, Brasília, 2022.

SHAFQAT, Ifrah *et al.* Characterization and applications of glutaminase free L- asparaginase from indigenous *Bacillus halotolerans* ASN9. **PLOS ONE**, Lahore, Paquistão, v. 18, n. 11, p. e0288620, 28 nov. 2023a.

SHAFQAT, Ifrah *et al.* Characterization and applications of glutaminase free L- asparaginase from indigenous *Bacillus halotolerans* ASN9. **PLOS ONE**, Lahore, Paquistão, v. 18, n. 11, p. e0288620, 28 nov. 2023b.

SHARMA, Deepankar; MISHRA, Abha. Apoptosis induction in leukemic cells by L-asparaginase preparation from *Bacillus indicus*: bench-scale production, purification and therapeutic application. **3 Biotech**, Varanasi, Índia, v. 13, n. 1, p. 21, 21 jan. 2023.

SHIFRIN, Sidney; PARROTT, Catherine L.; LUBORSKY, Samuel W. Substrate Binding and Intersubunit Interactions in l-Asparaginase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, EUA, v. 249, n. 5, p. 1335–1340, mar. 1974.

SHISHPARENOK, Anastasiya N.; GLADILINA, Yulia A.; ZHDANOV, Dmitry D. Engineering and Expression Strategies for Optimization of L-Asparaginase Development and Production. **International Journal of Molecular Sciences**, Moscou, Rússia, v. 24, n. 20, p. 15220, 16 out. 2023.

SHORT, Nicholas J.; KANTARJIAN, Hagop; JABBOUR, Elias. Optimizing the treatment of acute lymphoblastic leukemia in younger and older adults: new drugs and evolving paradigms. **Leukemia**, Houston, EUA, v. 35, n. 11, p. 3044–3058, 25 nov. 2021.

SIDNEY SHIFRIN; CATHERINE L PARROTT. In vitro assembly of L asparaginase subunits. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, EUA, v. 249, n. 13, p. 4175–4180, 1974.

SIECIECHOWICZ, Konrad A.; JOY, Kenneth W.; IRELAND, Robert J. The metabolism of asparagine in plants. **Phytochemistry**, Sackville, Canadá, v. 27, n. 3, p. 663–671, jan. 1988.

SILPA SOMAVARAPU *et al.* Enzymes from Microorganisms. **Innovations in Biotechnology for a Sustainable Future**, Guntur, Índia, p. 45–58, 2021.

SILVA, Wellington F. da *et al.* Toxicity Profile of PEG-Asparaginase in Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil: A Multicenter Cross-Sectional Study. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, Curitiba, Brasil, v. 20, n. 8, p. e523–e528, ago. 2020.

SILVA, Wellington *et al.* Healthcare inequities in Latin America outweigh the benefits of pediatric regimens in adult acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, São Paulo, Brasil, v. 146, n. Supplement 1, p. 288–288, 3 nov. 2025.

SIMAS, Rodrigo G. *et al.* An improved method for simple and accurate colorimetric determination of *L*-asparaginase enzyme activity using Nessler's reagent. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, São Paulo, Brasil, v. 96, n. 5, p. 1326–1332, 8 maio 2021.

SOARES, Sandra Clara *et al.* Oral Manifestations: A Warning-Sign in Children with Hematological Disease Acute Lymphocytic Leukemia. **Hematology Reports**, Porto Alegre, Brasil, v. 15, n. 3, p. 491–502, 24 ago. 2023.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. **Analytical Biochemistry**, Collins, EUA, v. 209, n. 1, p. 32–44, fev. 1993.

SREERAMA, Narasimha; VENYAMINOV, Sergei Yu.; WOODY, Robert W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. **Analytical Biochemistry**, Collins, EUA, v. 287, n. 2, p. 243–251, dez. 2000.

SRINIVASAN, Bharath. Words of Advice: teaching enzyme kinetics. **The FEBS Journal**, Cambridge, Reino Unido, v. 288, n. 7, p. 2068–2083, 27 abr. 2021.

STELIAROVA-FOUCHER, Eva *et al.* International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. **The Lancet Oncology**, Lyon, França, v. 18, n. 6, p. 719–731, jun. 2017.

STRZELCZYK, Pawel *et al.* Generalized enzymatic mechanism of catalysis by tetrameric *L*-asparaginases from mesophilic bacteria. **Scientific Reports**, Londres, Reino Unido, v. 10, n. 1, p. 17516, 15 out. 2020.

SUNDARAM, Srivarshan Shanmuga *et al.* Thermostable bacterial *L*-asparaginase for polyacrylamide inhibition and in silico mutational analysis. **International Microbiology**, Berlim, Alemanha, v. 27, n. 6, p. 1765–1779, 23 mar. 2024.

SUNDFELD, Carlos Ari; SOUZA, Rodrigo Pagani de. Parcerias para o desenvolvimento produtivo em medicamentos e a Lei de Licitações. **Revista de Direito Administrativo**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 264, p. 91–133, 1 set. 2013.

SWAIN, A. L. *et al.* Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, EUA, v. 90, n. 4, p. 1474–1478, 15 fev. 1993.

SY CHO; AC CHENG; MCK CHENG. Oral care for children with leukaemia. **Hong Kong Medical Journal**, Hong Kong, China, v. 6, n. 2, p. 203–208, 2000.

TIMOFEEV, V. I.; ZHUKHLISTOVA, N. E.; KURANOVA, I. P. Molecular Packing of a Mutant of L-Asparaginase from Wolinella succinigenes in Two Crystal Modifications. **Crystallography Reports**, Moscou, Rússia, v. 65, n. 4, p. 586–592, 28 jul. 2020.

TOSTA PÉREZ, María *et al.* l-Asparaginase as the gold standard in the treatment of acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review. **Medical Oncology**, Londres, Inglaterra, v. 40, n. 5, p. 150, 15 abr. 2023.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, San Diego, EUA, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

UHLEN, Mathias *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. **Science**, Estocolmo Suécia, v. 357, n. 6352, 18 ago. 2017.

ULU, Ahmet; ATES, Burhan. Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. **Bioconjugate Chemistry**, Malatya, Turquia, v. 28, n. 6, p. 1598–1610, 21 jun. 2017.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement. **Journal of Applied Crystallography**, Copenhagen, Dinamarca v. 30, n. 6, p. 1022–1025, 1 dez. 1997.

VICTORINO DA SILVA AMATTO, Isabela *et al.* Enzyme engineering and its industrial applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Hoboken, EUA v. 69, n. 2, p. 389–409, 25 abr. 2022.

VIDYA, Jalaja *et al.* RETRACTED: Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: An overview. **Bioresource Technology**, Amsterdã, Holanda v. 245, p. 1775–1781, dez. 2017.

WAN, Hong. An Overall Comparison of Small Molecules and Large Biologics in ADME Testing. **ADMET & DMPK**, Zagreb, Croáciav. 4, n. 1, p. 1, 30 mar. 2016.

WANG, Yiming *et al.* Efficient control of acrylamide in French fries by an extraordinarily active and thermo-stable l-asparaginase: A lab-scale study. **Food Chemistry**, Amsterdã, Holanda, v. 360, p. 130046, out. 2021.

WHITMORE, Lee; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, Hoboken, EUA, v. 89, n. 5, p. 392–400, 25 maio 2008.

WINN, Martyn D. *et al.* Overview of the CCP 4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, Warrington, Reino Unido, v. 67, n. 4, p. 235–242, 1 abr. 2011.

WOO, Michael H. *et al.* Hypersensitivity or Development of Antibodies to Asparaginase Does Not Impact Treatment Outcome of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, Memphis, EUA, v. 18, n. 7, p. 1525–1532, 7 abr. 2000.

YAN, Hong; CHEN, Fen-Er. Recent Progress in Solid-Phase Total Synthesis of Naturally Occurring Small Peptides. **Advanced Synthesis & Catalysis**, Xangai, China v. 364, n. 12, p. 1934–1961, 21 jun. 2022.

YANO, Shigekazu *et al.* Overexpression of type I L-asparaginase of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*, rapid purification and characterisation of recombinant type I L-asparaginase. **Annals of Microbiology**, Kanazawa, Japão, v. 58, n. 4, p. 711–716, dez. 2008.

YAO, Min *et al.* Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* at 2.16 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, Sapporo, Japão v. 61, n. 3, p. 294–301, 1 mar. 2005.

YUN, Mi-Kyung *et al.* Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* l-Asparaginase I. **Journal of Molecular Biology**, Memphis, EUA, v. 369, n. 3, p. 794–811, jun. 2007.

ZALEWSKA-SZEWCZYK, Beata *et al.* The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different l-asparaginase preparations. **Clinical and Experimental Medicine**, Lodz, Polônia, v. 9, n. 2, p. 113–116, 30 jun. 2009.

ZENATTI, Priscila Pini *et al.* Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of *E. coli* l-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **BioMedicine**, Campinas, Brasil v. 30, p. 158–166, abr. 2018.

ZHOU, Yawen *et al.* Enhancing the Catalytic Activity of Type II L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* through Semi-Rational Design. **International Journal of Molecular Sciences**, Wuxi, China v. 23, n. 17, p. 9663, 26 ago. 2022.