



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

ARIANY LIMA SOUSA TORRES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA L-ASPARAGINASE II *ansZ*
RECOMBINANTE DO *Bacillus subtilis* 168 EXPRESSA EM *Escherichia coli* E
AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL CITOTÓXICO**

FORTALEZA

2018

ARIANY LIMA SOUSA TORRES

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA L-ASPARAGINASE II *ansZ* RECOMBINANTE
DO *Bacillus subtilis* 168 EXPRESSA EM *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DE SEU
POTENCIAL CITOTÓXICO

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Enzimologia.

Orientador pedagógico: Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves

Orientador técnico-científico: Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

Coorientadora técnico-científico: Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

T643c Torres, Ariany Lima Sousa.

Caracterização bioquímica da L-asparaginase II ansZ recombinante do *Bacillus subtilis* 168 expressa em *Escherichia coli* e avaliação de seu potencial citotóxico / Ariany Lima Sousa Torres. – 2018.

46 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.

Orientação pedagógica: Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves.

Orientação técnico-científica: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

1. L-asparaginase. 2. Leucemia Linfoide Aguda. 3. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 661

ARIANY LIMA SOUSA TORRES

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA L-ASPARAGINASE II *ansZ* RECOMBINANTE
DO *Bacillus subtilis* 168 EXPRESSA EM *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DE SEU
POTENCIAL CITOTÓXICO

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Enzimologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Prof. Dr. Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À mãe, Meire Sousa, que sempre me apoiou e me motivou nas escolhas que realizem. Aos meus irmãos, Arthur e Lucas Lima, pela amizade única que compartilhamos. Ao meu padastro, Deromi Bezerra, pelo sorriso fácil e carinho. Ao meu tio Cícero Mayk, pelo constante empenho em me incentivar a pensar grande em relação ao meu futuro profissional. Ao meu pai, João Alfredo, pelo apoio, ainda que distante.

Ao meu companheiro e melhor amigo, Natan Andrade, por tudo que compartilhamos e por sempre acreditar em mim.

Aos meus colegas de laboratório, Marcus Rafael, Larissa Queiroz, Ludmilla Freire, Gabriella Bruno, Igor Studart e Davi de Castro, por contribuírem para a realização desse trabalho, pelo apoio e amizade. Ao Gilvan Furtado e à Marcela Gambim pela orientação atenciosa no desenvolvimento desse projeto.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) pela infraestrutura disponibilizada e aos colegas do laboratório pelo apoio.

À turma 6 da Biotecnologia, que não teria como ser melhor. Agradeço a cada um de vocês pelo companheirismo durante esses quatro anos e reforço que não guardo ressentimentos por vocês terem me indicado para a “lista negra”. Um agradecimento especial ao Ricardo Patrício, por todas as caronas e amizade.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro na manutenção da bolsa.

*“O conhecimento une cada um consigo mesmo
e todos com todos.”*

- José Saramago

RESUMO

A L-asparaginase tipo II é uma enzima terapêutica utilizada para tratamento de Leucemia Linfóide Aguda. Linfoblastos leucêmicos apresentam uma deficiência no gene asparagina sintetase, necessitando de L-asparagina livre no plasma para se proliferar. A L-asparaginase atua na hidrólise de L-asparagina, depletando os níveis séricos desse aminoácido e, conseqüentemente, inibindo seu potencial proliferativo. As formulações disponibilizadas atualmente no mercado utilizam L-asparaginases de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. Existe uma alta taxa relativa a efeitos adversos e imunogenicidade associada ao tratamento com essas enzimas em pacientes. Portanto, a busca por novas fontes que apresentem um tratamento eficaz com redução de efeitos adversos é importante. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a L-asparaginase II recombinante de *Bacillus subtilis*, que foi expressa de forma heteróloga em *Escherichia coli*, determinando, a partir de ensaios realizados em microescala, a influência de pH e temperatura na atividade enzimática e seus parâmetros cinéticos, além da avaliação da citotoxicidade em linhagem de linfoblastos leucêmicos. Foi utilizado o método colorimétrico baseado no uso do reagente de Nessler para os ensaios que envolviam a avaliação de atividade enzimática, enquanto que se realizou o ensaio de citotoxicidade com alamarBlue®. O pH ótimo determinado foi 7,0 e a temperatura ótima foi 50 °C. Para a citotoxicidade, foi possível observar que o tratamento de células Raji com L-asparaginase de *B. subtilis* só apresentou uma maior eficácia nas concentrações mais altas testadas (70 e 80 µg/mL). A adaptação para a microescala foi bem-sucedida, proporcionando benefícios quanto à utilização da enzima e uso do reagente Nessler.

Palavras-chave: L-asparaginase. Leucemia Linfóide Aguda. Citotoxicidade.

ABSTRACT

L-asparaginase type II is a therapeutic enzyme used to treat acute lymphoid leukemia. Leukemic lymphoblasts have a deficiency in the asparagine synthetase gene, requiring free L-asparagine in plasma to proliferate. L-asparaginase acts on the hydrolysis of L-asparagine, depleting the serum levels of this amino acid and, consequently, inhibiting its proliferative potential. The formulations currently available on the market use *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginases. There is a high rate relative to side effects and immunogenicity associated with treatment with these enzymes in patients. Therefore, the search for new sources that present an effective treatment with reduction of side effects is important. The objective of this work was to characterize the recombinant L-asparaginase II of *Bacillus subtilis*, which had been expressed heterologously in *Escherichia coli*, determining, from microscale tests, the influence of pH and temperature on enzymatic activity and its kinetic parameters, in addition to the evaluation of cytotoxicity in leukemic lymphoblastic lineage. The colorimetric method based on the use of the Nessler reagent was used for the assays that involved the evaluation of enzymatic activity, while the alamarBlue® cytotoxicity assay was performed. The optimum pH was 7.0 and the optimum temperature was 50 ° C. For cytotoxicity, it was possible to observe that the treatment of Raji cells with *B. subtilis* L-asparaginase only showed a higher efficacy at the highest concentrations tested (70 and 80 µg/mL). The adaptation to the microscale was successful, providing benefits regarding the use of the enzyme and use of the Nessler reagent.

Keywords: L-asparaginase. Acute Lymphoide Leukemia. Cytotoxicity .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo da L-asparaginase simplificado	16
Figura 2 – Estrutura cristalizada de L-asparaginase II de <i>Escherichia coli</i>	18
Figura 3 – Gel de poliacrilamida da purificação de L-ASNase de <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i>	28
Figura 4 – Perfil de placa obtido após período de incubação com alamarBlue®.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva padrão de sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄).....	30
Gráfico 2 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase recombinante de <i>Bacillus subtilis</i> em diferentes pH.....	31
Gráfico 3 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase recombinante de <i>Escherichia coli</i> em diferentes pH.....	32
Gráfico 4 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase recombinante de <i>Bacillus subtilis</i> sob gradiente de temperatura.....	33
Gráfico 5 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase recombinante de <i>Escherichia coli</i> sob gradiente de temperatura.....	33
Gráfico 6 – Curva cinética da L-ASNase recombinante de <i>Bacillus subtilis</i>	34
Gráfico 7 – Avaliação de citotoxicidade de L-asparaginase recombinante de <i>Bacillus subtilis</i>	37
Gráfico 8 – Avaliação de citotoxicidade de L-asparaginase recombinante de <i>Escherichia coli</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fases de terapia de tratamento de pacientes com leucemia linfóide aguda ..	15
Tabela 2 – Teste cinético realizado para as L-asparaginases II recombinante de <i>Bacillus subtilis</i>	26
Tabela 3 – Comparação de parâmetros cinéticos com outras L-asparaginases II.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SOBOPE	Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
PEG	Polietilenoglicol
L-ASNase	L-asparaginase
TCA	Ácido tricloroacético
Eco_LASNase II	L-asparaginase II de <i>Escherichia coli</i>
Ech_LASNase II	L-asparaginase II de <i>Erwinia chrysanthemi</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
mL	Mililitro
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
°C	Celsius
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônia
NH ₄ ⁺	Íon amônio
U	Unidade de concentração enzimática
µmol	Micromol
K _m	Constante de Michaelis-Menten
V _{máx}	Valor máximo da velocidade inicial quando todos os sítios ativos estão ocupados
kDa	Unidade de massa atômica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leucemia Linfoide Aguda.....	15
1.2	Enzima L-asparaginase.....	16
1.2.1	<i>Estrutura tridimensional</i>	17
1.2.2	<i>L-asparaginase para o tratamento de leucemia linfoide aguda</i>	17
1.2.3	<i>Efeitos secundários e imunogenicidade</i>	19
1.2.4	<i>L-asparaginase de Bacillus subtilis</i>	20
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Expressão heteróloga de L-asparaginases de <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	21
3.2	Lise por sonicação.....	21
3.3	Purificação de L-asparaginase II recombinante por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC).....	22
3.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	22
3.5	Atividade enzimática de L-asparaginase II de <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	23
3.5.1	<i>Quantificação de proteínas</i>	23
3.5.2	<i>Curva padrão</i>	23
3.5.3	<i>Atividade enzimática</i>	24
3.5.4	<i>Determinação da influência do pH para a atividade das L-asparaginases de E. coli e B. subtilis</i>	24
3.5.5	<i>Determinação da influência da temperatura para a atividade das L-asparaginases de E. coli e B. subtilis</i>	25
3.5.6	<i>Teste cinético com L-asparaginase II recombinante de Bacillus subtilis</i>	25
3.6	Ensaio de citotoxicidade utilizando o método <i>alarBlue</i> ®.....	26
3.6.1	<i>Linhagem e cultura de células</i>	26
3.6.2	<i>Avaliação da citotoxicidade</i>	27

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1	Purificação de L-asparaginase recombinante de <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus subtilis</i>.....	28
4.2	Curva padrão e atividade enzimática.....	29
4.3	Curvas de influência do pH e temperatura para as L-asparaginases de <i>B. subtilis</i> e <i>E. coli</i>.....	30
4.4	Teste cinético de L-asparaginase recombinante de <i>Bacillus subtilis</i>.....	34
4.5	Avaliação de citotoxicidade de L-asparaginases de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Escherichia coli</i> pelo método alamarBlue®.....	35
5	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A L-asparaginase é uma proteína terapêutica importante para o tratamento da leucemia linfóide aguda e desde sua introdução nos protocolos de tratamento pediátrico na década de 1960, as taxas de sobrevivência em crianças aumentaram progressivamente para 90% (EAGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). No entanto, o uso dessa enzima apresenta dois grandes problemas relevantes: disponibilidade comercial e efeitos adversos.

Em 2013, a Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE) alertou para o risco de desabastecimento do medicamento como consequência da interrupção da fabricação de L-asparaginase por vários laboratórios no mundo. Desde então, o governo brasileiro tem assumido medidas emergenciais para o suprimento da demanda desse biofármaco, tendo sua importação onerado bastante os cofres públicos (Ministério da Saúde, 2017).

Além disso, as formulações disponibilizadas atualmente no mercado – L-asparaginases recombinantes – promovem reações de hipersensibilidade em cerca de 30% dos pacientes, manifestada clinicamente por alergia e anafilaxia, o que dificulta o tratamento (EAGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Diante disso, são relevantes estudos com novas fontes de L-asparaginase que apresentem eficácia no tratamento e redução de efeitos secundários, com o intuito de proporcionar ao País o estabelecimento de uma plataforma de produção nacional desse fármaco, e consequente diminuição dos custos referentes à importação desse produto no Brasil.

1.1 Leucemia Linfoide Aguda

Leucemia é um câncer das células do sangue, caracterizado pelo crescimento descontrolado e acúmulo de glóbulos brancos de linhagem mieloide ou linfoide (AVRAMIS, 2012). Segundo as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o ano de 2018 surgiriam 10.800 novos casos, sendo 5.940 homens e 4.860 mulheres.

Um dos subtipos da doença é a leucemia linfoide aguda (LLA), considerado bastante agressivo uma vez que se caracteriza pela proliferação rápida de linfócitos anormais na medula óssea e no sangue (BARBOSA, 2015). Afeta frequentemente crianças de 0 a 15 anos, tendo maior pico de incidência entre os primeiros 5 anos de idade. (INABA; GREAVES; MULLINGHAN, 2013). As manifestações clínicas da doença em pacientes incluem o aparecimento de anemias prolongadas, diminuição do número de plaquetas e hipoplasia, e, por consequência, quadros de febre, sangramentos, infecções persistentes e fadiga crônica (MÜLLER; BOOS, 1998).

O tratamento para LLA atualmente consiste em 4 fases: indução da remissão; consolidação/terapia direcionada ao sistema nervoso central; reindução (intensificação retardada) e manutenção/continuação da remissão. A L-asparaginase é utilizada como parte da terapia de primeira linha, sendo utilizada nas duas primeiras fases do tratamento, como mostra a tabela 1 (EAGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Tabela 1 – Fases da terapia de tratamento de pacientes com leucemia linfoide aguda

Fase	Duração	Propósito	Drogas utilizadas
Indução	4-6 semanas	Indução da remissão	Risco padrão Vincristina Glucocorticóide (prednisona ou dexametasona) L-asparaginase Alto risco Risco padrão + antraciclina
Consolidação/ terapia direcionada ao SNC	4-8 semanas	Terapia preventiva para eliminar a doença subclínica no SNC	Terapia intratecal Metotrexato 6-mercaptopurina L-asparaginase Terapia sistêmica Metotrexato (dose alta ou dose crescente) 6-mercaptopurina Dexametasona L-asparaginase Ciclofosfamida ou citarabina

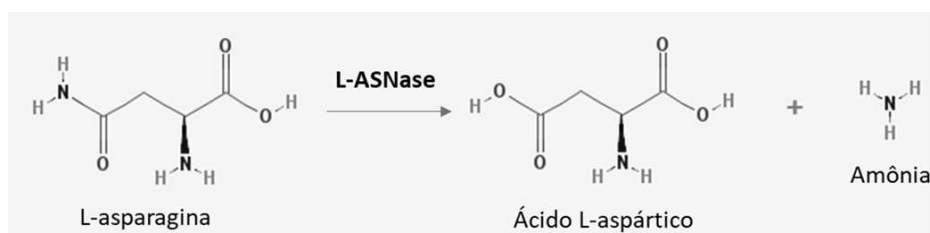
Reindução (intensificação retardada)	3-6 meses	Reduzir ainda mais as células leucocitárias e erradicar as células leucêmicas residuais resistentes aos medicamentos	Repetição da terapia de fase de indução Terapêutica anti- metabólito Metotrexato (dose alta ou dose crescente) Tiopurina Citarabina 6-mercaptopurina Ciclofosfamida
Manutenção/ continuação da remissão	2-3 anos	Evitar o ressurgimento de um clone resistente a medicamentos	Terapêutica anti- metabólito 6-mercaptopurina Metotrexato Vincristina / pulsos de corticosteroides
SNC= Sistema Nervoso Central			

Fonte: Adaptado de EAGLER *et al.*, 2016.

1.2 L-asparaginase

A enzima L-asparaginase (L-ASNase) ou L-asparagina aminohidrolase (EC 3.5.1.1) é uma enzima capaz de hidrolisar o aminoácido L-asparagina em L-ácido aspártico e amônia, como mostrado na figura 1 (KUMAR; VERMA, 2012). Encontra-se amplamente distribuída na natureza e desempenha um importante papel no metabolismo e utilização de aminoácidos. Já foi isolada de bactérias Gram negativas como *Escherichia coli* (WHELAN & WRISTON, 1969), *Bacillus coagulans* (LAW & WRISTON, 1971), *Pseudomonas* (ROBERTS, 1972), *Erwinia carotova* (LEE *et al.*, 1986), e de bactérias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (ROZALKA, 1989) e *Corynebacterium glutamicum* (MESAS *et al.*, 1990). Ela também já foi isolada de alguns fungos, como *Aspergillus* sp. (WRISTON & YELLIN, 1973) e *Cylindrocarpon obtusisporum* MB-10 (RAHA *et al.*, 1990) e leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* (DUNLOP *et al.*, 1978).

Figura 1 – Mecanismo de ação simplificado da L-asparaginase



Fonte: Adaptado de PubChem.

O interesse de estudo dessa enzima cresceu quando Kidd (1953) demonstrou que o soro do porco da Índia causava a diminuição de um tipo de lisosarcoma (Lisosarcoma de Gardner) em ratos, e sugeriu que a atividade antineoplásica era devido a uma proteína. Mais tarde, Broome (1961) relacionou definitivamente a propriedade antitumoral do soro do porco da Índia à atividade da L-asparaginase. Logo após a descoberta, foi isolada a L-asparaginase de *Escherichia coli*, que era eficiente em induzir a morte de células leucêmicas (MASHBURN & WRISTON, 1964). Desde então, os estudos envolvendo a L-asparaginase cresceram e seu uso terapêutico foi estendido para humanos.

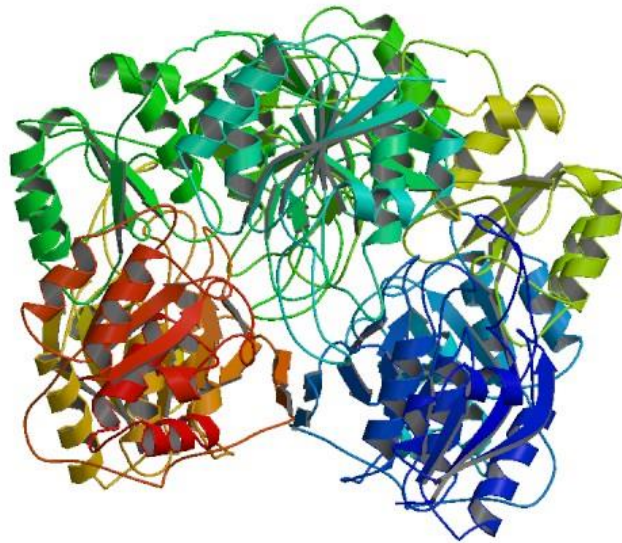
Uma das metodologias utilizadas para avaliar a atividade enzimática da L-asparaginase consiste no ensaio colorimétrico por meio do reagente de Nessler, uma solução alcalina de tetraiodomercurato II de potássio, que detecta nitrogênio amoniacal livre, produto da hidrólise enzimática da L-asparagina (WRISTON e YELLIN, 1973). Apesar de importante para estudos enzimáticos, esse reagente é altamente tóxico e bioacumulador, o que aumenta o risco de contaminação do ambiente, uma vez que possui metais pesados em sua composição, como mercúrio (FISPQ, 2016). Portanto, faz-se necessário melhorar metodologias de uso desse reagente, visando, principalmente, a redução de seus resíduos tóxicos.

1.2.1 Estrutura tridimensional

Campbell *et al.* (1967) verificaram a presença de duas isoformas de L-asparaginase de *Escherichia coli*: tipo I, encontrada no citoplasma, e tipo II, encontrada no periplasma. Ambas apresentam estruturas bioquímicas e genéticas diferenciadas. A L-asparaginase tipo II possui uma estrutura quaternária tetramérica e alta afinidade por L-asparagina (CEDAR; SCHWARTS, 1967). O primeiro cristal obtido foi da enzima originada de *E. coli*, resolvido por SWAIN *et al.* (1993) (figura 2), estruturado em quatro subunidades não-alostéricas nomeadas A, B, C e D, onde A/C e B/D formam dímeros íntimos.

Os monômeros possuem dois domínios principais, C-terminal (menor) e N-terminal (maior), estando entre esses um dos quatro sítios ativos encontrados na molécula, com destaque para os resíduos de treonina Th15 e Th95 (AGHAIYPOUR *et al.*, 2001)

Figura 2 – Estrutura cristalizada de L-asparaginase II de *Escherichia coli*



Fonte: PDB (código 3ECA).

1.2.2 L-asparaginase para o tratamento de leucemia linfóide aguda

O aminoácido não essencial L-asparagina possui síntese celular iniciada a partir da ação de uma transaminase, a qual converte oxalacetato em um aspartato intermediário, que é convertido em asparagina pela enzima asparagina sintetase (ASNS) (BATOOL *et al.*, 2016). Linfoblastos leucêmicos apresentam baixa expressão de ASNS, dependendo da captação de asparagina livre no plasma para sobreviver (ZHANG *et al.*, 2014; LAZARUS *et al.*, 1969). A depleção dos níveis séricos de L-asparagina pela ação da L-asparaginase afeta diretamente a produção energética da célula cancerígena e, conseqüentemente, interrompe seu potencial proliferativo (KUMAR & SOHBA, 2012).

Atualmente, três formulações são disponibilizadas no mercado para o tratamento oncológico: a L-asparaginase nativa de *Escherichia coli* (Elspar®, Kidrolase® e Spectrila®), a L-asparaginase produzida por *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®), e uma versão menos imunogênica da enzima nativa de *E. coli* devido à inclusão de polietilenoglicol (PEG) (Oncaspar®). As três possuem o mesmo mecanismo de ação, porém diferem em suas propriedades farmacocinéticas, como a meia vida plasmática: a L-asparaginase de *E. coli* possui uma meia vida de 30 horas, enquanto que a de *E. chrysanthemi* é de 16 horas e a de *E.*

coli com PEG é de 6 dias (3 dias em pacientes que desenvolveram hipersensibilidade) (RIZZARI, 2013).

No Brasil, não existe a produção nacional do produto, sendo necessária a compra da L-asparaginase por laboratórios do exterior. Até 2011, os hospitais adquiriam a L-asparaginase do Laboratório Bagó, que detinha o registro no País da L-asparaginase com o nome comercial de Elspar®, fabricada pela Merck Sharp & Dohme (MSD). A MSD encerrou a produção do biofármaco, tendência que se apresentou em todo mundo, tendo sido alertado o risco de desabastecimento do biofármaco pela Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE). De 2011 a 2013, a aquisição continuava a ser feita Laboratório Bagó, sob o mesmo nome comercial de Elspar®, produzida pela Lundbeck INC e OSO Biopharmaceutical. A partir de 2013, o Ministério da Saúde passou a adquirir, em caráter emergencial, a importação do medicamento e distribuição aos hospitais. O preço máximo de compra estipulado para pela Câmara de Regulação pelo Mercado de Medicamentos (CMED) para a L-asparaginase em 2013 era de R\$ 81,36, e o Ministério da Saúde estava adquirindo pelo valor de R\$ 381,99. Em 2017, foi realizada a compra de Leuginase® da empresa Beijing fornecida por Xetley, totalizando o valor de R\$ 7.683.702,60 para um estoque de uso para o primeiro semestre do ano (Ministério da Saúde, 2017).

1.2.3 Efeitos secundários e imunogenicidade

O uso da L-asparaginase para o tratamento de leucemia linfóide aguda está associado a várias toxicidades. A falha em receber o tratamento completo da asparaginase devido à toxicidade emergente do tratamento tem sido associada a desfechos desfavoráveis em crianças com LLA (PUI *et al.*, 2012).

Os efeitos apresentados são diversos, tendo sido relatados na literatura casos de hiperglicemia (DUVAL *et al.*, 2002; ALBERTSEN *et al.*, 2001); pancreatite (RAJA *et al.*, 2012); trombose (HERNANDES-ESPINOSA *et al.*, 2006; MITCHELL *et al.*, 1994); encefalopatia (PANIS *et al.*, 2010); toxicidade hepática (RAETZ *et al.*, 2010) e hipersensibilidade (MÜLLER; BOOS, 1998). Com exceção da hipersensibilidade, todos os demais efeitos têm como causa ou hipótese a redução da produção de várias proteínas como consequência dos baixos níveis séricos do aminoácido L-asparagina (MÜLLER; BOOS, 1998).

No caso da hipersensibilidade, a causa seria a resposta imune desencadeada pelo uso das L-asparaginases de origem bacteriana, associada ao desenvolvimento de anticorpos anti-

asparaginase (MÜLLER; BOOS, 1998), o que provoca uma redução da meia-vida da enzima circulante e, conseqüentemente, redução de sua eficiência terapêutica, fenômeno conhecido como “hipersensibilidade ou inativação silenciosa” (PIETERS *et al.*, 2011). A hipersensibilidade é manifestada clinicamente por alergia e anafilaxia, sendo a causa mais comum para descontinuação do tratamento com L-asparaginase (HIJIYA & VAN DER SLUIS, 2016).

1.2.4 L-asparaginase de *Bacillus subtilis*

Já foi reportada a presença de dois genes de L-asparaginase da bactéria *Bacillus subtilis*, *ansA* e *ansZ* (SUN & SETLOW, 1991; FISHER & WRAY, 2002). O gene *ansZ*, que codifica uma L-ASNase tipo II, foi identificado por KUMANO *et al.* (1997) a partir do sequenciamento do genoma de *B. subtilis* 168.

A enzima codificada pelo gene *ansA*, correspondente a uma L-asparaginase do tipo I, já possui aplicação na indústria de alimentos, voltada para a redução de acrilamida formada durante o processamento térmico de biscoitos, batatas e pães (ANESE *et al.*, 2011). Poucos estudos são relatados na literatura envolvendo a caracterização das L-asparaginases de *B. subtilis*, bem como avaliação do potencial antineoplásico por parte da sua L-ASNase II.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterização enzimática da L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* expressa em *Escherichia coli* e avaliação de sua atividade citotóxica antineoplásica.

2.2 Objetivos específicos

- Adaptação de ensaio de atividade enzimática para a microescala;
- Avaliação do efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática;
- Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima;
- Avaliação da atividade citotóxica da enzima recombinante sobre uma linhagem de células tumorais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo dá continuidade ao trabalho de conclusão de curso realizado em 2017 pela estudante Ludmilla Freire Caetano intitulado “Expressão e caracterização bioquímica de uma L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* expressa em *Escherichia coli*: estudo preliminar de um potencial biofármaco”, onde os genes *ansZ* e *ansB*, respectivamente, de *Bacillus subtilis* e de *Escherichia coli* que codificam L-asparaginases do tipo II, foram clonados em vetor plasmidial pET28a e inseridos em cepa de expressão *E. coli* Rosetta, seguido de padronização e purificação das respectivas enzimas recombinantes por cromatografia de afinidade utilizando coluna HisLink™.

3.1 Expressão heteróloga de L-asparaginases de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*

Colônias de *E. coli* Rosetta transformadas com os vetores pET28a-*ansZ* e pET28a-*ansB* foram isoladas em placas de LB ágar, e colônias individuais foram lançadas em 5mL de meio LB acrescidos de cloranfenicol (34 µg/mL) e canamicina (40 µg/mL) em tubos de vidro previamente autoclavados, sendo o controle negativo sem presença de material bacteriano. Os pré-inóculos foram então incubados a 37°C por aproximadamente 16 horas sob agitação de 200 rpm.

A expressão heteróloga foi realizada em volume de 250 mL de meio LB, ao qual foram adicionados 2,5 mL de MgCl₂ (0,1 M), 400 µL de canamicina (40 µg/mL) 250 µL de cloranfenicol (34 µg/mL), e 5 mL de meio de cultura crescida. O meio de cultivo inoculado foi incubado em shaker a 37°C e 200 rpm, medindo-se a densidade ótica (D.O) até que esta atingisse absorvância 0.5 a 600 nm. A indução se deu utilizando IPTG (0,5 mM) com incubação por 4 horas a 30°C sob agitação a 200 rpm. Posteriormente, foram submetidos a centrifugação a 7.000 x g por 5 minutos e armazenamento dos pellets a -20°C.

3.2 Lise por sonicação

A lise celular foi feita por sonicação, utilizando-se processador ultra-sônico UP50H da Hielscher Ultrasonics GMBH®, configurado para 50% de amplitude. O pellet referente ao teste de expressão foi resuspendido em 3 mL de tampão de lise (Tris 50 mM e NaCl 300 mM contendo 20 mM de Imidazol (pH 8)), 20 µL de Triton X100 e 100 µL de PMSF (0,03mM). A amostra seguiu para o passo de sonicação com ciclos de 30 segundos de ultrassom e 30 segundos em repouso, alternados, por cerca de 20 repetições, até obter uma

mistura homogênea. O lisado celular foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C e a fração solúvel.

3.3 Purificação de L-asparaginase II recombinante por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC)

Para a cromatografia de afinidade, foram preparados tampões de lavagem (300 mM de NaCl e 50 mM de Tris contendo de 60 a 100 mM de imidazol) e tampão de eluição (300 mM de NaCl, 50 mM de Tris e 300 mM de imidazol), ambos com pH 8,0. Aproximadamente, 1 mL da coluna HisTrap™HP (GE®) composta de agarose conjugada com íon níquel foi lavada com 5 mL com água destilada filtrada para retirada do álcool residual no qual é armazenada, equilibrada com tampão de lise e incubada com aproximadamente 10 mL de extrato protéico (pós sonicação) por 1 hora, em banho de gelo e sob agitação orbital de 100 rpm. Posteriormente, esse volume foi colocado em suporte para prosseguir com a cromatografia aplicando um protocolo de gradiente crescente de 20, 60, 100 mM de imidazol, onde as lavagens de eluição foram acompanhadas por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. Para acompanhamento posterior por meio de ensaio de SDS-PAGE, alíquotas da lavagem com 100 mM de imidazol foram coletadas e armazenadas a 4 °C. No passo de eluição, utilizou-se o tampão contendo 300 mM de imidazol, para coleta de alíquotas de 1 mL, as quais foram armazenadas a 4 °C, para uso posterior em eletroforese SDS-PAGE. As alíquotas em tampão contendo 300 mM de imidazol foram reunidas, dialisadas em tampão Tris 50mM e NaCl 300 mM (pH 8,6) e concentradas em aproximadamente 5 mL, com auxílio de Vivaspin (GE Healthcare®) com membrana de 10 kDa, sendo armazenada em glicerol 25% a -20 °C a 4 °C.

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para eletroforese (SDS-PAGE) utilizada para análise da expressão heteróloga de L-asparaginase II recombinante foi feito um gel de 12% de acrilamida (GE), sendo adicionados: 3,150 mL de água, 2,1 mL de bis-acrilamida 40%, 1,75 mL de solução lower Tris 4x e 80 µL de uma mistura com TEMED e APS 10%. Para o gel de 3,5% upper ou stacking gel 3,6%, utilizou-se: 2,17 mL de água, 0,33 mL de bis-acrilamida 40%, 0,83 mL de upper Tris 4x e 100 µL de mistura com TEMED e APS 10%. As amostras foram preparadas em tubos de 1,5 mL, sendo adicionados 6µL de tampão de amostra (5x) a 30 µL de amostra. todas as amostras

passaram por tratamento térmico em banho-maria a 100 °C por 10 minutos e ao gel de poliacrilamida foram aplicadas em cerca de 20 µL.

3.5 Atividade enzimática de L-asparaginase II de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*

3.5.1 *Quantificação de proteínas*

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o *Quibit® Protein Assay Kit*, a partir do qual 5 µL da amostra utilizada para quantificação, fosse L-ASNase de *E. coli* ou *B. subtilis*, eram adicionados em tubo de 0,5 mL à 195 µL de um *mix* contendo um 199 µL de tampão e 1 µL fluoróforo por reação (ambos os reagentes presentes no kit), submetidos a vórtex por 3 segundos e incubados à temperatura ambiente durante 15 minutos. Foram realizadas triplicatas para quantificação de cada uma das proteínas. Posteriormente, foi realizada a leitura utilizando o equipamento *Qubit® Fluorometer*.

3.5.2 *Curva padrão para cálculo de amônia liberada*

Uma curva padrão foi construída utilizando solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 12 mM em gradiente de concentração. Foram adicionados diferentes volumes da solução estoque de (NH₄)₂SO₄ a 80 µL de tampão Tris 50 mM e NaCl 300 mM (pH 8,0), produzindo triplicatas de diluições cujas concentrações variaram de 0,216 a 2,4 µM do íon amônio (NH₄⁺), para um volume final de trabalho de 180 µL. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 min, com posterior adição de 10 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M para bloqueio da reação.

Para reação colorimétrica, utilizou-se microplaca de 96 poços, onde 10 µL de cada diluição e 240 µL de reagente Nessler diluído (25 µL de Nessler + 215 µL de água ultrapura) foram adicionados. A leitura de absorbância em comprimento de onda de 436 nm foi realizada em um leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode.

3.5.3 Atividade enzimática

Foram realizadas diluições a partir da proteína em estoque de ambas as enzimas, sendo testadas as diluições de 1:10, 1:20 e 1:30. As diluições foram submetidas à avaliação da atividade enzimática, sendo adicionados 10 µL de cada diluição em uma reação contendo 160 µL de tampão Tris 50 mM e NaCl 300 mM (pH 8,0) e 10 µL de L-asparagina 189 mM e incubados a 37 °C durante 30 minutos. A adição de 10 µL de TCA 1,5M para o bloqueio da reação foi realizada após período de incubação.

Para reação colorimétrica, utilizou-se microplaca de 96 poços, onde 10 µL de cada diluição e 240 µL de reagente Nessler diluído (25 µL de Nessler + 215 µL de água ultrapura) foram adicionados. A leitura de absorbância em comprimento de onda de 436 nm foi realizada em um leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode.

3.5.4 Determinação da influência do pH para a atividade das L-asparaginases de *E. coli* e *B. subtilis*

A atividade enzimática para determinação de pH ótimo foi realizada em tubos de 0,2 mL utilizando-se 160 µL de diferentes tampões, cujo pH variou de 3,0 a 11,0, 10 µL de L-asparagina (189 mM) e 10 µL das enzimas recombinantes, totalizando 180 µL de reação. O tampão citrato 0,2 mM-fosfato 0,1 mM foi utilizado para os pH de 3 a 6, o tampão Tris 50 mM para pH 7 a 9 e de tampão Glicina 50 mM para os pH 10 e 11. Os tubos eram mantidos em banho de gelo durante a adição da enzima nas reações. Para cada tampão testado foi realizada uma triplicata e um ensaio branco sem a adição de enzima. As reações foram incubadas a 37°C durante 30 minutos em termociclador, seguidos de adição de 10 µL de TCA 1,5 M.

Para a reação colorimétrica, foram aplicados, em uma microplaca de 96 poços, 10 µL de cada reação, às quais foram adicionados 240 µL de uma diluição do reagente Nessler (25µL de Nessler + 215 µL de água ultrapura/ reação). A leitura de absorbância a 436 nm foi realizada em leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode.

3.5.5 Determinação da influência da temperatura para a atividade das L-asparaginases de E. coli e B. subtilis

A atividade enzimática para a determinação de temperatura ótima foi realizada em tubos de 0,2 mL, utilizando 160 µL do pH ótimo de atividade determinado anteriormente, 10 µL de L-asparagina 189 mM e 10 µL da enzima recombinante, totalizando 180 µL de reação. A determinação da influência da temperatura variou as temperaturas de incubação de 20 °C a 90 °C. Para cada temperatura testada foram realizadas triplicadas do branco e teste, não sendo adicionada enzima à reação do ensaio branco. As reações foram incubadas a diferentes temperaturas durante 30 minutos em termociclador. Após a incubação, adicionou-se 10 µL de TCA 1,5 M.

Para o ensaio colorimétrico, foram aplicados 10 µL de cada reação (triplicatas dos brancos e dos testes) em uma microplaca de 96 poços, aos quais foram adicionados 240 µL de uma diluição do reagente Nessler (25 µL de Nessler + 215 de água ultrapura/ reação). A leitura de absorbância a 436 nm foi realizada em leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode.

3.5.6 Teste cinético com L-asparaginase II recombinante de Bacillus subtilis

O teste de cinética para a enzima envolveu novamente o ensaio colorimétrico de Nessler. O substrato foi adicionado em diferentes volumes a partir do estoque de L-asparagina 10,5 mM, como mostrado na tabela 2, estando sob diferentes concentrações nas reações.

Tabela 2 – Teste cinético realizado para as L-asparaginases II recombinante de *Bacillus subtilis*

Concentração do substrato (mM)	Quantidade do substrato adicionado na reação (µL)	Quantidade de tampão ótimo de atividade da enzima adicionado na reação (µL)	Quantidade de enzima adicionada na reação (µL)	Volume total da reação (µL)
0,0625	1,07	168,93	10	180
0,1250	2,14	167,86	10	180
0,2500	4,29	165,71	10	180
0,5000	8,57	161,43	10	180
1,0000	17,14	152,86	10	180
2,0000	34,29	135,71	10	180
4,0000	68,57	101,43	10	180
6,0000	102,86	67,14	10	180
8,0000	137,14	32,86	10	180
9,9100	170	0	10	180

Fonte: Elaborado pela autora.

As reações foram realizadas em tubos de 0,2 mL em triplicata, e ensaio branco para cada uma das concentrações testadas também foi realizado em triplicata, sem a adição de enzima. Foram incubadas a 37 °C durante 30 min em termociclador. Encerrada a incubação, foram adicionados 10 µL de TCA 1,5 M a cada reação.

Para a reação colorimétrica, 10 µL de cada reação foram aplicados em uma microplaca de 96 poços e adicionados 240 µL de diluição de Nessler (25 µL de Nessler + 240 µL de água ultrapura/ reação). A leitura da absorbância foi feita a 436 nm utilizando leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando-se o programa SigrafW.

3.6 Ensaio de citotoxicidade utilizando o método *alamarBlue*®

3.6.1 Linhagem e cultura de células

Foi utilizada para o teste a linhagem neoplásica Raji. Foi cultivada em garrafas de cultura com meio RPMI contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C durante aproximadamente uma semana, para que atingissem a concentração celular necessária para o ensaio.

3.6.2 Avaliação da citotoxicidade

Foram adicionados 100 μL de células Raji em microplacas de 96 poços na concentração padronizada de 5×10^4 células/poço, as quais foram submetidas a diferentes concentrações das L-asparaginases de *E. coli* e *B. subtilis*. As concentrações utilizadas para a L-asparaginase de *B. subtilis* foram de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 70 e 80 $\mu\text{g/mL}$, e as de *E. coli*, 0, 5, 10, 15 e 18 $\mu\text{g/mL}$ (triplicata de cada concentração), preparadas em PBS estéril. Para cada poço, foram adicionados 10 μL de enzima nas concentrações anteriormente citadas, e 90 μL de meio RPMI, totalizando 200 μL por poço. O ensaio branco foi realizado apenas com tampão estéril.

As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO_2 a 37 °C durante 48 horas. Três horas anteriores ao término de incubação, adicionou-se 20 μL de alamarBlue® diluído em PBS (20 μL de estoque alamarBlue® 10 mg/mL em 1980 μL de PBS estéril) em cada um dos poços e as placas eram novamente incubadas até que completasse o período de incubação.

A leitura das placas foi feita por fluorescência utilizando leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode, com parâmetros de excitação de 540/35 nm e emissão a 590/20 nm.

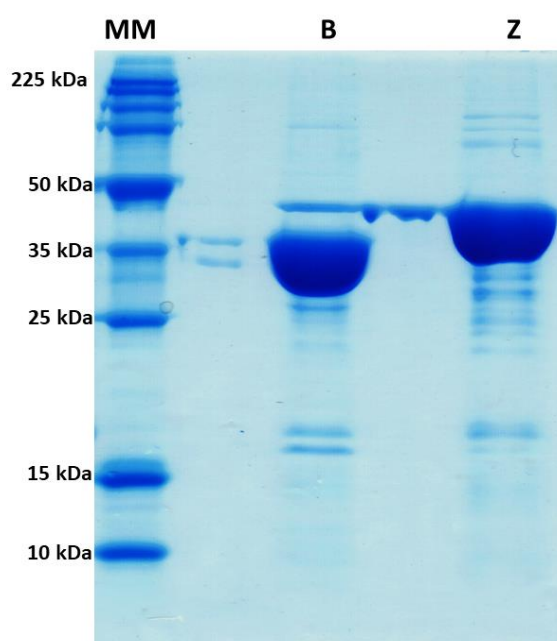
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação de L-asparaginase recombinante de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*

As sequências primárias de L-ASNase de *E. coli* e *B. subtilis* receberam seis histidinas em sua porção N-terminal pelo vetor de expressão pET28a. Por apresentarem estruturalmente um anel imidazólico, as histidinas interagem fortemente com íons metálicos, no caso o níquel (Ni^{2+}), como relatado por GABERC-POREKAR e MENART (2001), apresentando-se como uma metodologia consolidada de purificação de proteínas.

Uma nova expressão foi realizada para a obtenção de amostras a serem analisadas nos ensaios de caracterização. O gel de poliacrilamida da figura 3 mostra o resultado apresentado após o processo de purificação das enzimas.

Figura 3 – Gel de poliacrilamida da purificação de L-ASNase de *E. coli* e *B. subtilis*



Fonte: Elaborado pela autora. MM: marcador molecular; B: L-ASNase de *E. coli*, Z: L-ASNase de *B. subtilis*.

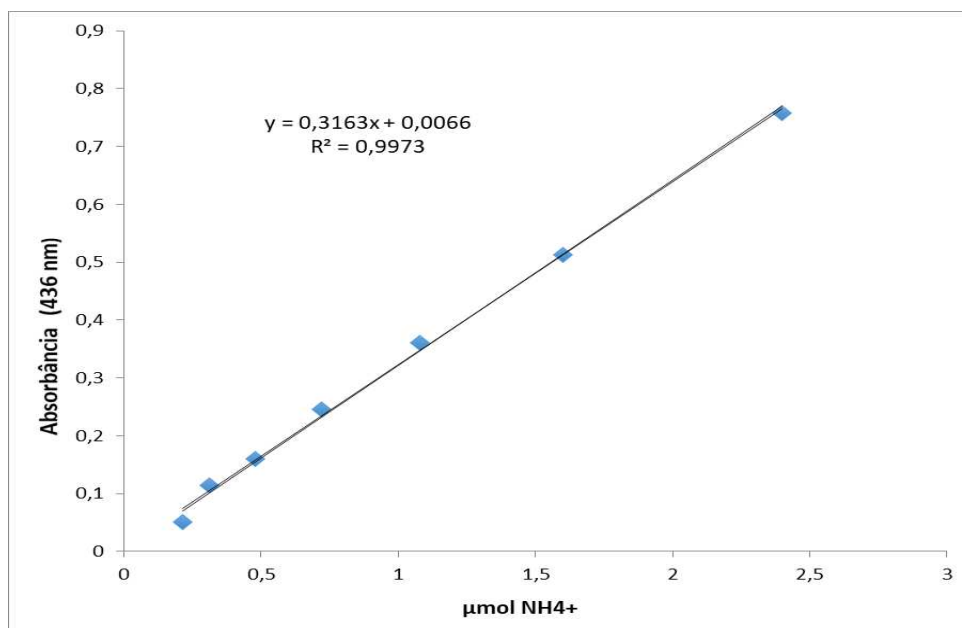
Assim como demonstrado anteriormente, as L-ASNases em questão foram expressas em fração solúvel e a indução por IPTG 0,5 mM proporcionou a obtenção de uma grande quantidade de enzima expressa, podendo ser visualizado a partir das bandas robustas apresentadas no gel. Além disso, é possível observar que a metodologia de purificação possui resultado satisfatório para a necessidade do trabalho, uma vez que é possível separar as enzimas recombinantes de grande parte das proteínas do organismo de expressão *E. coli* Rosetta.

4.2 Curva padrão e atividade enzimática

A avaliação da determinação da influência de pH e temperatura na atividade enzimática e o teste de cinético com as L-asparaginases de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* foram realizados por meio do ensaio colorimétrico com o reagente de Nessler (solução alcalina de tetraiodomercurato II de potássio), bastante utilizado para determinação de nitrogênio amoniacal, que é um dos produtos gerados pela hidrólise enzimática da L-asparagina (WRISTON e YELLIN, 1973). A partir da reação entre o reagente Nessler e os íons amônio formados pela reação, é produzido um composto com coloração amarelo-acastanhado.

Com a construção da curva padrão, torna-se possível associar a absorbância obtida a partir do teste cinético a um valor quantitativo de amônia liberada. Como mostrado no gráfico 1, foi obtida uma equação da reta formada pelos pontos correspondentes às absorbâncias obtidas a partir das diluições de sulfato de amônio realizadas, que passou a ser utilizada para os cálculos de determinação de atividade enzimática posteriores.

Gráfico 1 – Curva padrão de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)



Fonte: Elaborado pela autora. Eixo x: μmol de sulfato de amônia; Eixo y: absorbância obtida em leitura a 436 nm. Os valores da curva foram determinados realizando-se a média das absorbâncias das triplicatas obtidas para cada diluição de (NH₄)₂SO₄ em teste.

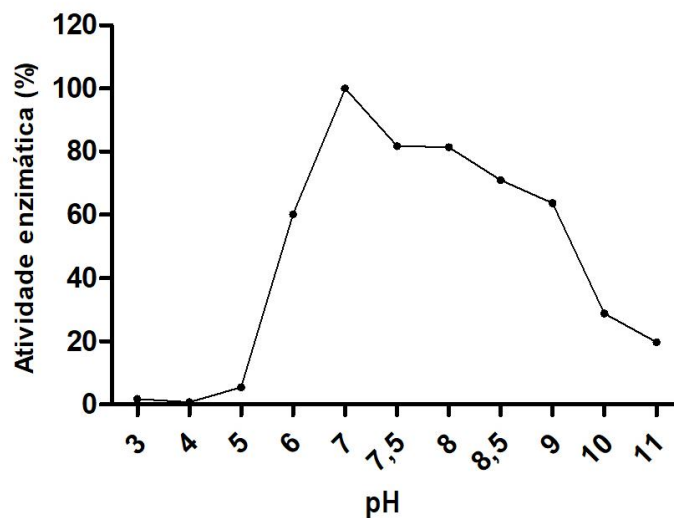
O teste de atividade enzimática realizado ocorreu de modo a obter-se uma diluição da enzima com absorbância que estivesse inclusa dentro do intervalo da curva padrão obtida, para que fosse possível aplicar esse valor na equação. A partir do conhecimento da concentração obtida de cada uma das enzimas (L-asparaginase *B. subtilis*: 450 μg/mL; L-asparaginase *E. coli*: 205 μg/mL) e das diluições realizadas para cada enzima (1:20 da *B. subtilis*; 1:30 da *E. coli*), é possível calcular os valores da concentração da enzima em U/mg, sabendo-se que 1U indica a quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 μmol de produto por minuto.

4.3 Curvas de influência do pH e temperatura para as L-asparaginases de *B. subtilis* e *E. coli*

A determinação da influência de pH e temperatura na atividade enzimática possui grande importância para a caracterização da enzima. Tendo em vista uma possível aplicação, como no caso da L-asparaginase, esses parâmetros são essenciais para se determinar a viabilidade do uso dessa enzima para a aplicação almejada.

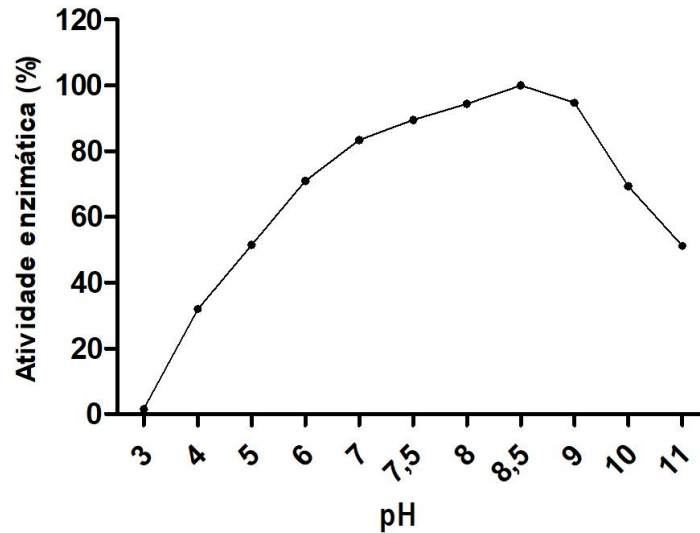
Para a L-asparaginase de *Bacillus subtilis*, o pH ótimo de atividade definido foi o pH 7,0, como mostrado no gráfico 2, que se aproxima de resultados apresentados na literatura, como apresentado por JIA *et al.* (2013) e ONISHI *et al.* (2011), que obtiveram pH ótimos de 7,5 e 8,0. Para a L-asparaginase de *E. coli*, como apresentado no gráfico 3, o pH ótimo de atividade foi de 8,5, que se diferencia de dados apresentados por WHEHNER *et al.* (1992), que obteve pH ótimo de 7,0 e VIDYA *et al.* (2011), que obteve pH ótimo de 6,0.

Gráfico 2 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase recombinante de *Bacillus subtilis* em diferentes pH.



Fonte: Elaborado pela autora. Curva de atividade enzimática analisada frente à variação de pH (3,0 a 11,0). Os valores da curva foram determinados realizando-se a média das absorvâncias das triplicatas obtidas para cada tampão em teste e relacionadas entre si, considerando o maior valor médio obtido como 100% de atividade enzimática para a curva. O ensaio foi realizado a 37 °C.

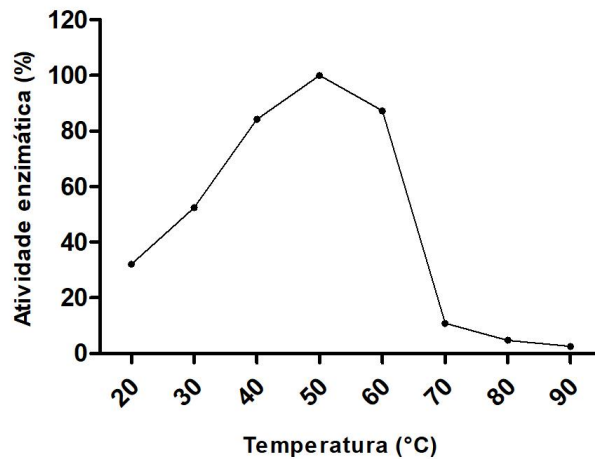
Gráfico 3 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase recombinante de *Escherichia coli* em diferentes pH



Fonte: Elaborado pela autora. Curva de atividade enzimática realizada frente à variação de pH (3,0 a 11,0). Os valores da curva foram determinados realizando-se a média das absorbâncias das triplicatas obtidas para cada tampão em teste e relacionadas entre si, considerando o maior valor médio obtido como 100% de atividade enzimática para a curva. O ensaio foi realizado a 37 °C.

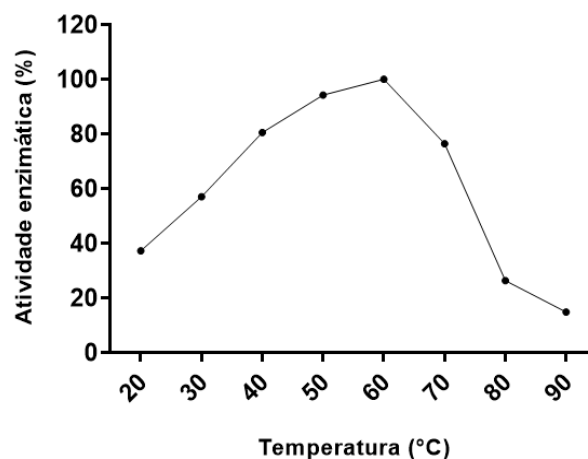
Para o ensaio de temperatura, a temperatura ótima obtida para a L-asparaginase de *B. subtilis* foi de 50 °C, como mostra o gráfico 4, que corrobora com o resultado obtido por ONISHI *et al.* (2011) e se aproxima do valor obtido por JIA *et al.* (2013), que foi de 40 °C. Já para a de *E. coli*, a temperatura ótima obtida foi de 60 °C, mostrado no gráfico 5, que diverge do valor apresentado por VIDYA *et al.* (2011), que obteve temperatura ótima de 40 °C.

Gráfico 4 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase recombinante de *Bacillus subtilis* sob gradiente de temperatura



Fonte: Elaborado pela autora. Curva de atividade avaliada frente à variação de temperatura (20 a 90 °C). Os valores da curva foram determinados realizando-se a média das absorbâncias das triplicatas obtidas para cada temperatura em teste e relacionadas entre si, considerando o maior valor médio obtido como 100% de atividade enzimática para a curva. O ensaio foi realizado em pH 7,0.

Gráfico 5 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase recombinante de *Escherichia coli* sob gradiente de temperatura



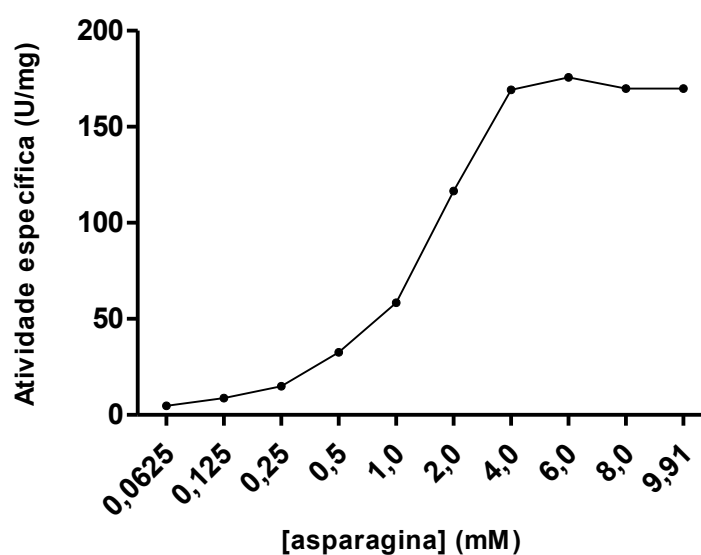
Fonte: Elaborado pela autora. Curva de atividade enzimática realizada frente à variação de temperatura (20 a 90 °C). Os valores da curva foram determinados realizando-se a média das absorbâncias das triplicatas obtidas para cada temperatura em teste e relacionadas entre si, considerando o maior valor médio obtido como 100% de atividade enzimática para a curva. O ensaio foi realizado em pH 8,5.

A variação apresentada entre os resultados pH e temperatura de diferentes estudos pode estar em razão dos diferentes tipos de tampão utilizados no preparo para os testes de pH, a metodologia utilizada para aferir atividade, uma mudança de conformação da proteína em razão da adição de cauda His-tag ou da cepa do organismo utilizado.

4.4 Teste cinético de L-asparaginase recombinante de *Bacillus subtilis*

O resultado do ensaio cinético para a L-asparaginase de *B. subtilis* está apresentado no gráfico 6, ao qual é possível observar um platô formado pela curva a partir da concentração de 4 μ M de L-asparagina presente na reação. Isso configura a saturação dos sítios ativos das L-asparaginases adicionadas nas reações.

Gráfico 6 – Curva cinética da L-ASNase recombinante de *Bacillus subtilis*



Fonte: Elaborado pela autora. Curva realizada a variação de concentração substrato (0,0625 a 9,91 mM) em função do valor em U/mg obtido a partir das reações. O ensaio foi realizado em pH 7,0 a 37 °C durante 30 min.

Os dados obtidos a partir dessa curva foram aplicados no programa SigrafW de acordo com LEONE *et al.* (2005) e foram determinados os parâmetros cinéticos da enzima, de modo que o valor de K_m foi de 1,427 mM e a $V_{m\acute{a}x}$ foi de 176,1 μ mol/min/mg, como mostrado na tabela 3. Comparativamente, os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos em relação aos dados presentes

na literatura relativos à L-asparaginase de *Bacillus subtilis* apresentam uma grande variedade. Essa variedade é justificada pelas diferentes condições submetidas por cada trabalho à enzima (expressão heteróloga; diferentes parâmetros utilizados para o teste), e também em razão da possibilidade de utilização de diferentes cepas de um mesmo organismo. Ainda assim, os valores de Km apresentados estão bem acima dos valores de Km das enzimas de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, fontes de enzimas utilizadas no tratamento de LLA, o que implica uma menor afinidade ao substrato por parte da L-asparaginase de *B. subtilis* (tabela 3). Para confirmar esses valores obtidos na literatura, a determinação dos parâmetros cinéticos da L-asparaginase II de *E. coli* está em andamento pelo nosso grupo de pesquisa.

Tabela 3 – Comparação de parâmetros cinéticos com outras L-asparaginases II

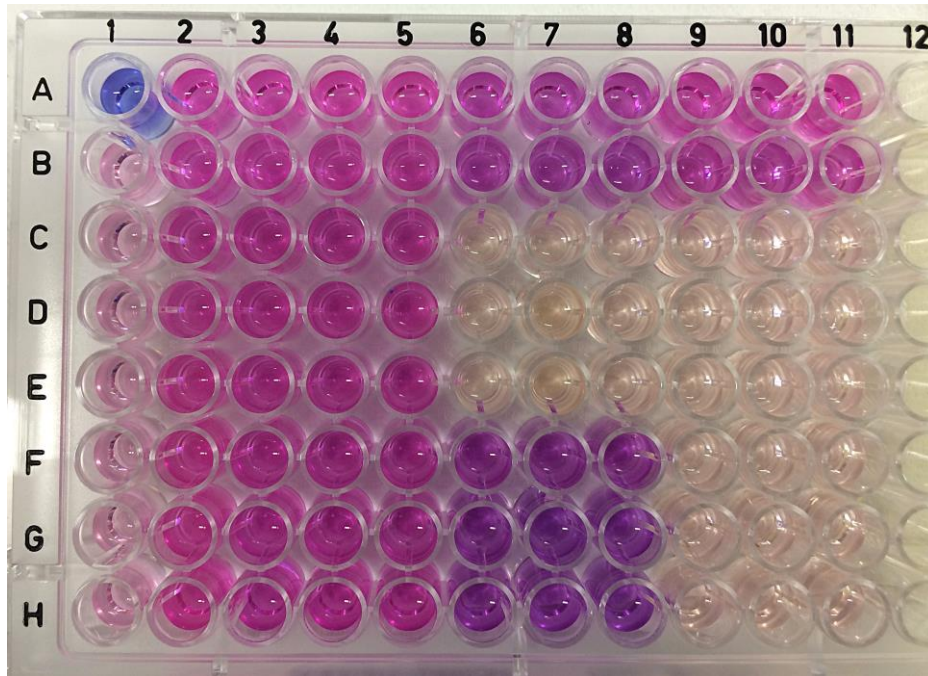
	Km (mM)	V _{máx}
Bs_LASNase II ^a	1,427	176,1 μmol/min/mg
Bs_AII40M ^b	2,06	-
Bs_LASNase II ^c	0,43	77,51 μM/min
Eco_LASNase II ^d	3,5 x 10 ⁻⁵	-
Ech_LASNase II ^e	1,5 x 10 ⁻²	-

Fonte: (a) presente estudo a 37°C; (b) ONISHI *et al.* (2011) a 30 °C; (c) JIA *et al.* (2013) a 40 °C; (d) DERST *et al.* (2000) a 25 °C e (e) KOTZIA & LABROU (2005) a 37°C.

4.5 Avaliação de citotoxicidade de L-asparaginases de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* pelo método alamarBlue®

O método é baseado no uso do reagente alamarBlue®, que é a resazurina, um composto redox utilizado como indicativo de atividade metabólica em culturas celulares e possui inúmeras aplicações, como estudos de toxicidade, de proliferação e de viabilidade celular (PRÄBST *et al.*, 2017). Em solução aquosa, a resazurina possui cor azul, adquirindo a cor rosa ao sofrer redução para resorufina (figura 4). Células metabolicamente viáveis são capazes de reduzir a resazurina por enzimas mitocondriais utilizando a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como fonte de elétrons (PRÄBST *et al.*, 2017). A justificativa para escolha do uso da resazurina reside no fato de ser relativamente barata e mais sensível que outros ensaios.

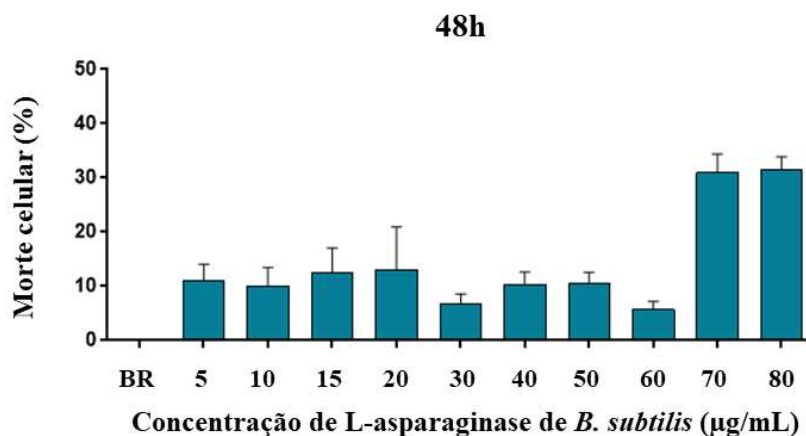
Figura 4 – Perfil de placa obtido após período de incubação com alamarBlue®



Fonte: Elaborado pela autora. No poço A1 é possível observar a coloração da resazurina em solução. Na coluna 2, temos o controle do ensaio, no qual a resazurina é completamente reduzida, apresentando a coloração rosa. Apresentada morte celular, apenas parte da resazurina será reduzida, apresentando uma cor roxa.

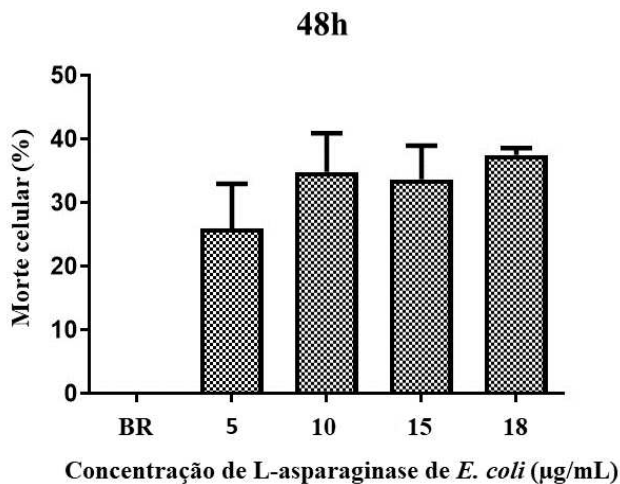
Para o ensaio de citotoxicidade envolvendo a L-asparaginase de *B. subtilis*, foi obtido o gráfico 7, onde é possível verificar a taxa de morte celular de células Raji quando submetidas a tratamento com essa enzima. Apenas nas concentrações mais altas, de 70 e 80 $\mu\text{g/mL}$, a enzima apresentou uma resposta significativa. Já a L-asparaginase de *E. coli*, em que foram testadas apenas concentrações mais baixas, foi possível obter uma taxa de morte celular significativa nessas concentrações, o que implica um melhor desempenho dessa enzima como antineoplásica, como mostrado no gráfico 8.

Gráfico 7 – Avaliação de citotoxicidade de L-asparaginase recombinante de *Bacillus subtilis*



Fonte: Elaborado pela autora. Gráfico obtido a partir da média das triplicatas realizadas para as concentrações em teste e posterior relação com o teste branco, considerando-se que a absorbância obtida a partir desse representa 0% de morte celular, tendo em vista que não foi submetida a tratamento com a enzima. Os desvios obtidos relativos à comparação dos valores obtidos pelas triplicatas estão representados acima das barras.

Gráfico 8 – Avaliação de citotoxicidade de L-asparaginase recombinante de *Escherichia coli*



Fonte: Elaborado pela autora. Gráfico obtido a partir da média das triplicatas realizadas para as concentrações em teste e posterior relação com o teste branco, considerando-se que a absorbância obtida a partir desse representa 0% de morte celular, tendo em vista que não foi submetida a tratamento com a enzima. Os desvios obtidos relativos à comparação dos valores obtidos pelas triplicatas estão representados acima das barras.

O motivo pelo qual a L-asparaginase de *B. subtilis* apresentou menor atividade citotóxica pode estar relacionado ao seu Km, que é maior que o da *E. coli*, conseqüentemente apresentando uma menor afinidade ao substrato. Outro fator, bastante discutido na literatura, diz respeito à atividade L-glutaminásica apresentada por essas enzimas e à possibilidade de contribuição dessa atividade para a citotoxicidade promovida pela L-asparaginase. A razão seria que as células que não expressam a asparagina sintetase (ASNS) podem ser protegidas da depleção de L-asparagina pela produção a partir L-glutamina como fonte (AVRAMIS, 2012; EHSANIPOUR, 2013). A L-asparaginase de *E. coli* possui alta atividade glutaminásica (DERST, 2000), enquanto que já é descrita uma baixa atividade glutaminásica por parte da enzima de *B. subtilis* (ONISHI, 2011). Para elucidar esta hipótese, estudos de atividade glutaminásica para ambas as enzimas estão em sendo planejados em nosso laboratório.

5 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, é possível concluir que foi viável a adaptação do teste de atividade enzimática para a microescala, apresentando por meio desse ensaio dados de pH e temperatura ótimos das enzimas L-asparaginases de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* que corroboram com resultados apresentados na literatura, bem como os parâmetros cinéticos obtidos para a enzima de *B. subtilis* apresentaram resultados coerentes. Com isso, obtém-se uma grande vantagem com a necessidade de uma menor quantidade de enzimas utilizadas para os ensaios realizados, além de reduzir a quantidade de reagente Nessler utilizado, reagente com alto grau de toxicidade, que gera um acúmulo de resíduo proveniente das reações realizadas.

Já em relação à atividade citotóxica apresentada pelas enzimas, a L-ASNase recombinante de *Escherichia coli* apresentou, comparativamente, uma melhor eficácia como enzima antineoplásica em relação à L-ASNase recombinante de *Bacillus subtilis*, sendo necessária para a última uma maior concentração de enzima para que se obtenha um maior índice de morte celular das células Raji. No entanto, este é o primeiro estudo a mostrar que a L-asparaginase II de *B. subtilis* possui atividade antitumoral contra uma linhagem leucêmica, abrindo caminhos para estudar mais sua ação e até mesmo melhorar suas propriedades terapêuticas por técnicas de engenharia de proteínas, abrindo caminho para o desenvolvimento de um novo biofármaco.

REFERÊNCIAS

- AGHAIYPOUR, K., WLODAWER, A., LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, p. 5655–5664, 2001.
- ALBERTSEN, B.K., SCHRODER, H., INGERSLEY, J., JAKOBSEN, P., AVRAMIS, V. I., MÜLLER, H. J., CARLSEN, N. T., SCHMIEGELOW, K. Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia asparaginase* and asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system. **Br J Haematol**, v. 115, p. 983-990, 2001.
- ANESE, M., QUARTA, B., PELOUX, L., CALLIGARIS, S. Effect of formulation on the capacity of L-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 435-440, 2011.
- AVRAMIS, V. I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Res**, v. 32, p. 2423–2437, 2012.
- BARBOSA, S. F. C., DA COSTA, C. A., FERREIRA, L. S. C., ALMEIDA, D. S., AZEVEDO, T. C. B., DE LEMOS, J. A. R., SOUSA, M. S. Aspectos epidemiológicos dos casos de leucemia e linfomas em jovens e adultos atendidos em hospital de referência para câncer em Belém, Estado do Pará, Amazônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v.6, n.3, p. 43- 50, 2015.
- BATOOL, T., MAKKY, E. A., JALAL, M., YUSOFF, M. M. A., Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 178 p. 900–923, 2016.
- CAETANO, L. F. *Expressão e caracterização bioquímica de uma L-asparaginase II de Bacillus subtilis expressa em Escherichia coli: estudo preliminar de um potencial biofármaco*. 2017. 63f. Monografia – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CAMPBELL, H. A.; MASHBURN, L. T.; BOYSE, E. A.; OLD, L. J. Two L-Asparaginases from *Escherichia coli* B. their separation, purification, and antitumor activity. **Biochemistry**, v.6, p.721–730.1967.

CEDAR, H.; SCHWARTS, J. H. Localization of two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, p. 3753-3755, 1967.

DERST, C; HENSELING, J, ROHM, K-H. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. **Protein Sci**, v. 9, p. 2009–2017, 2000.

DUNLOP, P. C., MEYER, G. M., BAN, D., ROON, R. J. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 253, p. 1297-1304, 1978.

DUVAL, M., SUCIU, S., FERSTER, A., RIALLAND, X., NELKEN, B., LUTZ, P., BENOIT, Y., ROBERT, A., MANEL, A. M., VILMER, E., OTTEN, J., PHILIPPE, N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, p. 2734-2739, 2002.

EAGLER, R. A.; AHUJA, S. P; MATLOUB, Y. L-asparaginase in treatment of patients with acute lymphoblastic leucemia. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 7, p. 62-71, 2016.

EHSANIPOUR, E. A., SHENG, X., BEHAN, J. W., WANG, X., BUTTURINI, A., AVRAMIS, V. I., MITTELMAN, S.D. Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. **Cancer Res**, v. 73, n.10, p. 2998-3006, 2013.

FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS (FISPQ).

Quimilab Produtos de Química Fina, 2016. Disponível em:

<[http://www.quimilab.com.br/_sistema_quimicafina/sistema/FISPQ/FISPQ%2088%20-%20NESSLER%20\(Reagente%20de%20Nessler\)%20\(NBR%2014725-4-2012\)%20SPECSOL%20Rev.pdf](http://www.quimilab.com.br/_sistema_quimicafina/sistema/FISPQ/FISPQ%2088%20-%20NESSLER%20(Reagente%20de%20Nessler)%20(NBR%2014725-4-2012)%20SPECSOL%20Rev.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2018.

FISHER, S.H., WRAY Jr, L. V. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. **J Bacteriol**. 184, p. 2148–2154, 2002.

GABERC-POREKAR, V., MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **J. Biochem Biophys Methods**. v. 49, p. 335-360, 2001.

HERNÁNDEZ-ESPINOSA, D., MIÑAMO, A., MARTÍNEZ, C., PÉREZ-CEBALLOS, E., HERAS, I., FUSTER, J. L., VICENT, V., CORRAL, J. L-asparaginase-induced antithrombin type I deficiency: implications for conformational diseases. **Am J Pathol**, v. 169, p. 142–153, 2006.

HIJIYA, N. & VAN DER SLUIS, I. M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia, **Leukemia & Lymphoma**, v. 57, p. 748-757, 2016.

INABA, H., GREAVES, M., MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**.v. 381, n. 9881, p.1943–1955, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tipos de câncer - Leucemia. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia>. Acesso em 10 nov. 2018.

JIA, M., XU, M., HE, B., RAO, Z. Cloning, Expression, and Characterization of l-Asparaginase from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* B11–06. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9428-9434, 2013.

KIDD, J. G., J. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of the of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **J. Exp. Med.**, v. 98, p.565-582, 1953a.

KIDD, J. G., J. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. II. Studies on the nature of the active serum constituent: histological mechanism of the regression: test for the effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro: discussion. **J. Exp. Med.**, v. 98, p. 583-612, 1953b.

KOTZIA, G.A., LABROU, N.E. Cloning, expression and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. **J Biotechnol**, v. 119, p. 309–323, 2005.

KUMANO, M., TAMAKOSHI, A., YAMANE, K. A 32 kb nucleotide sequence from the region of the lincomycin-resistance gene (22°-25°) of the *Bacillus subtilis* chromosome and identification of the site of the lin-2 mutation. **Microbiology** v. 143, p. 2775–2782, 1997.

KUMAR, D. S, SOHBA, K. L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review. **Adv. Bioresearch**, v. 3, p. 137–157, 2012.

LAW, A. S., WRISTON, J. C. Purification and Properties of *Bacillus coagulans* L-Asparaginase. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 147, p. 744-752, 1971.

LAZARUS, H., MCCOY, T. A., FARBER, S., BARELL, E. F., FOLEY, G. E. Nutritional requirements of human leukemic cells: Asparagine requirements and the effect of l-asparaginase. **Experimental Cell Research**, v. 57, n 1, p. 134-138, 1969.

LEE, S. M., ROSS, J. T., GUSTAFSON, M. E., WROBLE, M. H., MUSCHIK, G. M. Large scale recovery and purification of L-asparaginase from *E. carotovora*. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 12, p. 229-247, 1986.

LEONE, F. A., BARANAUSKAS, J. A., FURRIEL, R. P., BORIN, I. A. SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemic Mol Biol Educ**, v. 33, n. 6, p. 399-403, 2005.

MASHBURN, L. T., WRISTON, J. C. Tumor Inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 105, p. 451-52, 1964.

MESAS, J. M., GIL, J. A., MARTIN, J. F. Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. **Gen. Microbiol**, v. 136, p. 515-519, 1990.

MITCHELL, L. C., HALTON, J. M., VEGH, P.A., BARR, R. D., VENNERI, T., PAI, K. M., ANDREW, M. E. Effect of disease and chemotherapy on hemostasis in children with acute lymphoid leukemia. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, v. 16, p. 120–126, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cssf/arquivos-de-eventos/audiencia-publica-do-dia-10-e-11-05.17/apresentacao-ms>>. Acessado em 10 nov. 2018.

MÜLLER, H. J., BOOS J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 28, p. 97-113, 1998.

ONISHI, Y., YANO, S., THONGSANIT, J., TAKAGI, K., YOSHIMUNE, K., WAKAYAMA, M. Expression in *Escherichia coli* of a gene encoding type II L-asparaginase from *Bacillus subtilis*, and characterization of its unique properties. **Ann Microbiol**, v. 61, p. 517-524, 2011.

PANIS, B., VLAAR, A.M., VAN WELL, G.T., GRAZEN, B., WEBER, J. W., POSTMA, A. A., KLINKENBERG, S. Posterior reversible encephalopathy syndrome in paediatric leukaemia. **Eur J Paediatr Neurol**, v. 14, p. 539–545, 2010.

PRÄBST, K., ENGELHARDT, H., RINGGELER, S., HÜBNER, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: GILBERT, D.; FRIEDRICH, O., *Cell Viability Assays*. **Springer Protocols**, v. 1601, p. 1-17, 2017.

PIETERS, R., HUNGER, S. P., BOOS, J., RIZZARI, C., SILVERMAN, L., BARUNCHEL, A., GOEKBUGET, N., SCHRAPPE, M., PUI, C. H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-249, 2010.

PUI, C.H., MULLIGHAN, C. G., EVANS, W. E., RELING, M. V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? **Blood**, v. 120, p 1165-1174, 2012.

- RAETZ, E. A., SALZER, W. L. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 32, p. 554-563, 2010.
- RAJA, R. A., SCHIEGELOW, K., FRANDBSEN, T. L. Asparaginase-associated pancreatitis in children. **Br J Haematol**, v. 159, p. 18-27, 2012.
- RAHA, S. K., ROY, S. K., DEY, S. K., CHAKRABOUTY, S. L. Purification and properties of an L- asparaginase from *Cylindrocarpon* MB-10. **Biochem. Inter.**, v. 21, p. 977-1000, 1990.
- RIZZARI, C., CONTER, V., STARÝ, J., COLOMBINI, A., MOERICKE, A., SCHRAPPE, M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 25, Suppl 1, S1-9, 2013.
- ROBERTS, J. Purification and properties of a high potent ant tumor glutaminase-asparaginase from *Pseudomonas* 7Z. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 2119-2123, 1976.
- ROZALKA, M. Staphylococcal L-asparaginase: purification and properties of enzyme protein. **Acta Microbiol. Pol.**, v. 38, p. 233-245, 1989.
- SUN, D., SETLOW, P. Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis ansR* gene, which encodes a repressor of the ans operon coding for L-asparaginase and L-aspartase. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 2501–2506, 1991
- SWAIN, A. L., JASKÓLSKI, H., HOUSSET, D., WLODAWER, A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p 1474-1478, 1993.
- WEHNER, A., HARMS, E., JENNINGS, M. P. Site-specific mutagenesis of *Escherichia coli* asparaginase II. None of the three histidine residues is required for catalysis. **Eur J Biochem**, v. 208, p. 475–480, 1992.
- WHELAN, H. A. & WRISTON, J.C. Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 8, p. 2386-2393, 1969.

WRISTON, J. C. Jr, YELLIN, T. O. L-asparaginase: a review. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 39, p. 185-248, 1973.

VIDYA, J., VASUDEVAN, U. M., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. L-Asparaginase II from *E. coli* MTCC 739. **Food Technol. Biotechnol**, v. 49, n. 3, p. 286–290, 2011.

ZHANG, J., FAN, J., VENNETI, S., CROSS, J. R., TAKAGI, T., BHINDER, B., DJABALLAH, H., KANAI, M., CHENG, E. H., JUDKINS, A. R., PAWEL, B., BAGGS, J., CHERRY, S., RABINOWITZ, J.D., THOMPSON, C. B. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. **Molecular Cell**. v. 56, p. 205–218, 2014.