



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

**DAVI DE CASTRO GOMES**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CINÉTICA DE L-ASPARAGINASES  
BACTERIANAS E AVALIAÇÃO DE SEUS POTENCIAIS CITOTÓXICOS**

**FORTALEZA**

**2019**

DAVI DE CASTRO GOMES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CINÉTICA DE L-ASPARAGINASES  
BACTERIANAS E AVALIAÇÃO DE SEUS POTENCIAIS CITOTÓXICOS**

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.

Orientadora pedagógica: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Orientador técnico-científico: Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

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

FORTALEZA

2019

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)

---

- G613c Gomes, Davi de Castro.  
Caracterização bioquímica e cinética de L-asparaginases bacterianas e avaliação de seus potenciais citotóxicos / Davi de Castro Gomes. – 2019.  
59 f. : il.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação pedagógica: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.  
Orientação técnico-científica: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.
1. L-asparaginase. 2. Leucemia Linfóide Aguda. 3. Caracterização. 4. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 661

---

DAVI DE CASTRO GOMES

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CINÉTICA DE L-ASPARAGINASES  
BACTERIANAS E AVALIAÇÃO DE SEUS POTENCIAIS CITOTÓXICOS

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: 17 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora Pedagógica)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado (Orientador Técnico-Científico)  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

---

Dra. Fátima de Cássia Evangelista Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha família e amigos.

## AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio incondicional e por não duvidarem do meu potencial. Vocês são o motivo por eu sempre buscar ser uma pessoa melhor e nunca desistir dos meus sonhos.

À minha companheira Janick por todo o afago e compreensão nos momentos de fragilidade, por acreditar sempre na minha capacidade, por me apoiar em todas minhas decisões e por todas as memórias que criamos juntos. Obrigado por ser você.

Aos meus amigos do grupo Chapuletona por todos os momentos incríveis vividos durante a graduação. Sentirei falta dos nossos encontros diários na escada na frente do R.U.

À Germana Nogueira que me acompanha durante os vários altos e baixos da vida, além de sempre me ajudar a ver o lado positivo de todas as situações. Você é um grande presente na minha vida.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pela formação acadêmica adquirida. Aos professores do Bacharelado em Biotecnologia da UFC por todos os ensinamentos compartilhados que foram essenciais para aflorar cada vez mais minha paixão pela ciência.

Ao grupo EngProT da Fiocruz, especialmente meus amigos de bancada, Igor Studart, Marcus Rafael, Larissa Queiroz, Ludmilla Freire, Bruna de Souza, por todos os ensinamentos e pela parceria diária durante esse período. Sou eternamente grato a cada um de vocês. Aos grupos de pesquisa anteriores que participei, principalmente ao GPBio, pelo acolhimento e excelente aprendizado durante o tempo de iniciação científica.

Aos colegas da turma 6 da Biotecnologia pela união e pelo compartilhamento de “sofrimentos” da graduação e a todos os laços de amizade que construí na Biotecnologia, sempre levarei comigo as melhores lembranças.

Ao Dr. Gilvan Furtado pela orientação e pela confiança depositada em mim para conduzir o trabalho. Obrigado por acreditar na minha competência e por acompanhar de perto toda a confecção do trabalho. À Dra. Marcela Gambim pela coorientação e pela atenção constante com o grupo.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) da Universidade de Fortaleza (Unifor) pela infraestrutura imprescindível para o sucesso dos experimentos e aos colegas do laboratório pelos momentos de descontração e apoio.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) pela colaboração no trabalho. À Dra. Fátima de Cássia pela assistência concedida nos ensaios de citotoxicidade.

À Fiocruz e ao CIEE pelo auxílio financeiro e pela oportunidade de estágio.

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”*

- Paulo Freire

## RESUMO

A L-asparaginase (L-ASNase) é uma enzima que hidrolisa L-asparagina, gerando L-aspartato e amônia. Ela é conhecida por possuir duas isoformas enzimáticas, sendo denominadas de tipo I e tipo II. A L-ASNase do tipo II é muito empregada em rotinas quimioterápicas contra Leucemia Linfóide Aguda, como um agente antineoplásico adjuvante, cujo mecanismo de ação baseia-se na depleção de L-asparagina sérica, um aminoácido não-essencial importante para a proliferação de células leucêmicas. As principais L-ASNases oncoterápicas comerciais são obtidas das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, atribuem-se ao seu uso efeitos adversos e de hipersensibilidade devido à presença da atividade glutaminásica. Portanto, estratégias que visem caracterizar e estudar a viabilidade de L-asparaginases podem auxiliar no desenvolvimento de biomoléculas com propriedades terapêuticas melhoradas, a fim de promover um tratamento mais eficaz e seguro. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar diferentes L-asparaginases bacterianas, especificamente a de *Escherichia coli*, denominada L-ASNase B, e as de *Bacillus subtilis*, as L-ASNases A e Z, e determinar os seus potenciais citotóxicos em diferentes linhagens leucêmicas. As atividades enzimáticas foram avaliadas pelo método de Nessler, enquanto para os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular foi utilizado o reagente MTT. Condições reacionais de pH e temperatura ótimas das L-ASNases B e Z foram descritos anteriormente pelo grupo. O pH ótimo para a L-ASNase B foi de 8,5 e a temperatura ótima foi 60 °C, já para a L-ASNase Z o pH ótimo foi de 7,0 e a temperatura ótima foi de 50 °C. A caracterização da L-ASNase A foi realizada e determinada obtendo como pH ótimo 7,0, e como temperatura ótima 40 °C. Além disso, ao utilizar L-glutamina como substrato, a L-ASNase B demonstrou possuir maior atividade glutaminásica em relação à L-ASNase Z. Os parâmetros cinéticos da enzima L-ASNase B, foram de 3 mM para o  $K_m$  e 168,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  para a  $V_{m\acute{a}x}$ , frente ao substrato L-asparagina. E para a L-ASNase Z, os valores foram de 1,43 mM e 90,0  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  para  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , respectivamente, também frente à L-asparagina. Com relação ao ensaio de citotoxicidade realizado na linhagem HL-60, a L-ASNase B apresentou um  $\text{CI}_{50}$  de 0,83  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e para a L-ASNase Z o  $\text{CI}_{50}$  foi de 1,53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As enzimas caracterizadas possuem potencial aplicação na área oncológica, demonstrando as promissoras abordagens para otimização dos biocatalisadores a partir dos resultados apresentados, de forma que abra cada vez mais perspectivas para uma terapia eficiente aos pacientes leucêmicos.

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

## ABSTRACT

L-asparaginase (L-ASNase) is an enzyme that hydrolyzes L-asparagine, generating L-aspartate and ammonia. It is known to have two enzymatic isoforms, being named type I and type II. Type II L-ASNase is widely used in chemotherapeutic routines against Acute Lymphoid Leukemia as an adjuvant antineoplastic agent whose mechanism of action is based on the depletion of serum L-asparagine, a non-essential amino acid important for leukemia cells proliferation. The major commercial oncoterapeutic L-ASNases are obtained from the bacteria *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. However, adverse effects and hypersensitivity are attributed to its use due to the presence of glutaminase activity. Therefore, strategies aimed at characterizing and studying the viability of L-asparaginases may aid in the development of biomolecules with improved therapeutic properties in order to promote a more effective and safer treatment. The present work aimed to characterize different bacterial L-asparaginases specifically that of *Escherichia coli*, called L-ASNase B, and those of *Bacillus subtilis*, L-ASNases A and Z, and determine their cytotoxic potentials in different leukemic cell lines. The enzymatic activities were evaluated by the Nessler method, whereas for the cytotoxicity and cell viability assays the MTT reagent was used. Optimum pH and temperature reaction conditions of L-ASNases B and Z were described previously by the group. The optimum pH for L-ASNase B was 8.5 and the optimum temperature was 60 °C, while for L-ASNase Z the optimum pH was 7.0 and the optimum temperature was 50 °C. The characterization of L-ASNase A was carried out and determined obtaining as optimum pH 7.0, and as optimum temperature 40 °C. Furthermore, when using L-glutamine as a substrate, L-ASNase B was shown to have a higher glutaminase activity than L-ASNase Z. The kinetic parameters of the enzyme L-ASNase B were 3 mM for  $K_m$  and 168.2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  for  $V_{max}$ , compared to the L-asparagine substrate. For L-ASNase Z, the values were 1.43 mM and 90.0  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  for  $K_m$  and  $V_{max}$ , respectively, also compared to L-asparagine. In relation to the cytotoxicity assay performed in the HL-60 cell line, L-ASNase B had an  $\text{IC}_{50}$  of 0.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and for L-ASNase Z the  $\text{IC}_{50}$  was 1.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The enzymes characterized have potential application in the oncological area, demonstrating the promising approaches for the optimization of the biocatalysts from the presented results, in a way that opens up increasingly perspectives for an efficient therapy to leukemic patients.

**Keywords:** L-asparaginase. Acute Lymphoid Leukemia. Characterization. Cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma.....	17
Figura 2	– Mecanismo básico de ação da L-asparaginase, demonstrando os efeitos nas células leucêmicas.....	18
Figura 3	– Formação de acrilamida em processos alimentícios de alta temperatura.....	24
Figura 4	– Estrutura tetramérica de L-asparaginase II de <i>E. coli</i> .....	25
Figura 5	– Ilustração das reações de L-asparaginases de <i>E. coli</i> e <i>E. chrysanthemi</i> responsáveis pela dupla atividade asparaginásica e glutaminásica.....	27
Figura 6	– Demonstração do encapsulamento da L-ASNase com o PEG.....	28
Figura 7	– Diferentes abordagens para a melhoria da L-asparaginase.....	29
Figura 8	– SDS-PAGE 12,5% da purificação de L-ASNases B e Z.....	39
Figura 9	– SDS-PAGE 12,5% da purificação da L-ASNase A.....	40
Figura 10	– SDS-PAGE 12,5% de L-ASNases A, B e Z concentradas.....	41

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase A em diferentes pHs.....	43
Gráfico 2 – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase A em diferentes temperaturas...	44
Gráfico 3 – Atividade asparaginásica das L-asparaginases B e Z.....	45
Gráfico 4 – Atividade glutaminásica das L-asparaginases B e Z.....	46
Gráfico 5 – Influência da concentração do substrato L-asparagina na velocidade de reação da formação de amônia a 37 °C e pH 7,4 para a L-ASNase B.....	47
Gráfico 6 – Influência da concentração do substrato L-asparagina na velocidade de reação da formação de amônia a 37 °C e pH 7,4 para a L-ASNase Z.....	48
Gráfico 7 – Representação gráfica do percentual de inibição das substâncias testadas....	50
Gráfico 8 – Viabilidade celular da HL-60 contra as L-ASNases B e Z.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de enzimas terapêuticas.....	20
Tabela 2 – Bactérias gram-negativas e gram-positivas produtoras de L-ASNases.....	22
Tabela 3 – Dados acerca das L-ASNases utilizadas no trabalho.....	23
Tabela 4 – Teste cinético realizado para as L-ASNases tipo II recombinantes.....	36
Tabela 5 – Condições dos testes de citotoxicidade.....	38
Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos das L-ASNases B e Z.....	42
Tabela 7 – Valores de % de inibição nas duas linhagens celulares testadas.....	49
Tabela 8 – Avaliação da atividade citotóxica das L-ASNases B e Z frente à linhagem tumoral HL-60 por meio do ensaio de MTT após 72 horas de incubação.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASN	Asparagina
ASNS	Enzima asparagina sintetase
ASP	Aspartato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade Óptica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
HEPES	Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Média
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
L-ASNase	L-asparaginase
L-ASNase I	L-asparaginase tipo I
L-ASNase II	L-asparaginase tipo II
L-ASNase A	L-asparaginase A de <i>Bacillus subtilis</i>
L-ASNase B	L-asparaginase B de <i>Escherichia coli</i>
L-ASNase Z	L-asparaginase Z de <i>Bacillus subtilis</i>
LB	Luria-Bertani
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
TCA	Ácido tricloroacético

## LISTA DE SÍMBOLOS

$x g$	Aceleração gravitacional
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
Da	Dalton
US\$	Dólar
g	Gramma
°C	Graus Celsius
$\text{NH}_4^+$	Íon amônio
$\text{Ni}^{+2}$	Íon Níquel
®	Marca Registrada
$\mu$	Micro
m	Mili
mL	Mililitro
Min	Minutos
M	Molar
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
K	Quilo
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
U	Unidade de concentração enzimática
mol	Unidade de quantidade de substância
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade Máxima

## SUMÁRIO

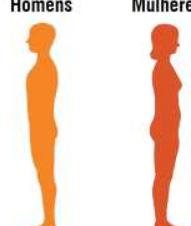
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Enzimas terapêuticas.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2</b>	<b>L-asparaginase.....</b>	<b>21</b>
<i>1.2.1</i>	<i>L-asparaginases bacterianas.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2.2</i>	<i>Características estruturais.....</i>	<i>24</i>
<b>1.3</b>	<b>L-asparaginase no tratamento da leucemia linfóide aguda.....</b>	<b>25</b>
<i>1.3.1</i>	<i>Atividade glutaminásica.....</i>	<i>26</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Efeitos secundários e imunogenicidade.....</i>	<i>27</i>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Expressão heteróloga de L-asparaginases de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Lise celular.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC).....</b>	<b>32</b>
<b>3.4</b>	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Quantificação de proteínas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6</b>	<b>Atividade enzimática.....</b>	<b>33</b>
<i>3.6.1</i>	<i>Curva padrão.....</i>	<i>34</i>
<i>3.6.2</i>	<i>Efeito da variação de pH sobre a atividade enzimática.....</i>	<i>35</i>
<i>3.6.3</i>	<i>Efeito da variação de temperatura sobre a atividade enzimática.....</i>	<i>35</i>
<b>3.7</b>	<b>Ensaio de atividade glutaminásica.....</b>	<b>35</b>
<b>3.8</b>	<b>Ensaio cinético.....</b>	<b>36</b>
<b>3.9</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade.....</b>	<b>37</b>
<i>3.9.1</i>	<i>Linhagens tumorais e culturas de células.....</i>	<i>37</i>
<i>3.9.2</i>	<i>Avaliação da citotoxicidade.....</i>	<i>37</i>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Purificação e concentração das L-asparaginases recombinantes.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização bioquímica.....</b>	<b>42</b>

4.3	Atividade asparaginásica e glutaminásica.....	44
4.4	Cinética enzimática.....	46
4.5	Citotoxicidade das L-asparaginases.....	49
4.5.1	<i>Determinação de <math>CI_{50}</math></i> .....	50
5	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO A – CURVA PADRÃO DE SULFATO DE AMÔNIO.....	61

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo generalista para um grupo de doenças que tem como característica marcante o rápido crescimento de células anormais, que se multiplicam desordenadamente e podem passar a invadir tecidos e espalhar-se para outros órgãos. É a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes no ano de 2018 (OMS, 2018). Estima-se que, para o Brasil, no período do biênio de 2018-2019, ocorrerão 600 mil casos novos de câncer, com exceção do câncer de pele não melanoma (FIGURA 1) (INCA, 2018). Entre os dez tipos de câncer com maior incidência, destaca-se a leucemia que apresentará 5.940 novos casos em homens e 4.860 novos casos em mulheres para o biênio 2018-2019, ocupando a nona e a décima posições, respectivamente.

**Figura 1** – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		<b>Homens</b> <b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

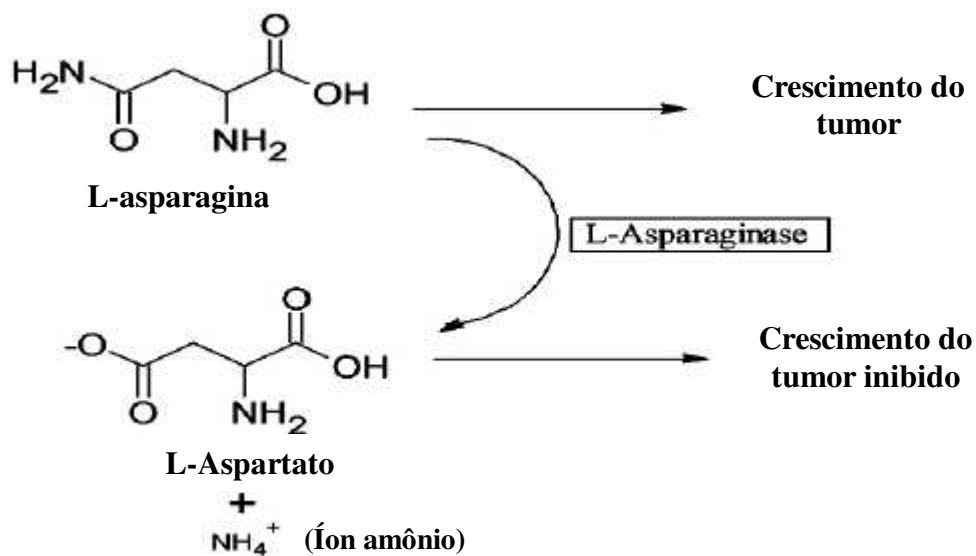
Fonte: INCA (2018).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, por ano, são identificados cerca de 300 mil novos casos de câncer entre crianças e jovens de até 19 anos no mundo, sendo a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) a mais frequente na infância, correspondendo a cerca de 30-35% dos casos de câncer infantojuvenil (HOWLADER *et al.*, 2014). É uma neoplasia maligna originária das células brancas do sangue, também conhecidas como leucócitos, caracterizada pela proliferação excessiva de células imaturas de origem linfóide no tecido hematopoiético, comprometendo o funcionamento normal da medula óssea. Possui características específicas de incidência para adultos e crianças, porém a ocorrência é mais comum em crianças (HOFFBRAND *et al.*, 2018).

O tratamento da LLA utiliza diversos agentes quimioterápicos, sendo a proteína terapêutica L-asparaginase (L-ASNase) a mais utilizada nas rotinas de terapia. A eficácia

clínica desta droga é baseada na depleção de L-asparagina circulante no sangue e a vulnerabilidade seletiva das células leucêmicas, cuja sobrevivência é dependente de fontes extracelulares de L-asparagina (MÜLLER *et al.*, 1998). A L-ASNase catalisa irreversivelmente a conversão hidrolítica de L-asparagina para ácido aspártico (L-aspartato na forma iônica) e amônia (amônio na forma iônica) sob condições fisiológicas (ELSHAFEI *et al.* 2012) (FIGURA 2).

**Figura 2** – Mecanismo básico de ação da L-asparaginase, demonstrando os efeitos nas células leucêmicas.



Fonte: Adaptado de ELSHAFEI *et al.* (2012). Reação hidrolítica enzimática da L-asparaginase que ocorre no tratamento oncológico.

As L-ASNases comerciais utilizadas no tratamento de LLA são obtidas através das bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, por ser uma enzima de origem bacteriana e de alto peso molecular, é reconhecida pelo sistema imunológico, diminuindo a sua meia-vida e podendo causar reações de hipersensibilidade nos pacientes (ULU *et al.*, 2017).

Até 2013, a L-asparaginase era comercializada no Brasil, sob o nome comercial de *Elspar*® (Merck & Co., Inc.) pelo laboratório Bagó, que detinha o registro nacional do medicamento, porém a fabricação acabou sendo interrompida no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Desde então, a Anvisa vem buscando alternativas para adquirir a L-asparaginase, devido a sua baixa disponibilidade no mercado farmacêutico e também por não haver outro produto equivalente com registro de produção nacional (ZENATTI *et al.*, 2018).

Uma vez que o Brasil não possui plataforma produtiva de L-asparaginase, atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) fornece como alternativa mais barata a *Leuginase*®, biofármaco fabricado pela empresa chinesa Beijing SL Pharmaceutical. No entanto, a aparente falta de estudos clínicos e escassez de informações de segurança acerca desse agente antineoplásico geraram debates entre os oncologistas e o governo brasileiro, acerca de quão seguro é comprar um novo medicamento com base em seu preço e não pela sua eficácia comprovada cientificamente (ZENATTI *et al.*, 2018).

A partir da problemática acima apresentada faz-se necessário buscar e discutir novas perspectivas acerca da L-asparaginase que fomente a implementação de uma produção brasileira, a fim de alcançar autonomia tecnológica desse biofármaco, cujos resultados são reconhecidamente importantes na clínica de leucemias.

### **1.1 Enzimas terapêuticas**

Enzimas ou biocatalisadores são proteínas (ou moléculas de RNA) que possuem atividade catalítica altamente específica e seletiva. Além disso, apresentam uma grande gama de funções estabelecidas desde muito tempo, atuando nas indústrias têxtil, petroquímica, química fina e farmacêutica. Uma das principais fontes naturais produtoras de enzimas são os microrganismos (BATOOL *et al.*, 2016).

Sob outra perspectiva, enzimas de uso terapêutico tiveram suas aplicações iniciadas entre as décadas de 60 e 80, sendo de grande interesse para a atual indústria de biotecnologia. Elas também são denominadas de “Enzimas especiais”, pois apresentam finalidades das mais variadas, como possuírem atividade anti-inflamatória e antisséptica, atuarem como auxiliar digestivo, apresentarem atividade antiviral e serem utilizadas como agentes oncoterápicos, porém dependendo da sua aplicação torna-se necessário um alto nível de pureza (AEHLE, 2007) (TABELA 1).

**Tabela 1** – Exemplos de enzimas terapêuticas.

Enzima	Fonte	Uso terapêutico	Referência
Lipase	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Auxiliar digestivo	HASSAN <i>et al.</i> , 2006
Ribonuclease	<i>Rana pipiens</i>	Antiviral	PRADEEPKUMAR <i>et al.</i> , 2012.
Colagenase	<i>Clostridium histolyticum</i>	Úlceras de pele	RAMUNDO <i>et al.</i> , 2009.
L-asparaginase	<i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> .	Leucemia linfóide aguda	RIZZARI <i>et al.</i> , 2013.

Fonte: adaptado de UMAMAHESWARI *et al.*, 2016.

Nos anos 80 ocorreu a revolução da indústria farmacêutica, devido ao advento dos biofármacos nas rotinas terapêuticas. Biofármacos é a designação dada a medicamentos originados a partir de processos biotecnológicos, nos quais o princípio ativo é obtido através de microrganismos ou células modificadas geneticamente (IPEA, 2018). Segundo a Comissão Europeia (2013), eles são englobados como moléculas complexas de alto peso molecular que podem ser classificados em: proteínas (hormônios, enzimas ou anticorpos monoclonais), produtos derivados do sangue, medicamentos imunológicos (como soros e vacinas), os alérgenos e os produtos de tecnologia avançada, tais como os medicamentos de terapia genética e celular. Nesse contexto, uma grande parcela dos medicamentos biológicos são proteínas (como enzimas e anticorpos) e hormônios, confirmando cada vez mais sua importância no cenário médico (RYU *et al.*, 2012).

Propriedades enzimáticas, como a alta afinidade e a especificidade ao seu substrato, além da capacidade de converter múltiplas moléculas deste em produto, explicam a aplicabilidade de enzimas na área da saúde, resultando na obtenção de drogas potentes. Os fatores-chave que devem impulsionar o crescimento do mercado global de enzimas terapêuticas incluem o aumento progressivo do número de casos de câncer, as variadas aplicações de enzimas em tratamentos para as doenças crônicas e a alta demanda por terapias cada mais efetivas (UMAMAHESWARI *et al.*, 2016). Segundo a previsão de mercado realizada pelo Allied Market Research (2015), o mercado global de enzimas especiais, pesquisa em biotecnologia e diagnósticos foi responsável por movimentar US\$ 561,9 milhões de investimentos em 2014 e está previsto gerar US\$ 947,5 milhões até 2020, registrando um crescimento líquido anual de 9,4% durante o período de 2015 – 2020.

## 1.2 L-asparaginase

Dentre as enzimas citadas na tabela 1, vale destacar a L-asparaginase (L-asparaginase amidohidrolase, EC 3.5.1.1) que tem sido citada constantemente em pesquisas clínicas oncológicas devido à sua atividade antineoplásica para o tratamento de distúrbios linfoproliferativos e de linfomas, mais notadamente da leucemia linfóide aguda (LLA) (BATOOL *et al.*, 2016).

A hidrólise de L-asparagina em aspartato e amônia foi primeiramente observado por Lang (1904) em tecido bovino. Clementi (1922) descobriu a presença de L-asparaginase no soro sanguíneo de porquinho-da-índia. Kidd (1953) realizou uma série de experimentos que demonstraram que o soro desse animal era capaz de tratar linfossarcomas em ratos, atuando então como um inibidor tumoral. Finalmente, Broome (1961) demonstrou que a L-asparaginase era o agente responsável pela atividade antitumoral presente no soro desses animais.

Desde a década de 60, foi reconhecido que uma dose única de L-asparaginase podia alcançar a remissão em 65 % de crianças com LLA por cerca de 60 dias (MÜLLER *et al.*, 1998). Mesmo com a existência comprovada de L-asparaginases em diferentes organismos, apenas as enzimas de *E. coli* e *E. chrysanthemi* são produzidas industrialmente e utilizadas frequentemente na terapia do câncer há mais de 30 anos (SANCHES *et al.*, 2007).

A presença do biocatalisador L-asparaginase já foi reportada em diversos organismos, incluindo animais, plantas e microrganismos (BATOOL *et al.*, 2016), além de existir alguns estudos iniciais com humanos (KARAMITROS *et al.*, 2014), entretanto a preferência na plataforma de produção acaba recaindo nos microrganismos devido à facilidade de escalonamento do processo (BATOOL *et al.*, 2016; PATRO *et al.*, 2011). Logo, alguns estudos mostraram que os fungos também poderiam ser fontes potenciais de L-ASNases para o tratamento de neoplasias, devido aos efeitos adversos já documentados sobre as enzimas bacterianas e pelos fungos serem geneticamente mais semelhantes aos humanos. Conseqüentemente, isso diminuiria a probabilidade de ocorrência das reações imunogênicas contra L-asparaginases fúngicas (SHRIVASTAVA *et al.*, 2012). Alguns fungos já reportados como produtores são: *Aspergillus niger* (SHRIVASTAVA *et al.*, 2012), *Aspergillus oryzae* (HENDRIKSEN *et al.*, 2009), *Fusarium roseum* (NAKAHAM *et al.*, 1973), dentre outros.

Outras fontes importantes reportadas como produtoras são leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* (BOM *et al.*, 1997); macroalgas marinhas como *Vaucheria uncinata* (USHA; PANDEY, 2011); e plantas, como nas sementes de *Phaseolus vulgaris*

(SALEH *et al.*, 2015), em que a enzima apresentou uma alta atividade enzimática e era livre de atividade glutaminásica. Além disso, Clementi (1922) interessadamente notou que a L-ASNase se encontrava na forma ativa em todos os tecidos de animais herbívoros e no fígado de animais onívoros, mas a enzima estava ausente nos órgãos de animais carnívoros.

### 1.2.1 L-asparaginases bacterianas

As bactérias são fontes ricas de L-ASNases e possuidoras de interesse médico considerável. A possibilidade do controle de vários fatores ambientais, como fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, pH e níveis de oxigênio permitiram uma maior facilidade para o escalonamento do processo e a ocorrência de vários estudos acerca de produção e caracterização de L-ASNases com potencial terapêutico (VIDYA *et al.*, 2017; SANCHES *et al.*, 2007). Além disso, é importante o estudo dos fatores bioquímicos e farmacológicos, pois são eles que influenciam na presença da atividade antileucêmica (VIDYA *et al.*, 2017).

Alguns trabalhos mostraram o isolamento da L-ASNase com atividade anticâncer a partir de diferentes plataformas bacterianas, como evidenciado na tabela 2.

**Tabela 2** – 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: Adaptado de BATOOL *et al.*, 2016.

As L-ASNases bacterianas são classificadas em dois subtipos, sendo denominados de tipo I (citoplasmática e expressa constitutivamente) e de tipo II (periplasmática e induzida por anaerobiose) (OHNUMA, 1967). Um exemplo de L-asparaginase I é a codificada pelo

gene *ansA* de *Bacillus subtilis* e do tipo II tem-se a codificada pelo gene *ansB*, em *Escherichia coli*, e pelo gene *ansZ* pela gram-positiva *B. subtilis* (TABELA 3) (EINSFELDT, 2014), no presente trabalho, serão denominadas respectivamente por L-ASNase A, B e Z.

**Tabela 3** – Dados acerca das L-ASNases utilizadas no trabalho.

Gene	Proteína	Organismo hospedeiro	Massa molecular aparente
<i>ansA</i>	L-ASNase A (tipo I)	<i>B. subtilis</i>	36323,49 Da
<i>ansB</i>	L-ASNase B (tipo II)	<i>E. coli</i>	36719,45 Da
<i>ansZ</i>	L-ASNase Z (tipo II)	<i>E. coli</i>	39972,13 Da

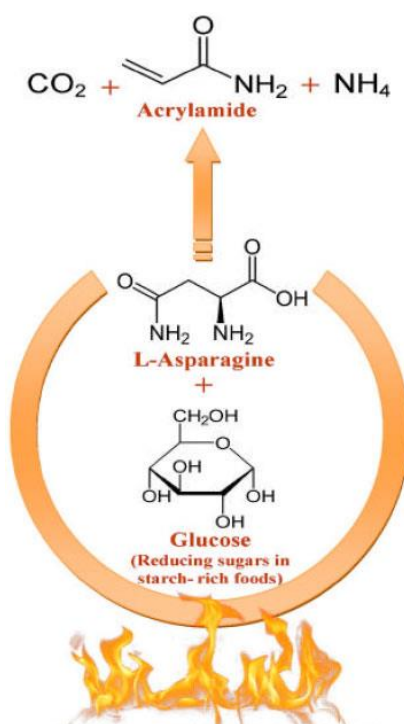
Fonte: Elaborado pelo autor. Os dados de massa molecular foram obtidos a partir da busca da sequência primária de aminoácidos das L-asparaginases de cada organismo hospedeiro na plataforma *Kegg Organisms*. Logo, as sequências primárias obtidas foram submetidas ao software *ProtParam tool*, hospedado no portal *Expasy Bioinformatic Resources*, responsável por computar e gerar os parâmetros físicos e químicos (massa molecular, pI teórico, composição atômica, coeficiente de extinção molar, entre outros) das proteínas de interesse.

Ambas apresentam afinidades diferentes ao substrato L-asparagina, a enzima do tipo I apresenta um  $K_m$  (Constante de Michaelis-Menten) aparente relativamente alto na ordem milimolar (mM), indicando baixa afinidade ao substrato, devido à baixa eficiência cinética representada pelo valor de  $K_m$ , além de não possuir atividade antileucêmica reportada (YUN *et al.*, 2007). Já a enzima do tipo II possui um  $K_m$  aparente na ordem micromolar ( $\mu\text{M}$ ), apresentando uma elevada afinidade pelo substrato e alta atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* reportada, por isso elas são utilizadas nas formulações de quimioterápicos para tratamento da leucemia, atuando como adjuvante junto com outros fármacos como a vincristina e os glicocorticoides (YUN *et al.*, 2007; KOTZIA *et al.*, 2007).

Yun *et al.* (2007) buscaram explicar a falta de atividade antineoplásica na L-asparaginase de tipo I destacando as propriedades bioquímicas da enzima, como o elevado  $K_m$  para a L-asparagina, e conseqüentemente menor afinidade, além da influência do comportamento alostérico da enzima em que a L-asparagina atua como uma molécula moduladora da atividade enzimática. Alguns estudos destacaram a sua potencial aplicação na indústria alimentícia, atuando como agente auxiliar no processamento de alimentos visando a redução dos níveis de acrilamida tóxica no processo de pré-tratamento (KUMAR *et al.*, 2014; ANESE *et al.*, 2011). A acrilamida (2-propenamida) é um composto potencialmente neurotóxico, carcinogênico e danoso para o sistema reprodutivo, que acaba sendo formado no

processo de cozimento, em altas temperaturas, de alimentos amiláceos (pão, batatas, biscoitos) devido à ocorrência da reação de Maillard entre a L-asparagina e os açúcares redutores presentes no meio, como a glicose (FIGURA 3). Logo, a L-ASNase I pode ter, futuramente, uma importância fundamental na indústria de alimentos por ter a capacidade de converter L-asparagina em L-aspartato, e assim, otimizar o processamento desses alimentos (ANESE *et al.*, 2011).

**Figura 3** – Formação de acrilamida em processos alimentícios de alta temperatura.



Fonte: BATOOL *et al.* (2016).

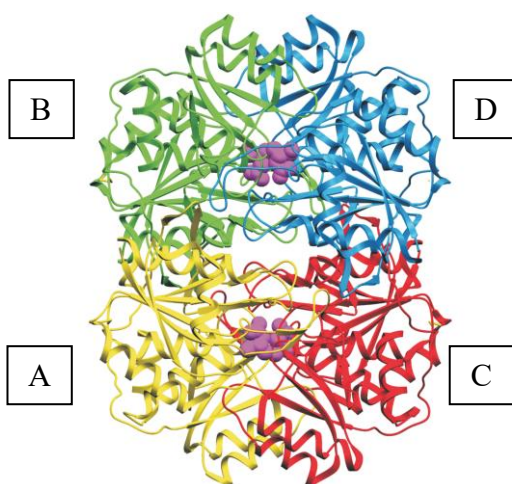
### 1.2.2 Características estruturais

A elucidação da estrutura molecular das L-ASNases é de fundamental importância para uma melhor caracterização funcional. A estrutura cristalizada de L-ASNase I de *E. coli*, por exemplo, mostra que há a formação de apenas um dímero (YUN *et al.*, 2007).

No caso da L-ASNase II de *E. coli*, a estrutura tridimensional existe na forma de homotetrâmero, ou seja, composta por quatro subunidades idênticas não-cooperativas denominadas de A, B, C e D (FIGURA 4), contendo aproximadamente 330 aminoácidos por monômero (KOZAK *et al.*, 2000; SWAIN *et al.*, 1993). Essas subunidades estão organizadas

na forma de dímeros AB e CD, sendo que cada um dos dímeros possui dois sítios ativos. O sítio ativo é criado pela dimerização das subunidades A e C ou B e D e as treoninas (12 e 89) são as responsáveis pela atividade catalítica (KOZAK *et al.*, 2000). Apesar de aparentemente as enzimas serem funcionais na forma de dímeros, análises em raio-X confirmaram que a formação de tetrâmeros é essencial para a eficiência catalítica da L-ASNase II (SANCHES *et al.*, 2007).

**Figura 4** – Estrutura tetramérica de L-asparaginase II de *E. coli*.



Fonte: Adaptado de KOZAK *et al.* (2000). Estrutura tridimensional de *E. coli* com suas subunidades indicadas pelas letras A, B, C e D.

### 1.3 L-asparaginase no tratamento da leucemia linfóide aguda

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é um tipo de neoplasia maligna na qual ocorre o acúmulo e a proliferação desordenada de células linfóides imaturas dentro da medula óssea e em tecidos linfóides (INCA, 2014).

A L-asparaginase (L-ASNase) tipo II é um componente quimioterápico importante utilizado como fármaco de primeira linha para o tratamento da LLA, devido a ser um relevante agente antileucêmico por atuar especificamente sob células tumorais. Desde que se tornou aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 1978, seu uso tornou-se fundamental para induzir a remissão da LLA (RIZZARI *et al.*, 2013).

O exato mecanismo de ação da L-ASNase II não está completamente elucidado, mas fundamenta-se na lógica de que as células leucêmicas são incapazes de sintetizar quantidades adequadas do aminoácido não essencial L-asparagina (L-Asn), uma vez que não

expressam ou expressam a níveis muito baixos a enzima asparagina sintetase (ASNS), o que as tornam dependentes de fontes de L-Asn exógenas para manterem-se em multiplicação. Portanto, ao ocorrer a diminuição dos níveis séricos desse aminoácido, os linfoblastos leucêmicos sofrem uma drástica redução na síntese de DNA, RNA e proteínas, o que acarreta em ativação da cascata sinalizadora de morte celular por apoptose (KIRIYAMA *et al.* 1989; NARTA *et al.*, 2007; RIZZARI *et al.*, 2013; SHRIVASTAVA *et al.*, 2006).

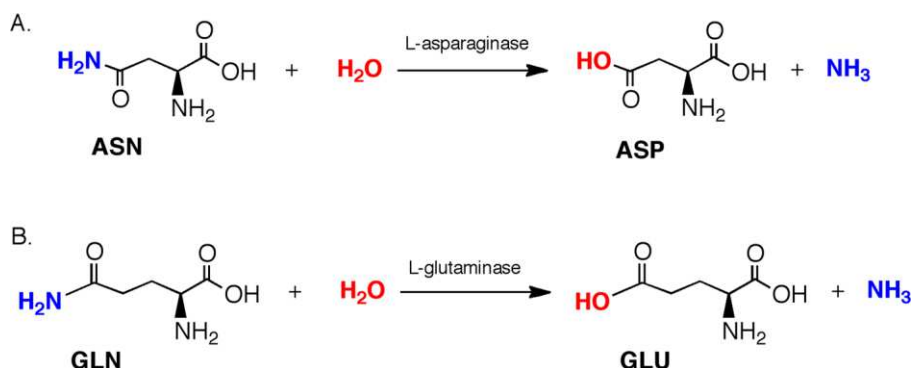
As células saudáveis não são afetadas pela atividade hidrolítica da L-ASNase II, por expressarem ASNS de forma suficiente para suprir sua necessidade nutricional de L-Asn (NARTA *et al.*, 2007).

### **1.3.1 Atividade glutaminásica**

Um fator bastante discutido na literatura é a presença da atividade glutaminásica de L-asparaginases bacterianas tipo II de *E. coli* e *E. chrysanthemi* (NARTA *et al.*, 2007). Essas enzimas hidrolisam preferencialmente o substrato L-Asn, mas possuem cerca de 2-10 % de atividade glutaminásica na atividade enzimática total da L-ASNase, podendo hidrolisar o substrato L-glutamina (L-Gln) e gerar L-glutamato (L-Glu) e amônia como produtos finais (FIGURA 5).

Acredita-se que a atividade de L-glutaminase seja determinante para a citotoxicidade promovida pela enzima, que estaria relacionada aos efeitos adversos do tratamento (NGUYEN *et al.*, 2016). Essa teoria está sustentada no fato de linhagens leucêmicas com alta expressão de ASNS, como MOLT-4, K562 e REH, conseguirem captar e utilizar L-glutamina como fonte energética alternativa à L-asparagina, o que torna a L-asparaginase II com atividade glutaminásica, a alternativa mais conveniente para obter uma considerável eficiência antineoplásica nesses casos (PARMENTIER *et al.*, 2015). Sob outro ponto de vista, Chan *et al.* (2014) ao testar mutantes de L-asparaginase sem atividade glutaminásica, conseguiram demonstrar que as linhagens leucêmicas com baixa ou nenhuma expressão de ASNS, como as SUP-B15 e RS4;11, foram hipersensíveis à atividade asparaginásica sozinha, no entanto esses mesmos mutantes não apresentaram citotoxicidade efetiva nas células com alta expressão de ASNS, sugestionando que a atividade glutaminásica deva ser considerada ou não dependendo do nível de expressão de ASNS do alvo cancerígeno.

**Figura 5** – Ilustração das reações de L-asparaginases de *E. coli* e *E. chrysanthemi* responsáveis pela dupla atividade asparaginásica e glutaminásica.



Fonte: Nguyen *et al.* (2016).

Outros pesquisadores buscam diminuir a atividade glutaminásica, mas mantendo a alta citotoxicidade ou utilizar outras L-asparaginases desprovidas de atividade glutaminásica, como é o caso da oriunda de *B. subtilis* (ONISHI *et al.*, 2011), com o objetivo final de abrandar a toxicidade do quimioterápico, pois o decaimento brusco dos níveis séricos de mais de um aminoácido pode acarretar várias reações metabólicas desfavoráveis e afetar o funcionamento de alguns órgãos (REINERT *et al.*, 2006; NARTA *et al.*, 2007; AVRAMIS *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Efeitos secundários e imunogenicidade

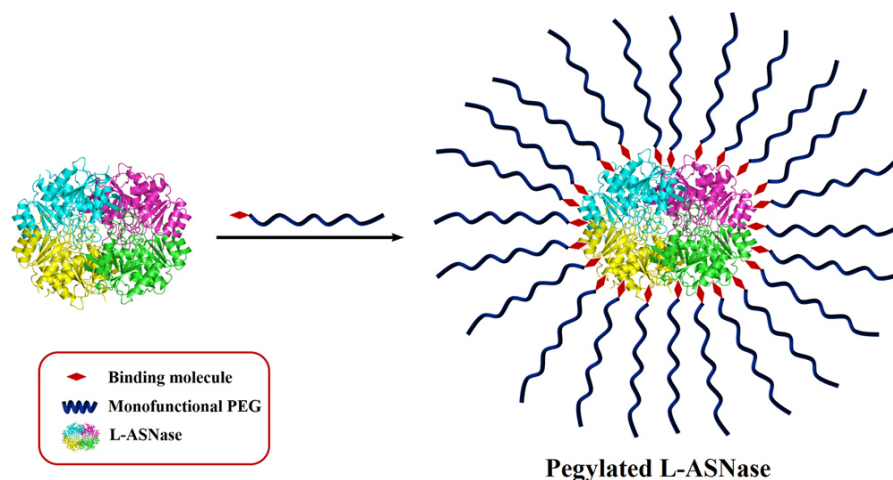
As L-ASNases II bacterianas, disponíveis atualmente, apresentam uma série de efeitos secundários que limitam sua função terapêutica, como reações de hipersensibilidade, resistência adquirida, complicações imunogênicas e curto tempo de meia-vida (PASUT; VERONESE, 2009). Além disso, há relatos associados ao risco de trombose (EDEN *et al.*, 2016), pancreatite (RAJA *et al.*, 2012), choques anafiláticos (WARRELL *et al.*, 1982) fadiga crônica e febre (MÜLLER *et al.*, 1998), provavelmente em decorrência da atividade glutaminásica presente na enzima (SHRIVASTAVA *et al.*, 2006).

Müller *et al.* (1998) afirmaram que os efeitos imunogênicos, desencadeados pela presença da L-ASNase II bacteriana, ocorreriam em virtude do grande peso molecular e da complexidade de alto grau da enzima, causando o desenvolvimento de anticorpos específicos contra ela, os chamados anticorpos “Anti-asparaginase”. Tais efeitos causados por esses

anticorpos vão desde dores no local da administração do quimioterápico até a inativação enzimática, diminuindo conseqüentemente sua eficiência terapêutica, sendo um fenômeno conhecido como “inativação silenciosa”. Dessa forma, monitorando os níveis de anticorpos Anti-asparaginase e os níveis séricos de asparagina, é possível determinar a ocorrência de resistência à proteína, o que implica na adoção de estratégias clínicas que contornem esse problema (FU; SAKAMOTO, 2007).

Uma das tentativas de reduzir a imunogenicidade da droga e prolongar seu período de meia-vida foi a conjugação da L-ASNase em polietileno glicol (PEG), o qual funciona como um invólucro ao redor da proteína impedindo o reconhecimento da enzima por anticorpos, sem afetar sua atividade antileucêmica, pois o PEG é capaz de esconder os sítios imunogênicos (FIGURA 6). A PEG-asparaginase já se encontra no mercado, sob o nome de *Oncaspar*<sup>®</sup> (Exelead, Inc), mas seu elevado custo acaba limitando seu uso (PASUT; VERONESE, 2009).

**Figura 6** – Demonstração do encapsulamento da L-ASNase com o PEG.



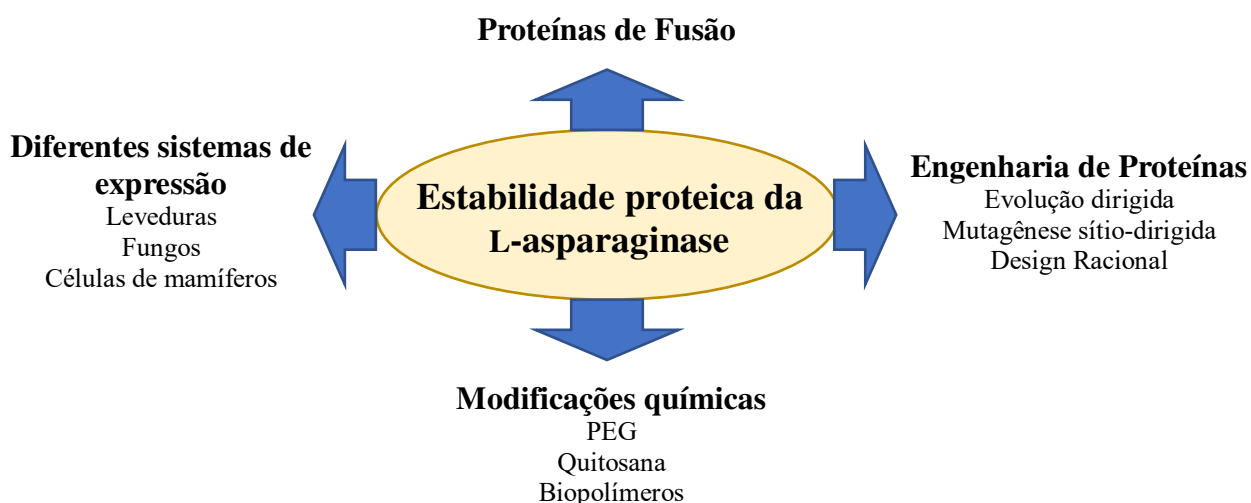
Fonte: Adaptado de ULU *et al.* (2017). A peguilação é capaz de proteger sítios imunogênicos, permitindo que a enzima se evada do sistema imunológico.

Os gargalos que afetam o potencial terapêutico da L-ASNase podem ser contornados com as abordagens de engenharia genética e engenharia metabólica, buscando o desenvolvimento de uma L-asparaginase com propriedades melhoradas, com um *drug delivery* mais eficaz, caso acopladas a algum carreador, ou pela produção da enzima de forma recombinante em elevadas concentrações (VIDYA *et al.*, 2017).

Métodos para minimizar as respostas imunológicas ao tratamento com L-asparaginase incluem a bioengenharia de versões enzimáticas menos imunogênicas, utilizar enzimas de organismos diferentes como alternativa para terapia e prospectar novas fontes promissoras de L-asparaginase. Algumas estratégias reportadas buscam a diminuição da atividade glutaminásica (HUANG *et al.*, 2014); a obtenção da enzima de forma extracelular, por meio de secreção (GHOSHON *et al.*, 2015); enzimas termoestáveis (JIA *et al.*, 2013); enzimas de organismos diferentes com melhor atividade e rendimento se comparado às advindas de cepas parentais (CORNEA *et al.*, 2002); uso de *drug delivery* por lipossomos (VIDYA *et al.*, 2017).

Por fim, outras abordagens mais modernas visam afetar a estabilidade enzimática, por meio de alterações na estrutura primária de proteínas; uso de ferramentas de bioinformática para prever estratégias que diminuam os efeitos de imunogenicidade; uso de metodologias de engenharia de proteínas, como a evolução dirigida por meio da geração de mutações pontuais aleatórias na sequência gênica com a posterior triagem de acordo com a característica de interesse, e a mutagênese sítio-dirigida que visaria a obtenção de enzimas menos imunogênicas através de mutações em *hot spots* nos nucleotídeos do DNA; expressão de proteínas de fusão ou quiméricas, resultando em melhorias nas propriedades funcionais das L-ASNases (VIDYA *et al.*, 2017) (FIGURA 7).

**Figura 7** – Diferentes abordagens para a melhoria da L-asparaginase.



Fonte: Adaptado de VIDYA *et al.* (2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização bioquímica e cinética de diferentes L-asparaginases bacterianas e a determinação dos seus potenciais citotóxicos em linhagens tumorais.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Expressar de forma heteróloga as L-ASNases;
- Avaliar a influência da variação do pH e da temperatura na atividade enzimática;
- Analisar as atividades asparaginásica e glutaminásica das enzimas;
- Estimar os parâmetros cinéticos frente ao substrato L-asparagina;
- Determinar a  $CI_{50}$  e o potencial citotóxico *in vitro* das L-asparaginases em linhagens celulares cancerígenas (HL-60 e Raji).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

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

Os genes *ansA*, *ansB* e *ansZ* foram clonados em vetor plasmidial pET28a e transformados na cepa de expressão *E. coli* Rosetta em trabalhos anteriores do grupo (CAETANO, 2017; TORRES, 2018). Colônias de *E. coli* Rosetta transformadas com os vetores pET28a-*ansA*, pET28a-*ansB* e pET28a-*ansZ* foram isoladas em placas de LB-ágar suplementadas com antibióticos. Colônias isoladas em cada placa, com o auxílio de uma ponteira estéril, foram lançadas em 5 mL de meio LB para o preparo dos pré-inóculos e posterior acréscimo dos antibióticos canamicina (40 µg/mL), correspondente ao marcador de seleção do vetor pET28a, e cloranfenicol (34 µg/mL), correspondente à resistência da Rosetta, em tubos de vidro previamente autoclavados. O controle negativo continha 5 mL de meio LB com antibióticos, mas sem a presença do material bacteriano. Os pré-inóculos foram incubados a 37 °C *overnight*, sob agitação de 200 rpm em agitador orbital (Marconi MA420).

A expressão heteróloga foi realizada em 3 frascos de Erlenmeyer de 1 litro, cada um com 300 mL de meio LB, aos quais foram adicionados MgCl<sub>2</sub> (0,1 M), canamicina (40 µg/mL), cloranfenicol (34 µg/mL) e 5 mL do pré-inóculo crescido em cada. O meio de cultivo inoculado foi incubado a 37 °C e sob agitação de 210 rpm, até que atingisse a densidade ótica (D.O.) entre 0,4 – 0,6 a 600 nm. A partir daí, a indução ocorreu utilizando IPTG (0,5 mM) com incubação por 4 horas a 30 °C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, todo o meio de expressão foi submetido a centrifugação de 10.000  $\times$  g por 10 minutos, a 4 °C, seguido do armazenamento dos *pellets* a -20 °C até o momento da sonicação.

#### 3.2 Lise celular

A lise celular foi realizada por sonicação, utilizando-se o processador ultrassônico VC 505 / VC 750 da SONICS Vibra Cell™, configurado para 30% de amplitude, por 20 minutos com ciclos de 20 segundos de ultrassom e 40 segundos em repouso até a amostra ficar homogênea. Os *pellets* foram ressuspensos em banho de gelo utilizando 15 mL de tampão de lise (HEPES 100 mM, NaCl 300 mM e 10 mM de Imidazol (pH 8,0)), (1% v/v) de Triton X100 e (1% v/v) de PMSF 1 mM. O lisado celular foi centrifugado a 10.000  $\times$  g por 30 minutos a 4 °C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante, contendo as proteínas recombinantes solúveis, foi reservado para posterior purificação.

### 3.3 Purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC)

As estruturas primárias de L-ASNases de *E. coli* e *B. subtilis* receberam seis histidinas em sua porção N-terminal pelo vetor de expressão pET28a. Por apresentarem na sua estrutura um anel imidazólico, as histidinas interagem fortemente com cátions metálicos bivalentes, como o  $\text{Ni}^{2+}$ , apresentando-se como uma metodologia consolidada de purificação de proteínas por meio de cromatografia de afinidade, como relatado por Gaberc-Porekar e Menart (2001).

A purificação das L-ASNases foi realizada por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) e foram preparados tampões de lavagem (500 mM de NaCl e 100 mM de HEPES contendo concentrações de 10, 30 e 60 mM de imidazol) e o tampão de eluição (500 mM de NaCl, 100 mM de HEPES e 300mM de imidazol), todos com pH 7,5. Aproximadamente 2 mL da coluna HisTrap™HP (GE®) foi lavada com água destilada filtrada para a retirada do álcool residual na qual é armazenada. Logo depois foi equilibrada com o tampão de lise e incubada com o sobrenadante proteico por 1 hora, em banho de gelo, e sob agitação orbital de 100 rpm. O processo cromatográfico prosseguiu com a aplicação de um gradiente crescente de 10, 30 e 60 mM de imidazol. A eluição das proteínas recombinantes foi feita com 300 mM de imidazol, em aproximadamente 20 mL de volume coletado.

Para avaliar a purificação das L-ASNases A, B e Z por meio de SDS-PAGE, alíquotas de 1 mL de cada lavagem (10, 30 e 60 mM de imidazol) e da eluição (300 mM de imidazol) foram coletadas e armazenadas a 4 °C para posterior uso na eletroforese. As alíquotas finais da eluição foram reunidas e concentradas em aproximadamente 2 mL, utilizando o concentrador *Amicon® Pro Purification System* com membrana de 10 kDa, os quais foram então armazenadas no ultra freezer a -80 °C.

### 3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese (SDS-PAGE) foi utilizada para a análise da expressão heteróloga e da purificação de L-asparaginases recombinantes. realizada em gel de poliacrilamida 12,5%, em condições desnaturantes e redutoras, na presença de  $\beta$  – mercaptoetanol, sendo adicionados para o gel de corrida: 3,150 mL de água, 2,1 mL de bis-acrilamida 40%, 1,75 mL de solução *lower* Tris 4x (Solução de Tris, 10% SDS, água destilada em pH 8,8) e 80  $\mu\text{L}$  de uma mistura com TEMED e APS 10%. Para o gel de empilhamento 3,5% utilizou-se: 2,17

mL de água, 0,33 mL de bis-acrilamida 40%, 0,83 mL de *upper* Tris 4x (Solução de Tris, 10% SDS e água destilada em pH 6,8) e 100 µL de mistura com TEMED e APS 10%.

Os *pellets* de expressão, bem como as alíquotas de sobrenadante e precipitado após a lise celular foram preparados em tubos de 1,5 mL; aos *pellets* e precipitado pós-sonicação, foram adicionados 30 µL de tampão de amostra (5x), ressuspendendo delicadamente por pipetagem; e a 30 µL de sobrenadante foram adicionados 6 µL de tampão de amostra (5x). Essas amostras passaram por tratamento térmico a 100°C por 10 minutos para desnaturação e em cada poço do gel de poliacrilamida foram aplicadas cerca de 15 µL de amostra. O gel foi corado com solução de *Coomassie Brilhante Blue R-250* para visualização das bandas proteicas.

### 3.5 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo *Qubit® Protein Assay Kit*, sendo um método de detecção por fluorescência responsável por quantificar amostras na faixa de 12,5 µg/mL a 5 mg/mL de proteínas, a partir da adição de 1 µL a 20 µL de amostra. O *mix* reacional do kit foi feito conforme recomendação do fabricante.

No experimento, 5 µL de cada L-ASNase foi utilizada para quantificação. As amostras proteicas foram então adicionadas em tubos de 0,5 mL e o volume foi completado com 195 µL do *mix*, resultando em um volume final de 200 µL. Logo, cada tubo de reação foi submetido a vórtex por 3 segundos e incubados à temperatura ambiente durante 15 minutos. Foram realizadas triplicatas para a quantificação de cada uma das L-ASNases. Posteriormente, foi executada a leitura utilizando o equipamento *Qubit® Fluorometer*.

### 3.6 Atividade Enzimática

A atividade enzimática das L-asparaginases foi mensurada a partir da determinação de nitrogênio amoniacal livre por reação de Nessler (solução alcalina de tetraiodomercurato II de potássio), segundo a adaptação para microescala de Torres (2018) do método colorimétrico descrito por Wriston e Yellin (1973).

As amostras de L-ASNases B e Z foram utilizadas em sua forma estoque e em frações diluídas (1:10 e 1:20), enquanto a A não sofreu diluição. As reações de atividade enzimática ocorreram em microtubos de 0,2 mL. Foram adicionados 10 µL de cada enzima em um volume reacional composto por 160 µL de tampão HEPES 100 mM, NaCl 500 mM

(pH 8,0) e 10 µL do substrato L-asparagina (189 mM), totalizando no final 180 µL de reação enzimática. E em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos em termociclador ESCO® Swift MaxPro. Após incubação, adicionou-se 10 µL de TCA 1,5 M para o bloqueio da reação. Para a reação colorimétrica, em microplaca de 96 poços, adicionou-se 10 µL da reação bloqueada e 240 µL de reagente de Nessler diluído (25 µL de Nessler concentrado + 215 µL de água ultrapura). Os microtubos eram mantidos em banho de gelo durante a adição da enzima nas reações. As leituras de absorbância foram realizadas em leitor de placas Synergy™ HTX Multi-Mode a 436 nm. Todo o ensaio foi feito em triplicata e um ensaio branco sem a adição de enzima como controle negativo. Para a plotagem dos gráficos e análises estatísticas, foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* Software versão 5.0.

A concentração de amônia liberada foi calculada por comparação com os valores obtidos da curva padrão com sulfato de amônio para então obter os valores de U/mg como descrito pela equação abaixo:

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{[\text{NH}_4^+] (\mu\text{mol})}{t(\text{min}) * [\text{enzima}](\text{mg}/\mu\text{L})}$$

Onde:

- $[\text{NH}_4^+]$  é a concentração de amônia liberada na reação enzimática (valor calculado a partir de uma curva padrão);
- t é o tempo de reação;
- [enzima] é a concentração de proteína utilizada na reação.

Uma unidade (U) de atividade da L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a produção de 1 µmol de amônia por minuto, nas condições de ensaio estabelecidas.

### 3.6.1 Curva padrão

Uma curva padrão foi construída utilizando uma solução de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 12 mM, dissolvido em tampão PBS, em variados gradientes de concentração. Foram então adicionados diferentes volumes da solução estoque de ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e de tampão PBS nas tiras de microtubos (0,2 mL), produzindo triplicatas de diluições cujas concentrações variaram de 0,216 a 2,4 µM de íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), para um volume final de trabalho de 180

$\mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 min, com posterior adição de 10  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M para bloqueio da reação. Para reação colorimétrica, utilizou-se microplaca de 96 poços, onde 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição e 240  $\mu\text{L}$  de reagente Nessler diluído (25  $\mu\text{L}$  de Nessler + 215  $\mu\text{L}$  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.

### ***3.6.2 Efeito da variação de pH sobre a atividade enzimática***

A atividade enzimática para determinação do pH ótimo de cada enzima foi realizada em tiras de microtubos (0,2 mL), tal como descrito no item 3.6, utilizando diferentes tampões cujos pHs variaram de 3,0 a 11,0. O tampão Citrato (0,2 mM)-Fosfato (0,1 mM) abrangeu os pHs 3 a 7, o tampão Tris (50 mM) os pHs 7 a 9 e o tampão Glicina para os pHs 10 e 11. O ensaio colorimétrico também seguiu os mesmos parâmetros descritos no tópico 3.6. A leitura de absorbância a 436 nm foi realizada em leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode. Para cada pH foi realizada uma triplicata e um ensaio branco sem adição de enzima.

### ***3.6.3 Efeito da variação de temperatura sobre a atividade enzimática***

A atividade enzimática para a determinação da temperatura ótima foi realizada como descrito no item 3.6 com variação de incubação entre 20 °C e 90 °C. O ensaio colorimétrico também seguiu os mesmos parâmetros descritos no tópico 3.6. A leitura de absorbância a 436 nm foi realizada em leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode. Para cada temperatura testada foi realizada uma triplicata e um ensaio branco sem adição de enzima.

## **3.7 Ensaio de atividade glutaminásica**

No ensaio de atividade glutaminásica foram testadas as L-asparaginases tipo II (B e Z), com o objetivo de verificar a possível influência e a contribuição dessa atividade nos testes de citotoxicidade. Foram realizados os mesmos parâmetros descritos no tópico 3.6 acerca da atividade enzimática, com exceção da mudança do substrato, que nesta ocasião foi a L-glutamina (189 mM).

### 3.8 Ensaio cinético

O ensaio de cinética enzimática envolveu novamente o ensaio colorimétrico de atividade enzimática por reagente de Nessler. O substrato L-asparagina foi adicionado em diferentes volumes a partir de um estoque de 10,5 mM, como mostrado na tabela 4, estando sob diferentes concentrações nas reações.

**Tabela 4** – Teste cinético realizado para as L-ASNases tipo II recombinantes.

Concentração do substrato (mM)	Quantidade do substrato adicionado na reação (µL)	Quantidade de tampão PBS pH 7,4 adicionado na reação (µL)	Quantidade de enzima adicionada na reação (µL)	Volume total da reação (µL)
0,0625	1,07	168,93	10	180
0,125	2,14	167,86	10	180
0,250	4,29	165,71	10	180
0,500	8,57	161,43	10	180
1,00	17,14	152,86	10	180
2,00	34,29	135,71	10	180
4,00	68,57	101,43	10	180
6,00	102,86	67,14	10	180
8,00	137,14	32,86	10	180
9,91	170	0	10	180

Fonte: Elaborado pelo autor.

As reações foram realizadas em tubos de 0,2 mL em triplicata, e ensaio branco para cada uma das concentrações testadas que também foi realizado em triplicata, sem a adição de enzima. Foram incubadas a 37 °C durante 30 min em termociclador ESCO® Swift MaxPro. Encerrado o período de incubação, foram adicionados 10 µL de TCA 1,5 M em cada reação. O ensaio colorimétrico seguiu os mesmos parâmetros descritos no tópico 3.6. A leitura de absorbância a 436 nm foi realizada em leitor de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando o programa SigrafW segundo Leone *et al.* (2005), responsável por utilizar um modelo de equação de Hill simplificado para ajustar os dados cinéticos de ambas enzimas alostéricas ou Michaelianas.

### 3.9 Ensaio de citotoxicidade

#### 3.9.1 Linhagens tumorais e culturas de células

O ensaio inicial de citotoxicidade foi realizado em linhagens tumorais Raji (linfoma de *Burkitt*) e HL-60 (leucemia mieloide aguda) sendo utilizadas como *screening* para definir uma linhagem modelo para os futuros ensaios de toxicidade, através da avaliação do potencial citotóxico das L-asparaginases recombinantes. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.9.2 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade das enzimas recombinantes em células tumorais humanas foi feita pelo teste do MTT após 72h de incubação. O teste do MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo *in vitro* baseado na redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) – de cor amarelada – para formazan – de cor púrpura –, sendo essa conversão realizada pela enzima succinil-desidrogenase, presente no Ciclo de Krebs, e conseqüentemente, em mitocôndrias de células viáveis (MOSMANN, 1983). Logo, essa metodologia permite estimar a viabilidade celular e o estado metabólico da célula.

As L-asparaginases B e Z foram as amostras selecionadas para as análises citotóxicas devido à atividade antitumoral reportada anteriormente em testes preliminares realizados pelo nosso grupo. Inicialmente, elas foram testadas e incubadas junto das células em concentrações únicas de 40 µg/mL (20 µL de enzima/80 µL de RPMI) e 100 µg/mL (50 µL de enzima/50 µL de RPMI) para a avaliação do potencial citotóxico, segundo a metodologia descrita na tabela 5.

**Tabela 5** – Condições dos testes de citotoxicidade.

Amostra	Quantidade da amostra no poço	Quantidade de meio no poço
<b>C20/80</b>	20µl de PBS	80 µL de RPMI completo
<b>C50/50</b>	50µl de PBS	50 µL de RPMI completo
<b>L-ASNase B 20/80</b>	20 µL de L-ASNase B	80 µL de RPMI completo
<b>L-ASNase B 50/50</b>	50 µL de L-ASNase B	50 µL de RPMI completo
<b>L-ASNase Z 20/80</b>	20 µL de L-ASNase Z	80 µL de RPMI completo
<b>L-ASNase Z 50/50</b>	50 µL de L-ASNase Z	50 µL de RPMI completo

Fonte: Elaborado pelo autor.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços, em cada poço sendo adicionados 100 µL de células, numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL para as linhagens HL-60 e Raji, respectivamente. Os controles negativos foram as proporções de 20/80 e 50/50 de tampão PBS/meio de cultura RPMI.

Após 72h de incubação, cada poço recebeu 200 µL da solução de MTT e a placa foi reincubada durante 3 horas em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, ela foi centrifugada (3000 rpm/10 min/20 °C), o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspenso em 200 µL DMSO para a quantificação do sal reduzido nas células vivas. Logo depois, a placa foi colocada em agitador durante 20 minutos para homogeneização da solução. As absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa BeckmanCoulter® Multimode Detector DTX 880, no comprimento de onda de 595 nm. Os dados de todas as repetições foram normalizados e submetidos à regressão não linear utilizando o programa *GraphPad Prism* Software versão 5.0 para obtenção do potencial de inibição e de viabilidade celular.

Depois de realizado o *screening* inicial para definir a linhagem celular a ser utilizada em ensaios posteriores, foram realizadas diluições seriadas a partir da concentração única de 40 µg/mL (20 µL de enzima/80 µL de RPMI), em triplicata. Foi feita a determinação da CI<sub>50</sub> (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não linear, realizado pelo programa *GraphPad Prism* Software versão 5.0.

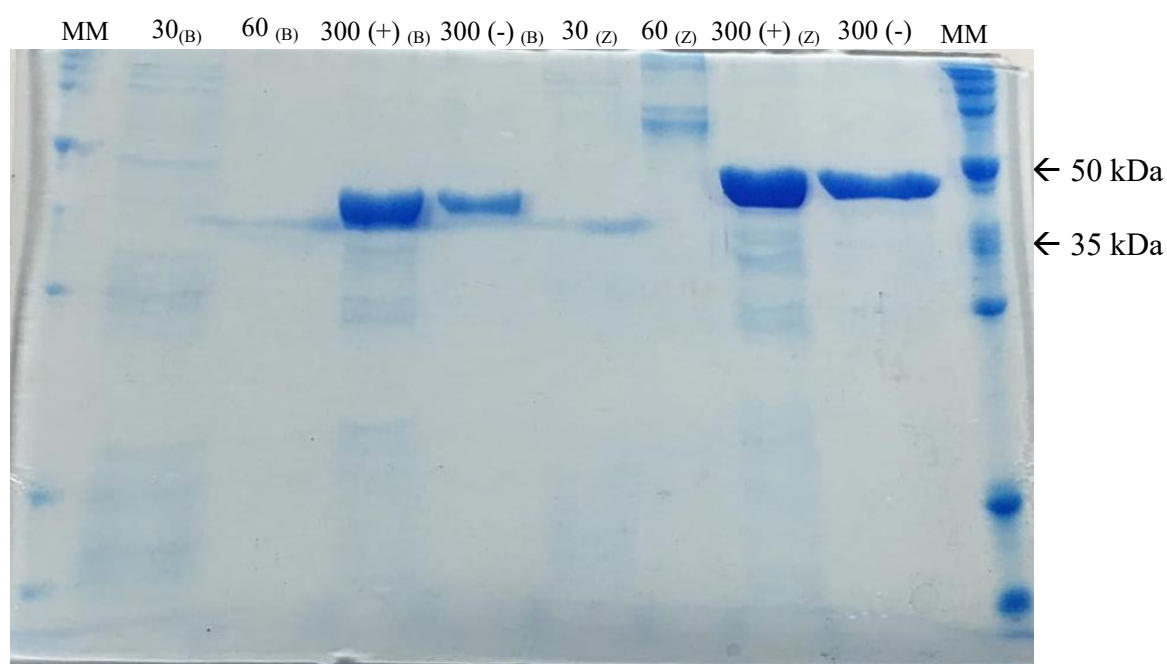
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Purificação e concentração das L-asparaginases recombinantes

A eluição das proteínas aderidas na coluna foi feita com alta concentração de imidazol (300 mM) e aproximadamente 30 mL das frações proteicas foram coletadas, uma vez que a absorbância a 280 nm foi sendo monitorada por espectrofotometria e variou de 0,600 a 0,007, indicando a presença de proteína em solução.

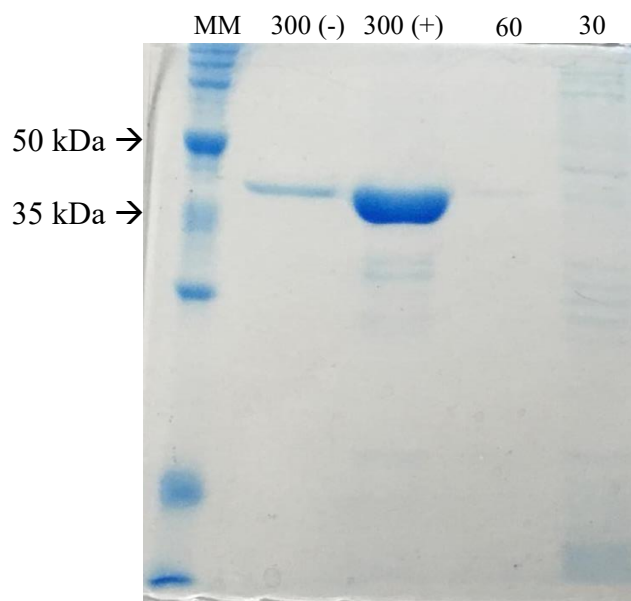
Os géis SDS-PAGE 12,5% mostrados nas figuras 8 e 9 apresentaram bandas referentes às enzimas recombinantes purificadas, com massa molecular aparente entre 35 kDa e 50 kDa. A purificação de todas as L-asparaginases ocorreu desde a fração solúvel após a sonicação, nas frações de lavagem de diferentes concentrações de imidazol de 30 e 60 mM, e nas alíquotas de eluição contendo 300 mM de imidazol.

**Figura 8** – SDS-PAGE 12,5% da purificação de L-ASNases B e Z.



Fonte: Elaborado pelo autor. Purificação L-ASNase B → 30<sub>(B)</sub>: lavagem com 30 mM de imidazol; 60<sub>(B)</sub>: lavagem com 60 mM de imidazol; 300 (+)<sub>(B)</sub>: eluído da fração mais concentrada de 300 mM de imidazol; 300 (-)<sub>(B)</sub>: eluído da fração mais diluída de 300 mM de imidazol. Purificação L-ASNase Z → 30<sub>(Z)</sub>: lavagem com 30 mM de imidazol; 60<sub>(Z)</sub>: lavagem com 60 mM de imidazol; 300 (+)<sub>(Z)</sub>: eluído da fração mais concentrada de 300 mM de imidazol; 300 (-)<sub>(Z)</sub>: eluído da fração mais diluída de 300 mM de imidazol; MM: marcadores molecular *Broad Range Protein* (Promega®).

**Figura 9** – SDS-PAGE 12,5% da purificação da L-ASNase A.

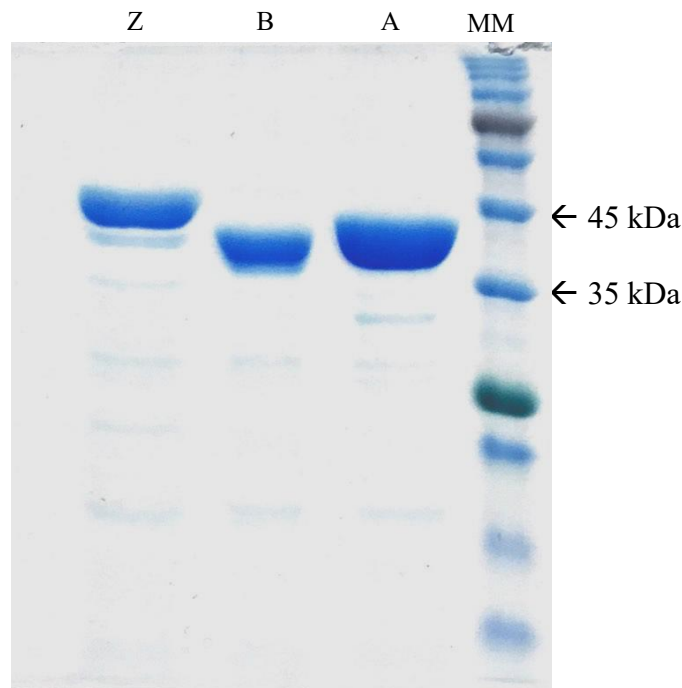


Fonte: Elaborado pelo autor. MM: marcador molecular *Broad Range Protein* (Promega®); 300 (-): eluído da fração mais diluída de 300 mM de imidazol; 300 (+): eluído da fração mais concentrada de 300 mM de imidazol; 60: lavagem com 60 mM de imidazol; 30: lavagem com 30 mM de imidazol.

Após a cromatografia de afinidade para a purificação das asparaginases e posterior concentração, as amostras foram submetidas novamente à SDS-PAGE para a análise dos resultados da pós-concentração de amostras, podendo-se observar que as bandas correspondentes estão entre 35 kDa e 45 kDa, tamanho esperado para cada asparaginase (FIGURA 10). Vale destacar a presença da sequência rica em histidina (*His-tag*) adicionada nas L-asparaginases, devido ao vetor pET28a, que possui cerca de 2,5 kDa, então cada enzima apresentará uma massa molecular aparente final diferente.

O tamanho esperado da L-asparaginase A, B e Z, incluindo a porção *His-tag*, é cerca de, respectivamente, 38,8 kDa, 39,2 kDa e 42,4 kDa. Yano *et al.* (2008) caracterizou e purificou uma L-asparaginase tipo I de *B. subtilis* e após análise de SDS-PAGE foi verificado uma massa molecular de cerca de 39 kDa, corroborando com o tamanho aproximado da L-ASNase A obtida na figura 10. Vidya *et al.* (2011) isolou o gene *ansB* e o clonou no vetor pET20b para expressar uma L-asparaginase tipo II em células de *E. coli* DE3, e ao concluir todo o processo confirmou a obtenção de uma enzima de massa molecular de cerca de 37 kDa, correlacionando com o valor obtido pela L-ASNase B sem a cauda de histidina.

**Figura 10** – SDS-PAGE 12,5% de L-ASNases A, B e Z concentradas.



Fonte: Elaborado pelo autor. Z: L-ASNase tipo II de *Bacillus s.*; B: L-ASNase tipo II de *E.coli*; A: L-ASNase tipo I de *Bacillus s.*; MM: marcador molecular colorido TrueColor High Range Protein Marker (Sinapse®).

Em contrapartida, ocorreu uma pequena diferença da L-ASNase Z com o resultado obtido por Jia *et al.* (2013), pois no referido trabalho buscou-se clonar o gene *ansZ* e expressar uma L-asparaginase II advinda da cepa não patogênica *B. subtilis* B11-06, obtendo no final do processo uma proteína de massa molecular de 38 kDa, essa divergência é provavelmente explicada pelo uso diferente do vetor, que nesse caso foi testado o vetor pMA5, além de ser uma cepa produtora distinta.

Além disso, a metodologia de purificação e concentração possuiu um resultado satisfatório para a necessidade do trabalho, uma vez que é possível separar as enzimas recombinantes de grande parte das proteínas da cepa de expressão *E. coli* Rosetta, mas foi possível observar algumas contaminações, que com uma segunda etapa de purificação por meio de outro método, como o de gel filtração, poderia aumentar o grau de pureza. Como demonstrado, as L-ASNases foram expressas, em sua maioria, em fração solúvel, podendo ser visualizado a partir das bandas robustas apresentadas no gel, indicando que a bactéria consegue expressar satisfatoriamente. O rendimento proteico obtido, após quantificação em *Qubit*®, apresentou rendimento de 400 µg/mL para as L-ASNases B e Z visando serem utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

## 4.2 Caracterização bioquímica

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

Trabalhos anteriores do grupo caracterizaram preliminarmente a influência do pH e da temperatura nas L-ASNases B e Z. Logo, o presente estudo buscou reproduzir as experimentações para a confirmação dos resultados e certificação das melhores condições reacionais para atividade enzimática, como apresentado na tabela 6.

**Tabela 6** – Parâmetros bioquímicos das L-ASNases B e Z.

Condições Reacionais	L-ASNase B	L-ASNase Z
pH ótimo	8,5	7,0
Temperatura ótima	60 °C	50 °C

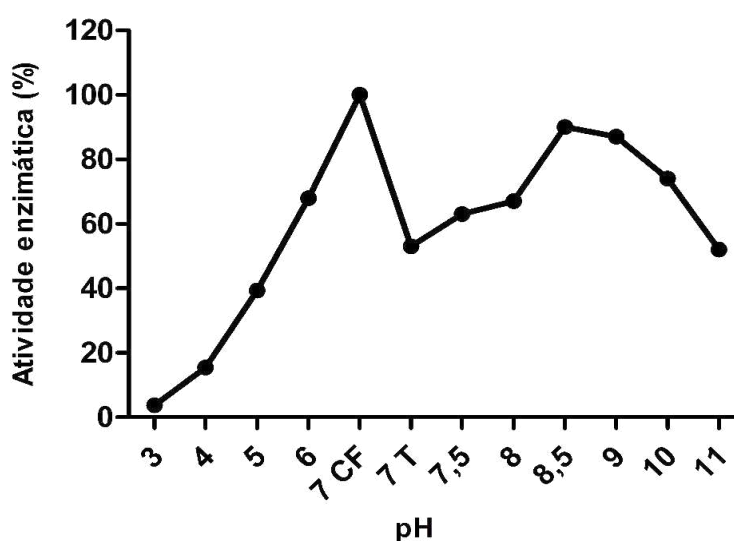
Fonte: Adaptado de TORRES, A. L. S., 2018

Para o resultado de pH da L-asparaginase II de *E. coli* (L-ASNase B), o pH ótimo de atividade foi de 8,5, divergindo de alguns trabalhos relatados na literatura, como os descritos por Vidya *et al.* (2011) e Khushoo *et al.* (2004), que obtiveram pHs ótimos de 6,0 e 7,2, respectivamente. Ademais, a temperatura ótima obtida foi de 60 °C, também apresentando-se diferente dos resultados encontrados por Vidya *et al.* (2011) e Khushoo *et al.* (2004), onde ambos relataram temperatura ótima de 37 °C. Essas discordâncias de resultados podem ser explicadas devido aos parâmetros de expressão, purificação, atividade enzimática serem diferentes dos utilizados nos diversos trabalhos da literatura. Além da utilização de diferentes variações de cepas de *E. coli*.

Já para o resultado de pH da L-asparaginase II de *B. subtilis* (L-ASNase Z), o melhor pH de atividade enzimática foi 7,0, assemelhando-se com os dados relatados por Moorthy *et al.* (2010) e Jia *et al.* (2013) que obtiveram como pH ótimo de atividade, 7,0 e 7,5, respectivamente. Nessa perspectiva, o resultado de temperatura ótima obtido foi de 50 °C, corroborando com o resultado de Onishi *et al.* (2011), e se aproximando dos valores de Jia *et al.* (2013), que obteve valor de 40 °C, e Moorthy *et al.* (2010), que obteve 37 °C.

Na determinação do pH ótimo da L-asparaginase tipo I de *B. subtilis* (L-ASNase A), o pH com atividade máxima foi 7 com o tampão citrato-fosfato. No entanto, verificou-se uma pequena inibição de atividade ao tampão Tris no pH 7 e uma faixa de pH com atividade crescente, entre os pHs 8 e 9 (GRÁFICO 1), indicando a influência do referido tampão na decaimento atividade da enzima, o que corrobora com os resultados obtidos por Yano *et al.* (2008).

**Gráfico 1** – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase A em diferentes pHs.

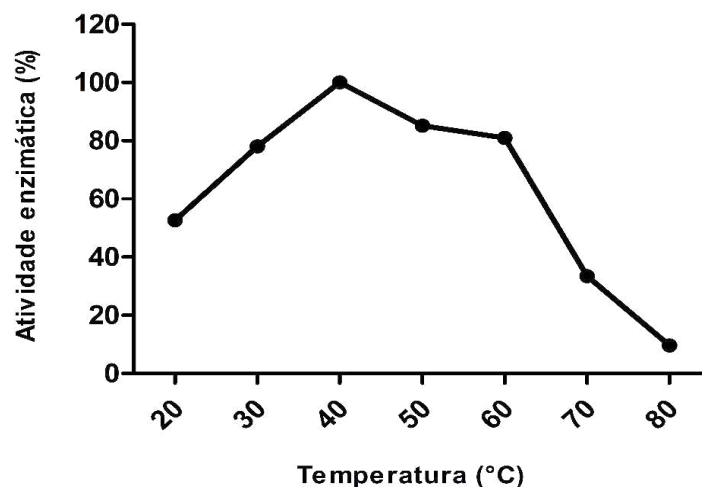


Fonte: Elaborado pelo autor. Curva de atividade enzimática realizada frente à variação de pH (3,0 a 11,0). Os valores da curva foram determinados realizando-se a média das absorbâncias das triplicatas obtidas para cada tampão em teste e relacionadas entre si, considerando o maior valor médio obtido como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

Yano *et al.* (2008) ao testar o tampão Tris para os pHs 8 e 9 verificou uma diminuição de cerca de 70% na atividade relativa enzimática, no entanto ao utilizar outros tampões na mesma faixa de pH citada obteve-se uma atividade máxima da enzima. Então, a provável hipótese levantada para esse decaimento da atividade seja devido ao fato dos grupamentos amina ou hidroxila do tampão estarem interferindo no sítio catalítico enzimático acarretando na inibição de atividade.

A L-ASNase A exibiu máxima atividade na temperatura de 40 °C como indicado no gráfico 2, mas mantendo uma atividade relativa de cerca de 80% entre as temperaturas de 50 °C e 60 °C, antes do decaimento de atividade mais brusco nas últimas temperaturas analisadas devido à provável desnaturação enzimática. O resultado obtido é similar ao de Yano *et al.* (2008), que obteve temperatura ótima de 50 °C.

**Gráfico 2** – Perfil de atividade enzimática da L-ASNase A em diferentes temperaturas.

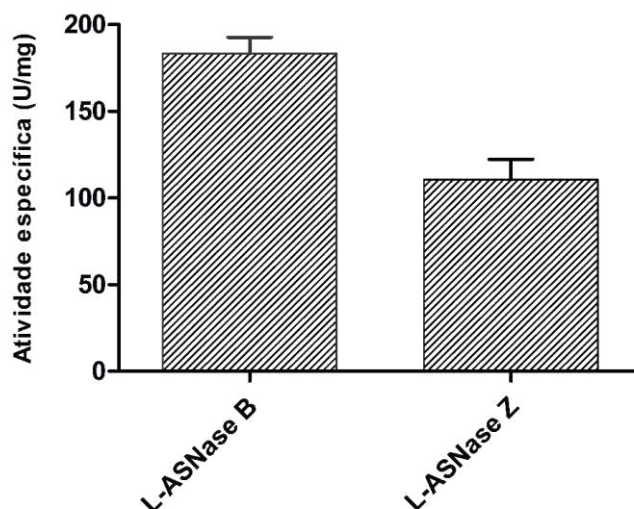


Fonte: Elaborado pelo autor. Curva de atividade enzimática realizada frente à variação de temperatura (20 a 80 °C). Os valores da curva foram determinados realizando-se a média das absorbâncias das triplicatas obtidas para cada tampão em teste e relacionadas entre si, considerando o maior valor médio obtido como 100% de atividade enzimática para a curva. O ensaio foi realizado em pH 7 tampão citrato-fosfato.

### 4.3 Atividade asparaginásica e glutaminásica

O teste de atividade glutaminásica foi realizado com as L-asparaginases B e Z com o intuito de observar a possível atividade glutaminásica presentes nas amostras. L-ASNase B possuía concentração proteica de 351,5 µg/mL e a L-ASNase Z possuía 358 µg/mL. Inicialmente, foi realizado o ensaio de atividade asparaginásica a título de comparação com a posterior atividade glutaminásica, logo a L-ASNase B apresentou 183,47 U/mg contra 110,50 U/mg da L-ASNase Z (GRÁFICO 3). Pode-se inferir que as L-ASNases B e Z possuem uma alta afinidade ao substrato L-asparagina devido à elevada atividade específica apresentada (NGUYEN *et al.*, 2016).

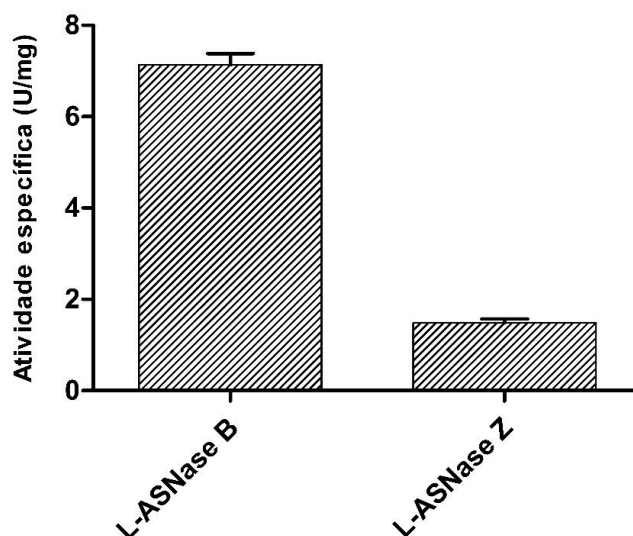
**Gráfico 3** – Atividade asparaginásica das L-asparaginases B e Z.



Fonte: Elaborado pelo autor. Gráfico de barras evidenciando a atividade enzimática das L-asparaginases B e Z com o **substrato L-asparagina** em função do valor em U/mg de proteína obtido a partir das reações. Todo o teste foi realizado com triplicatas de cada amostra enzimática (n=3, Média  $\pm$  DP).

Os resultados de atividade glutaminásica indicaram que a L-asparaginase B apresentou maior atividade glutaminásica (7,14 U/mg) em relação a L-asparaginase Z (1,48 U/mg) (GRÁFICO 4). Acredita-se que isso explique o motivo da L-ASNase B ter maior atividade hidrolítica em comparação à L-ASNase Z, pois segundo Nguyen *et al.* (2016) ao possuir atividade asparaginásica, e uma considerável atividade glutaminásica, ocorreria a hidrólise concomitante dos dois aminoácidos L-Asn e L-Gln. Mahajan *et al.* (2014) purificou e caracterizou uma L-asparaginase de *Bacillus licheniformis*, obtendo uma atividade específica para L-asparagina de 140 U/mg e de 0,71 U/mg para L-glutamina, assemelhando-se aos resultados obtidos para a L-ASNase Z.

**Gráfico 4** – Atividade glutaminásica das L-asparaginases B e Z.



Fonte: Elaborado pelo autor. Gráfico de barras evidenciando a atividade enzimática das L-asparaginases B e Z com o **substrato L-glutamina** em função do valor em U/mg de proteína obtido a partir das reações. Todo o teste foi realizado com triplicatas de cada amostra enzimática (n=3, Média  $\pm$  DP).

Ademais, o presente resultado é corroborado por Narta *et al.* (2007) que afirma que a atividade glutaminásica representa cerca de 2-10% da atividade total da L-asparaginase, no caso para a L-ASNase B, essa atividade representou cerca de 3,9% estando o valor dentro da faixa citada, nesse caso, ela poderia ser uma forte candidata para o uso de ferramentas de bioinformática que visem diminuir a possível imunogenicidade. Para a L-ASNase Z essa atividade representou apenas cerca de 1,3%, então abordagens de mutagênese sítio-dirigida, com o auxílio de ferramentas de bioinformática para determinar *hotspots* de aminoácidos da enzima que podem ser mutados, ou até estratégias de evolução dirigida para gerar mutantes aleatórios com características mais robustas, seriam de grande interesse para aumentar a sua eficiência catalítica, ou seja, aumentar a afinidade por L-asparagina, e possivelmente ser um potencial biofármaco mais seguro para os tratamentos quimioterápicos.

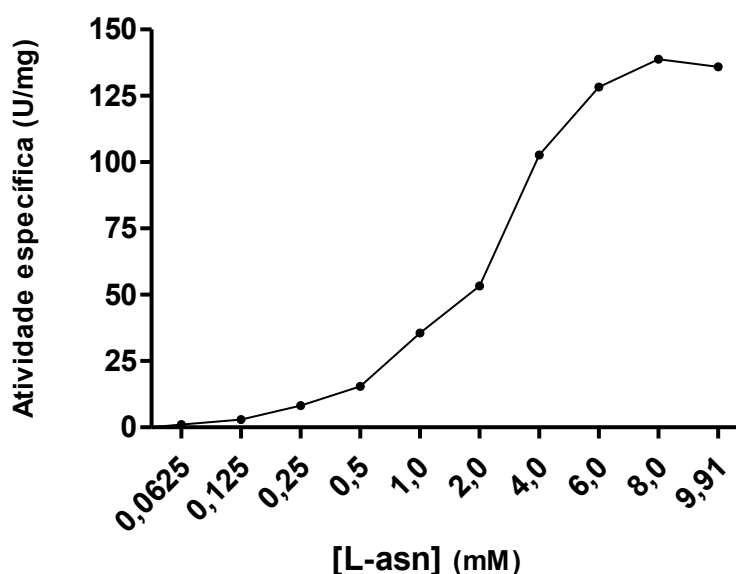
#### 4.4 Cinética enzimática

Os resultados dos ensaios cinéticos indicam até o quão da concentração de substrato que a enzima suporta hidrolisar até que seus sítios catalíticos estejam completamente saturados, sob a influência de outras variáveis experimentais como pH e temperatura. Os dados obtidos foram aplicados no programa SigrafW de acordo com Leone *et al.* (2005) para determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos.

O  $K_m$  de um substrato é a concentração do substrato na qual a velocidade inicial de reação equivale à metade da velocidade máxima (LEHNINGER *et al*, 2014). Ele também é muito utilizado para se comparar a eficiência catalítica entre enzimas, em que quanto maior valor de  $K_m$ , menor a afinidade do substrato pela enzima e vice-versa (SEGEL, 1979).

No ensaio cinético, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  das L-ASNases B e Z, ambas com concentração proteica de 400  $\mu\text{g/mL}$ , para um volume reacional final de 180  $\mu\text{L}$  para cada reação. Nos resultados apresentados, é possível observar que para L-asparaginase B consegue-se perceber um início de platô a partir da concentração de 8 mM de L-asparagina, o que representaria a saturação dos sítios ativos enzimáticos, ou seja, não há enzima livre para ligar-se ao substrato (GRÁFICO 5).

**Gráfico 5** – Influência da concentração do substrato L-asparagina na velocidade de reação da formação de amônia a 37 °C e pH 7,4 para a L-ASNase B.



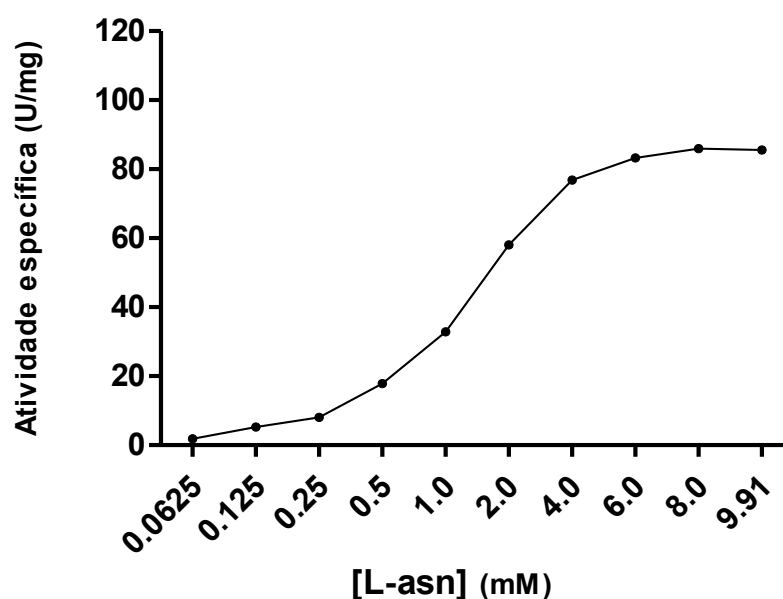
Fonte: Elaborado pelo autor. Curva de atividade avaliada frente à variação de concentração do substrato (0,0625 a 9,91 mM) em função do valor em U/mg obtido a partir das reações. O ensaio foi realizado em triplicata, em pH 7,4 a 37 °C durante 30 min.

Para a L-asparaginase Z é possível observar um pico também na concentração de 8 mM de L-asparagina, e tornando-se homogênea na concentração seguinte, indicando que os sítios catalíticos enzimáticos estão configurando uma saturação (GRÁFICO 6).

Foram determinados os parâmetros cinéticos da enzima L-ASNase B, de modo que o valor de  $K_m$  foi de 3 mM e o  $V_{máx}$  foi de 168,2  $\mu\text{mol/min/mg}$ . E para a L-ASNase Z os valores foram de 1,43 mM e 90,0  $\mu\text{mol/min/mg}$  para  $K_m$  e  $V_{máx}$ , respectivamente. O valor de

$K_m$  obtido para a L-ASNase Z, menor do que a da L-ASNase B, foi diferenciado, uma vez que a literatura mostra que a L-asparaginase B de *E. coli* possui um dos menores  $K_m$  entre as L-asparaginases já caracterizadas (DERST *et al.*, 2000) e, caso confirmado por outras metodologias, esse dado indica uma considerável afinidade pela L-asparagina e reforça o potencial uso terapêutico ou biotecnológico da enzima de *B. subtilis*.

**Gráfico 6** – Influência da concentração do substrato L-asparagina na velocidade de reação da formação de amônia a 37 °C e pH 7,4 para a L-ASNase Z.



Fonte: Elaborado pelo autor. Curva de atividade avaliada frente à variação de concentração do substrato (0,0625 a 9,91 mM) em função do valor em U/mg obtido a partir das reações. O ensaio foi realizado em triplicata, em pH 7,4 a 37 °C durante 30 min.

Vale ressaltar que o valor de  $K_m$  da L-ASNase Z obtido no trabalho apresentou-se similar com alguns obtidos na literatura como os de Onishi *et al.* (2011) e de Jia *et al.* (2013), em que ambos caracterizaram uma L-ASNase II de *B. subtilis*, obtendo um  $K_m$  de 2,06 mM e de 0,43 mM, respectivamente.

Na literatura, os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  são bem variáveis, pois mudanças nas condições de reação, como pH ou temperatura, podem ter influência nos valores de cinética enzimática (COPELAND, 2000), além da metodologia e os reagentes usados para a determinação da atividade enzimática. Com o objetivo de confirmar os parâmetros cinéticos obtidos, os experimentos estão sendo repetidos nas mesmas condições, além de buscar novas metodologias para a determinação da atividade enzimática, especialmente aquelas em que a

hidrólise é monitorada em tempo real.

#### 4.5 Citotoxicidade das L-asparaginases

Das substâncias testadas, tanto a L-ASNase B quanto a L-ASNase Z apresentaram atividade de inibição celular superior a 75%, em ambas condições testadas 50/50 ou 20/80 (amostra/meio RPMI completo), para a linhagem HL-60, exceto a L-ASNase Z na proporção de 20/80 para a linhagem Raji. Logo, a L-ASNase B foi a substância que apresentou melhor % de inibição para as linhagens testadas, com valores em torno ou maiores que 80%, em ambas condições estabelecidas. Os resultados de percentual de inibição das amostras testadas estão apresentados na tabela 7 e, representados graficamente no gráfico 7.

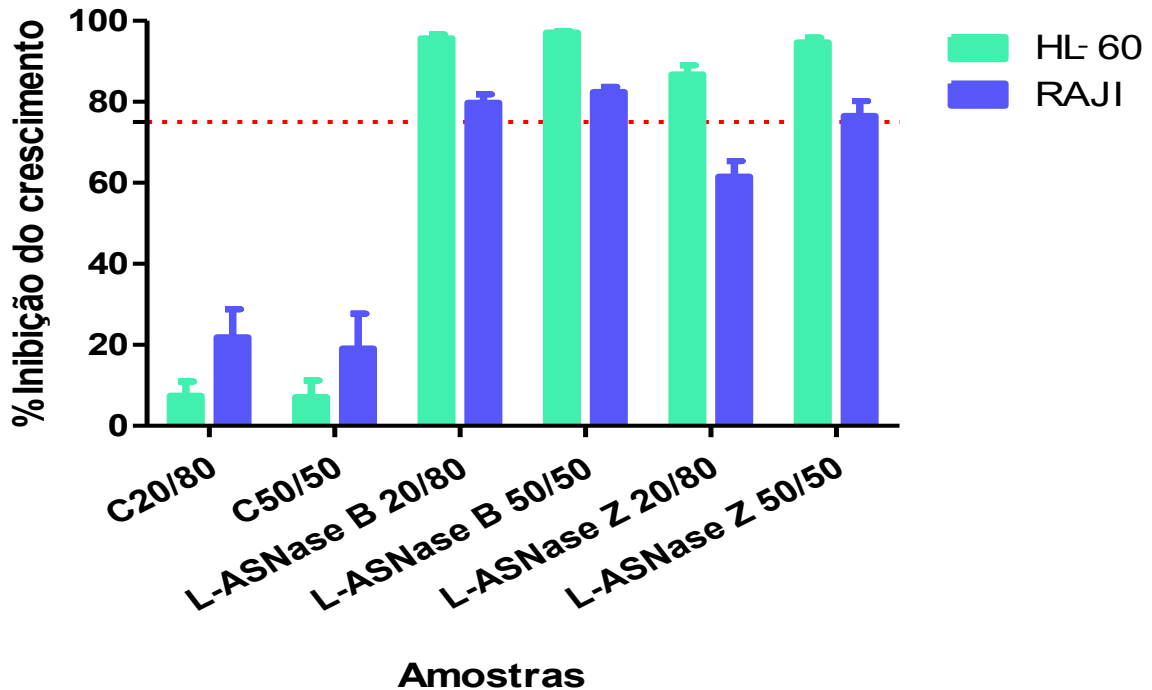
**Tabela 7** – Valores de % de inibição nas duas linhagens celulares testadas.

Amostra	HL-60	RAJI
Identificação	Porcentagem de inibição ± desvio padrão	Porcentagem de inibição ± desvio padrão
C20/80	7,48 ± 3,50	23,46 ± 7,3
C50/50	7,75 ± 4,04	17,07 ± 11
L-ASNase B 20/80	95,72 ± 0,94	79,79 ± 2,11
L-ASNase B 50/50	97,16 ± 0,27	82,45 ± 1,25
L-ASNase Z 20/80	86,80 ± 2,25	61,53 ± 3,80
L-ASNase Z 50/50	94,72 ± 1,16	76,53 ± 3,65

Fonte: Elaborado pelo autor. Valores de percentagem de inibição com desvio padrão obtido por regressão não linear de dois experimentos independentes, realizados em triplicatas. C20/80: controle 20 µL de PBS e 80 µL de meio RPMI; C50/50: controle 50 µL de PBS e 50 µL de meio RPMI; L-ASNase B 20/80: 20 µL de L-ASNase B e 80 µL de meio RPMI; L-ASNase B 50/50: 50 µL de L-ASNase B e 50 µL de meio RPMI; L-ASNase Z 20/80: 20 µL de L-ASNase Z e 80 µL de meio RPMI; L-ASNase Z 50/50: 50 µL de L-ASNase Z e 50 µL de meio RPMI.

Nesse sentido, Li *et al.* (2014) buscou explicar a resistência das linhagens tumorais frente à L-asparaginase, por meio da análise dos níveis de expressão gênica da enzima asparagina sintetase (ASNS), utilizando a metodologia de PCR em tempo real, em diferentes linhagens de linfoma, e concluiu que as linhagens leucocitárias Jurkat, Hut-78 e Karpas 299, que eram naturalmente resistentes à PEG-asparaginase, possuíam elevados níveis de expressão da ASNS, e conseqüentemente eram mais resistentes ao tratamento. A linhagem Raji, utilizada no presente trabalho, foi também avaliada por Li *et al.* (2014) e demonstrou possuir um considerável nível de expressão de ASNS, logo necessitou de doses mais concentradas da enzima para obter a CI<sub>50</sub>, esclarecendo, então, a menor taxa de inibição obtida em células Raji ao comparar com as de HL-60.

Gráfico 7 – Representação gráfica do percentual de inibição das substâncias testadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados de maior efeito citotóxico nas células HL-60 corroboraram com o trabalho de Husain *et al.* (2016), que ao testar a L-asparaginase produzida pelo organismo *Enterobacter cloacae* diante de diferentes linhagens de câncer, como MOLT-4, T47D, MB-231 e HL-60, na última citada foi observada uma citotoxicidade elevada, com uma  $CI_{50}$  de 3,1 U/mL. Vale destacar que segundo Parmentier *et al.* (2015), as células de HL-60 eram dependentes da atividade glutaminásica para obter uma citotoxicidade efetiva, isso talvez explique o motivo da L-ASNase B apresentar um percentual de inibição mais acentuado que a L-ASNase Z.

#### 4.5.1 Determinação de $CI_{50}$

Na análise de citotoxicidade, as amostras de L-ASNases B e Z obtiveram um percentual de inibição de crescimento celular elevado contra a linhagem leucêmica HL-60, logo ela foi a selecionada como modelo para determinação da  $CI_{50}$  das enzimas. As células foram incubadas com concentrações que variaram entre 0,15 a 40  $\mu\text{g/mL}$ , a fim de determinar a  $CI_{50}$ . Os valores de  $CI_{50}$  após 72 horas de tratamento estão apresentados na tabela 8.

**Tabela 8** – Avaliação da atividade citotóxica das L-ASNases B e Z frente à linhagem tumoral HL-60 por meio do ensaio de MTT após 72 horas de incubação.

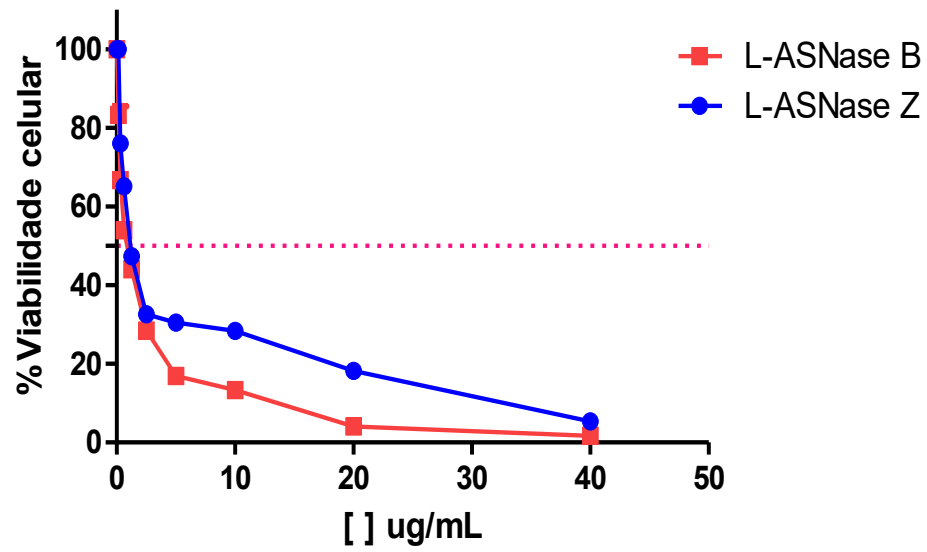
CI <sub>50</sub> (µg/mL) Intervalo de confiança de 95%	
Substâncias	HL-60
<b>L-ASNase B</b>	<b>0,83 µg/mL</b> (0,77-0,88)
<b>L-ASNase Z</b>	<b>1,53 µg/mL</b> (1,26-1,87)

Fonte: Elaborado pelo autor. A tabela apresenta os valores de CI<sub>50</sub> representados em µg/mL e foram calculados utilizando o GraphPad Software versão 5.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por regressão não linear a partir de um experimento realizado em triplicata, sendo mostrados entre parênteses.

Nas primeiras concentrações testadas, em ambas as amostras, já foram possíveis observar a queda significativa na percentagem de células viáveis, inferindo que elas se apresentam tóxicas mesmo em baixas concentrações. As amostras são consideradas tóxicas quando apresentam a curva de viabilidade celular abaixo da linha do CI<sub>50</sub> ou quando cruzam esta linha. Neste ensaio foi observado que as amostras apresentaram CI<sub>50</sub> distintos para cada, 0,83 µg/mL para a L-ASNase B e 1,53 µg/mL para a L-ASNase Z, então esses valores representam que foi necessária uma menor concentração da L-ASNase B para inibir metade da população celular, inferindo que ela possui maior atividade citotóxica (GRÁFICO 8).

Os valores de concentração inibitória média obtidos no presente trabalho mostraram-se bem promissores para uma possível aplicação como biofármaco, pois ao comparar com outros estudos de L-asparaginases, como o de Elshafei *et al.* (2012) e o de Sayed *et al.* (2011), que apresentaram valores de CI<sub>50</sub> elevados na faixa de 43,3 – 76,4 µg/mL para o primeiro trabalho citado e de 4,67 – 10 µg/mL para o segundo, logo isso indicou que foram necessárias maiores concentrações de enzima para obter a CI<sub>50</sub> nesses estudos.

**Gráfico 8** – Viabilidade celular da HL-60 contra as L-ASNases B e Z.



Fonte: Elaborado pelo autor. O gráfico representa o perfil de viabilidade celular da HL-60 com diferentes concentrações das enzimas e foi plotado utilizando o GraphPad Software versão 5.0. A linha pontilhada representa a concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ).

## 5. CONCLUSÃO

Com os resultados expostos, foi possível expressar as enzimas recombinantes com sucesso e realizar a caracterização bioquímica por meio da avaliação do pH e da temperatura, que corroboraram com alguns resultados expostos na literatura. É necessária uma melhor avaliação na cinética enzimática apresentada com o objetivo de otimizar o teste para futuras experimentações. Por fim, foi possível destacar o efeito inibitório das L-ASNases B e Z contra a proliferação das células HL-60, sendo as enzimas consideradas promissoras para o tratamento oncoterápico, especialmente a L-ASNase B devido ao menor valor de  $CI_{50}$ , apresentando, conseqüentemente, maior potencial citotóxico.

Como perspectivas, busca-se realizar estratégias modernas de bioinformática e de mutagênese sítio-dirigida para aperfeiçoar e aprimorar as propriedades terapêuticas das L-ASNases obtidas, visando contornar as possíveis limitações que possam ocorrer e permitir a sua futura aplicação no sistema de saúde.

## REFERÊNCIAS

AEHLE, W. **Enzymes in Industry**. 3 ed., Weinheim: WILEY-VCH, 2007.

ALLIED MARKET RESEARCH. Disponível em:

<<https://www.alliedmarketresearch.com/specialty-enzymes-market>>. Acesso em 30 de maio de 2019.

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, p. 435-440, 2011.

AVRAMIS, V. I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Res**, v. 32, p. 2423-2437, 2012.

BASCOMB, S.; BANKS, G. T.; SKARSTEDT, M. T.; FLEMING, A.; BETTELHEIM, K. A.; CONNORS, T. A. The properties and large-scale production of L-asparaginase from *Citrobacter*. **Journal of General Microbiology**, v. 91, p. 1-16, 1975.

BATOOL, Tahira; MAKKY, Essam A.; JALAL, Muna; YUSOFF, Mashitah M. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 178, p. 900-923, 2016.

BON, E. P.; CARVAJAL, E.; STANBROUGH, H.; ROWEN, D.; MAGASANIK, B. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. GLN3/URE2 regulation of a periplasmic enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, p. 203-212, 1997.

BROOME J. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effect. **Nature**, v. 191, p. 1114-1115, 1961.

CAETANO, Ludmilla Freire. Expressão e Caracterização bioquímica de uma L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* expressa em *Escherichia coli*: estudo preliminar de um potencial biofármaco. 63 f. Monografia – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CHAN, W. K.; LORENZI, P. L.; ANISHKIN, A.; *et al.* The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, v. 123, p. 3596-3606, 2014.

CLEMENTI, A. La desamidation enzymatique de L-asparaginase chez les diferentes especes animals et la signification physiologique de sa presence dans l'organiasma. **Archives Internationales de Physiologie**, v. 19, p. 369-376, 1922.

COPELAND, R. A. **Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis**. 2 ed. New York: Wiley-VCH, p. 397, 2000.

CORNEA, C. P.; LUPESCU, I.; VATAFU, I.; CARAIANI, V. G.; SAVOIU, G. H.; *et al.* Production of L-asparaginase II by recombinant *Escherichia coli* cells. **Rom. Biotechnol. Lett.**, v. 7, p. 717-722, 2002.

DERST, C.; HENSELING, J.; ROHM, K. 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.

DUVAL, M; SUCIU, S.; FERSTER, A.; *et al.* Comparison of *Escherichia coli*–asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organization for Research and Treatment of Cancer–Children’s Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, p. 2734-2739, 2002.

EDEN, D.; HIPKINS, R.; BRADBURY, C. A. Cerebral Thrombotic Complications Related to L-Asparaginase Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 22, p. 589-593, 2006.

EINSFELDT, Karen. **Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco**. 2014. 143 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

ELSHAFEI, Ali M.; HASSAN, Mohamed; MAHMOUD, Dalia A. Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, p. 158-174, 2012.

FISHER, S. H.; WRAY, L. V. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 2148-2154, 2002.

FU, C. H.; SAKAMOTO, K. M. PEG-asparaginase. **Expert Opin. Pharmacotherapy**, v. 8, p. 1977-1984, 2007.

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

GHOSHON, M. B.; BERENJIAN, A.; HEMMATI, S.; YOUNES, G. Extracellular production of recombinant L-asparaginase II in *Escherichia coli*: medium optimization using response surface methodology. **Int. J. Pept. Res. Ther.**, v. 21, p. 487-495, 2015.

HAMMES, G. G. How do enzymes really work? **Journal of Biological Chemistry**, 283, p. 22337-22346, 2008.

HASAN, F.; SHAH A. A.; HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb Tech**, v. 39, p. 235, 2006.

HENDRIKSEN, H. V.; KORNBURST, B. A.; OSTERGAARD, P. R.; STRINGER, M. A. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4168-4176, 2009.

HOFFBRAND A.V.; MOSS P. A. H. **Fundamentos da hematologia**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOWLADER, N; *et al.* **SEER Cancer Statics Review**. 1 ed., Bethesda: National Cancer

Institute, 2014.

HUANG, L.; LIU, Y.; SUN, Y.; YAN, Q., JIANG, Z. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, p. 1561-1569, 2014.

HUSAIN, I.; SHARMA, A.; KUMAR, S.; MALIK, F. Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from *Enterobacter cloacae*: *In-Vitro* Evaluation of Cytotoxic Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. **PLOS ONE**, v. 11, p.1-27, 2016.

HYMAVATHI, M.; SATHISH, T.; RAO, C. S.; PRAKASHAM, R. S. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* MTCC 8574 using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 191-198, 2009

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em:  
<<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>>. Acesso em 1 dez. 2018.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA.

**Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, julho de 2018.

JIA, M.; XU, M.; HE, B.; RAO, Z. Cloning, expression, and characterization of asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. **J. Agric. Food Chem.** v. 61, p. 9428-9434, 2013.

KARAMITROS, Christos S.; KONRAD, Manfred. Human 60-kDa Lysophospholipase Contains an N-terminal L-Asparaginase Domain That Is Allosterically Regulated by L-Asparagine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289: p. 12962–12975, 2014.

KHUSHOO, A; PAL, Y.; SINGH, B. N.; MUKHERJEE, K. J. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. **Protein Expression and Purification**, v. 38, p. 29-36, 2004.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, p. 65-82, 1953.

KIRIYAMA, Y.; KUBOTA, M.; TAKIMOTO, T.; *et al.* Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparaginase synthetase. **Leukemia**, v. 3, p. 294-297, 1989.

KOTZIA, Georgia A.; LABROU, Nikolaos E. L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning expression and characterization. **Journal Biotechnology**, v. 127, p. 657-669, 2007.

KOZAK, M.; JASKÓLSKI, M.; RÖHM, K. H.; Preliminary crystallographic studies of Y25F mutant of periplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, p. 807-814, 2000.

- KUMAR, N. S. M.; SHIMRAY, C. A.; INDRANI, D.; MANONMANI, H. K. Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, p. 741-748, 2014.
- LANG, S. Desamidierung im Tierkörper. **Beitraege zur Chemischen Physiologie und Pathologie**, v. 190, p. 321-345, 1904.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6° ed. São Paulo: Artmed, p.200-212, 2014.
- LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P.; BORIN, I. A. SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochem Mol Biol Educ**, v. 33, p. 399-403, 2005.
- LI, Y.; ZHANG, T.; HU, T.; *et al.* Asparagine synthetase expression and its potential prognostic value in patients with NK/T cell lymphoma. **Oncology Reports**, v. 32, p. 853-859, 2014.
- MAHAJAN, R.; KUMAR, V; RAJENDRAN, V.; *et al.* Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from bacillus licheniformis: In vitro evaluation of anti-cancerous properties. **PLOS ONE**, v. 9, p.1-8, 2012.
- MESAS, J. M.; GIL, J. A.; MARTIN, J. F. Characterization and partial purification of l-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 515-519, 1990.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:  
<[http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2.%20b%20-%20L%20ASPARAGINASE\\_CIT\\_22\\_06\\_2017.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2.%20b%20-%20L%20ASPARAGINASE_CIT_22_06_2017.pdf)>. Acesso em 1 dez. 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivor: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOOLA, Z. B.; SCAWEN, M. D.; ATKINSON, T.; NICHOLLS, D. J. *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. **Biochemical Journal**, v. 302, p. 921-927, 1994.
- MOORTHY, V.; RAMALINGAM, A.; SUMANTHA, A.; *et al.* Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from soil isolate *Bacillus sp.* **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 1862-1867, 2010.
- MÜLLER, H.J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 28, p. 97-113, 1998.
- NAKAHAMA, K.; IMADA, A.; IGARASI, S.; TUBAKI, K. Formation of L-asparaginase by *Fusarium* species. **Journal of General Microbiology**, v. 75, p. 269-273, 1973.
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 61, p. 208-211, 2007.

NETRVAL, J. Stimulation of L-asparaginase production in *Escherichia coli* by organic and amino acids. **Folia Microbiologica Praha**, v. 22, p. 106-116, 1977.

NGUYEN, H.; SU, Y.; LAVIE, A. Structural Insight into Substrate Selectivity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 55, p. 1246-1253, 2016.

OHNUMA, T.; BERGEL, F.; BRAY, R. C. Enzymes in cancer asparaginase from chicken liver. **Biochemical Journal**, v. 103, p. 238-245, 1967.

ONISHI, Y.; YANO, S.; THONGSANIT, J.; *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**, v. 61, p. 517-524, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Disponível em: <[https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com\\_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839](https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839)>. Acesso em 1 dez. 2018.

PARMENTIER, J. H.; MAGGI, M.; TARASCO, E.; SCOTTI, C.; AVRAMIS, V. I.; MITTELMAN, S. D. Glutaminase activity determines cytotoxicity of L-asparaginases on most leukemia cell lines. **Leuk. Res.**, v. 39, p. 57-62, 2015.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1177-1188, 2009.

PATRO, K. K. R., SATPATHY, S.; GUPTA, N. Evaluation of some fungi for L-asparaginase production. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 1, p. 219-221, 2011.

PINHEIRO, I. O.; ARAUJO, J. M.; XIMENES, E. C. P. A.; PINTO, J. C. S.; ALVES, T. L. M. Production of L-asparaginase by *Zymomonas mobilis* strain CP4. **Biomater Diagnostic**, v. 6, p. 243-244, 2001.

PRADEEPKUMAR P.I.; HÖBARTNER Claudia. RNA-Cleaving DNA enzymes and their potential therapeutic applications as antibacterial and antiviral agents. **From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine RNA Technologies**, v. 1, p. 371-410, 2012.

RAJA, Raheel A.; SCHMIEGELOW, K.; FRANDSEN, Thomas L. Asparaginase-associated pancreatitis in children. **British Journal on Hematology**, v. 159, p. 18-27, 2012

RAMUNDO, Janet.; GRAY Mikel. Collagenase for enzymatic debridement: a systematic review. **J Wound Ostomy Continence Nurs**, v. 36, p. 4-11, 2009.

REDDY, V. K.; REDDY, S. M. Effect of carbon and nitrogen sources on L-asparaginase production by bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 81-83, 1990.

REINERT, R. B.; OBERLE, L. M.; WEK, S. A.; BUNPO, P.; *et al.* Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 31222-31233, 2006.

RIZZARI, Carmelo; CONTER, Valentino.; STARÝ, Jan; COLOMBINI, Antonella; MOERICKE, Anja; SCHRAPPE, Martin. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion on Oncology**, v. 25, p. 1-9, 2013.

RYU, J. K.; KIM, H. S.; NAM, D. H. Current Status and Perspectives of Biopharmaceutical Drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 900-911, 2012

SALEH, A.; MOHAMED, F. E.; KUMOSANI, T. A.; ALDAHLAWI, A. M. Purification and Characterization of Asparaginase from *Phaseolus vulgaris* Seeds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

SANCHES, Mario; KRAUCHENCO, Sandra; POLIKARPOV, Igor. Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial. **Current Chemical Biology**, v. 1, p. 75-86, 2007.

SAYED, E-L; SHOUSHA, W. G.; SHEHATA, A; *et al.* Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from Chicken liver. **Journal of American Science**, v. 7, p. 439-449, 2011.

SEGEL, I.H. Bioquímica, Teoria e Problemas. Traduzido Grassiano, D. M. Rio de Janeiro: Livros técnico e científicos, 1979.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A. A.; KHURSHID, M.; KALAM, M. A.; *et al.* Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1-10, 2016.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A. A.; SHRIVASTAY, A.; JAIN, S. K.; SINGHAL, P. K. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 574-581, 2012.

SMITH, Owen P.; HANN, Ian M. Clinical features and treatment of lymphoblastic leukemia. **Pediatric Hematology**, Third Edition. Massachusetts: Blackwell Publishing: 450-481, 2006.

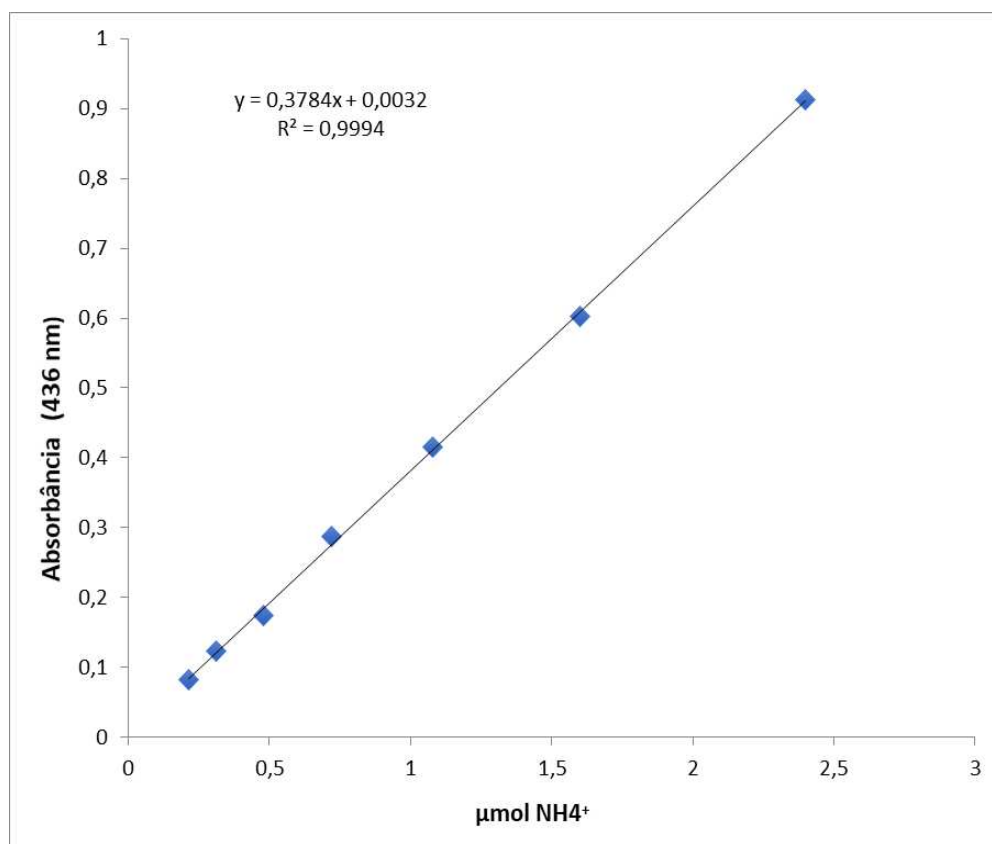
SWAIN, A.L., JASKOLSKI, M., HOUSSET, D.; *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 1474-1478, 1993.

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. 48 f. Monografia – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

ULU, Ahmet; BURHAN, Ates. Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, p. 1598-1610, 2017.

UMAMAHESWARI, T.; HEMALATHA, T.; SANKARANARAYANAN, P.; PUVANAKRISHNAN, R. Enzyme Therapy: Current Perspectives. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 54, p. 7-16, 2016.

- USHA, P.; PANDEY, J. Food science and technology imprint: Enhanced production of  $\beta$ -carotene and L-asparaginase from a tribal food alga *Vaucheria uncinata*. **Anthony J Greco ed**, v. 2, p. 195–208, 2011.
- VIDYA, J.; SAJITHA, S.; USHASREE, M. V.; *et al.* Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: an overview. **Bioresource Technology**, v. 1, p. 1-7, 2017.
- VIDYA, Jalaja; VASUDEVAN, Ushasree Mrudula; SOCCOL, Carlos Ricardo; PANDEY, Ashok. Cloning, Functional Expression and Characterization of L-asparaginase II from *E. coli* MTCC 739. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 49, p. 286-290, 2011.
- WARRELL, R. P.; ARLIN, Z. A.; GEE, T. S.; *et al.* Clinical evaluation of succinylated *Acinetobacter* glutaminase-asparaginase in adult leukemia. **Cancer Treat Rep.**, v. 66, p. 1479-1485, 1982.
- WRISTON, J. C. Jr.; YELLIN, T. O. L-asparaginase: a review. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 39, p. 185-248, 1973.
- YANO, S.; MINATO, J.; THONGSANIT, J.; *et al.* Overexpression of type I L-asparaginase of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*, rapid purification and characterization of recombinant type I L-asparaginase. **Annals of Microbiology**, v. 58, p. 711-716, 2008.
- YUN, Mi-Kung; NOURSE, Amanda; WHITE, Stephen W.; ROCK, Charles O.; HEATH, Richard J. Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I. **J. Mol. Biol.**, v. 369, p. 794-811, 2007.
- ZENATTI, Priscila P.; MIGITA, Natacha A.; CURY, Nathália M.; GOZZO, Fábio C. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of *E. coli* L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine**, v. 30, p. 158-166, 2018.
- ZUCKERMAN, Tsila; ROWE, Jacob M. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. **F1000prime reports**, v. 6, p. 1-5, 2014.

**ANEXO A – CURVA PADRÃO DE SULFATO DE AMÔNIO**

Fonte: Elaborado pelo autor. Eixo x:  $\mu\text{mol}$  de sulfato de amônia; Eixo y: absorbância a 436 nm.

Diluições seriadas de sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) foram feitas e reveladas pelo reagente de Nessler, utilizando os mesmos parâmetros utilizados para o teste de atividade enzimática. Sabendo que o valor do coeficiente de determinação da regressão ( $R^2$ ) expressa numericamente a variação total do sinal analítico (x), representado por  $\mu\text{ mol}$  de sulfato de amônia, e pela variação da concentração do analito (y), correspondente a absorbância a 436nm, o valor  $R^2$  atribuído à reta obtida nesta curva padrão foi consideravelmente satisfatório para baseamento dos dados de atividade enzimática futuros.