



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

LUDMILLA FREIRE CAETANO

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA L-ASPARAGINASE
II DE *Bacillus subtilis* EXPRESSA EM *Escherichia coli*: ESTUDO PRELIMINAR DE
UM POTENCIAL BIOFÁRMACO**

FORTALEZA

2017

LUDMILLA FREIRE CAETANO

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA L-ASPARAGINASE II DE
Bacillus subtilis EXPRESSA EM *Escherichia coli*: ESTUDO PRELIMINAR DE UM
POTENCIAL BIOFÁRMACO

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biologia molecular.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.
Coorientadora: Prof. Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca.

FORTALEZA

2017

LUDMILLA FREIRE CAETANO

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA L-ASPARAGINASE II DE
Bacillus subtilis EXPRESSA EM *Escherichia coli*: ESTUDO PRELIMINAR DE UM
POTENCIAL BIOFÁRMACO

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biologia molecular.

Aprovada em: 29/11/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Ceará)

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

Prof. Dr. Kaio César Simiano Tavares
Universidade de Fortaleza (Unifor)

À vida.

À minha avó Maria de Jesus, aos meus pais,
Fátima Regina e Divaldo e à minha irmã
Lérida.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção constante nos caminhos que tenho trilhado, por iluminar meu espírito e derramar tantas bênçãos sobre cada pequeno passo na vida.

Aos meus pais, Fátima Regina Freire e Divaldo Caetano pelos ensinamentos de valores fundamentais, pelo amor, apoio incondicional e pela incansável dedicação para que eu realizasse meus sonhos. À minha irmã Lérida Freire, pelas conversas enérgicas e fraternas que me ajudaram a perceber o quão forte é laço que nos une. À minha avó Maria de Jesus, com a qual aprendo dia após dia a construir uma vida digna, pautada na perseverança e honestidade.

Ao meu companheiro, João Paulo Serpa, por toda a paciência, amizade, carinho e amor nesses longos anos de convívio, compartilhando cada vitória e angústia, as quais nos fizeram crescer lado a lado. Por acreditar em quem eu posso me tornar, nos momentos em que me senti cansada e com pouca fé em dias melhores.

Aos grandes amigos e companheiros de jornada que a Biotecnologia me presenteou: Amanda Dias, pela simplicidade e calma que me inspira; Juliany Noberto por transmitir tanta coragem em desbravar o mundo e a si mesma; Priscilla Paiva, pela doçura que compõe alguém tão cheia de força; Janise Rodrigues, pelo olhar cuidadoso com que dedica tamanha vontade de fazer-se presente; Débora Albuquerque, pela fé inabalável que transborda e contagia, Guilherme Rúben e Eduardo Cunha pela energia e espontaneidade natas; Luca Milério, pela empatia e compreensão diante do caos que nos cerca e também nos ensina; Natália Fernandes, pela camaradagem e perspicácia que me estimula. Vocês foram parte essencial de um dos caminhos mais desafiadores e gratificantes que enfrentei, e me ajudaram a trilhá-lo de forma mais leve e vívida.

Aos meus amigos de intercâmbio, Layara Malvestio, Aline Luz, Gabriela Barten, Marla Calazans, Flor Dias, Renan Mendes, Maíra Scarpelli e Amanda Cruz, por compartilhar tantas experiências, cultura e ideias enriquecedoras, as quais me ensinaram tanto sobre a pluralidade do mundo. À minha tutora acadêmica Dra. Patrícia Roig, pelo cuidado e preocupação para que eu me sentisse à vontade diante da nova realidade que me cercava, à Universitat de València, pelo dinamismo e novas concepções de aprendizado, os quais experimentei através do curso de Bioquímica y Ciências Biomédicas. À cidade de València (Espanha), por ter me proporcionado as memórias culturais e emocionais mais valiosas da fase mais inesquecível da minha vida até então.

Ao Dr. Gilvan Pessoa Furtado pela orientação e ensino paciente, pela solicitude em ajudar, e pela confiança depositada para que esse projeto pudesse ser construído,

permitindo assim meu crescimento profissional. À Dra. Marcela Gambim, pela atenção, ensinamentos e palavras gentis proferidas diante dos desafios encontrados a cada dia de trabalho, e que me encheram de esperança para alcançar os resultados pretendidos. Aos meus companheiros de bancada, Ana Carolina Xavier, Marcus Rafael Lobo, Larissa Queiroz e Gabriella Bruno, pelo entusiasmo com que levam cada dia de trabalho e estudo, pela confiança, parceria e ensinamentos constantes.

À Universidade de Fortaleza, especialmente à toda a equipe do Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD), sob coordenação dos Drs. Kaio Tavares e Leonardo Toledo, pela excelente infraestrutura disponibilizada e pela dedicação à tarefa de formar grandes profissionais; ao grupo do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos (F66), do Dr. Renato Moreira, pela partilha solícita de sua infraestrutura; à Dra. Marina Duarte Lobo, do Laboratório de Análise Proteômica II, pela gentileza na proposição de ideias e sugestões para a melhoria desse trabalho.

À todos os meus professores do Bacharelado em Biotecnologia, pelo fascínio pela ciência disseminado dentro e fora de aula, estimulando a ética e o discernimento para com os desafios acadêmicos e científicos diários. À Universidade Federal do Ceará, pelo compromisso com a excelência acadêmica e pelas importantes lições de vida e cidadania. Ao Gilmar Ferreira, secretário do curso de Biotecnologia, pelo compromisso em ajudar cada aluno.

À Fiocruz Ceará pela oportunidade de participar desse projeto e por tamanho engajamento com a excelência na formação e capacitação de recursos humanos. À Funcap pelo financiamento e manutenção da bolsa de auxílio.

“La ciencia ha eliminado las distancias.”

- Gabriel García Márquez
(Cien Años de Soledad)

RESUMO

A L-asparaginase tipo II (L-ASNase II) é uma proteína terapêutica utilizada no tratamento da Leucemia Linfóide Aguda, câncer que acomete especialmente crianças. Ela atua hidrolisando L-asparagina, um aminoácido imprescindível na proliferação de linfoblastos leucêmicos, debelando o desenvolvimento das células tumorais. As principais L-ASNase II empregadas em quimioterapia originam das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. Entretanto, há diversos casos de pacientes que apresentaram reações alérgicas ou de hipersensibilidade a essas formulações. Portanto, torna-se importante a busca por outras fontes de L-ASNase II, que propiciem um tratamento eficaz e com menos efeitos secundários. O objetivo desse trabalho foi clonar o gene *ansZ* de *Bacillus subtilis*, que codifica uma L-asparaginase II, expressar de forma heteróloga em *Escherichia coli* e purificar a proteína recombinante, a fim de realizar a caracterização bioquímica e avaliação das possíveis propriedades terapêuticas. Para isso, o DNA genômico de *B. subtilis* foi usado como molde para amplificação do gene *ansZ*, por PCR, que foi clonado no vetor pET28a, plasmídeo que codifica uma sequência rica em histidina no N-terminal da proteína expressa. A construção foi confirmada por sequenciamento automático de nucleotídeos, seguindo a expressão do gene em cepa de *E. coli* Rosetta. A L-ASNase II recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna His-trap e de troca iônica em coluna MonoQ. A eficiência de purificação foi visualizada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Como resultado, a amplificação e clonagem do gene *ansZ* em pET28a foi atestada por PCR de colônias transformadas e o sequenciamento confirmou um DNA recombinante sem mutações. Análise da expressão da L-ASNase II heteróloga por SDS-PAGE, mostrou bandas no gel em aproximadamente 40 kDa, que aparecem a partir da primeira hora de expressão, continuando de forma progressiva até a quarta hora, sendo este o tamanho predito da enzima recombinante, de acordo com sua sequência primária. Análise da solubilidade citoplasmática da enzima mostrou que ela foi expressa predominantemente de forma solúvel, não sendo constatado formação considerável de corpos de inclusão. A purificação da enzima foi satisfatória e sua atividade catalítica foi avaliada pelo método de Nessler, apresentando atividade máxima em pH 8.0. Conclui-se que o gene *ansZ* de *B. subtilis* foi clonado e expresso com êxito em *E. coli* Rosetta, a proteína recombinante foi obtida predominantemente na forma solúvel indicando um correto enovelamento e não formação de agregados. Outros testes bioquímicos e citotóxicos serão realizados para avaliar o potencial uso da enzima como biofármaco.

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

ABSTRACT

L-asparaginase type II (L-ASNase II) is a therapeutic protein used in the treatment of acute lymphoid leukemia, which affects especially children. It acts by hydrolyzing L-asparagine, an essential amino acid in the proliferation of leukemic lymphoblasts, which depletes the development of tumor cells. Actually, the main L-ASNase II used in chemotherapy originate from the bacteria *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. However, there are many cases of patients who have presented allergic or hypersensitive reactions to these formulations. Therefore, the search for other sources of L-ASNase II, which provides effective treatment and with fewer side effects, becomes important. The objective of this work was to clone the *Bacillus subtilis ansZ* gene, which encodes an L-asparaginase II, express heterologous *E. coli* and purify a recombinant protein, to finally carry out a biochemical characterization and evaluation of the therapeutic properties therapies. To this end, genomic DNA from *B. subtilis* was used as template for PCR amplification of the *ansZ* gene, which was cloned into the pET28a vector, a plasmid encoding a N-terminal histidine sequence of the expressed protein. Construction was confirmed by automatic nucleotide sequencing, following an expression of the gene in *E. coli* Rosetta strain. Recombinant L-ASNase II was completed by His-trap column affinity chromatography and MonoQ column ion exchange. The efficiency of purification was visualized on polyacrylamide gel under denaturant conditions. As a result, amplification and cloning of the *ansZ* gene in pET28a was attested by PCR from transformed colonies and sequencing confirmed a recombinant DNA without mutations. Analysis of heterologous L-ASNase II expression by SDS-PAGE showed non-gel bands at approximately 40 kDa, appearing from the first hour of expression, progressively continuing up to a fourth hour, which is the predicted size of the recombinant enzyme, according to its primary sequence. Analysis of the cytoplasmic solubility of the enzyme shown that it was expressed predominantly in a soluble form, and no considerable formation of inclusion bodies was found. A purification of the enzyme for satisfaction and its catalytic activity was evaluated by the Nessler method, presenting the maximum activity at pH 8.0. It is concluded that the *B. subtilis ansZ* gene was cloned and successfully expressed in *E. coli* Rosetta, a recombinant protein obtained predominantly in the soluble form indicating correct folding and non-aggregate formation. Other biochemical and cytotoxic tests are performed to evaluate the potential use of the enzyme as a biopharmaceutical.

Keywords: L-asparaginase, Acute Lymphoide Leukemia, Biopharmaceutic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto de pele não melanoma _____	15
Figura 2	– Mecanismo químico de ação da L-asparaginase _____	18
Figura 3	– Estrutura cristalizada de uma L-asparaginase II de <i>E. coli</i> _____	19
Figura 4	– Estrutura cristalizada de uma L-asparaginase II de <i>E. chrysanthemi</i> _____	21
Figura 5	– Ilustração da estrutura química das moléculas de Imidazol e Histidina _____	22
Figura 6	– Mapa gênico vetor de expressão pET28a(+) _____	26
Figura 7	– Alinhamento das sequências primárias de L-asparaginase II de <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>E. chrysanthemi</i> _____	36
Figura 8	– Eletroforese em gel de agarose 1% contendo o produto da amplificação do gene <i>ansZ</i> por PCR, a partir do DNA genômico de <i>B. subtilis</i> _____	37
Figura 9	– Eletroforese em gel de agarose 1% contendo o produto gênico da amplificação do gene <i>ansB</i> por PCR, a partir do DNA genômico de <i>E. coli</i> _____	38
Figura 10	– Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR de colônias transformadas com plasmídeo recombinante pET28a- <i>ansZ</i> e pET28a- <i>ansB</i> _____	39
Figura 11	– Eletroforese em gel de agarose 1% do teste de digestão de colônias <i>E. coli</i> TOP10 transformadas _____	40
Figura 12	– Análise de sequenciamento dos genes <i>ansZ</i> e <i>ansB</i> comparando às respectivas sequências nativas _____	41
Figura 13	– SDS-PAGE de expressão de Bc_LASNaseII recombinante em sistema bacteriano _____	42
Figura 14	– SDS-PAGE de ensaio de solubilidade da Bc_LASNaseII recombinante pós-sonicação _____	43
Figura 15	– SDS-PAGE de ensaio de solubilidade de Ec_LASNaseII recombinante pós-sonicação _____	44
Figura 16	– SDS-PAGE de purificação de Ec_LASNaseII recombinante por cromatografia de afinidade _____	45
Figura 17	– SDS-PAGE de purificação de Bc_LASNaseII recombinante por cromatografia de afinidade _____	46
Figura 18	– Cromatograma de eluição da L-asparaginase II de <i>B. subtilis</i> por cromatografia de troca iônica por meio de sistema ÄKTA _____	47

Figura 19 – SDS-PAGE de purificação por Cromatografia de Troca Iônica _____	48
Figura 20 – Ensaio enzimático preliminar com Reagente de Nessler _____	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva padrão de Sulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ _____	50
Gráfico 2 – Atividade enzimática das L-asparaginases II de <i>B. subtilis</i> e <i>E. coli</i> sob diferentes pH_____	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas microbianas para fins terapêuticos_____	16
Tabela 2 – Principais avanços no desenvolvimento de l-asparaginase como agente antileucêmico_____	20
Tabela 3 – Dados de quantificação de proteína por espectrofotometria_____	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
L-ASNase	L-asparaginase
L-ASNaseI	L-asparaginase I
L-ASNaseII	L-asparaginase II
Bc_LASNaseII	L-asparaginase II de <i>Bacillus subtilis</i>
Ec_LASNase II	L-asparaginase II de <i>Escherichia coli</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosose
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLPC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
PEG	Polietilenoglicol
TCA	Ácido Tricloroacético
PDB	Protein Data Bank
PAGE	Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida

LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Dólar
%	Porcentagem
©	Copyright
®	Marca Registrada
kDa	Quilodalton
mL	Mililitro
mg	Milligram
µg	Micrograma
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
Ni ⁺²	Íon Niquel
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de ammonia
NH ₄ ⁺	Íon Amônio
D.O _{600nm}	Densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm
λ	Comprimento de onda
M	Molar
xg	Aceleração gravitacional
pb	Pares de base
g	Gramas
U	Unidade de concentração enzimática
µmol	Micromol
K _m	Constante de Michaelis-Menten
K _{cat}	Número de renovação
mAU	Amplitude

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leucemia Linfóide Aguda	15
1.2	Enzimas terapêuticas	16
1.3	Purificação de enzimas recombinantes	17
1.4	L-asparaginase	18
1.4.1	<i>L-asparaginase de Bacillus subtilis</i>	20
1.4.2	<i>Estrutura tridimensional</i>	21
1.4.3	<i>Efeitos secundários e imunogenicidade</i>	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivos gerais	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	MATEIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Obtenção do material	25
3.2	Estriamento e pré-inóculo de bactérias <i>E. coli</i> TOP10 e Rosetta	25
3.3	Extração de DNA plasmidial (Miniprep)	26
3.4	Alinhamento de sequências	26
3.5	Amplificação dos genes <i>ansZ</i> de <i>B. subtilis</i> e <i>ansB</i> de <i>E. coli</i>	27
3.6	Digestão enzimática do plasmídeo pET28a	28
3.7	Eletroforese em gel de agarose	28
3.8	Purificação de amostras a partir de excisão do gel de agarose 1% e de solução	29
3.9	Ligação entre o vetor e o inserto	29
3.10	Transformação bacteriana	29
3.11	PCR de colônias transformadas para diagnóstico de clonagem	30
3.12	Expressão heteróloga de L-asparaginase II em sistema procarioto (<i>E. coli</i> Rosetta)	31
3.13	Lise celular por sonicação	32
3.14	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	32
3.15	Purificação de L-asparaginase II recombinante	33
3.15.1	<i>Cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC)</i>	33
3.15.2	<i>Cromatografia de Troca Iônica</i>	33

3.16	Quantificação de proteína.....	34
3.17	Atividade enzimática de L-asparaginase II.....	34
3.17.1	<i>Curva padrão com Sulfato de Amônio</i>	34
3.17.2	<i>Atividade enzimática e curva de pH</i>	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Alinhamento de sequências.....	35
4.2	Amplificação gênica e clonagem molecular.....	37
4.3	Expressão heteróloga de L-asparaginase II de <i>B. subtilis</i> e de <i>E. coli</i> em sistema bacteriano.....	41
4.4	Purificação de L-asparaginase II recombinante por IMAC e Troca Iônica.....	44
4.5	Quantificação de proteínas.....	48
4.6	Caracterização bioquímica.....	49
4.6.1	<i>Atividade enzimática e curva de pH</i>	49
5	CONCLUSÃO	52
6	PERSPECTIVAS	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer é um termo genérico para designar um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células anormais. É uma das principais causas de mortalidade no mundo, tendo causado a morte 8,8 milhões de pessoas em 2015. Estima-se que, nas próximas duas décadas, haja um aumento de 70% no número de casos no mundo, principalmente em países emergentes e subdesenvolvidos, onde o diagnóstico e o tratamento são negligenciados pelas condições precárias de tecnologia e políticas públicas ineficientes. Com grande impacto econômico, em 2010, o custo anual total do câncer alcançou aproximadamente \$ 1,6 trilhão (OMS, 2017).

Por apresentarem funções especiais, como alta especificidade, enzimas são largamente empregadas em tratamentos quimioterápicos e de inflamações crônicas, compondo o grupo de medicamentos chamados biofármacos. São obtidos a partir de fontes naturais através de processos biotecnológicos aprimorados, como técnicas avançadas de Biologia Molecular ou de Engenharia de Proteínas.

Ainda que confira muitas vantagens, a administração de proteínas terapêuticas frequentemente está relacionada a efeitos secundários indesejados, como a morte células saudáveis. Em face disso, a indústria farmacêutica e diversos grupos de pesquisa estão investindo em melhorias da eficiência dessas moléculas, promovendo avanços significativos na caracterização de genomas de novos microrganismos, na construção de vetores plasmidiais mais versáteis e na disponibilidade de diferentes cepas microbianas para expressão heteróloga.

No que diz respeito à produção biotecnológica de proteínas terapêuticas no Brasil, destaca-se a problemática em torno do biofármaco antineoplásico L-asparaginase, medicamento de grande impacto nos tratamentos contra o câncer, como leucemias e linfomas. Comercializada no Brasil sob nome comercial Elspar® e adquirida por meio de importação, passou por risco de desabastecimento em 2012, quando o laboratório Merck Sharp & Dohme interrompeu a fabricação do medicamento. Desde então, o governo brasileiro toma medidas emergenciais para solucionar esse problema, buscando formulações semelhantes (ANVISA, 2017). Porém a importação desse medicamento onera os cofres públicos e estabelece uma sensível dependência comercial no país.

Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento produtivo nacional de L-asparaginase, a fim de suprir a demanda interna e reduzir, pelo menos em parte, os custos inerentes à importação.

1.1 Leucemia Linfóide Aguda

A Leucemia é um tipo de câncer heterogêneo determinado pela proliferação de células neoplásicas malignas no sistema hematopoiético, comprometendo a medula óssea, o sangue ou outros tecidos e órgãos. É dividida quanto ao tempo de desenvolvimento, — na forma aguda, quando observa-se aumento rápido de células imaturas anormais, ou na forma crônica, caracterizada por um progresso lento de células maduras anormais —, e quanto ao tipo de célula afetada, linfoblastos ou mieloblastos (SÁNCHEZ; ORTEGA; BARRIENTOS, 2007).

Segundo a OMS, constitui o décimo primeiro tipo de câncer mais frequente no mundo, com 322 mil novos casos registrados em 2012 (cerca de 2,5% de todos os casos mundiais de câncer), sendo 3,5% destes resultando em óbito (FERLAY *et al.*, 2014). No Brasil, foram estimados 5.540 casos de leucemias em homens, como indicado pela figura 1, e 4.530 casos em mulheres em 2016 (INCA, 2016).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, por sexo, exceto de pele não melanoma.

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos novos	%	Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA (2016).

Caracterizada como uma neoplasia maligna dada pela proliferação e acúmulo rápidos de linfoblastos imaturos anormais na medula óssea, a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) acomete, especialmente, crianças de 0 a 15 anos, apresentando um maior pico de incidência nos primeiros 5 anos de vida (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013).

Assim como as células saudáveis, os linfoblastos leucêmicos necessitam de asparagina, um aminoácido não essencial envolvido em diferentes rotas metabólicas, como a via das pirimidinas e purinas, portanto é crucial na manutenção da viabilidade celular.

Normalmente, a síntese celular de asparagina acontece, inicialmente, através da ação de uma transaminase, a qual converte oxaloacetato em um aspartato intermediário, que por sua vez é convertido em asparagina pela enzima asparagina sintetase (ASNS) (BATOOL *et al.*, 2016).

A enzima ASNS é uma aminotransferase dependente de ATP responsável pela conversão de aspartato e glutamato em asparagina e glutamina. Sua baixa expressão pelos linfoblastos leucêmicos cria forte dependência à captação de asparagina livre no plasma para manter de sua capacidade proliferativa (ZHANG *et al.*, 2014; LAZARUS *et al.*, 1969).

As manifestações clínicas mais comuns em pacientes portadores de LLA são divididas em duas grandes classes: a primária, onde há o aparecimento de anemias prolongadas, diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) e hipoplasia, e a secundária, envolvendo quadros de febre, sangramentos, infecções persistentes e fadiga crônica (MÜLLER; BOOS, 1998).

1.2 Enzimas terapêuticas

O emprego de proteínas no tratamento de doenças data de meados do século XIX, através do uso de extratos proteicos obtidos de fluidos animais ou de microrganismos cultivados por fermentação. Desde então, inúmeras descobertas no campo da Bioquímica Clínica, alavancada por avanços da Biologia molecular, como a tecnologia do DNA recombinante, permitiram o desenvolvimento de novas biomoléculas com finalidade médica, especialmente as enzimas (tabela 1). A Enzimologia é uma área importantíssima para projetar produtos e processos inovadores, e nas últimas décadas tem crescido o interesse acadêmico e industrial no desenvolvimento de enzimas com funções e eficiência aprimoradas. (GURUNG *et al.*, 2013).

Tabela 1. Proteínas microbianas recombinantes para fins terapêuticos.

Proteína	Fonte	Uso clínico	Referência
Colagenase	<i>Clostridium histolyticum</i>	Lesões cutâneas	DOLYNCHUK, et al., 2000.
Estreptoquinase	<i>Streptococcus sp.</i>	Trombose	ZAITSEV, et al., 2010.

L-asparaginase	<i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Leucemia Linfóide Aguda	JAIN, <i>et al.</i> , 2012.
β-lactamase	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i>	Antibiótico	GUPTA, <i>et al.</i> , 2012.
Glutaminase	<i>Escherichia coli</i>	Leucemias	SONNEVELD, <i>et al.</i> , 1979.
Uroquinase	<i>Bacillus subtilis</i>	Anticoagulante	ZAITSEV, <i>et al.</i> , 2010.

Fonte: Adaptado de JOZALA *et al.*, 2016 e GURUNG *et al.*, 2013.

Atualmente, o mercado de vendas de medicamentos biológicos constituídos de proteínas recombinantes de fonte microbiana atinge a cifra de \$ 50 bilhões anuais, correspondendo a um terço do mercado farmacêutico. Em 2015, dos dez biofármacos mais comercializados nos EUA, quatro eram produzidos em plataforma procarionte, como o análogo de insulina humana Lantus®, o anticorpo anti-VEGF Ranibizumabi (Lucentis®) e a proteína peguilada G-CSF Neulasta®, com receitas líquidas de venda de \$ 7,2, \$ 3,6 e \$4,7 milhões, respectivamente (JOZALA *et al.*, 2016).

1.3 Purificação de enzimas recombinantes

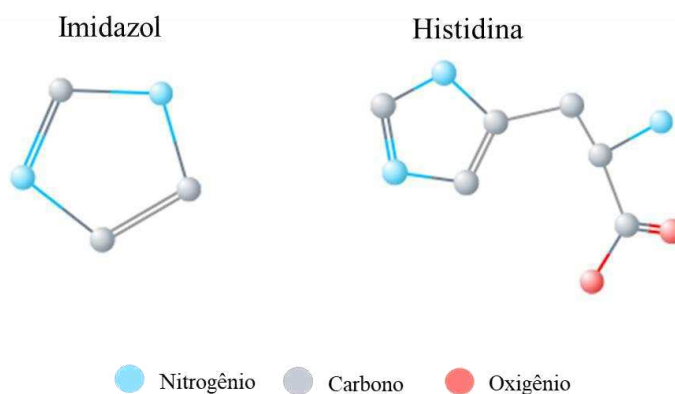
Para obter proteínas com alto grau de pureza, a indústria farmacêutica, principalmente, utiliza uma grande diversidade de métodos de purificação, os quais refletem-se bastante no valor final do produto biológico de interesse. O método que apresenta melhor desempenho e condição de escalonamento é a cromatografia de afinidade (LOWE *et al.*, 2001).

Uma das estratégias de purificação de proteínas recombinantes baseada na afinidade de grupamentos químicos é a adição de etiquetas (*tags*) de aminoácidos, como histidina, triptofano e cisteína, que demonstram capacidade de interação com cátions metálicos bivalentes (SARASWAT *et al.*, 2013). O aminoácido histidina (His) possui um anel imidazólico contendo dois átomos de nitrogênio, como ilustrado na figura 2. O par de elétron

do nitrogênio é o principal contribuinte na interação entre a His com íons metálicos, como Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+} , por exemplo (SULKOWSKI, 1989).

Com base nesse princípio, a conjugação de íons metálicos à fase estacionária, em uma abordagem chamada Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography* - IMAC), constitui um modelo bastante favorável à obtenção de biomoléculas ativas, a fim de caracterizar sua estrutura e função. No entanto, proteínas nativas raramente possuem *tags* de polihistidinas localizados em sua superfície, porque tais resíduos possuem caráter hidrofóbico e localizam-se com maior frequência no interior da molécula. Logo, a eficiência de purificação por IMAC é melhor atestada para proteínas cuja a sequência primária foi engenheirada (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; GABERC; MENART, 2001).

Figura 2. Ilustração da estrutura química das moléculas de Imidazol e Histidina.



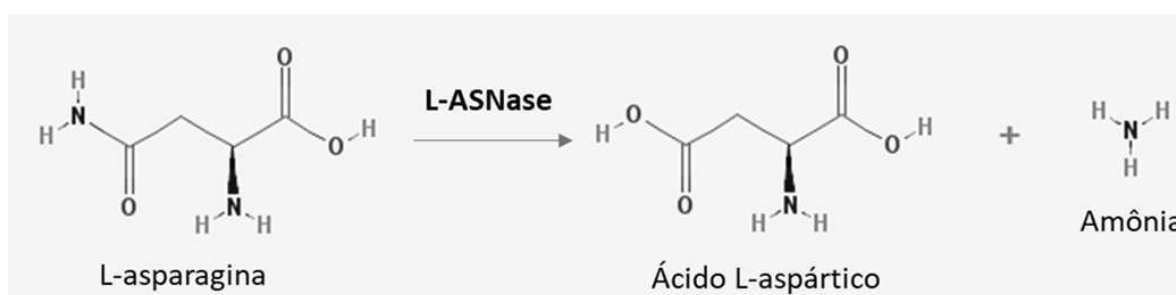
Fonte: Adaptado de *PubChem*. Estruturas químicas das moléculas de histidina e imidazol, com seus respectivos átomos de carbono (cor cinza), oxigênio (cor vermelha) e nitrogênio (cor azul).

Outras abordagens para obtenção de proteínas cada vez mais puras são adotadas em sequência a cromatografia de afinidade, como tentativa de polimento das amostras proteínicas. Um exemplo é a cromatografia de troca iônica, que remove grande parte das proteínas celulares, vírus e ácidos nucleicos da amostra de interesse com taxas de fluxo aumentadas, além de reduzir o consumo de tampão para eluição e o tempo, quando comparada à cromatografia de afinidade (LI *et al.*, 2006).

1.4 L-asparaginase

A L-asparaginase (L-ASNase) ou L-asparagina aminohidrolase (EC 3.5.1.1) é uma enzima capaz de hidrolisar o aminoácido essencial L-asparagina em L-ácido aspártico e amônia (KUMAR; VERMA, 2012), como mostra a figura 3. Esse mecanismo interfere diretamente na produção energética da célula cancerígena, debelando o avanço da doença, uma vez que diminui os níveis séricos do aminoácido (MCCOY *et al.*, 1956).

Figura 3. Mecanismo de ação simplificado da L-asparaginase.



Fonte: Adaptado de *PubChem*. L-asparagina (à esquerda), sendo convertida em ácido L-aspártico (ao centro) e amônia (à direita) pela enzima L-ASNase.

No início do século XX, a L-ASNase foi observada pela primeira vez (LANG, 1904), porém apenas na década de 1950 foi descrita como inibidor tumoral, quando o soro de porcos da Índia rico em L-ASNase foi injetado em ratos com linfossarcomas e carcinomas mamário, levando à regressão gradativa dos tumores (KIDD, 1953). Em meados de 1960, comprovou-se sua presença em meio de cultivo bacteriano (ALTENBERN; HOUSEWRIGHT, 1954) e de leveduras (BROOME, 1965), ocorrendo a partir daí inúmeros avanços científicos quanto ao seu potencial terapêutico, os quais estão apresentados na tabela 2. Atualmente, as principais formulações de L-ASNase adotadas nos protocolos de quimioterapia para LLA, Linfoma de Hodgkin e outras neoplasias malignas são originadas das bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (SALZER *et al.*, 2014).

É possível obter L-ASNase a partir de diversas fontes naturais: bactérias gram negativas, como *E. coli* (NETRVAL, 1977) e *E. chrysanthemi* (MOOLA *et al.*, 1994); bactérias gram positivas, como *Bacillus subtilis* (FISHER; WRAY, 2002) e *Staphylococcus aureus* (ROZALSKA; MIKUCKI, 1991); leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (BON *et al.*, 1997) e *Pichia polymorpha* (FODA; ZEDAN; HASHEM, 1980); macroalgas marinhas,

como *Vaucheria uncinata* (USHA; PANDEY, 2011) e plantas, como nas sementes de *Phaseolus vulgaris* (SALEH *et al.*, 2015).

Em geral, as L-ASNases microbianas apresentam-se sob duas isoformas: l-asparaginase I (L-ASNaseI), enzima citoplasmática de K_m 3.5×10^{-3} M para o substrato l-asparagina, e l-asparaginase II (L-ASNaseII), enzima extracelular cujo K_m é 1.2×10^{-5} M, (HO *et al.* 1970). Por apresentar um K_m mais baixo, indicando maior afinidade pelo substrato asparagina, apenas a tipo II é utilizada como biofármaco coadjuvante em protocolos de quimioterapia, geralmente combinada com vincristin (Oncovin®) e glucocorticóide.

Tabela 2. Principais avanços no desenvolvimento de l-asparaginase como agente antileucêmico.

1953	Kidd: discovery of antileukemic effect of guinea pig serum
1963	Broome: identification of ASNase as antileukemic agent in guinea pig serum
1964–1967	Suppression of tumor cell growth by <i>Escherichia coli</i> -derived ASNase; isolation and purification of active <i>E. coli</i> isoform
1966	Dolowy: first clinical use of ASNase
1968	Wade: isolation of ASNase from <i>Erwinia carotovora (chrysanthemi)</i>
1978	Native <i>E. coli</i> ASNase approved by FDA for use to treat ALL
1981	Kamisaki: initial development of pegylated <i>E. coli</i> -derived ASNase
1985	<i>Erwinia</i> ASNase authorized in the United Kingdom for use to treat ALL
1993	Asselin: identification of distinct pharmacokinetic properties
1994	Pegylated <i>E. coli</i> ASNase (Oncaspar®) approved by FDA for use to treat ALL
2006	Pegylated <i>E. coli</i> ASNase approved by FDA for first-line use to treat ALL
2008	Start of COG AALL07P2 and compassionate-use EMTP trials to evaluate ASNase <i>Erwinia chrysanthemi</i>
2011	ASNase <i>Erwinia chrysanthemi</i> approved by FDA for use in patients with hypersensitivity to <i>E. coli</i> -derived ASNase

Fonte: SALZER *et al.* 2014.

1.4.1 L-asparaginase de *Bacillus subtilis*

A bactéria gram positiva *B. subtilis* sintetiza duas isoformas de L-asparaginase, codificadas pelos genes *ansA* e *ansZ*, em um processo regulado pelo estado nutricional celular, quando o cultivo é feito em condições limitadas de nitrogênio em meio mínimo de glicose (SUN; SETLOW, 1991).

A o gene *ansZ*, o qual codifica um L-ASNase tipo II, foi identificado por KUMANO *et al.* (1997) a partir do sequenciamento do genoma de *B. subtilis* cepa 168. Tem sequência nucleotídica 59% idêntica ao gene que codifica uma L-ASNase II de *E. chrysanthemi* (MINTON *et al.* 1986) e 56% de identidade com de *E. coli* (BONTHRON, 1990). Já o gene *ansA* de *B. subtilis* codifica uma L-asparaginase de sequência aminoacídica e propriedades cinéticas similares a uma L-ASNase I de *E. coli* (YANO *et al.* 2008).

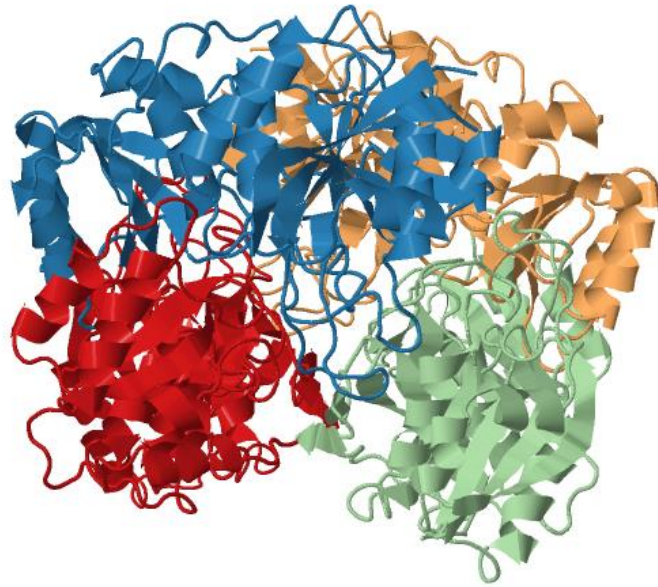
As aplicações de ambas as proteínas são diferentes: enquanto a L-asparaginase II tem propriedades terapêuticas contra células tumorais, a tipo I tem sido utilizada na indústria de alimentos, por sua capacidade de reduzir a formação de acrilamida, um agente carcinogênico formado durante o processamento térmico de biscoitos, batatas, café e pães (ANESE *et al.*, 2011).

1.4.2 Estrutura tridimensional

Estruturalmente, a L-ASNase II é encontrada como homotetrâmero de aproximadamente 140 kDa, apesar de apresentar-se também como um hexâmero ou dímeros biologicamente ativos (GREENQUIST; WRISTON, 1972). O primeiro cristal obtido foi da enzima originada de *E. coli*, resolvido por SWAIN *et al.* (1993) (figura 4), estruturado em quatro subunidades não-alostéricas nomeadas A, B, C e D, onde A/C e B/D formam dímeros íntimos. Já a estrutura tridimensional da enzima proveniente de *E. chrysanthemi* foi resolvida por AGHAIYPOUR *et al.* (2001) (figura 5), consistindo em dois tetrâmeros (ABCD e EFGH) com formação de dímeros íntimos semelhante aos de *E. coli*.

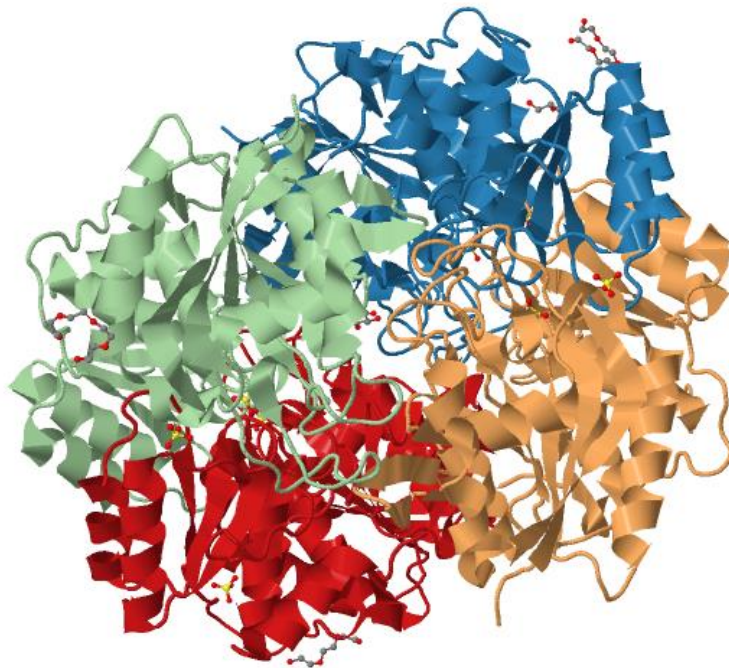
Os monômeros de ambas possuem dois domínios principais, C-terminal (menor) e N-terminal (maior), estando entre eles um dos quatro sítios ativos, com destaque para os resíduos de treonina Thr15 e Thr95 (AGHAIYPOUR *et al.*, 2001).

Figura 4. Estrutura cristalizada de uma L-asparaginase II de *E. coli*.



Fonte: PDB (código 3ECA). Em verde: subunidade A, em laranja: subunidade C, em azul: subunidade B, em vermelho: subunidade D.

Figura 5. Estrutura cristalizada de uma L-asparaginase II de *E. chrysanthemi*.



Fonte: PDB (código 1O7J). Em laranja: subunidade C, em azul: subunidade A, em verde: subunidade D, em vermelho: subunidade B.

1.4.3 Efeitos secundários e imunogenicidade

A utilização de L-ASNase II como agente antitumoral tem sido acompanhada por diversos relatos de seus efeitos adversos, como disfunção hepática, diabetes *mellitus*, pancreatite, dores de cabeça, tontura e convulsões (NOURA EL-AHMADY *et al.*, 2014). Reações de hipersensibilidade também são reportadas em cerca de 60% dos pacientes que utilizaram a formulação proveniente de *E. coli* injetada via intramuscular, principalmente durante os regimes terapêuticos de reindução e intensificação (PANOSYAN *et al.*, 2004). Os sintomas mais recorrentes de hipersensibilidade são anafilaxia (reação alérgica aguda) acompanhada de edema, febre e urticária (WOO *et al.*, 2000 e ALBERTSEN *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de hipersensibilidade à L-ASNase II é considerado a sintomatologia mais preocupante no quadro de saúde de pacientes leucêmicos, uma vez que significa a degradação rápida da enzima diminuindo sua meia-vida e consequentemente sua eficiência terapêutica, um fenômeno conhecido como “hipersensibilidade ou inativação silenciosa” (PIETERS *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos apontam o surgimento de resistência à proteína, devido à não repressão espontânea da enzima ASNS (CANELLOS; HASKELL, 1970).

Tem sido reportado que a L-ASNase reprime a produção de linfócitos T pela medula óssea e desregula a expressão de receptores de células T (TCRs), em parte por reduzir a formação de citocinas (TORRES *et al.*, 2016). Em SONG *et al.* (2017), descobriu-se que a L-asparaginase proveniente de *E. chrysanthemi* inibia a autofagia de macrófagos, células com funções essenciais no controle natural da proliferação de células tumorais.

As principais causas apontadas como razão da citotoxicidade da L-asparaginase II são: a atividade glutaminase (PARMENTIER *et al.*, 2015), queda nos níveis séricos de asparagina, — por seu importante papel metabólico na síntese de diversas proteínas como albumina, insulina e fatores de coagulação, e desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase (MÜLLER; BOOS, 1998).

Uma série de alternativas para mitigar a imunogenicidade da L-asparaginase II tem sido proposta, como uso de polietilenoglicol (PEG) para encobrir parte da proteína, em um processo chamado peguilação, na tentativa de permitir que enzima se evada do sistema imunológico (POKROVSKY *et al.*, 2016). Outra metodologia bastante promissora é o mapeamento de epítomos antigênicos de enzimas mitigadas (MOOLA *et al.*, 1994), e mais recentemente, a proposição de mutações através de mutagênese sitio-dirigida (MEHTA *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Clonar, expressar e purificar uma L-asparaginase II de *Bacillus subtilis* recombinante, e caracterizar bioquimicamente quanto à influência da variação do pH na atividade enzimática, como estudo preliminar de seu potencial terapêutico.

2.2 Objetivos específicos

- ⊕ Amplificar o gene *ansZ* de *B. subtilis*.
- ⊕ Clonar o gene amplificado em vetor de expressão pET28a(+).
- ⊕ Sequenciar e analisar a sequência de DNA recombinante.
- ⊕ Transformar bactérias *E. coli* TOP10 e Rosetta com plasmídeo recombinante *ansZ*-pET28a.
- ⊕ Expressar a proteína recombinante em *E. coli* Rosetta a 30°C por 4 horas com indução por IPTG.
- ⊕ Purificar a enzima recombinante por cromatografia de afinidade IMAC utilizando uma coluna His-Link com níquel imobilizado e de troca iônica utilizando coluna MonoQ de troca aniônica.
- ⊕ Avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material

O DNA genômico de *B. subtilis* foi cedido, gentilmente, pelo professor Richard John Ward da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto, assim como a linhagem de *E. coli* Rosetta e o vetor plasmidial pET28a(+). A cepa *E. coli* TOP10 foi cedida pelo professor Dr. Kaio César Simiano Tavares, coordenador do Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) da Universidade de Fortaleza (Unifor), de CQB 0294/10. As enzimas de restrição *NheI* e *BamHI*, DNA ligase e seus respectivos tampões, bem como o kit de extração e purificação de DNA foram obtidos da empresa Promega®, e a enzima fosfatase alcalina (*Heat Inactivated Alkaline Phosphatase*) e seu respectivo tampão proveio da Invitrogen®. Os *primers Forward*: ATATGCTAGCCCTGAAACAAAAGAATCC, *Reverse*: ATCGGATCCTTAATACTCATTGAAATAAGC, específicos para o gene *ansZ* de *B. subtilis*, e os *Forward*: AGTATGCTAGCTTACCCAATATCACCATT e *Reverse*: ATCGGATCCTTAGTACTGATTGAAGAT específicos para o gene *ansB* de *E. coli* foram adquiridos comercialmente junto a empresa Invitrogen®.

3.2 Estriamento e pré-inóculo de bactérias *E. coli* TOP10 e Rosetta.

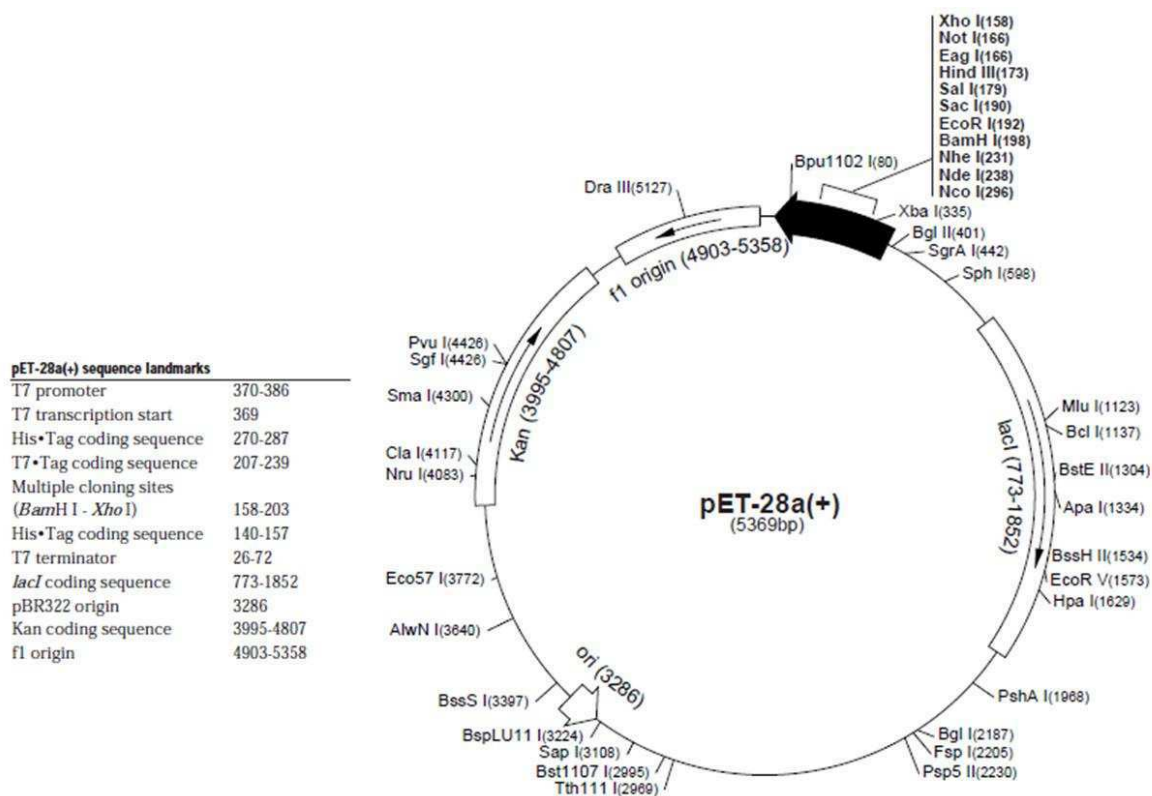
Uma pequena quantidade de células *E. coli* TOP10 e Rosetta ainda congeladas a -80° C foi retirada com auxílio de uma ponteira estéril e inoculada em placa de LB (Luria Bertani Broth Miller) ágar HIMEDIA® contendo antibiótico de resistência (quando necessário). Com auxílio de uma alça de níquel previamente esterilizada, a porção bacteriana inoculada foi estriada em movimentos de vai e vem, para isolamento de colônias. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por, aproximadamente, 12 horas a 37°C.

Das colônias isoladas produziram-se pré-inóculos em caldo LB (5 mL) previamente autoclavado contendo antibiótico de resistência (se necessário) em tubos de vidro estéreis. Com auxílio de uma ponteira estéril, tocou-se sua ponta em uma colônia, submergindo a ponteira em meio de cultivo. Os pré-inóculos foram incubados a 37°C *overnight*, sob agitação orbital de 200 rpm.

3.3 Extração de DNA plasmidial (*Miniprep*)

O vetor pET28a (figura 6) foi o plasmídeo escolhido neste trabalho, o qual adiciona uma sequência de seis histidinas na porção N-terminal da proteína expressa. A extração do DNA plasmidial (*Miniprep*) foi realizada seguindo as instruções contidas no manual do fabricante do kit comercial *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems*. Após a realização dos experimentos, seguiu-se para a quantificação dos plasmídeos em aparelho *NanoDrop* (ThermoScientific®).

Figura 6. Desenho esquemático do vetor de expressão pET28a(+).



Fonte: Novagen.

3.4 Alinhamento de sequência

As sequências aminoacídicas de L-asparaginase II de *B. subtilis* (código GenBank: AIN95080.1), *E. coli* (código GenBank: OWC14106.1) e *E. chrysanthemi* (código GenBank: KGT98450.1), no formato FASTA, foram alinhadas em softwares *Clustaw W*, hospedado no portal *EMBL-EBI*, e *Protein BLAST*, no *NCBI*.

3.5 Amplificação dos genes *ansZ* de *B. subtilis* e *ansB* de *E. coli*

O gene *ansZ* de *B. subtilis* foi amplificado através da reação da cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers Forward* e *Reverse* descritos no item 3.1 deste trabalho, os quais contêm sítios correspondentes as enzimas de restrição *NheI* e *BamHI*, respectivamente.

Em tubos de 0,2 mL estéreis adicionou-se:

1 μ L de cada *primer* (10 μ M).

4 μ L de dNTPs (200 mM).

1 μ L da enzima GoTaq® DNA polimerase (1U).

10 μ L de tampão GoTaq® (5x).

2 μ L de DNA genômico (200 ng).

Volume final por reação: 50 μ L. Os parâmetros ajustados no termociclador Biometra® foram:

- I. 95°C por 2 minutos.
- II. 95°C por 1 minuto.
- III. 52°C por 1 minuto.
- IV. 72°C por 1,5 minuto.
- V. 72°C por 5 minutos.

Os itens II a IV foram repetidos 29 vezes, totalizando 30 ciclos.

O gene *ansB* de *E. coli* foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos descritos no item 3.1 que contêm sítios de reconhecimento das mesmas enzimas de restrição supracitadas para a amplificação de *ansZ*. Em tubos estéreis de 0,2 mL foram preparadas reações contendo:

1 μ L de cada *primer* (34 μ M)

4 μ L de dNTPs (200 mM).

1 μ L da enzima GoTaq® DNA polimerase (1U).

10 μ L de tampão GoTaq® (5x).

10 μ L de DNA genômico (~150 ng).

Volume final por reação: 50 μ L. Os parâmetros ajustados no termociclador Biometra® foram:

- VI. 95°C por 2 minutos.
- VII. 95°C por 1 minuto.
- VIII. 52°C por 1 minuto.

- IX. 72°C por 1 minuto.
- X. 72°C por 5 minutos.

Ambas amostras foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) após eletroforese em gel de agarose 1%.

3.6 Digestão enzimática do plasmídeo pET28a

Para digestão do plasmídeo pET28a, o qual foi extraído como descrito no item 3.3, foram preparadas reações em tubos de 0,5 mL estéreis para um volume final de 20µL, onde continha os seguintes componentes:

- 2 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 10x (Promega®).
- 2 µL de tampão 10x multicore (Promega®).
- 1 µg de DNA plasmidial.
- 1 µL da enzima de restrição *NheI* (10U).
- 1 µL de *BamHI* (10U).

As enzimas de restrição permaneceram em suporte gelado durante todo o procedimento. Os tubos foram incubados em termociclador Biometra® a 37° C durante 3 horas, seguido da etapa de inativação enzimática a 65°C durante 15 minutos.

Posteriormente, o plasmídeo digerido foi submetido a tratamento enzimático com fosfatase alcalina (5U), onde aos 20µL da reação de digestão foram acrescentados 2,5 µL de tampão 10x para fosfatase e 1µL de enzima (volume final de reação: 25 µL). A mistura reacional foi incubada a 37°C por 1 hora, com inativação da enzima a 65°C por 15 minutos.

3.7 Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose 1%, constituído de 1 g de agarose em 100 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), foi submetido à corrida eletroforética aplicando voltagem de 100V e amperagem de 100 mA. As amostras de DNA obtidas por PCR foram preparadas para um volume final de 12 µL, contendo 10 µL de DNA e 2 µL de tampão de amostra, o qual continha glicerol, azul de bromofenol e GelRed® diluído 5x. Utilizou-se 7 µL do marcador de peso molecular de 1 Kb (Ludwing Biotech®). A visualização de bandas foi feita sob luz UV.

3.8 Purificação de amostras a partir de excisão do gel de agarose 1% e de solução

A purificação de DNA plasmidial digerido e dos fragmentos gênicos *ansZ* e *ansB* amplificados, ocorreu a partir de banda excisada do gel de agarose 1% (plasmídeo digerido) e de solução (produto de PCR), seguindo as instruções contidas no manual do fabricante do kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System*. As amostras foram eluídas em 50 µL, concentradas para 20 µL em SpeedVac (GE®), quantificada em aparelho *NanoDrop* (ThermoScientific®) e armazenada a -20°C.

3.9 Ligação entre o vetor e o inserto

Para calcular a quantidade de inserto utilizada para preparar uma reação de ligação ao vetor a seguinte equação foi adotada (sugerida pelo fabricante da enzima DNA ligase):

$$\frac{\eta\text{g de vetor}}{\text{kb de vetor}} \times \text{razão molar (inserto : vetor)} = \eta\text{g de inserto}$$

A partir desse cálculo, a ligação do gene *ansZ* e *ansB* ao pET28a prosseguiu utilizando tubos de 1,5 mL contendo:

- 7 µL de vetor (~100 ηg).
- 3 µL de inserto (~80 ηg/cada).
- 2 µL de tampão da ligase (10x).
- 1 µL de enzima ligase (1U).

Volume final de reação: 20 µL.

A mistura reacional foi incubada a 4°C *overnight* (~16h), e o bloqueio da reação de ligação foi feito mediante tratamento térmico a 65°C por 15 minutos.

3.10 Transformação bacteriana

A cepa de clonagem *E.coli* TOP10 em alíquotas de 100 µL de foi descongelada em banho de gelo, adicionou-se 40 µL de uma solução estoque de KCM (2,5x) e 6 µL de DNA (plasmídeo recombinante produto da reação de ligação) completando o volume final

para 200 μL . Essa mistura permaneceu em banho de gelo por 20 minutos, repousando posteriormente por 10 minutos em temperatura ambiente. Para a fase de regeneração celular, adicionou-se 800 μL de meio LB (Sigma-Aldrich®), incubando por 1 hora a 37°C sob agitação orbital de 200 rpm. Centrifugou-se o meio de cultivo regenerado a 2.000 xg por 2 minutos, descartando 950 μL do sobrenadante e ressuspendendo, gentilmente, o precipitado celular nos 50 μL restantes, seguido de plaqueamento em meio LB ágar (Invitrogen®) acrescido de antibiótico canamicina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas permaneceram em estufa bacteriológica a 37°C por 16 horas.

A transformação de *E. coli* Rosetta, utilizada para expressão heteróloga, ocorreu adicionando-se 10 μL de MgCl_2 (0.1 M), 5 μL de CaCl_2 (0.1 M), 1 μL de pET28a-*ansZ* ou pET28a-*ansB* (~80 ηg), completando-se o volume final para 50 μL . No controle, foi adicionado 1 μL de água ultrapura. A este volume foram acrescentados 50 μL de bactérias quimiocompetentes, as quais repousaram por 20 minutos em gelo, seguidos de 15 minutos de banho seco a 37°C, retornando ao banho de gelo por 2 minutos. Às células, adicionou-se 900 μL de meio LB iniciando o passo de regeneração, onde os tubos permaneceram sob agitação por 1 hora a 37°C e 200 rpm. Após incubação, os meios de cultivo foram centrifugados a 10.000 xg por 3 minutos, descartando 950 μL de sobrenadante e homogeneizando gentilmente o pellet em um restante de solução. Plaqueou-se 50 μL do homogeneizado 10 mL de meio LB ágar, contendo antibióticos cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) correspondendo a resistência da Rosetta e canamicina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de resistência do vetor pET28a, incubando overnight, a 37°C, em estufa bacteriológica.

3.11 PCR de colônias transformadas para diagnóstico de clonagem

Após transformação de *E. coli* TOP10 quimiocompetente com o plasmídeo recombinante pET28a-*ansZ*, 10 colônias foram selecionadas e submetidas a uma PCR de colônia. Em tubos 0,2 mL estéreis adicionou-se 22,5 μL de Master Mix (mistura de tampão, dNTP's, magnésio e DNA polimerase), 1 μL de primer T7*pro* e 1 μL de primer T7*ter* (0,2 mM de concentração final), 0,5 μL de água pura e DNA proveniente de esfregaço das colônias de TOP10. Os parâmetros utilizados no termociclador Biometra® foram:

- I. 95°C por 2 minutos.
- II. 95°C por 30 segundos.

- III. 55° C por 30 segundos.
- IV. 72° C por 30 segundos.
- V. 72° C por 10 minutos.

Os passos II a IV foram repetidos 29 vezes, totalizando 30 ciclos.

Posteriormente, fez-se uma eletroforese em gel de agarose para visualização das bandas por luz UV, seguido de confecção de pré-inóculos em meio LB (5 mL) contendo antibiótico de resistência canamicina (40 µg/mL), onde cada colônia foi esfregada com auxílio de uma ponteira estéril, e incubada a 37°C *overnight*. A extração de DNA recombinante deu-se como descrito no tópico 3.3 desse trabalho, sendo quantificado e enviado para sequenciamento automático de nucleotídeos na unidade da Fiocruz-PE em Recife. A estocagem das colônias positivas se deu em glicerol 50% a -80°C.

3.12 Expressão heteróloga de L-asparaginase II em sistema procarioto (*E. coli* Rosetta)

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

Para um ensaio de teste de expressão, utilizou-se 50 mL de meio LB, previamente, autoclavado, adicionando 500 µL de MgCl₂ (0,1 M), 80 µL de canamicina (40 µg/mL), 50 µL de cloranfenicol (34 µg/mL), e 1 mL de meio de cultura crescida. Essa cultura foi incubada em *shaker* a 37°C e 200 rpm, medindo-se a densidade ótica (D.O) até que esta atingisse absorvância 0.5 a 600 nm. A expressão foi induzida adicionando isopropil-β-D-tiogalactopiranosose (IPTG) com uma concentração final de 0,5 mM, incubando o meio inoculado a 30°C por 4 horas em *shaker* a 200 rpm. Foram retiradas alíquotas de 1 mL a cada hora, medindo sua D.O_{600nm}, com posterior centrifugação a 7.000 xg por 5 minutos em temperatura ambiente, descartando o sobrenadante e armazenando o precipitado celular (*pellet*) a -20°C. Ao final da expressão, todo o meio de cultivo foi transpassado para tubo Falcon estéril de 50 mL, centrifugando a 4.000 xg por 30 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante e armazenando o *pellet* a -20° C.

Após confirmação da expressão por SDS-PAGE (item 3.13), realizou-se nova expressão heteróloga em volume maior de meio LB (250 mL), ao qual foram adicionados 2,5 mL de MgCl₂ (0,1 M), 400 µL de canamicina (40 µg/mL) 250 µL de cloranfenicol (34 µg/mL), e 5 mL de meio de cultura crescida. O meio de cultivo inoculado foi incubado em *shaker* a 37°C e 200 rpm, medindo-se a densidade ótica (D.O) até que esta atingisse absorvância 0.5 a 600 nm. Assim como no teste de expressão, a indução se deu utilizando IPTG (0,5 mM) com incubação por 4 horas a 30°C sob agitação magnética. Foram separadas apenas alíquotas (1mL) dos tempos t₀ e t₄, correspondentes ao início e fim da expressão, submetidos a centrifugação a 7.000 xg por 5 minutos e armazenamento dos *pellets* a -20°C.

3.13 Lise celular por sonicação

A lise celular foi feita por sonicação, utilizando-se processador ultra-sônico UP50H da Hielscher Ultrasonics GMBH©, configurado para 50% de amplitude. O *pellet* referente ao teste de expressão foi resuspendido em 3 mL de tampão de lise (Tris 50 mM e NaCl 300 mM contendo 20 mM de Imidazol (pH 8)), 20 µL de Triton X100 e 100 µL de PMSF (0,03 mM). A amostra seguiu para o passo de sonicação com ciclos de 30 segundos de ultrassom e 30 segundos em repouso, alternados, por cerca de 20 repetições, até obter uma mistura homogênea. O lisado celular foi centrifugado a 10.000 xg por 30 minutos a 4° C para separação entre os *debris* celulares e a fração solúvel, uma alíquota de 100 µL do lisado foi centrifugada separadamente, a fim de ser utilizada em eletroforese (SDS-PAGE) para avaliar sua solubilidade da L-asparaginase II heteróloga.

3.14 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

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

Os *pellets* de cada hora de expressão bem como as de sobrenadante e precipitado após a lise celular foram preparadas em tubos de 1,5 mL da seguinte forma: aos pellets e ao

precipitado pós-sonicação foram adicionados 30 μ L de tampão de amostra (5x), ressuspendendo delicadamente por pipetagem; a 30 μ L de sobrenadante foram adicionados 6 μ L de tampão de amostra (5x); todas as amostras passaram por tratamento térmico a 100°C por 10 minutos e ao gel de poliacrilamida foram aplicadas em cerca de 20 μ L.

3.15 Purificação de L-asparaginase II recombinante

3.15.1 Cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC)

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

As alíquotas em tampão contendo 300 mM de imidazol foram reunidas, dialisadas em tampão Tris 50mM e NaCl 300 mM (pH 8,6) e concentradas em aproximadamente 5 mL, com auxílio de Vivaspin (GE Healthcare®) com membrana de 10 kDa, sendo armazenada em glicerol 25% a -20°C, e em tampão a 4°C.

3.15.2 Cromatografia de Troca Iônica

Uma cromatografia de troca iônica foi realizada em FPLC *ÄKTApurifier* 10 (GE Healthcare®), para repurificar amostra de Bc_LASNaseII anteriormente purificada por

IMAC, utilizando como fase estacionária uma coluna MonoQ de troca aniônica, a qual foi equilibrada com tampão contendo 20 mM de Tris pH 8,0 (tampão A), e a vazão ajustada a 1 mL·min⁻¹.

Aproximadamente, 2 mL de proteína previamente dialisada em tampão A, foi filtrada em membrana de 0,22 mm e mantida em banho de gelo e injetada ao sistema cromatográfico. A metodologia de eluição adotada foi por gradiente salino, através de tampão Tris 20 mM contendo 1 M de NaCl em pH 8,0 (tampão B).

As alíquotas de 1 mL da eluição da proteína, correspondente à porcentagem de sal aplicado, foram armazenadas a 4°C, sendo 30 uL reservados para aplicação em gel de poliacrilamida 12%.

3.16 Quantificação de proteína

A quantificação das proteínas recombinantes de *E. coli* (Ec_LASNase II) e *B. subtilis* (Bc_LASNase II) foi realizada por espectrofotometria em *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific®) adotando a leitura em comprimento de onda de 280 nm. As absorbâncias medidas foram correlacionadas ao coeficiente de extinção molar das respectivas proteínas, obtidos através do software *ProtParam tool*, hospedado no portal *Expasy Bioinformatic Resources*, a partir da sequência primária das mesmas.

3.17 Atividade enzimática de L-asparaginase II

3.17.1 Curva padrão

Uma curva padrão utilizando sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) foi construída a partir de uma solução estoque de 6 mM de (NH₄)₂SO₄. Em tubos de 2 mL estéreis, 800µL de tampão Tris 50 mM e NaCl 300 mM (pH 8,0) foram adicionados a diferentes volumes de solução estoque de (NH₄)₂SO₄, produzindo diluições seriadas cuja concentração final variou de 0,395 µM a 3 µM de íon amônio (NH₄⁺), completando o volume final para 1,7 mL. Cada diluição foi realizada em duplicata. As diluições foram incubadas a 37°C por 30 minutos, e ao final adicionou-se 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M realizando centrifugação a 10.000 xg por 3 minutos.

Para reação colorimétrica, adicionou-se 200 µL das diluições de (NH₄)₂SO₄ a 500 µL de reagente de Nessler, completando o volume para 5 mL com água destilada. A quantificação foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 436 nm e os dados de absorbância foram plotados em gráfico linear.

3.17.2 Atividade enzimática e curva de pH

A atividade enzimática das Bc_LASNaseII e Ec_LASNaseII foi medida utilizando 800 µL de tampão, 800 µL de L-asparagina 189 mM e 100µL de enzima recombinante, sendo o volume final de reação completados para 1,8 mL. A mistura reacional foi incubada a 37°C por 30 minutos e bloqueada com 100 µL de TCA 1,5 M, realizando centrifugação a 10.000 xg por 3 minutos. Como branco, realizou-se a adição de 100 µL de enzima correspondente após adição do TCA 1,5 M.

Para reação colorimétrica, adicionou-se 200 µL de cada L-asparaginase recombinante a 500 µL de reagente de Nessler, completando o volume de 5 mL com água destilada. A quantificação foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 436 nm e os dados de absorbância foram plotados em gráfico linear. A determinação da influência da atividade sobre o pH foi feita em diferentes tampões, variando de pH 3 a 9. Tampão citrato-fosfato 50mM foi utilizado para preparar tampões na faixa entre pH 3,0 e pH 7,0, enquanto tampão Tris-HCl 50mM foi utilizado na faixa de pH 7,0 a pH 9,0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Alinhamento de sequências

Proteínas cujas sequências aminoacídicas são conservadas podem estar relacionadas dentro de um contexto evolutivo e apresentar alto grau (%) de identidade e similaridade quando realiza-se um alinhamento de sequências. Enquanto a identidade leva em consideração a presença de aminoácidos idênticos em uma mesma posição em ambas as sequências alinhadas, a similaridade indica mudanças entre aminoácidos não idênticos, mas que compartilham características bioquímicas comuns, posicionados de forma alinhada em ambas as sequências comparadas (HÖLTJE; FOLKERS, 1997).

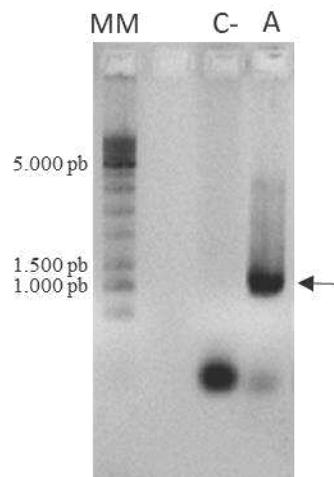
O alinhamento de sequências primárias de L-asparaginase II de *B. subtilis* (Bc_LASNaseII), *E. coli* (Ec_LASNaseII) e *E. chrysanthemi* (Er_LASNaseII) foi realizado

Esses resultados são validados em MINTON *et al.* (1986), que observou 56% de identidade entre Bc_LASNaseII e Er_LASNaseII, e em BONTHRON (1990), o qual indicou 53% de identidade quando comparada a Ec_LASNaseII. As pequenas diferenças de valores de porcentagem podem ser explicadas pelo fato de as sequências de aminoácidos alinhadas nesse trabalho não terem incluída a sequência do peptídeo sinal de cada proteína.

4.2 Amplificação gênica e clonagem molecular

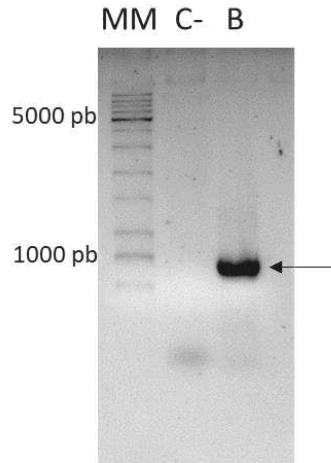
O gene *ansZ* de *B. subtilis* codifica uma L-asparaginase II com 375 aminoácidos de sequência primária predita, incluindo o peptídeo sinal, sendo que a proteína madura possui 352 aminoácidos. O gene *ansB* de *E. coli*, por sua vez, codifica uma proteína de 348 aminoácidos, ficando com 326 aminoácidos após clivagem do peptídeo sinal. Assim, os tamanhos das sequências nucleotídicas das asparaginases codificadas pelos genes *ansZ* e *ansB* são de 1.056 e 978pb, respectivamente. Tais valores puderam ser confirmados por PCR a partir do DNA genômico, onde as bandas correspondentes aos genes amplificados indicam tamanhos próximos de 1.000 pares de base (figuras 8 e 9).

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo o produto da amplificação do gene *ansZ* por PCR, a partir do DNA genômico de *B. subtilis*.



Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador de peso molecular 1 kb (Ludwig Biotec®), controle negativo. A: gene *ansZ* amplificado.

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo o produto da amplificação do gene *ansB* por PCR, a partir do DNA genômico de *E. coli*.

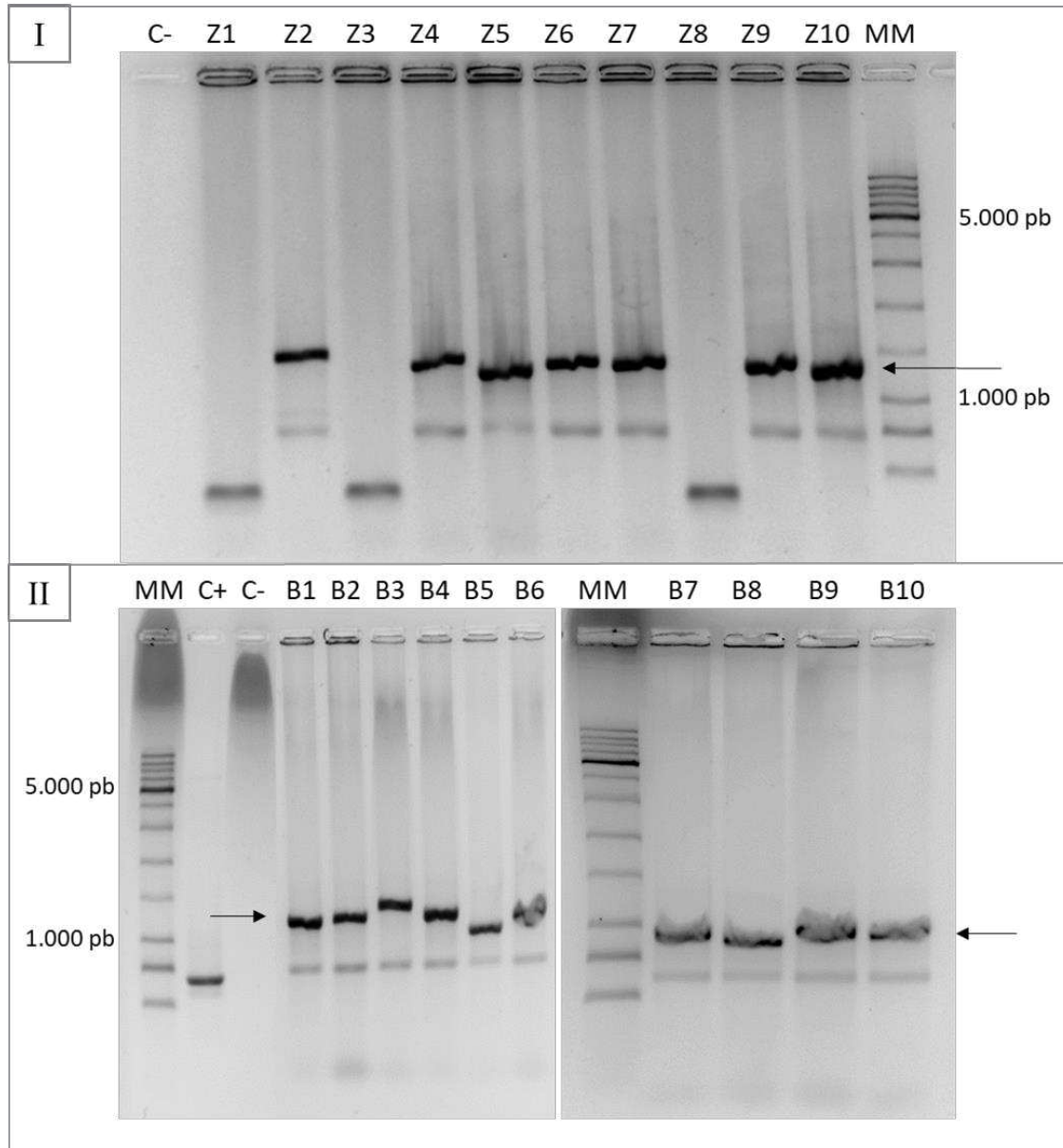


Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador de peso molecular 1 Kb (Ludwing Biotec®), C-: controle negativo, B: gene *ansB* amplificado.

Após amplificação, os genes *ansZ* e *ansB* foram digeridos e ligados ao vetor pET28a, para criação dos vetores pET28a-*ansZ* e pET28a-*ansB*. O produto da ligação foi transformado em cepas de *E. coli* top10 competente e o sucesso da clonagem gênica foi avaliada por PCR de colônia, cujo resultado é mostrado na figura 10. Em I, sete das colônias apresentaram-se positivas para pET28a-*ansZ*, e em II 10 colônias para pET28a-*ansB*, evidenciados pelas bandas entre 1.000 e 1.500 pares de base.

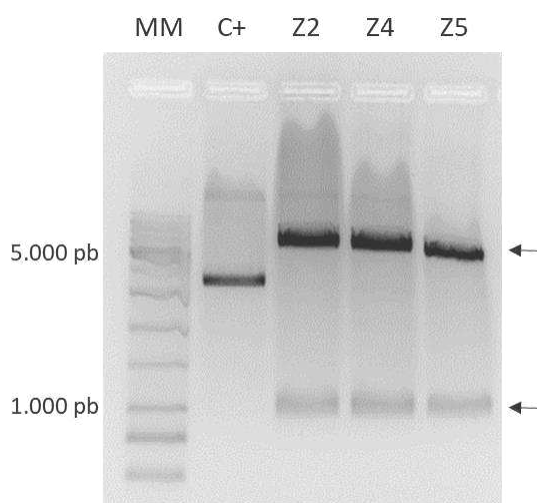
O êxito da transformação bacteriana com o vetor recombinante pET28a-*ansZ* foi confirmado também mediante teste de digestão com enzimas de restrição *NheI* e *BamHI*, onde três das sete colônias positivas (Z2, Z4 e Z5) foram avaliadas. Como apresenta a figura 11, as três colônias apontam liberação do inserto entre 1.000 e 1.500 pb, enquanto o vetor pET28a, que possui 5.369 pares de base, apresenta-se acima da linha do marcador de 5.000 pb no gel.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR de colônias transformadas com plasmídeo recombinante pET28a-*ansZ* e pET28a-*ansB*.



Fonte: Elaborada pela autora. Em I: C-: controle negativo, Z1 a Z10: colônias *E. coli* TOP10 transformadas com pET28a-*ansZ*. MM: marcador de peso molecular 1 kb (Promega®). Em II: MM: marcador de peso molecular 1 kb (Promega®), C+: DNA previamente amplificado, C-: controle negativo, B1 a B10: colônias *E. coli* TOP10 transformadas com pET28a-*ansB*.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% do teste de digestão de colônias *E. coli* TOP10 transformadas.

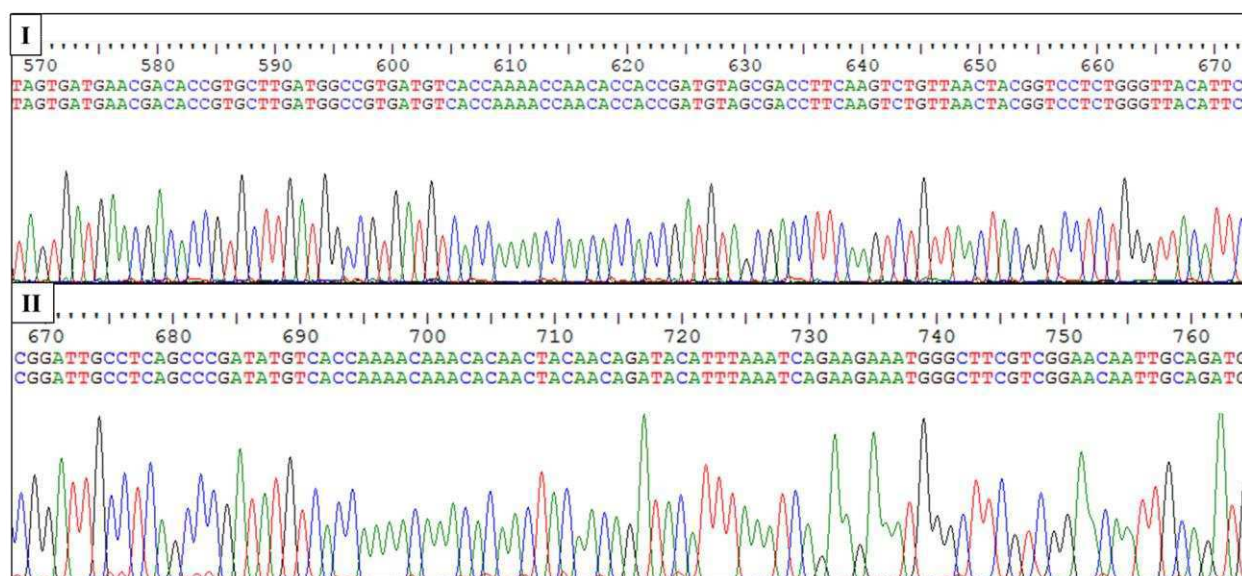


Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador molecular, C+: controle positivo com pET22b vazio. Z2, Z4 e Z5: colônias *E. coli* TOP10 transformadas com o plasmídeo recombinante pET28a-*ansZ*.

As colônias positivas de pET28a-*ansB* não passaram por teste de digestão enzimática, sendo selecionadas três delas (B2, B3 e B4) para extração de DNA plasmidial. Posteriormente, as amostras do DNA plasmidial foram enviadas para sequenciamento automático de nucleotídeos na Plataforma de Sequenciamento de DNA da Fiocruz Pernambuco e a análise comparativa entre as sequências de *ansZ* e *ansB* obtidas e aquelas depositadas em banco de dados, foi feita através do software *BioEdit*, (figura 12), que constatou a não existência de mutações nas sequências gênicas de interesse.

Após confirmação das sequências corretas dos referidos genes, o DNA recombinante referente às colônias Z2 e B3 foi utilizado para transformação bacteriana da cepa de expressão *E. coli* Rosetta, para posterior expressão heteróloga das respectivas proteínas (Bc_LASNaeII e Ec_LASNseII).

Figura 12. Análise de sequenciamento dos genes *ansZ* e *ansB* com suas respectivas seqüências nativas.



Fonte: Elaborada pela autora. Perfil de eletrograma do sequenciamento automático de nucleotídeos analisado em software *BioEdit*. Em I: parte da seqüência nucleotídica do gene *ansB*. Em II: parte da seqüência nucleotídica do gene *ansZ*.

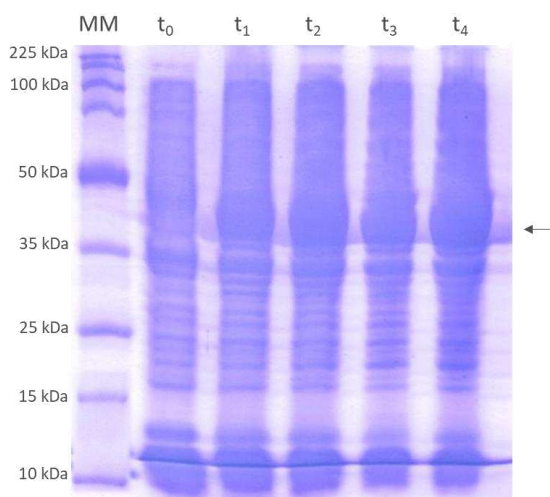
4.3 Expressão heteróloga de L-asparaginase II de *B. subtilis* e de *E. coli* em sistema bacteriano

A cepa *E. coli* Rosetta transformada com os vetores pET28a-*ansZ* e pET28a-*ansB* foi usado para expressão de L-asparaginase II de *B. subtilis* (Bc_LASNaseII) e *E. coli* (Ec_LASNaseII). A expressão das proteínas recombinantes foi feita em meio LB, a 37 °C e induzida por IPTG. Aliquotas de 1mL do meio de expressão a cada hora após a indução, foram coletadas, centrifugadas, sendo os *pellets* ressuspensos em tampão de amostra e aplicados em um gel de poliacrilamida 12%, respeitando a proporcionalidade da D.O_{600nm} medida, exceto a alíquota da quarta hora (t4), o qual foi aplicado todo volume que suporta o poço (25 uL) a fim de garantir correta visualização.

O resultado da eletroforese em condições desnaturantes, apresentado na figura 13, indica que a enzima Bc_LASNaseII recombinante manteve-se expressa durante as quatro horas de expressão, uma vez que é possível notar um padrão de banda gradual de 40 kDa de tamanho aproximado. Como esperado, no início da indução (t0), não se nota a presença da proteína recombinante, uma vez que o gene *ansZ* só é expresso mediante presença do indutor IPTG. Ao ser adicionado ao meio de cultivo, cujas bactérias estão em sua fase exponencial de

crescimento, o agente de indução promove a expressão de forma contínua e gradual, como observado na raia referente à primeira hora (t1) até a da última hora (t4).

Figura 13. SDS-PAGE para expressão de Bc_LASNaseII recombinante em sistema bacteriano.

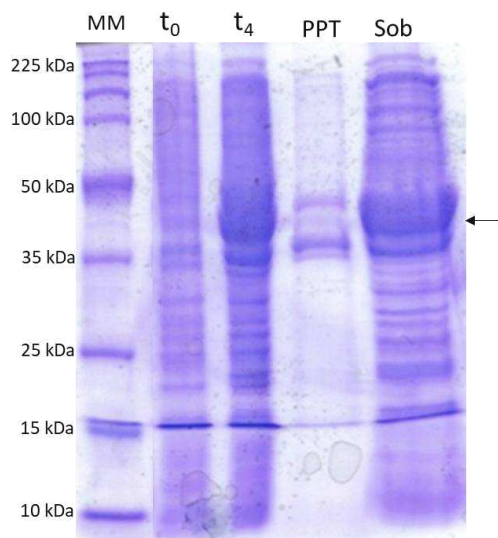


Fonte: Elaborada pelo autora. Géis de poliacrilamida 12%. MM: marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega®); t0: tempo zero (momento de indução); t1 a t4 (cada hora de expressão).

A sequência primária da L-asparaginase II de *B. subtilis*, predita em banco de dados, possui em torno de 37.5 kDa de peso molecular (sem o peptídeo sinal), no entanto a expressão no vetor pET28a adiciona uma sequência rica em histidina (*His-tag*) na porção N terminal da proteína expressa, que possui cerca de 2,5kDa. Os dados obtidos corroboram com a literatura em AZARA *et al.* (2014), que expressou L-asparaginase II de *B. subtilis* em pET21d(+), obtendo uma proteína heteróloga com banda cujo tamanho estimado foi de 43 kDa.

A partir desse resultado, fez-se uma nova expressão em volume maior de meio de cultivo (250 mL), seguindo os mesmos parâmetros do teste anterior, com o objetivo de avaliar a solubilidade da proteína Bc_LASNaseII. Na figura 14, observa-se que a proteína expressa apresentou-se majoritariamente na forma solúvel, estando presente na fração relativa ao sobrenadante pós-sonicação, como indica o padrão de banda na raia “Sob”, de tamanho estimado de aproximadamente 40 kDa. Logo, é possível inferir o correto enovelamento da enzima, assim como sua possível atividade preservada.

Figura 14. SDS-PAGE de ensaio de solubilidade da Bc_LASNaseII recombinante pós-sonicação.

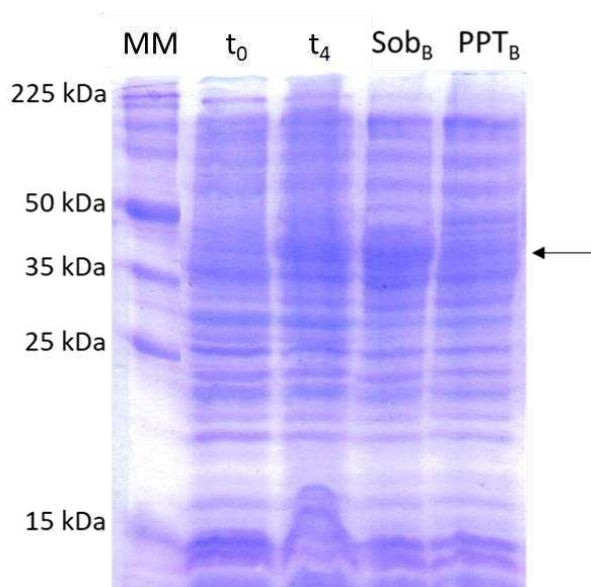


Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega®), t0: tempo zero (momento de indução); t4 (última hora de expressão); PPT: precipitado celular pós-sonicação; Sob: sobrenadante pós sonicação.

Com relação a expressão da L-asparaginase II de *E. coli* (Ec_LASNaseII) o tamanho esperado da proteína recombinante, incluindo a porção do *His-tag*, é cerca de 37 kDa. A eletroforese em condições desnaturantes apresentada na figura 15, aponta presença de Ec_LASNaseII (~40 kDa), sendo como resultado da expressão heteróloga, a ausência da proteína imediatamente após adição do indutor (t0) e sua presença na fração correspondente à quarta hora de ensaio (t4), como mostrado também por VIDYA *et al.* (2011).

Quanto à solubilidade, pode-se afirmar que grande parte da enzima recombinante fez presente na fração solúvel (Sob_B), após o rompimento das células por sonicação, apesar de observar banda correspondente à mesma proteína na fração referente ao precipitado celular (PPT_B). Este resultado apresentou que a enzima Ec_LASNaseII também mostrou um correto enovelamento durante a expressão heteróloga, minimizando a formação de agregados proteicos, conhecidos como corpos de inclusão.

Figura 15. SDS-PAGE de ensaio de solubilidade de Ec_LASNaseII recombinante pós sonicação.



Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega®), t0: tempo zero (momento de indução); t4 (última hora de expressão); Sob_B: Sobrenadante pós-sonicação; PPT_B: precipitado celular pós-sonicação.

4.4 Purificação de L-asparaginase II recombinante por IMAC e Troca Iônica

As sequências primárias de Bc_LASNaseII e de Ec_LASNaseII receberam seis histidinas na sua porção N terminal pelo vetor de expressão pET28a. Por apresentarem estruturalmente um anel imidazólico, as histidinas interagem fortemente com íons metálicos, no caso com o níquel (Ni^{+2}), como relatado por GRABERC-POREKAR e MENART (2001) apresentando-se como uma metodologia consolidada de purificação de enzimas contendo sequências de histidinas adicionadas à sua estrutura.

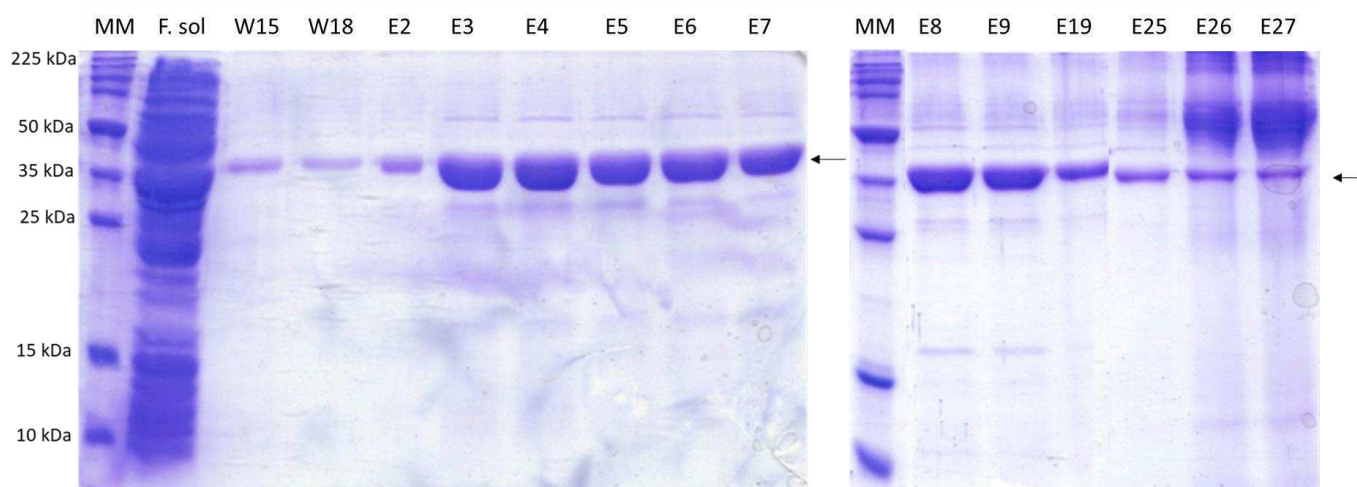
A eluição das proteínas aderidas na coluna foi feita com alta concentração de imidazol (300mM) e cerca de 30 mL de fração protéica foram coletados, uma vez que a absorbância a 280 nm foi sendo monitorada por espectrofotometria e variou de 0,485 a 0,030, indicando a presença de proteína em solução. Os géis de poliacrilamida 12% mostrados nas figuras 16 e 17 apresentam bandas referentes as enzimas recombinantes purificadas, com tamanho aproximada de 40 kDa. A purificação de Bc_LASNaseII e Ec_LASNaseII é apontada desde a fração solúvel após a sonicação, persistindo na fração de lavagem com

tampão contendo 100 mM de imidazol, e em todas as alíquotas de eluição, contendo 300 mM de imidazol (E1 a E30 e E2 a E27, respectivamente).

Sabendo que o mecanismo de interação entre os grupos His e os íons metálicos conjugados à resina cromatográfica é a estratégia utilizada na purificação de proteínas recombinantes, a obtenção de L-asparaginase II recombinante por meio de IMAC apresentou-se satisfatória, uma vez que possibilitou separá-las de grande parte das proteínas citosólicas expressas pela bactéria *E. coli* Rosetta. Esse resultado corrobora com a literatura em FENG *et al.* (2016), onde obteve-se L-ASNase II de *B. subtilis* purificada por cromatografia de afinidade com Ni⁺ imobilizado.

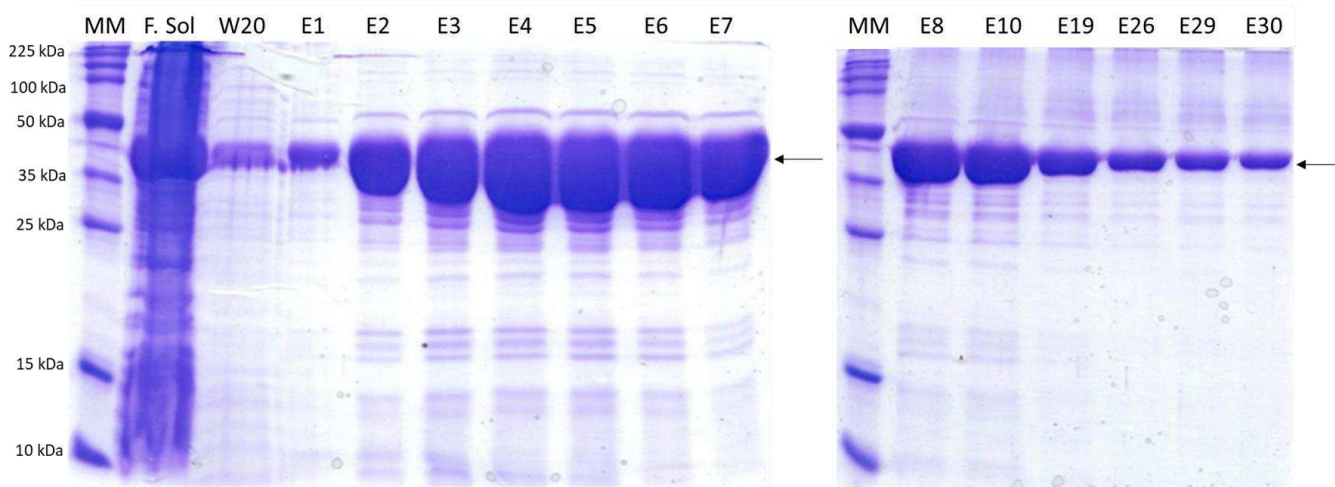
Entretanto, o volume de eluição coletado (~30 mL), bem como o grau de pureza das amostras, indica ser necessário a adoção de uma metodologia mais eficiente de purificação da enzima em questão.

Figura 16. SDS-PAGE de purificação da Ec_LASNaseII recombinante por cromatografia de afinidade.



Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador MM: marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega®), F. sol: fração solúvel, W 15 e 18: lavagem com tampão contendo 100 mM de Imidazol, E 2 a 7: alíquotas de eluição com tampão contendo 300 mM de Imidazol.

Figura 17. SDS PAGE de purificação de Bc_LASNaseII recombinante por cromatografia de afinidade.

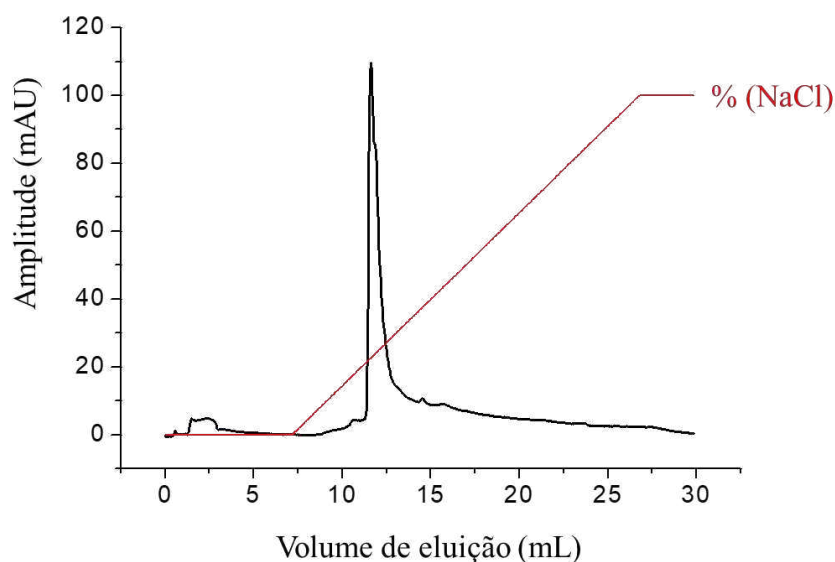


Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega®), F. sol: fração solúvel, W20: lavagem com 100 mM de imidazol, E1 a E30: eluídos com 300 mM de imidazol.

A fim de aumentar seu grau de pureza, visando ensaios cristalográficos, a amostra de Bc_LASNaseII recombinante foi submetida a uma nova purificação, adotando o método de Cromatografia de Troca Iônica, através de coluna *MonoQ* aniônica acoplada a sistema FPLC *ÄKTA*. Essa metodologia de purificação se baseia no sinal e magnitude da carga elétrica final da proteína de interesse em pH pré-estabelecido, onde aplicando-se um gradiente salino (neste caso, tampão Tris contendo NaCl 1 M) é possível desligar a biomolécula que havia interagido anteriormente com a fase estacionária carregada positivamente (NELSON; COX, 2014).

O cromatograma representado na figura 18, apresenta o perfil de eluição da proteína Bc_LASNaseII, onde um pico principal entre 10 e 15 mL indica o desligamento da proteína pela injeção de NaCl à matriz. O ponto de amplitude máxima (entra 100 e 110 mAU) corresponde à alíquota E12 representada na figura 18, obtida com 42,2% de gradiente salino.

Figura. 18. Cromatograma de eluição da L-asparaginase II de *B. subtilis* por cromatografia de troca iônica por meio de sistema *ÄKTA*.

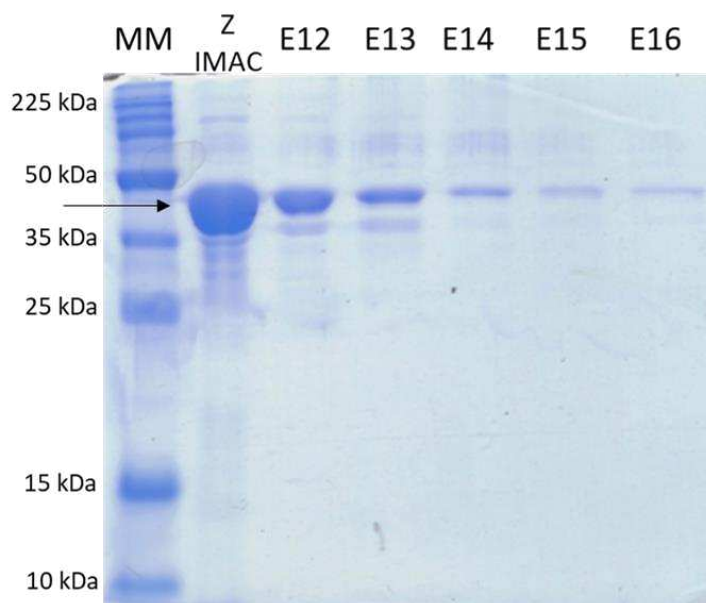


Fonte: Elaborada pela autora. Em preto: perfil de eluição da amostra. Em vermelho: perfil de injeção de NaCl em porcentagem (tampão B).

Analisando a figura 19, as raíes E12 a E16 correspondentes às frações de eluição entre 12 e 16 mL, apresentam perfil mais límpido quando comparadas à raia Z IMAC, correspondente à purificação por IMAC. No entanto, ainda é possível notar a presença de bandas que não correspondem à L-asparaginase II de interesse, indicando provável contaminação e necessidade de maiores ajustes nos métodos de purificação até aqui utilizados. Em ZHANG *et al.* (2017), a cromatografia por troca iônica utilizando coluna aniônica obteve amostra de proteína bastante límpida, quando comparada à de afinidade adotada pelo referido autor.

Vale ressaltar que no novo passo cromatográfico, utilizando o equipamento FPLC *ÄKTA*, alcançou um volume de eluído menor (~5 mL) do que os 30 mL coletados pela cromatografia de afinidade, feito em sistema de bancada.

Figura 19. SDS-PAGE de purificação por Cromatografia de Troca.



Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador. Z IMAC: amostra de L-ASNase II de *B. subtilis* obtida por IMAC. E12 a E16: alíquotas eluídas indicadas pelo cromatograma em gradiente salino.

Quanto ao rendimento alcançado em cada purificação, a cromatografia de afinidade com íon Ni^{+2} imobilizado rendeu cerca de 3,9 mg de Bc_LASNaseII e 1,1 mg de Ec_LASNaseII purificada, a partir de 250ml de meio de expressão.

4.5 Quantificação de proteínas

A quantificação de Ec_LASNaseII e Bc_LASNaseII após purificação por cromatografia de afinidade baseou-se na leitura de absorvância em comprimento de onda de 280 nm, correlacionando com os valores do coeficiente de extinção molar de cada proteína. Para realização das leituras, os *pools* de eluição foram reunidos, dialisados e concentrados para volume de 2mL, através do sistema de filtração Vivaspin. Os dados de absorvância foram cruzados com os obtidos pelo software *ProtParam tool*, hospedado no portal *Expasy Bioinformatic Resources*, a partir da sequência primária das referidas proteínas. Tais resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Dados de quantificação de proteínas por espectrofotometria.

Proteína	Absorbância (280 nm)	Massa Molecular (Da)	Coefficiente de extinção molar ($M^{-1} cm^{-1}$)	Concentração (mg/mL)
Bc_LASNaseII	0,802	39.915,73	16.390	1,95
Ec_LASNaseII	0,330	37.046,57	23.505	0,52

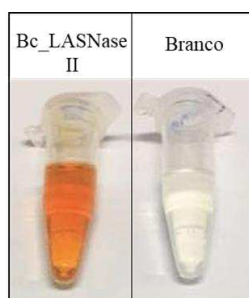
Fonte: Elaborada pela autora. Cruzamento dos dados de quantificação de proteína por espectrofotometria (280 nm) e das respectivas sequências primárias de L-ASNase II.

4.6 Caracterização bioquímica

4.6.1 Atividade enzimática e curva de pH

A avaliação da atividade enzimática das duas L-asparaginases II recombinantes ocorreu por meio de ensaio colorimétrico com Reagente de Nessler, metodologia largamente empregada para determinação da concentração e eficiência hidrolítica de enzimas asparaginolíticas. O agente colorimétrico em questão é uma solução alcalina forte de tetraiodomercurato II de potássio, o qual reage com os íons amônio formados pela hidrólise enzimática de L-asparagina (WRISTON e YELLIN, 1973), produzindo composto amarelo-acastanhado, como ilustrado pela figura 19.

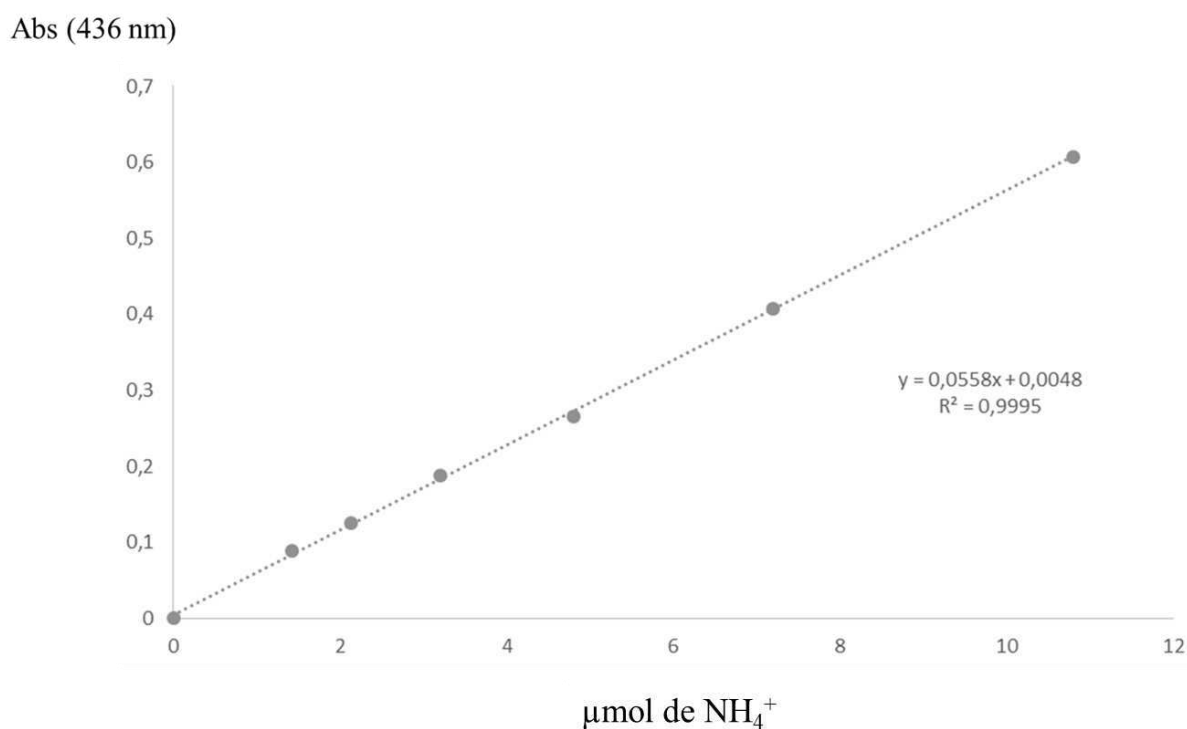
Figura 20. Ensaio enzimático preliminar com Reagente de Nessler



Fonte: Elaborada pela autora. Bc_LASNaseII: amostra reacional de L-asparaginase II de *B. subtilis* (~48,8 μM) adicionada ao reagente de Nessler; Branco: sem enzima.

A quantidade do composto colorimétrico formado no teste de atividade enzimática pode ser associado a um valor quantitativo de amônia liberada, através da construção de uma curva padrão. Para isso diluições seriadas de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) foi feita e revelada pelo reagente de Nessler, utilizando os mesmos parâmetros daqueles utilizados para o teste de atividade enzimática. Sabendo que o valor do coeficiente de determinação da regressão (R²) expressa numericamente a variação total do sinal analítico (x), representado por μmol de sulfato de amônia, e pela variação da concentração do analito (y), correspondente a absorbância a 436 nm, o valor R² atribuído à reta obtida nesta curva padrão foi consideravelmente satisfatório para baseamento dos dados de atividade enzimática subsequentes.

Gráfico 1. Curva padrão de Sulfato de Amônio (NH₄)₂SO₄.



Fonte: Elaborado pela autora. Eixo x: μmol de sulfato de amônia; Eixo y: absorbância a 436 nm.

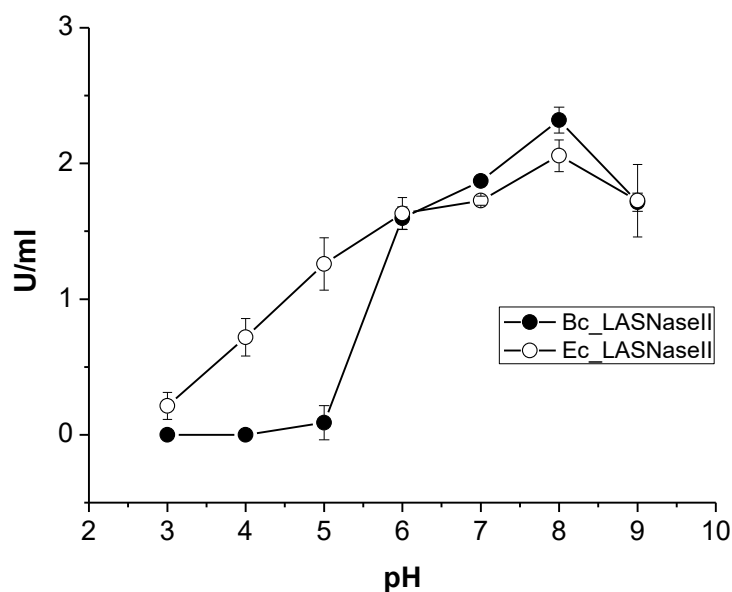
A avaliação da atividade enzimática das L-asparaginases recombinantes frente a diferenças de pH e temperatura é um fator importante a considerar como análise preliminar de uma possível aplicação biotecnológica dessas biomoléculas. No caso de enzimas de

importância farmacológica, essa avaliação leva em conta possíveis efeitos de redução da atividade enzimática em ensaios *in vitro* ou *in vivo*.

Tanto as L-asparaginase II de *B. subtilis* quanto a de *E. coli* apresentaram pH de atividade máxima de 8,0. No entanto, o desempenho hidrolítico da Bc_LASNaseII (2,31 U/mL) foi maior que a Ec_LASNaseII (2,05 U/mL), como mostrado no gráfico 2. Isso poderia indicar que, a L-asparaginase II de *B. subtilis* tem uma maior atividade hidrolítica do substrato L-asparagina que a de *E. coli* sob o mesmo pH, resultado que ratifica a literatura em ONISHI *et al.* (2011).

Em contrapartida, o resultado obtido para a enzima recombinante de *E. coli* não está de acordo com o apresentando por WEHNER *et al.* (1992), que obteve pH ótimo 7,0, e por CAPIZZI *et al.* (1971), em com pH ótimo entre 5,0 e 6,0. Tais contradições podem estar relacionadas ao efeito do tampão utilizado, método de aferição da atividade e até mesmo de alguma mudança conformacional devido a adição da cauda His-tag. Novos ensaios de caracterização enzimática frente a variações de pH, temperatura e concentração de substrato serão realizados para complementar os resultados preliminares aqui apresentados.

Gráfico 2. Atividade enzimática das L-asparaginases II de *B. subtilis* e *E. coli* sob diferentes pH.



Fonte: Elaborado pela autora. Curvas de atividade enzimática analisada frente à variação de pH (3,0 a 9,0). Em ● : curva de atividade de L-ASNase II de *B. subtilis*. Em ○ : curva de atividade de L-ASNase II de *E. coli*. O ensaio foi realizado a 37°C.

5 CONCLUSÃO

A partir dos dados levantados nesse trabalho, foi possível concluir que o gene *ansZ* e foi amplificado com êxito, assim como o *ansB*, não apresentando mutações em sua sequência clonada. A expressão heteróloga em sistema procarionte *E. coli* Rosetta foi realizada com sucesso, uma vez que a L-asparaginase II de *B. subtilis* recombinante manteve-se expressa de forma contínua por 4 horas. Além disso, foi obtida, predominantemente, na forma solúvel, o que indica um correto enovelamento e não formação de agregados (corpos de inclusão). Tal resultado também foi acompanhado na expressão de L-asparaginase II de *E. coli* no mesmo sistema bacteriano.

A purificação por cromatografia de afinidade (IMAC) apresentou-se satisfatória como um primeiro passo de isolamento das enzimas em estudo, uma vez que foi possível obter amostras enriquecidas de L-ASNase II, ainda que com um pequeno grau de impureza. A cromatografia por troca iônica fez-se importante para evidenciar uma purificação mais eficiente da amostra enzimática de interesse em um menor volume de eluição, apesar do decaimento no rendimento de proteína obtida, fato comum em ensaios cromatográficos.

Foi possível constatar também que a L-asparaginase II de *B. subtilis* foi obtida em sua forma ativa e apresenta-se com atividade enzimática ótima em pH 8,0, o mesmo obtido para a L-asparaginase II de *E. coli*.

6 PERSPECTIVAS

Com os dados obtidos até então, pretende-se finalizar a metodologia de caracterização bioquímica da L-asparaginase II de *B. subtilis*, avaliando sua atividade enzimática sob um espectro mais amplo de pH (especialmente os mais básicos, como 10, 11 e 12), frente às variações de temperatura (30°C a 55°C, por exemplo) e na presença de íons metálicos. Posteriormente, avaliar seus parâmetros cinéticos (K_M e K_{cat}) e analisar sua citotoxicidade sob diferentes linhagens de células tumorais, por meio de ensaio com *AlamarBlue*™, além da produção de um cristal para elucidar sua estrutura tridimensional. O objetivo final é avaliar a atividade terapêutica *in vivo* e imunogenicidade desta enzima, vislumbrando sua possível ação como biofármaco, gerando desenvolvimento da indústria biotecnológica nacional e melhoria no tratamento oferecido pelo nosso sistema de saúde.

REFERÊNCIAS

- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/nota-utorizacao-para-importacao-da-l-asparaginase/219201/pop_up?inheritRedirect=false. Acesso em 6 nov. 2017.
- AGHAIYPOUR, K., WLODAWER, A., LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, p. 5655–5664, 2001.
- ALBERTSEN, B. K., SCHRODER, H., JAKOBSEN, P., AVRAMIS, V. I., MÜLLER, H. J., SCHMIEGELOW, K. Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase. **Med PediatrOncol**. v. 38, p. 310–316, 2002.
- ALTENBERN, R. A., HOUSEWRIGHT, R. D. Stereospecific asparaginases in smooth *Brucella abortus* strain 19. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 49, p. 130–137, 1954.
- ANESE, M., QUARTA, B., PELOUX, L., CALLIGARIS, S. Effect of formulation on the capacity of L-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 435-440, 2011.
- AZARA, R., HELIANTI, I., KUSNADI, J., YUNIANITA. Cloning and Gene Expression of *AnsZ* Encoding L-Asparaginase Enzyme from Local *Bacillus sp.* **Microbiology Indonesia**. v. 8, n. 2, 2014.
- BATOOL, T., MAKKY, E. A., JALAL, M., YUSOFF, M. M. A., Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Appl Biochem Biotechnol** v. 178 p. 900–923, 2016.
- BRESOLIN, I. T. L., MIRANDA, E. A., BUENO, S. M. A. L. Cromatografia de Afinidade por íons Metálicos Imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009.
- BROOME, J. D. Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 35, p. 967–974, 1965.
- 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.
- BONTHRON, D. T. L-Asparaginase II of *Escherichia coli* K-12: cloning, mapping and sequencing of the *ansB* gene. **Gene** v. 91, p. 101–105, 1990.
- CANELLOS, G. P., HASKELL, C. M. Studies of Resistance to L-Asparaginase in Human Leukemia. v. 33. p. 188-193, **Springer**, Berlin, Heidelberg, 1970.
- CAPIZZI, R. L., BERTINO, J. R., SKEEL, R. T., CREASEY, W. A., ZANES, R. L-Asparaginase: Clinical biochemical, pharmacological and immunological studies. **Annals Internal Med.**, v. 74, p. 893-901, 1971.

DOLYNCHUK, K., KEAST, D., CAMPBELL, K., HOUGHTON, P., ORSTED, H., SIBBALD, G., ATKINSON, A. Best practices for the prevention and treatment of pressure ulcers. **Ostomy/Wound Management**, vol. 46, n. 11, p 38–53, 2000.

FENG, Y., LIU, S., JIAO, Y., GAO, H., WANG, M., DU, G., CHEN, J. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, p1509–1520, 2016.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D., BRAY, F., Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 359–386, 2014.

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

FODA, M. S., ZEDAN, H. H., HASHEM, S. A. Formation and properties of L-glutaminase and Lasparaginase activities in *Pichia polymorpha*. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 29, p. 343–352, 1980.

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

GREENQUIST, A. C., WRISTON, J. C. Jr. Chemical evidence for identical subunits in L-asparaginase from *Escherichia coli* B. **Arch Biochem Biophys**. v. 152, n. 1, p. 280-6, 1972.

GUPTA, V., KUMARASAMY, K., GULATI, N., RITU GARG, R., KRISHNAN, P., CHANDER, J. AmpC β -lactamases in nosocomial isolates of Klebsiella pneumonia from India. **Indian Journal of Medical Research**, vol. 136, p. 237–241, 2012.

GURUNG, N., RAY, S., BOSE, S., RAJ, V. A. broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HO, P., MILIKIN, E. B., BOBBIT, J. L., GRINNAN, E. L., BURCK, P. J., FRANK, B. H., BOECK, L. D., SQUIRES, R. W. Crystalline L-asparaginase from *Escherichia coli* B, I. Purification and chemical characterization. **J Biol Chem**. v. 245, p. 3708-15, 1970.

HÖLTJE, H.-D., FOLKERS, G. Molecular Modeling: Basic Principles and Applications; MANNHOLD, R., KUBINYI, H., TIMMERMAN, H., eds.; **VCH: Weinheim**, 1997.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=1>. Acesso em 24 ou. 2017.

JAIN, R., ZAIDI, K. U., VERMA, Y., SAXENA, P. L-Asparaginase: a promising enzyme for treatment of acute lymphoblastic leukemia. **People's Journal of Scientific Research**, vol. 5, n. 1, p. 29–35, 2012.

JOZALA, A. F., GERALDES, D. C., TUNDISIB, L. L., FEITOSA, V. A., BREYERD, C. A., CARDOSO, S. L., MAZZOLA, P. G., NASCIMENTO, L. O., RANGEL-YAGUIC, C. O., MAGALHÃES, P. O., OLIVEIRA, M. A., PESSOA JR., A. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v47, p51-63, 2016.

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, n. 6, p. 565-82, 1953.

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

KUMAR, K., VERMA, N., The various sources and application of L-asparaginase. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 3, p. 197–205, 2012.

LANG, S., UBER. Desamidierung im Tierkorper. **Beitraege zur Chemischen Physiologie und Pathologie**, v. 190, p. 5321–345, 1904.

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

LI, F., LEE, B., ZHO, J. X., TRESSEL, T., YANG, X. Current therapeutic antibody production and process optimization. **BioProcessingJ**. v. 5, p. 16–25, 2006.

LOWE, C. R., LOWE, A. R., GUPTA, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. **J Biochem Biophys Methods**. v. 49 (1–3) p.561–574, 2001.

MCCOY, T. A., MAXWELL, M., NEUMAN, R. E. The amino acid requirements of the Walker carcinosarcoma 256 *in vitro*. **Cancer Research**, v. 16, p. 979–984, 1956.

MEHTA, R. K., VERMA, S., PATI, R., SENGUPTA, M., KHATUA, B., JENA, R. K., SETHY, S., KAR, S. K., MANDAL, C., ROEHM, K. H., SONAWANE, A. Mutations in subunit interface and B-cell epitopes improve antileukemic activities of *Escherichia coli* asparaginase-II: evaluation of immunogenicity in mice. **J Biol Chem**. v. 289, n. 6, p. 3555-70, 2014.

MINTON, N. P., BULLMAN, H. M. S., SCAWEN, M. D., ATKINSON, T., GILBERT, H. J. Nucleotide sequence of the *Erwinia chrysanthemi* NCPPB1066 L-asparaginase gene. **Gene** v. 46, p. 25–35, 1986.

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.

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

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. Cap. 3, ed. 6, p 90. **Arnet**, 2014.

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

NOURA EL-AHMADY, E. N., SARA, M. E. E., & NANCY, M. E. S. Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 10, p. 182–199, 2014.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Disponível em <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. Acesso em 4 nov. 2017.

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

PANOSYAN, E. H., SEIBEL, N. L., MARTIN-ARAGON, S., GAYNON, P. S., AVRAMIS, I. A., SATHER, H. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. **J Pediatr Hematol Oncol**. v. 26, p. 217–226, 2004.

PARMENTIER, J. H., MAGGI, M.M TARASCO, E., SCOTTI, C., AVRAMIS, V. I., METTELMAN, S. D. Glutaminase Activity Determines Cytotoxicity of L-Asparaginases on Most Leukemia Cell Lines. **Leuk Res**. v. 39, n.7, p. 757–762, 2015.

POKROVSKY, V. S., KAZANOV, M. D., DYAKOV, I. N., POKROVSKY, M. V., ALEKSANDROVA, S. S. Comparative immunogenicity and structural analysis of epitopes of diferente bacterial L-asparaginases. **BMC Cancer**, v. 16, p. 89, 2016.

ROZALSKA, M., MIKUCKI, J. Staphylococcal L-asparaginase: catabolic repression of synthesis. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 41, p. 145–150, 1991.

SALEH, A. Mohamed, 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. 6 pages, 2015.

- SALZER, W. L., ASSELIN, B. L., PLOURDE, P. V., CORN, T., HUNGER SP. Development of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1329, p. 81–92, 2014.
- SÁNCHEZ, M. A. O., ORTEGA, M. L. O., BARRIENTOS, J. V. R.; Leucemia linfoblástica aguda, **Medicina Interna de México**, v.23, n.1, 2007.
- SARASWAT, M., MUSANTE, L., RAVIDÁ, A., SHORTT, B., BYRNE, B., HOLTHOFER, H. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. **Biomed Res Int**. v. 2013, p. 1–18, 2013.
- SONG, P., WANG, Z., ZANG, W., JIAJUN, F., LI, Y., QICHENG, C., SHAOFEI, W., LIU, P., LUAN, J., YE, L., JU, D. The role of autophagy in asparaginase-induced immune suppression of macrophages. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 3, e2721, 2017.
- SONNEVELD, P., HOLCENBERG, J. S., BEKKUM, D. W. Effect of succinylated *Acinetobacter* glutamine-asparaginase treatment on an acute myeloid leukemia in the rat (BNML). **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, vol. 15, n. 8, p. 1061–1063, 1979.
- SULKOWSKI, E. The Saga of IMAC. **Bioessays**. v. 10, n. 5, p. 170, 1989.
- SUN, D., SETLOW, P. Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis ansR* gene, which encodes a repressor of the ans operon coding for L-asparaginase and L-aspartase. **J. Bacteriol**. v. 175, p. 2501–2506, 1991.
- SWAIN, A. L., JASKÓLSKI, H., HOUSSET, D., WLODAWER, A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 1474–1478, 1993.
- THE PUBCHEM PROJECT (PubChem). Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em 30 out. 2017.
- TORRES, A., LUKE, J. D., KULLAS, A. L., KAPILASHRAMI, K., BOTBOL, Y., KOLLER, A. Asparagine deprivation mediated by *Salmonella* asparaginase causes suppression of activation-induced T cell metabolic reprogramming. **J Leukoc Biol**, v. 99, p. 387–398, 2016.
- USHA, P., PANDEY, J. Food science and technology imprint, volume 2: Enhanced production of β -carotene and L-asparaginase from a tribal food alga *Vaucheria uncinata*. **Anthony J Greco ed**, p. 195–208, 2011.
- VIDYA, J., VASUDEVAN, U. M., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. Clonagem, expressão funcional e caracterização de L-Asparaginase II de *E. coli* MTCC 739. **Food Technol. Biotechnol**. v. 49, n. 3, p. 286–290, 2011.
- WEHNER, A., HARMS, E., JENNINGS, M. P. Site-specific mutagenesis of *Escherichia coli* asparaginase II. None of the three histidine residues is required for catalysis. **Eur J Biochem**, v. 208, p. 475–480, 1992.

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

WOO, M. H., HAK, L. J., STORM, M.C., SANDLUND, J. T., RIBEIRO, R. C., RIVERA, G. K., Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**. v. 18, p. 1525–1532, 2000.

YANO, S., MINATO, R., THONGSANIT, J., TACHIKI, T., WAKAYAMA, M. Overexpression of type I L-asparaginase of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*, rapid purification and characterization of recombinant type I L-asparaginase. **Ann Microbiol** v. 58, p. 711–716, 2008.

ZAITSEV, S., SPITZER, D., MURCIANO, J. C., DING, B. S., TLIBA, S., KOWALSKA, M. A., CONTREAS, O. A. M, KUO, A., STEPANOVA, V., ATKINSON, J. P., PONCZ, M., CINES, D. B., MUZYKANTOV, V. R. Sustained thromboprophylaxis mediated by an RBC-targeted pro-urokinase zymogen activated at the site of clot formation. **Blood**, vol. 115, n. 25, p. 5241–5248, 2010.

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

ZHANG, Y., LI, D., LI, Y. Expression and purification of L-asparaginase from *Escherichia coli* and the inhibitory effects of cyclic dipeptides. **Natural Product Research**. v. 31, n. 18, 2017.