

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

KELLEN CRUVINEL RODRIGUES ANDRADE

L-Asparaginase tipo II de *Penicillium cerradense*: análises *in silico* e  
expressão heteróloga

BRASÍLIA-DF

2023

KELLEN CRUVINEL RODRIGUES ANDRADE

L-Asparaginase tipo II de *Penicillium cerradense*: análises *in silico* e expressão heteróloga

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito à obtenção de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães

BRASÍLIA – DF

2023

Kellen Cruvinel Rodrigues Andrade

L-Asparaginase tipo II de *Penicillium cerradense*: análises *in silico* e expressão heteróloga

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de Setembro de 2023.

### **Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

---

Profa. Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

---

Profa. Dra. Clarisse Salomé Nobre Gonçalves  
Universidade do Minho (UMINHO), Portugal

---

Profa. Dra. Yris Maria Fonseca Bazzo  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Dedico este trabalho a toda a minha família,  
em especial ao meu marido e meus filhos por  
todo incentivo e apoio dado para minha  
formação.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por todo amparo em me iluminar e guiar nessa etapa.

À minha família, que sempre torceu por minhas conquistas. Em especial ao meu maior incentivador, meu marido Henderson, obrigada pelo apoio, carinho e compreensão nesse período, por estar ao meu lado. Aos meus filhos, Gael e Gabriel, minhas inspirações, que me impulsionam diariamente pela busca de conhecimento e prática do bem.

Aos meus pais, Valdeir e Luci, que acreditam no princípio da educação e conduziram-me ao caminho da disciplina. À minha irmã, Flávia, por ser minha amiga e compartilhar o mesmo caminho comigo.

À minha orientadora, professora Pérola Magalhães, por ter me acolhido, pela oportunidade e confiança ao trabalho, por sua dedicação e carinho nos direcionamentos.

Aos meus companheiros de trabalho e amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e Produtos Naturais - Diegue, João Victor, Juliana, Marcela, Marina, Letícia, Ana, Arthur, Paula, Renata e Samuel - sou grata aos momentos compartilhados e pelos conselhos disponíveis a qualquer momento. Em especial, ao Joel, pelo apoio e acolhimento.

Às técnicas do laboratório, Júlia e Patrícia, que se dedicam a nos apoiar e cuidam de cada um com muita atenção.

Ao professor Georgios Pappas do CEL/Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília que me acolheu com prontidão, agradeço a disposição, ensinamentos e suporte essencial para elaboração deste trabalho.

Aos professores Mauricio H. Mello, Edivaldo X. F. Filho e Eliane Noronha – inSiliTox/FS; e Enzimologia/IB da Universidade de Brasília, respectivamente -

agradeço o suporte disponibilizado que permitiu a execução de atividades inerentes ao trabalho.

Aos membros da banca de avaliação, por aceitarem o convite. Sou grata a atenção e contribuição neste trabalho.

À CAPES, pelo suporte financeiro concedido.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram e doaram-se para se tornar possível a conclusão deste trabalho. Sou imensamente grata!

*“Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz.”*

*(Renato Teixeira e Almir Sater)*

## RESUMO

ANDRADE, Kellen Cruvinel Rodrigues. **L-ASPARAGINASE TIPO II DE *Penicillium cerradense*: ANÁLISES *in silico* E EXPRESSÃO HETERÓLOGA**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília 2023.

A enzima L-asparaginase possui grande importância na área farmacêutica, sendo utilizada no tratamento de primeira escolha de algumas neoplasias malignas, como a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), devido à sua capacidade de hidrolisar a L-asparagina em L-aspartato e amônia. As preparações clínicas dessa enzima são derivadas de fonte procariota e seu uso está frequentemente associado a reações adversas graves. Assim, apresenta-se importante a busca por novas fontes de L-asparaginase. O objetivo desse trabalho foi caracterizar funções biofísico-químicas e caracteres imunogênicos e elucidar a estrutura molecular da L-asparaginase de *Penicillium cerradense*, e em paralelo a produção recombinante dessa L-asparaginase fúngica em sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Na relação evolutiva, a L-asparaginase de *P. cerradense* aproxima-se das L-asparaginases de espécies de *Aspergillus*. Utilizando ferramentas *in silico*, a enzima foi caracterizada como um fragmento proteico de 378 aminoácidos, com um peso molecular de 39 kDa, com um peptídeo sinal contendo 17 aminoácidos, ponto isoelétrico de 5,13, índice alifático 97,25 e hidropatia positiva (0,256). Foi proposto um modelo estrutural para formar um tetrâmero. Essa L-asparaginase apresentou um grau de imunogenicidade compatível ao uso clínico (epítomos de células T e B) em comparação com as enzimas clínicas de *E. coli* e *Dickeya chrysanthemi*, e apresenta-se como enzima não tóxica. Para aumentar a expressão da enzima a sequência foi introduzida em um desenho de vetor pET-28a(+) em *E. coli* BL21(D3). A L-asparaginase de *P. cerradense*, sem a sequência de sinalização periplasmática, foi clonada e expressa com formação de corpos de inclusão típicos. Estes resultados apresentam uma L-asparaginase potencialmente útil ao uso clínico e traz conhecimentos que podem conduzir a estratégias para melhorar a produção da enzima.

**Palavras chaves:** L-asparaginase, *Penicillium cerradense*, Leucemia, *Escherichia coli*, Expressão heteróloga.



## ABSTRACT

ANDRADE, Kellen Cruvinel Rodrigues. **L-ASPARAGINASE TYPE II FROM *Penicillium cerradense*: IN SILICO ANALYSIS AND HETEROLOGOUS EXPRESSION.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília 2023.

The enzyme L-asparaginase represents great importance in the pharmaceutical area, being used in the first-line treatment of malignant neoplasms, such as for Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), due to its ability to hydrolyze L-asparagine into L-aspartate and ammonia. Clinical preparations of this enzyme are derived from a prokaryotic source and their use is often associated with severe adverse reactions. Thus, the search for new sources of L-asparaginase is important. The aim of this work was to characterize the biophysical/chemical functions and immunogenic characteristics and to elucidate the molecular structure of L-asparaginase from *Penicillium cerradense*, and in parallel with the recombinant production of this fungal L-asparaginase in an *Escherichia coli* expression system. In evolutionary terms, the L-asparaginase from *P. cerradense* is close to the L-asparaginases from *Aspergillus* species. Using in silico tools, the enzyme was characterized as a protein fragment of 378 amino acids, with a molecular weight of 39 kDa, with a signal peptide containing 17 amino acids, an isoelectric point of 5.13, an aliphatic index of 97.25 and positive hydropathy (0.256). A structural model was proposed to form a tetramer. This L-asparaginase showed a degree of immunogenicity compatible with clinical use (T and B cell epitopes) in comparison with clinical enzymes from *E. coli* and *Dickeya chrysanthemi* and is presented as a non-toxic enzyme. To increase the expression of the enzyme, the sequence was introduced into a pET-28a(+) vector design in *E. coli* BL21(D3). The L-asparaginase from *P. cerradense*, without the periplasmic signaling sequence, was cloned and expressed with the formation of typical inclusion bodies. These results present a potentially useful L-asparaginase for clinical use, with knowledge that could lead to strategies to improve the production of the enzyme.

**Key words:** L-asparaginase, *Penicillium cerradense*, Leukemia, *Escherichia coli*, Heterologous expression.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tratamento de primeira linha para LLA. *A quimioterapia intratecal consiste em metotrexato isolado ou combinado com hidrocortisona e citarabina. **O transplante alogênico de células hematopoiéticas é opcional após a consolidação. Fonte: adaptado de Malard e Mohty (2020). .....	5
Figura 2: Mecanismo de hidrólise de L-asparagina catalisada por L-asparaginase. Fonte adaptado de Costa-Silva <i>et al.</i> (2020). .....	7
Figura 3: Mecanismo de ação da L-asparaginase. Fonte adaptada Shrivastava <i>et al.</i> (2016). .....	8
Figura 4: Esquema do vetor da série pET. amp <sup>R</sup> (região marcadora para resistência a ampicilina), <i>lacI</i> (gene <i>lac1</i> ), P <sub>T7</sub> (promotor de transcrição T7), <i>lacO</i> (região do operador <i>lac</i> ), pLink (sítio de policlonagem). (Feliciano, 2009). .....	23
Figura 5: Curva padrão em µg/mL de soro albumina bovino (BSA) para quantificação de proteínas totais. ....	29
Figura 6: Mecanismo de reação do agente colorimétrico de Nessler em interação com amônia livre, produto da hidrólise por L-asparaginase. ....	30
Figura 7: Curva padrão em µmol de sulfato de amônio para quantificação da atividade enzimática de L-asparaginase. ....	32
Figura 8: Mecanismo de reação da asparagina e hidroxilamina mediado pela L-asparaginase para a formação do complexo β-hidroxamato aspártico férrico. ....	33
Figura 9: Curva padrão em µmol de β-hidroxamato aspártico para quantificação da atividade enzimática de L-asparaginase. ....	35
Figura 10: Gel de quantificação da extração de DNA genômico do fungo <i>P. cerradense</i> . Espécime: (1) <i>Penicillium cerradense a</i> ; (2) <i>Penicillium cerradense b</i> . ....	58
Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os <i>primers AsnPsiz</i> à 53 °C (1) e 55 °C (2) temperatura de anelamento, (*) DNA diluído 1/5. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN). ....	60
Figura 12: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os <i>primers AsnPsiz</i> à 57 °C (1) temperatura de anelamento, Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN). ....	60
Figura 13: Sequência do gene da enzima L-asparaginase identificada do <i>contigs</i> de <i>Penicillium cerradense</i> . Em negrito encontram-se os <i>itrons</i> presentes na sequência. ....	62
Figura 14: Tradução "six frame" do gene da enzima L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> por Clustal Omega® e BLAST do NCBI. ....	62
Figura 15: Sequência de nucleotídeos de <i>P. cerradense</i> . Homologia com o gene da asparaginase tipo II derivado de <i>P. sizovae</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>A. ibericus</i> , por Clustal Omega® e BLAST do NCBI. ....	63
Figura 16: Relação evolutiva Maximum likelihood de L-asparaginases fúngicas, incluindo <i>P. cerradense</i> . A árvore consenso foi inferida usando o IQ-TREE com 1.000 réplicas de bootstrap ultrarrápidas. A árvore foi enraizada usando a sequência de <i>E. coli</i> como grupo externo e os valores de suporte de bootstrap são indicados abaixo das bordas dos nós. Os representantes de <i>Penicillium</i> sp. estão destacados. ....	65
Figura 17: Resultado da predição do peptídeo sinal de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> usando o servidor SignalP -5.0. No eixo horizontal está representado os aminoácidos constituintes da proteína e no eixo vertical a estimativa da probabilidade	

de ocorrência do peptídeo sinal. SP: peptídeo sinal Sec/SPI; CS (o local de clivagem); OTHER ((a probabilidade de que a sequência não tenha nenhum tipo de peptídeo sinal).....	67
Figura 18: Resultado da predição do peptídeo sinal de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> por Phobius. ....	67
Figura 19: Alinhamento de Hinge Region (HR), Active Site Flexible Loop (ASFL) e resíduos do sítio ativo para L-asparaginases de <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> incluindo <i>P. cerradense</i> . HR é indicado em vermelho, ASFL em cinza e os resíduos relevantes para a atividade catalítica estão destacados em verde. Porcentagem de identidade e diferenças de resíduos do alinhamento completo (em amarelo) entre as L-asparaginases comparadas. ....	69
Figura 20: Previsão da estrutura tridimensional da L-asparaginase de <i>Penicillium cerradense</i> por SwissModel®. (A) <i>Cartoon</i> - Estrutura tetramérica com monômeros apresentados por cores distintas e (B) Superfície.....	70
Figura 21: Alinhamento da sequência de L-asparaginase de <i>Penicillium cerradense</i> com o modelo proposto pelo software SwissModel®. ....	71
Figura 22: Estrutura. ProCheck Ramachandran Plot da estrutura tridimensional de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> prevista por SwissModel ® representando 95,57% de resíduos presentes na região favoravelmente permitida (vermelho, brilhante e amarelo claro), enquanto 0,7% de resíduos de aminoácidos consistiam na região não permitida (pálidoamarelo). ....	72
Figura 23: Modelagem da estrutura tridimensional para a sequência de L-asparaginase de <i>Penicillium cerradense</i> por AlphaFold2®. ....	73
Figura 24: Perfil de confiabilidade da predição da estrutura tridimensional de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> por codificação de cores baseada em medidas internas do AlphaFold2®.....	74
Figura 25: ProCheck Ramachandran Plot da estrutura de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> prevista por Alphafold2® representando 96,0% de resíduos presentes na região favoravelmente permitida (vermelho, brilhante e amarelo claro). ....	74
Figura 26: Monômero de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> com a indicação do domínio N-terminal, o domínio C-terminal, o linker, a região HR em vermelho, o elemento ASFL em azul e os resíduo conservados do sítio catalítico em verde. ....	75
Figura 27: Sobreposição estrutural de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> modelo SwissModel® (amarelo) ao modelo AlphaFold2® (vermelho). RMSD 2,27 Å. ....	77
Figura 28: Sobreposição estrutural de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> (vermelho) à L-asparaginase de <i>E. coli</i> (3ECA pdb) (azul). ....	79
Figura 29: Mapeamento da conservação sequência-estrutura para L-asparaginases de espécies do gênero <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> , em modelo estrutural L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> . Conservação expressa em uma escala de cores, de turquesa (0 – baixa conservação) para rosa (10 – alta conservação). ....	80
Figura 30: Gráfico <i>box plot</i> (mediana e mínima/máxima) representando o grau de imunogenicidade de L-asparagianase por frequência relativa por predição de epítomos imunogênicos de células T para oito alelos ( <i>HLA-DRB1*01:01</i> , <i>HLA-DRB1*03:01</i> , <i>HLA-DRB1*04:01</i> , <i>HLA-DRB1*07:01</i> , <i>HLA-DRB1*08:01</i> , <i>HLA-DRB1*11:01</i> , <i>HLA-DRB1*13:01</i> e <i>HLA-DRB1*15:01</i> ), para L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> e outros microrganismos. Os pontos no box representam os oitos alelos avaliados. Não	

apresenta diferença significativa ( $p < 0.05$ – Kruskal-Wallis com teste posterior Dunn's test). .....	82
Figura 31: Gráfico de barras representando o grau de imunogenicidade de L-asparaginase por predição de epítomos imunogênicos de células T para oito alelos independentes ( <i>HLA-DRB1*01:01</i> , <i>HLA-DRB1*03:01</i> , <i>HLA-DRB1*04:01</i> , <i>HLA-DRB1*07:01</i> , <i>HLA-DRB1*08:01</i> , <i>HLA-DRB1*11:01</i> , <i>HLA-DRB1*13:01</i> e <i>HLA-DRB1*15:01</i> ) de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> e outros microrganismos .....	83
Figura 32: Gráfico em barras representando a frequência relativa dos epítomos alergênicos de células T para o alelo <i>HLA-DRB1*07:01</i> da L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> e outros microrganismos. ....	84
Figura 33: Distribuição estrutural dos epítomos alergênicos de células T para o alelo <i>HLA-DRB1*07:01</i> no monômero de L-asparaginase. Zonas azuis representam epítomos alergênicos de <i>E. coli</i> . Zonas verdes representam epítomos alergênicos de <i>D. chrysanthemi</i> . Zonas vermelhas representam epítomos alergênicos de <i>P. cerradense</i> . Cinza representam as zonas não alergênicas.....	85
Figura 34: Mapeamento da conservação estrutural dos epítomos alergênicos de células T para o alelo <i>HLA-DRB1*07:01</i> para L-asparaginases de <i>P. cerradense</i> , <i>E. coli</i> e <i>D. chrysanthemi</i> . Zonas azuis representam epítomos alergênicos de <i>E. coli</i> . Zonas verdes representam epítomos alergênicos de <i>D. chrysanthemi</i> . Zonas vermelhas representam epítomos alergênicos de <i>P. cerradense</i> . Cinza representam as zonas não alergênicas. ....	86
Figura 35: Gráfico em barras representando a frequência relativa dos epítomos imunogênicos de células B da L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> e outros microrganismos. ....	87
Figura 36: Distribuição estrutural dos epítomos de células B para L-asparaginase monômero. Zonas azuis representam epítomos de <i>E. coli</i> . Zonas verdes representam epítomos de <i>D. chrysanthemi</i> . Zonas vermelhas representam epítomos de <i>P. cerradense</i> . Cinza representam as zonas não imunogênicas.....	88
Figura 37: Mapa do vetor pTE28a utilizado para expressão heteróloga da L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> em <i>E. coli</i> . ....	90
Figura 38: Gel de quantificação da extração de DNA plasmidial para cepas de (Clone 1, 2, 3, e 4) <i>E. coli</i> DH10B pET28a(+)-L-ASNase_Pc e (Clone -) Controle negativo por <i>E. coli</i> DH10B pET28a(+). (MM) Marcador Molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder® (Thermo Scientific). ....	91
Figura 39: Perfil eletroforético em gel de agarose 1,2% para os fragmentos amplificados na seleção por PCR dos clones transformantes de <i>E. coli</i> DH10B pET28a(+)-L-ASNase_Pc. (C+) Controle positivo por plasmídeo vetores pET28a(+)-L-ASNase_Pc - Genome . (C-) Controle negativo por <i>E. coli</i> DH10B pET28a(+). (MM) Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen). ....	92
Figura 40: Gel de quantificação da extração de DNA plasmidial para 10 cepas de <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET28a(+)-L-ASNase_Pc. (Clone - ) Controle negativo por <i>E. coli</i> DH10B pET28a(+). (MM) Marcador GeneRuler 1Kb DNA Ladder® (Thermo Scientific). ....	92
Figura 41: Perfil eletroforético em gel de agarose 1,2% para os fragmentos amplificados na seleção por PCR dos 10 clones transformantes de <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET28a(+)-L-ASNase_Pc. (C+) Controle positivo por plasmídeo vetores pET28a(+)-L-	

ASNase_Pc extraído de <i>E. coli</i> DH10B. (C-) Controle negativo por <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET28a(+). (MM) Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen).....	93
Figura 42: Perfil eletroforético da expressão da enzima L-asparaginase por SDS-PAGE de 10 clones de <i>E. coli</i> ASNase_Pc. Frações solúvel (FS) e insolúvel (FI). (MM) Marcador Low-Molecular-Weight. (C-) Controle negativo <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a(+), vetor vazio. ....	94
Figura 43: Perfil eletroforético da expressão da enzima L-asparaginase por <i>Western Blot</i> dos clones 6, 8 e 10 de <i>E. coli</i> ASNase_Pc. Frações solúvel (FS) e insolúvel (FI). Marcador PageRuler Prestained Protein Ladder® (MM). Controle negativo por <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET28a(+) (C-). ....	95
Figura 44: Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% para avaliação de diferentes métodos (1, 2 e 3) de lise celular para <i>E. coli</i> ASNase_Pc por processador ultrassônico. (MM) Marcador Molecular Low Molecular Weight Calibration® (GE Healthcare). (FS) Fração solúvel. (FI) Fração insolúvel. ....	96
Figura 45: Curva de crescimento bacteriano de <i>E. coli</i> ASNase_Pc a 37°C em meio líquido LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL com agitação de 200 rpm. ....	97
Figura 46: Gráfico referentes a curva de crescimento de <i>E. coli</i> ASNase_Pc a 37°, em meio líquido LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL com agitação de 200 rpm, ajustado para logaritmo natural (ln). ....	97
Figura 47: Gel SDS-PAGE 12% para avaliação da expressão de L-asparaginase de <i>E. coli</i> ASNase_Pc a 37 °C sob diferentes condições - concentrações de IPTG (0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM) e tempo de cultivo após indução (0 h; 2 h; 4 h; 8 h; 12 h; 20 h e 24 h). A. Frações solúveis de cultivos induzidos com 0,1 mM de IPTG. B. Frações solúveis de cultivos induzidos com 0,5 mM de IPTG. C. Frações solúveis de cultivos induzidos com 1 mM de IPTG. D. Frações insolúveis de cultivos induzidos com 0,1 mM de IPTG. E. Frações insolúveis de cultivos induzidos com 0,5 mM de IPTG. F. Frações insolúveis de cultivos induzidos com 1 mM de IPTG. ....	99
Figura 48: Tradução "six frame" do gene para expressão heteróloga da enzima L-asparaginase por <i>E. coli</i> ASNase_Pc. ....	101
Figura 49: Modelagem <i>ab initio</i> da estrutura tridimensional para a sequência de L-asparaginase de <i>E. coli</i> ASNase_Pc. ....	102
Figura 50: Sobreposição estrutural de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> (vermelho) à <i>E. coli</i> ASNase_Pc (cinza). RMSD 1,08 Å. Regiões de distanciamento sinalizadas em seta amarela. ....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alinhamento de estrutura em pares de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> (SwissModel®) com outros microrganismos. ....	73
Tabela 2: Alinhamento de estrutura em pares de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> (AlphaFold2®) com outros microrganismos. ....	76
Tabela 3: Alinhamento de estrutura em pares de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> com outros microrganismos. ....	78

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Revisão de fontes produtoras de L-asparaginase, adaptado de Chand <i>et al.</i> (2020). ....	14
Quadro 2: Sistemas hospedeiros de produção e suas principais características, adaptado de Tripathi e Shrivastava (2019). ....	18
Quadro 3: Preparação das soluções padrão para o método de Nessler. ....	31
Quadro 4: Preparação das soluções padrão para o método de $\beta$ -hidroxamato aspártico. ....	34
Quadro 5: <i>Primers</i> degenerados construídos para identificação de L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> . ....	39
Quadro 6: <i>Primers</i> de L-asparaginase a partir de <i>P. sizovae</i> . ....	39
Quadro 7: Combinação de <i>primers</i> testados para a identificação do gene da L-asparaginase de <i>P. cerradense</i> . ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ágar-água

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASFL - Active Site Flexible Loop

ASNase – L- asparaginase

BDA – Ágar Batata Dextrose

CDM – Czapek Dox modificado

DNA – Ácido desoxirribonucleico

*E. coli* ASNase\_*Pc* – *Escherichia coli* com vetor para produção de L-asparaginase de *Penicillium cerradense*

FDA - Food and Drug Administration

GI – Grau de imunogenicidade

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

HR - Hinge Region

IPTG - Isopropil- $\beta$ -Dtiogalactosídeo

LB - Luria Bertani

LLA – Leucemia Linfoide Aguda

MEA – Ágar Extrato de Malte

OD<sub>600nm</sub> - Densidade óptica a 600 nm

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDB – Bancos de dados de proteínas

PEG - Peguilação

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pI – Ponto isoelétrico

pH – Potencial hidrogeniônico

PVP – Polivinilpirrolidona

rpm – Rotações por minuto

SDA – Ágar Sabouraud

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TCA – Ácido Tricloroacético

TRIS - 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

UI – Unidade Internacional

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Leucemias</b>	<b>2</b>
2.1.1 Leucemia Linfóide Aguda	3
<b>2.2 L-asparaginase</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Produção de proteínas heterólogas</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Expressão heteróloga de L-asparaginase</b>	<b>19</b>
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	19
2.4.2 Vetor pET-28a	22
<b>2.5 Bioinformática e engenharia de proteínas</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>27</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Preservação do fungo</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Preparação do inóculo</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Condições de cultivo</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Quantificação de proteínas totais</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Determinação da atividade enzimática</b>	<b>30</b>
4.5.1 Método de Nessler	30
4.5.2 Método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato	32
<b>4.6 Extração de DNA</b>	<b>36</b>
4.6.1 Condições de cultivo para isolamento de DNA	36
4.6.2 Manipulação de DNA genômico	36
4.6.3 Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1%	37
4.6.4 Coloração com <i>GelRed Nucleic Acid Gel Stain®</i> (Biotium)	37
<b>4.7 Purificação de produto de PCR e sequenciamento de DNA</b>	<b>38</b>
<b>4.8 Sequenciamento do gene da L-asparaginase</b>	<b>38</b>
4.8.1 Desenho dos <i>primers</i> iniciadores	38
4.8.2 Amplificação da região gênica L-asparaginase	40
4.8.3 Purificação de fragmentos de amplificação em gel de agarose	40
<b>4.9 Sequenciamento do genoma</b>	<b>40</b>



4.10	Sequência gênica de L-asparaginase.....	41
4.11	Caracterização da proteína <i>in silico</i> .....	41
4.12	Modelagem estrutural da proteína <i>in silico</i> .....	42
4.13	Alinhamento de Estrutura por Pares.....	43
4.14	Conservação sequência-estrutura L-asparaginase de <i>Penicillium</i> .....	44
4.15	Predição de epítomos nas células-T e determinação de densidade de epítomos.....	44
4.16	Predição de alergenicidade dos epítomos.....	45
4.17	Predição de epítomos nas células-B.....	45
4.18	Predição da toxicidade.....	46
4.19	Mapeamento de epítomos.....	46
4.20	Clonagem e expressão de L-asparaginase em <i>E. coli</i> por pET28a.....	46
4.20.1	Preparo de células termocompetentes.....	46
4.20.2	Transformação genética de cepas de <i>E. coli</i> .....	47
4.20.3	Preparo de estoque de células.....	48
4.20.4	Extração de DNA plasmidial.....	49
4.20.5	Seleção de clones transformantes por PCR.....	49
4.20.6	Cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	50
4.21	Avaliação da expressão de L-ASNase <sup>PC</sup> .....	51
4.21.1	Precipitação de proteínas com TCA.....	51
4.21.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	51
4.21.3	Western Blotting.....	52
4.22	Avaliação da extração de proteínas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	53
4.23	Curva de crescimento.....	55
4.24	Avaliação dos parâmetros de cultivo.....	55
4.25	Análise estatística.....	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	Produção de L-asparaginase.....	56
5.2	Extração, amplificação e purificação de DNA genômico.....	58
5.3	Identificação do gene de L-asparaginase.....	58
5.4	Análise <i>in silico</i> de L-asparaginase.....	64
5.5	Modelagem estrutural da proteína <i>in silico</i> .....	70
5.6	Predição de imunogenicidade, alergenicidade e toxicidade.....	80
5.7	Expressão de L-asparaginase <i>P. cerradense</i> em <i>E. coli</i> pET28a.....	89
5.7.1	Construção dos vetores e transformação genética.....	89

5.7.2	Expressão de L-asparaginase .....	93
5.7.3	Avaliação da extração de proteínas de <i>E. coli</i> ASNase_ <i>Pc</i> .....	96
5.7.4	Curva de crescimento bacteriano .....	96
5.7.5	Avaliação dos parâmetros de cultivo para <i>E. coli</i> ASNase_ <i>Pc</i> .....	98
5.7.6	Avaliação <i>in silico</i> do gene de L-asparaginase recombinante ( <i>E. coli</i> ASNase_ <i>Pc</i> ) .....	100
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	103
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	104

## 1. INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia maligna de origem linfocitária caracterizada pelo acúmulo de células imaturas na medula óssea, órgãos linfóides e sangue periférico, e acomete principalmente as crianças entre 2-5 anos de idade (Pui *et al.*, 2008). Desde 1962, a enzima L-asparaginase foi incluída em protocolo no tratamento LLA (INCA, 2001). O mecanismo antileucêmico da enzima corresponde a catálise seletiva da reação de hidrólise da L-asparagina em ácido aspártico e amônia. Com esse mecanismo, os efeitos terapêuticos da enzima L-asparaginase ocupam um espaço único de destaque no panorama terapêutico da LLA (Burke e Zalewska-Szewczyk, 2022).

A L-asparaginase ao chegar à corrente sanguínea ocasiona a depleção das reservas de L-asparagina presente no plasma. As células humanas para a síntese de proteínas necessitam do suprimento regular do aminoácido L-asparagina. A maioria das células humanas podem produzir seus próprios suprimentos de L-asparagina por meio da enzima asparagina sintetase. Ao oposto, as células neoplásicas dependem do fornecimento exógeno de L-asparagina. Na presença de L-asparaginase circulante no plasma, ocasionando esgotamento extracelular desse aminoácido impedindo a síntese de proteínas, de DNA e RNA, as células neoplásicas são afetadas seletivamente e observa-se apoptose inibindo a proliferação celular (Heinemann e Howard, 1969; Müller e Boos, 1998; Brunton *et al.*, 2012).

As L-asparaginases protótipos de uso clínico são de origem bacteriana, derivadas de *Escherichia coli* e *Dickeya chrysanthemi* (sin. *Erwinia chrysanthemi*), e apresentam-se em três formas – L-asparaginase nativa e polietilenoglicol conjugado (PEG-ASNase) de *E. coli*, e a enzima nativa de *E. chrysanthemi* (Brumano *et al.*, 2018; Van Trimont *et al.*, 2022). No entanto, reações adversas críticas e toxicidade associadas à L-asparaginase de *E. coli* e *D. chrysanthemi* são observadas, tais como hipersensibilidade (clínica e subclínica), hipertrigliceridemia, encefalopatia, disfunção hepática, glicosúria, cetoacidose, diminuição da síntese de proteínas, hiperglicemia, mielossupressão, pancreatite, trombose, toxicidade de órgãos, hipoalbuminemia e coagulopatias (Avramis, 2012; Hijjiya e Van Der Sluis, 2016).

No Brasil o abastecimento da L-asparaginase é por importação, o que contribui a dificuldade na distribuição do medicamento. Em 2013, o país passou por desabastecimento de L-asparaginase nos hospitais com necessidade crítica de ações imediatas para normalização da distribuição do medicamento, e de forma recorrente

apresenta o caráter emergencial de importação excepcional (Federal, 2013; Deputados, 2017; Anvisa, 2022). Esse cenário de abastecimento nacional de L-asparaginase, apresenta uma problemática com a distribuição do medicamento e garantia de tratamento na LLA.

A partir de trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Pérola Magalhães no Laboratório de Controle de Qualidade e Produtos Naturais – Faculdade de Ciências da Saúde; UnB; Brasília (DF) - foi abordada a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos presentes no solo e em espécies vegetais do bioma Cerrado brasileiro, localizado na região Centro-Oeste. Em um dos resultados apresentados foi identificado como uma espécie nova de *Penicillium* – *Penicillium cerradense*, e revelado como produtor de L-asparaginase (Andrade *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2021).

A busca por outras fontes de L-asparaginase motiva a investigação em encontrar uma enzima que apresente menos reações adversas aos pacientes e sistema de produção com alto rendimentos. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a enzima L-asparaginase expressa pelo fungo filamentoso, *Penicillium cerradense*, e estudou as características físico-químicas e os caracteres imunogênicos dessa enzima. Além de elucidar a estrutura molecular, e em paralelo a produção recombinante dessa L-asparaginase fúngica em sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli*.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Leucemias**

As leucemias correspondem a neoplasias das células sanguíneas, provenientes do crescimento desordenado e o acúmulo de glóbulos brancos imaturos do tipo linfóide ou mieloide (Avramis, 2012).

As leucemias podem ser agrupadas segundo a velocidade de evolução da doença e gravidade, sendo diferenciada em dois tipos: crônica ou aguda. Quando ocorre o acúmulo de células brancas maduras, porém anormais com progressão lenta, classificam-se em crônica. No tipo aguda, as células imaturas são afetadas correspondendo a produção excessiva de células blásticas anormais e acumulando-se na medula óssea, interferindo a produção de células saudáveis. Além dessa diferenciação, as leucemias podem ser agrupadas em linfóides e mielóides conforme

o tipo de glóbulo branco afetado (INCA, 2022b). A classificação da neoplasia tem importância no prognóstico e decisão terapêutica.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as leucemias de acordo com a origem da célula neoplásica, velocidade de crescimento e de alguns marcadores tumorais. Em 2016, a organização revisou as classificações em tumores dos tecidos hematopoéticos e linfoides, agregando aspectos clínicos, genético-moleculares, imunofenotípicos e morfológicos de relevância para prognóstico e tratamento dos pacientes. Essa atualização acrescentou classificações como: neoplasias mieloproliferativas e mielodisplásicas, neoplasias mieloides com predisposição germinativa, leucemias agudas de linhagem ambígua, leucemia linfoblástica de linfócitos B, e leucemia linfoblástica de linfócitos T (Arber *et al.*, 2016).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima mais de 12 tipos de leucemia, dessas a leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfoblástica aguda e leucemia linfoblástica crônica são os quatro principais tipos (Inca, 2022b).

Na estimativa mundial, em 2020, foram estimados 475 mil casos de leucemia, equivalente a 2,5% de todos os tipos de câncer, e corresponde ao décimo tumor mais incidente. Para o Brasil, em cada ano do triênio 2023 a 2025, a leucemia foi estimada a 11.540 casos novos (6.250 homens e 5.290 mulheres) com um risco estimado de 5,33 por 100 mil habitantes (Inca, 2022a). Quanto a mortalidade, no ano de 2020 foram registrados 6.738 óbitos por leucemia (CID C91-95) (3,18 por 100 mil), sendo o 8º tipo de câncer com maior mortalidade (DATASUS, 2019) (SIM, 2020).

Na infância e juventude (entre 0 e 19 anos), a leucemia representa o tipo mais predominante de câncer expressando 28% de todos os tipos de câncer diagnosticados entre crianças, adolescentes e jovens adultos. Nessa faixa etária, a leucemia linfóide aguda é o tipo de diagnóstico mais frequente, seguida pela leucemia mielóide aguda (American Cancer Acs, 2019).

### 2.1.1 Leucemia Linfóide Aguda

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna de células progenitoras linfóides B ou T com progressão rápida, resultante da proliferação clonal e acúmulo de células que exibem marcadores associados aos estágios precoces de maturação linfóide. Nessa neoplasia, os blastos acumulam-se na medula óssea, substituem as células saudáveis do sangue e promovem a supressão da hematopoese normal (Pui *et al.*, 2008; Inca, 2022b).

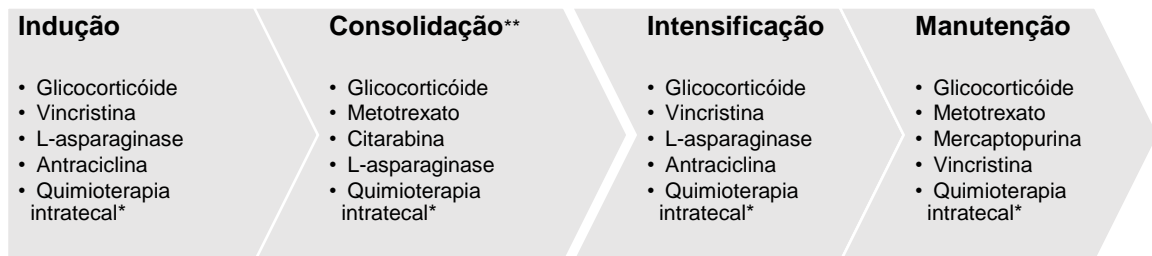
A LLA atinge ambos os sexos, afeta adultos e crianças em todas as regiões do mundo. Apesar da ampla ocorrência, esse tipo de leucemia ocorre predominantemente em crianças e adultos jovens, com pico de incidência entre o segundo e quinto ano de vida, sendo considerada o tipo mais comum em crianças. Considerando crianças e adolescentes diagnosticados com câncer, a ocorrência da LLA é aproximadamente cinco vezes maior do que a leucemia mieloide aguda, sendo responsável por 75% dos diagnósticos de leucemia. O risco em desenvolver leucemia linfóide aguda é inferior a 0,1% (Onciu, 2009; Avramis, 2012; Acs, 2021).

Os fatores de risco para a LLA ainda não estão bem estabelecidos, mas acredita-se na suspeita de associação de vários processos envolvendo leucemogênese e a alteração genética, representando um fator importante no desenvolvimento dessa leucemia (INCA, 2019). Em estudos epidemiológicos, os fatores de risco genéticos, infecciosos e ambientais foram apontados como possíveis fatores para leucemias agudas em crianças (Belson *et al.*, 2007). E ainda, a ocorrência pode estar ligada a condições genéticas hereditárias, como Síndrome de Down (Hertzberg *et al.*, 2010), alguns vírus, como Epstein-Barr e HIV (Gérinière *et al.*, 1994; Sehgal *et al.*, 2010), e exposição anterior à quimioterapia e radioterapia (LLS, 2020). O início clínico da LLA é frequentemente agudo e as manifestações geralmente estão relacionadas a consequência da ocupação de células leucêmicas na medula óssea. Os sintomas geralmente estão associados a insuficiência medular com sinais relacionados a anemia, leucopenia e trombocitopenia. Desses os mais frequentes são fadiga, letargia, febre, dor nos ossos e articulações. O sintoma menos comum é o comprometimento do Sistema Nervoso Central, atinge 10% dos pacientes, mas exige atenção especial na terapia. E, as alterações laboratoriais frequentes incluem anemia, trombocitopenia, neutropenia e leucocitose ou leucopenia, níveis séricos de lactose desidrogenase e ácido úrico (Pui *et al.*, 2008; Onciu, 2009; LLS, 2020).

O diagnóstico é baseado nas diretrizes de classificação da OMS de 2016 integrando os resultados das análises morfológicas da medula óssea, em conjunto com as reações citoquímicas, perfil citogenético e imunofenotípico das células leucêmicas. A princípio, o diagnóstico baseia-se na identificação de células precursoras no microscópio com determinação da linhagem e estágio de desenvolvimento por citometria de fluxo. Os avanços recentes em sequenciamento de genoma e técnicas de diagnóstico permitem inclusão ou substituição em abordagem rotineiras, refinar o prognóstico e orientar o manejo (Pui *et al.*, 2008; Arber *et al.*, 2016).

O tratamento de primeira linha é composto de quatro principais fases ao longo de 2-3 anos: indução, consolidação, intensificação e manutenção. A indução visa remissão completa erradicando a sobrecarga da doença e restando a hematopoiese normal. A terapia de consolidação tem como propósito eliminar as células residuais submicroscópicas que restam após a indução. Em seguida, na intensificação a terapia é de reindução, semelhante a primeira fase. E, a fase de manutenção tem por finalidade evitar relapso e prolongar a remissão, o tratamento nessa fase geralmente é mais brando e longo (Pui *et al.*, 2008; Malard e Mohty, 2020).

No período entre 1960 e 1970, várias drogas de classe antineoplásica foram investigadas e desenvolvidas, incluindo as L-asparaginases de fonte bacterianas disponível para uso (Avramis, 2012). Desde 1962, a enzima L-asparaginase foi incluída em protocolo no tratamento da LLA. Em primeira linha, a L-asparaginase está presente na abordagem de 3 das quatro fases do tratamento, sendo indução, consolidação e intensificação (Figura 1). No Brasil, o protocolo em uso e vigor - GBTLI-LLA 2009 – inclui a enzima a L-asparaginase com atividade antineoplásica para a LLA (INCA, 2001; Sociedade Brasileira de Pediátrica, 2009).



**Figura 1:** Tratamento de primeira linha para LLA. \*A quimioterapia intratecal consiste em metotrexato isolado ou combinado com hidrocortisona e citarabina. \*\*O transplante alogênico de células hematopoiéticas é opcional após a consolidação. Fonte: adaptado de Malard e Mohty (2020).

Os protocolos de tratamento são complexos e envolve o uso de vários medicamentos. A combinação da enzima L-asparaginase com quimioterápicos e corticoides tem se apresentado eficaz para a remissão da neoplasia (Avramis, 2012; Quintanilla-Flores *et al.*, 2014). Aos pacientes de alto risco ou doença residual mínima, o transplante com células hematopoiéticas pode ser realizado a partir de células extraídas da medula óssea, do cordão umbilical ou sangue periférico de um doador

compatível. Em resposta a inovação, eficácia e acesso aos tratamentos, a taxa cura a LLA em crianças foi elevada para 90% e observado aumento na sobrevida (> 80% sobrevida livre de doença), considerando taxa de 5 anos. Esse valor de sobrevida representa um grande avanço comparado a taxa de 58% em 1970 (Pui *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2017; American Cancer Acs, 2019).

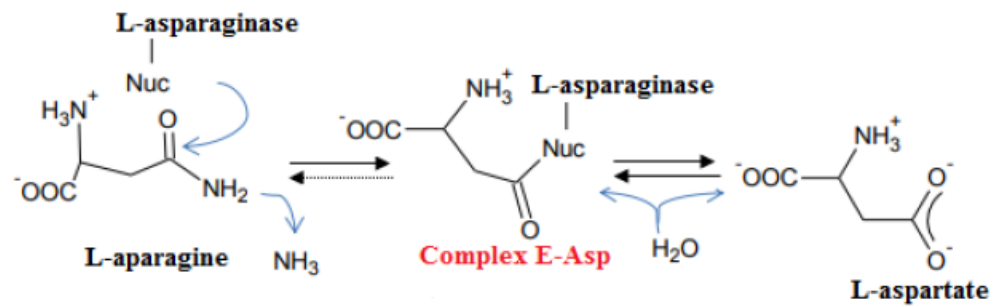
## 2.2 L-asparaginase

A L-asparaginase tem sido um essencial componente empregado no tratamento de doenças hematológicas como a LLA. Como agente quimioterápico, representou um marco na medicina pela remissão completa da LLA em crianças após a inclusão da enzima no tratamento e seletividade na ação. A ação quimioterápica da L-asparaginase consiste em inibir biossíntese proteica reduzindo replicação de células neoplásicas, seguindo por estratégia evitar o fornecimento de aminoácidos necessários na corrente sanguínea para a síntese de proteínas que permitem o funcionamento e sobrevivência da célula, e em consequência induzir a apoptose celular (Krall *et al.*, 2016; Brumano *et al.*, 2018).

Em estudos mais recentes, a L-asparaginase apresentou contribuição na redução do potencial da metástase do câncer ampliando a perspectiva de aplicação. Conforme relato em modelo de câncer de mama em camundongo, pode-se esperar no uso da enzima na redução da invasão do câncer, circulação de células tumorais e a metástase (Knott *et al.*, 2018).

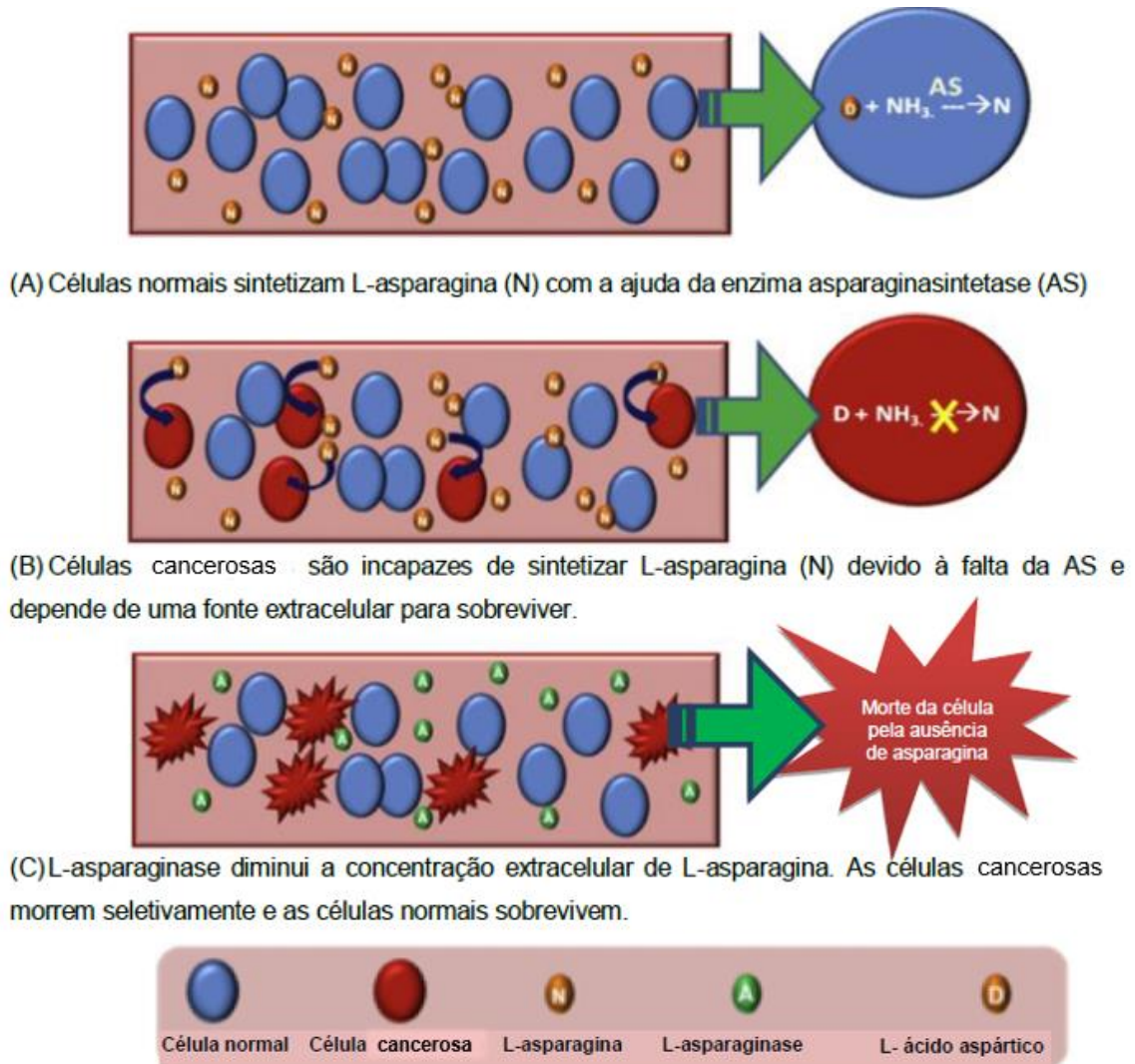
A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) (ASNase) é uma enzima responsável pela catálise da reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônio (Figura 2)(Gurunathan e Sahadevan, 2012; Nomme *et al.*, 2012). Em detalhe, a enzima catalisa a hidrólise do nitrogênio do grupo amida da cadeia lateral convertendo em ácido (Loureiro, 2010). Trata-se de uma enzima encontrada em abundância em alguns microrganismos, plantas e animais, mas não em humanos. A atenção evidente foi dada a L-asparaginase após estudos que corroboraram para a descoberta da ação como agente antineoplásico.





**Figura 2:** Mecanismo de hidrólise de L-asparagina catalisada por L-asparaginase. Fonte adaptado de Costa-Silva *et al.* (2020).

A característica notável e incomum na L-asparaginase que atraiu considerável atenção corresponde a sua atividade antineoplásica (Batool *et al.*, 2016). A L-asparaginase encontra-se no tratamento da LLA por sua capacidade de hidrolisar o aminoácido L-asparagina. As células normais e leucêmicas demandam da presença do aminoácido L-asparagina por necessidades metabólicas. As células normais sintetizam L-asparagina utilizando a enzima transaminase que converte o oxaloacetato em um aspartato intermediário, que mais tarde transfere um glutamato ao oxaloacetato produzindo  $\alpha$ -cetoglutarato e aspartato. Por fim, em células saudáveis, o aspartato é convertido em asparagina pela enzima L-asparaginase. Por outro lado, as células neoplásicas sintetizam L-asparaginase em pequenas quantidades, sendo incapazes de produzirem o aminoácido L-asparagina em níveis regulares, e portanto, são dependentes do suprimento exógeno de asparagina. A diferença metabólica entre as células normais e neoplásicas torna viável o uso de L-asparaginase no tratamento da leucemia, considerando que a enzima rapidamente esgota os níveis extracelulares de asparagina bloqueando o metabolismo das células neoplásicas e impedindo a síntese de proteínas, de DNA e RNA, inibindo a proliferação celular (Heinemann e Howard, 1969; Müller e Boos, 1998; Brunton *et al.*, 2012; Batool *et al.*, 2016). Nesse sentido estratégico, as células saudáveis não sofrem com o efeito da depleção por conseguirem sintetizar de L-asparagina pela asparagina sintetase (Heinemann e Howard, 1969). A figura 3 apresenta em resumo o mecanismo de ação antineoplásico da enzima L-asparaginase.



**Figura 3:** Mecanismo de ação da L-asparaginase. Fonte adaptada Shrivastava *et al.* (2016).

L-asparaginase é considerada a primeira enzima terapêutica com propriedades antineoplásicas amplamente estudada por pesquisadores e cientistas em todo o mundo. A enzima L-asparaginase foi relatada pela primeira vez por Lang (1904) em tecidos bovinos e estabelecida por Furth e Friedmann (1910) e Clementi (1922) (Clementi, 1922; Arif e Hussain, 2014). Clementi (1922) demonstrou a atividade da enzima utilizando soro de mamíferos (porquinho-da-Índia - *Cavia porcellus*). Anos depois, o prospecto da atividade da L-asparaginase como agente antitumoral foi descrito (Kidd, 1953). Após a correlação dos resultados já apresentados em estudos por Clementi e Kidd, Broome (1961) observou a relação da regressão de linfomas à dependência nutricional das células malignas em asparagina exógena e, assim começou a elucidar o mecanismo de dependência nutricional das células neoplásicas

à L-asparagina plasmática (Broome, 1961; El-Naggar *et al.*, 2014). Pelo mesmo autor, investigações posteriores confirmaram o potencial terapêutico da enzima (Broome, 1963a; b; 1965). Ainda, usando a mesma fonte (soro de porquinho-da-Índia) em estudo Yellin e Wriston (1966) obteve a purificação parcial de duas isoformas da L-asparaginase, entretanto, apenas uma isoforma apresentou atividade antitumoral *in vivo*. Em 1967, em pesquisa para elucidação da estrutura, duas isoformas da L-asparaginase foram identificadas em *E. coli*: L-asparaginase I e L-asparaginase II. A forma tipo I encontra-se predominantemente no citoplasma e apresenta baixa afinidade pela L-asparagina, e a forma tipo II é periplasmática e com alta afinidade pelo aminoácido (Cedar e Schwartz, 1967; Yun *et al.*, 2007). Desde então, várias pesquisas foram conduzidas visando a busca de outras fontes da enzima, sendo as mais frequentes de origem microbiana (Loureiro, 2010).

As L-asparaginases podem ser classificadas em três classes com base em domínios distintos (InterPro Scan), características estruturais e filogenéticas: Classe 1 - InterPro ID: IPR027474; Classe 2 - InterPro ID: IPR000246; e Classe 3 - InterPro ID: IPR010349. E, cada classe apresenta uma subdivisão em grupos com características funcionais, mecânicas e estruturais comuns (Da Silva *et al.*, 2022).

A estrutura cristalográfica por raio x da enzima L-asparaginase II de *E. coli* foi determinada como homotetrâmero o composto de subunidades idênticas de 34 kDa com 326 aminoácidos cada (Swain *et al.*, 1993). Um protômero da enzima é composto de dois domínios, o domínio N-terminal maior (~ 195 resíduos) conectado covalentemente ao domínio C-terminal menor (~ 120 resíduos) por meio de um ligante com aproximadamente 20–25 aminoácidos (Lubkowski e Wlodawer, 2021). A topologia geral da estrutura monômero parece ser altamente conservada. O tetrâmero é descrito como um dímero de dímeros devido às interações entre os monômeros. Os monômeros são mantidos principalmente por forças de van der Waals e interações eletrostáticas, os dois dímeros são ligados por ligações semelhantes, sendo estruturalmente ativa apenas na conformação tetramérica. (Swain *et al.*, 1993; Lopes *et al.*, 2017; Lubkowski e Wlodawer, 2019). Asselin *et al.* (1995) relataram uma L-asparaginase de *E. coli* modificada por peguilação, nisso o peso molecular apresentado foi aumentado para 145 kDa. A L-asparaginase de *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) foi caracterizada por cristalografia como tetrâmero por dímero de dímero com 328 aminoácidos em cada subunidade. A enzima de *D. chrysanthemi*

apresentou semelhança estrutural a de *E. coli*, diferenciando pela afinidade por seus substratos (Stecher *et al.*, 1999; Aghaiypour *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2016).

A enzima L-asparaginase é encontrada normalmente como um tetrâmero, mas as formas monomérica, dimérica e hexamérica também foram encontrados para isolados de diferentes fontes (Batool *et al.*, 2016). As fontes diferentes e modificações pós-traducionais podem provocar forte influência na estrutura molecular da enzima (Castro *et al.*, 2021).

O tetrâmero de L-asparaginase possui quatro sítios ativos localizados na interface entre as subunidades nos dímeros. A cavidade do sítio ativo é formada principalmente por um protômero e é complementado por vários resíduos do segundo protômero. A central para a atividade catalítica da enzima é um motif que consiste em Hinge Region-HR e a Active Site Flexible Loop-ASFL localizados do domínio N-terminal. O protômero primário contribui com cinco cadeias laterais de aminoácidos que participam diretamente da reação catalítica. Esses resíduos são bem conservados e rígidos em diferentes L-asparaginases, sendo uma treonina no HR, uma tirosina no ASFL e três outros resíduos (um par Thr-Asp e Lys) localizados cerca de 64-67 e 137-140 resíduos separados, respectivamente, do Tyr da ASFL (Lubkowski, Jacek *et al.*, 2020; Lubkowski e Wlodawer, 2021).

As regiões HR e ASFL correspondem ao elemento mais dinâmico de uma molécula L-asparaginase. Com mudanças conformacionais após ligação do substrato, essas regiões apresentam papel crítico na reação catalítica: formação de uma tampa que determina e limita o acesso à cavidade do sítio ativo; contribuem com o nucleófilo primário e posiciona-o precisamente contra uma molécula do substrato. Nas L-asparaginases, o HR é um octapeptídeo altamente conservado rico em glicina com sequência padrão GGTxyGGG (x = Ile or Leu; y = Ala or Gly). Em contraste, ASFL apresenta menor homologia de sequência entre diferentes L-asparaginases (Strzelczyk *et al.*, 2020; Lubkowski e Wlodawer, 2021).

O mecanismo catalítico de L-asparaginase ainda não foi totalmente esclarecido. Mas, o mecanismo de duplo deslocamento (ping-pong) apresenta aceitação mais ampla (Ehrman *et al.*, 1971) e suportado fortemente por estudos mais recentes (Lubkowski e Wlodawer, 2019; Lubkowski, J. *et al.*, 2020; Strzelczyk *et al.*, 2020). A esse respeito, a L-asparaginase forma uma classe nova e única de hidrolase por utilizar um resíduo da cadeia lateral de treonina como nucleófilo (Lubkowski e Wlodawer, 2021).

A L-asparaginase é a única enzima não humana aprovada para administração repetida em terapia clínica. Em escala industrial, a enzima L-asparaginase comercializada com utilização clínica é de origem bacteriana em três formas – asparaginase nativa e conjugada com polietilenoglicol (PEG-ASNase) de *E. coli*, e a asparaginase obtida de *D. chrysanthemi* (Crisantaspase). Essas preparações disponíveis compartilham o mesmo mecanismo terapêutico no tratamento da leucemia - desaminação e depleção dos níveis séricos de asparagina, embora difiram consideravelmente no perfil farmacocinético, afinidade pelo substrato e perfil de sensibilização do sistema imune. As formas derivadas de *E. coli* são as mais aplicadas no tratamento de LLA (Cortijo-Cascajares *et al.*, 2012; Rizzari *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2021). A asparaginase de *D. chrysanthemi* recebeu o nome de Erwinase®, utilizada geralmente como opção de segunda escolha na administração em pacientes que apresentaram reações de hipersensibilidade as formulações de *E. coli* (Woods *et al.*, 2017; Costa-Silva *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020).

Apesar de relevante demanda mundial por L-asparaginase, apenas algumas preparações comerciais foram amplamente difundidas no mercado e estão bem estabelecidas (Castro *et al.*, 2021). Considerando as aplicações clínicas, algumas das formulações de maior sucesso no tratamento da LLA são: a L-asparaginase nativa *E. coli* Elspar® (Merck & Co., Inc., EUA), sua forma peguilada Oncaspar® (Sigma-Tau Pharmaceuticals, EUA), e L-asparaginase de *D. chrysanthemi* Erwinaze® (Jazz Pharmaceuticals, EUA). Essas formulações da enzima já foram produzidas com nomes comerciais diferentes em vários países, como: Medac® (Kyowa Hakko, Japão), Crasnitin® (Bayer AG, Alemanha) (Pieters *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2016), Aginasa (Medac, GmbH) e Leuginase (Beijing SL Pharmaceutical, China) (Araújo *et al.*, 2021). Outros nomes comerciais: Kidrolase®, Leunase® e Spectrila® - essa última a partir de DNA recombinante;

No tratamento da LLA, a L-asparaginase é um medicamento que manifesta reações graves com necessidade de intervenção (Gonzaga e Oshiro, 2019), e observa-se reações adversas e toxicidade importantes associadas ao uso da enzima de origem procariota (Shrivastava *et al.*, 2012). As principais associações negativas ao uso de L-asparaginase podem estar relacionadas ao mecanismo de hipersensibilidade e à sua inibição de síntese proteica (Keating *et al.*, 1993).

Em estudo de revisão, Hijiya e Van Der Sluis (2016) apontaram as seguintes reações adversas associadas ao uso de L-asparaginas: hipersensibilidade (clínica e

subclínica), hipertrigliceridemia, encefalopatia, disfunção hepática, hiperglicemia, mielossupressão, pancreatite e trombose. Além dessas associação ao uso, podem ser identificadas: toxicidade de órgãos, glicosúria, cetoacidose, síntese proteica diminuída, hipoalbuminemia, hipofibrinonemia, estado hipercoagulável – coagulopatias e alteração de fatores de coagulação (Avramis, 2012).

A presença de encefalopatia e hepatotoxicidade observadas durante o tratamento com L-asparaginase, parecem estar relacionadas com a liberação da amônia no sangue a partir da hidrólise da L-asparagina. E, os sintomas de neurotoxicidade podem ter associação ácido L-aspártico e ácido glutâmico, produtos da hidrólise L-asparagina, e incluem as manifestações de agitação, irritabilidade, tontura, depressão, fadiga, sonolência e confusão. A toxicidade associada à L-asparaginase mais frequente é hipersensibilidade clínica, observa-se ocorrência em 5-50% dos pacientes tratados. As manifestações clínicas das reações de hipersensibilidade incluem reações alérgicas, urticária, erupção cutânea, eritema, edema, broncoespasmo, prurido e inchaço das extremidades, anafilaxia (rara). A presença de hipersensibilidade é caracterizada pela tendência de desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase, e pode reduzir significativamente os níveis de atividade da enzima afetando negativamente os resultados clínicos, incluindo a sobrevida. Nesse caso, pode-se requerer descontinuação do tratamento (Keating *et al.*, 1993; Avramis, 2012; Hijjiya e Van Der Sluis, 2016; Burke e Zalewska-Szewczyk, 2022; Śliwa-Tytka *et al.*, 2022).

O tratamento com L-asparaginase na LLA consiste na administração por via intramuscular ou intravenosa de alta quantidade de proteína. A dose de L-asparaginase utilizada da formulação de *E. coli* é 5.000 UI/m<sup>2</sup> de superfície corporal (Costa-Silva *et al.*, 2020), para L-asparaginase de *D. chrysanthemi* é cinco vez maior (25.000 UI/m<sup>2</sup>)(Gossai *et al.*, 2018) e ambas apresentam administração por três vezes/semana (Costa-Silva *et al.*, 2020).

Considerando a via de administração, apresenta-se a exigência de enzima altamente ativa para viabilidade de uso em humanos. A disponibilidade de uso de L-asparaginase de *E. coli* corresponde a sua atividade específica de 100 UI/mg (unidades por mg de proteína pura, em que 1 unidade é definida como 1 μmol de asparagina hidrolisada por minuto); sendo que por consequência, para administrar 5000 unidades a uma criança, faz-se necessário ter 50 mg de proteína pura e ativa (Costa-Silva *et al.*, 2020).

A L-asparaginase de *D. chrysanthemi* apresenta pelo menos o dobro de atividade específica de L-asparaginase de *E. coli*. A diferença de dose entre as duas L-asparaginase mencionadas anteriormente, deve-se considerando o tempo de meia-vida da enzima. Sendo que, o tempo de meia-vida da L-asparaginase de *D. chrysanthemi* corresponde a 15 horas e o de *E. coli* de 24-30 horas (Asselin *et al.*, 1993).

Em estratégia de peguilação da L-asparaginase de *E. coli*, resultou no aumento de meia-vida da enzima para aproximadamente 7 dias, apresentou diminuição na dose (2.500 UI/m<sup>2</sup>) e frequência de aplicação (uma vez por semana) (Asselin *et al.*, 1993; Zenatti *et al.*, 2018).

A mesma enzima de L-asparaginase fornecida por diferentes preparações industriais apresenta diferença na estabilidade e imunogenicidade. As apresentações clínicas estabelecidas têm apresentado efeitos adversos imunológicos e anafilaxia, bem como apresentado inativação enzimática no tratamento. As melhorias adicionais no resultado da terapia de LLA requerem o desenvolvimento de estratégias menos tóxicas (Mullighan, 2011). Diante da importância de aplicação clínica e em observação as reações adversas apresentadas em decorrência do uso, a busca por outras fontes de L-asparaginase tem se tornado alvo de muitas pesquisas, com motivação em obter a produção da enzima em maior rendimento e apresentando menos reações adversas (Sarquis *et al.*, 2004). Além dessa observação, nacionalmente tem-se gerado uma notável procura por sistemas de diferentes produções de L-asparaginase. Ainda, no Brasil a enzima utilizada para o tratamento de LLA é importada e apresenta dificuldade de abastecimento.

No Brasil até 2013, o Ministério da Saúde realizava a compra da L-asparaginase denominada Elspar® e comercializada pelo laboratório Bagó. Mas em dezembro de 2012, esse laboratório perdeu o registro desse medicamento junto a Anvisa e a empresa produtora anuncia a descontinuação da fabricação da enzima por insustentabilidade. Em janeiro de 2013, ocorreu desabastecimento do medicamento nos hospitais brasileiros, culminando em uma compra emergencial em março de 2013 da L-asparaginase Medac®. Sendo esse, um medicamento sem registro na ANVISA. Em 2014, seguiu com uma nova compra emergencial do medicamento. E, apenas em 2017, um novo medicamento obteve registro aprovado pela ANVISA. No entanto, o novo medicamento apresenta-se como uma L-asparaginase peguilada, registrada como Oncaspar®, e por ser um produto diferente do edital para compra do MS, não

foi adquirido para distribuição no SUS. O produto que foi adquirido nesta compra emergencial foi a L-asparaginase denominada Leuginase, por apresentar o menor valor para compra (Federal, 2013; Deputados, 2017)..

A L-asparaginase é produzida amplamente por animais, plantas e microrganismos. Os microrganismos são considerados uma melhor fonte em comparação aos animais ou plantas, por sua capacidade de crescer facilmente em substratos simples e baratos (Lopes *et al.*, 2017). O quadro 1 revisa as fontes produtoras de L-asparaginase em diferentes fontes (Chand *et al.*, 2020).

**Quadro 1:** Revisão de fontes produtoras de L-asparaginase, adaptado de Chand *et al.* (2020).

Fonte	Microrganismo	Fonte	Microrganismo	
Actinomicetos	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Fungos	<i>Aspergillus aculeatus</i>	
	<i>Streptomyces aurantiacus</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Streptomyces fradiae</i> NEAE-82		<i>Aspergillus terreus</i>	
	<i>Streptomyces ginsengisoli</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>	
	<i>Streptomyces griseus</i>		<i>Cladosporium</i> sp.	
	<i>Streptomyces gulbargensis</i>		<i>Penicillium</i> sp.	
	<i>Streptomyces karnatakensis</i>		<i>Penicillium brevicompactum</i>	
	<i>Streptomyces noursei</i>		<i>Penicillium digitatum</i>	
	<i>Streptomyces parvulus</i>		<i>Penicillium sizovae</i>	
	<i>Streptomyces</i> sp. TA22		Levedura	<i>Candida bombicola</i>
	<i>Streptomyces thermoluteus</i>			<i>Candida guilliermondii</i>
	<i>Streptomyces venezuelae</i>			<i>Candida utilis</i>
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>			<i>Mucor hiemalis</i>
	Algas			<i>Chlamydomonas species</i>
<i>Vaucheria uncinata</i>		<i>Rhodospodium toruloides</i>		
Bactérias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>		
	<i>Acinetobacter glutaminasificans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	<i>Bacillus aryahattai</i>	<i>Talaromyces pinophilus</i>		
	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Trichoderma viride</i>		
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Plantas		<i>Arabidopsis thaliana</i>
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Capsicum annum</i>
	<i>Erwinia carotovora</i>			<i>Coriandrum sativum</i>
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>			<i>Eriobotrya japonica</i>
	<i>Helicobacter pylori</i>		<i>Lotus japonicas</i>	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		<i>Lupin angustifolius</i>	
	<i>Nocardiaopsis alba</i>		<i>Lupin arboreus</i>	
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>		<i>Lupinus luteus</i>	
	<i>Photobacterium</i> sp. J15		<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Phyllanthus amarus</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Phyllanthus emblica</i>	
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		<i>Phyllanthus niruri</i>	
	<i>Pyrococcus furiosus</i>		<i>Phyllanthus urinary</i>	
	<i>Serratia marcescens</i>		<i>Pisum sativum</i>	
	<i>Staphylococcus</i> sp.-6A		<i>Sphagnum fallax</i>	
	<i>Vibrio succinogenes</i>		<i>Withania somnifera</i>	
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YpA		<i>Zea mays</i>	



Em destaque como produtores, espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* (Baskar e Renganathan, 2012; Gurunathan e Sahadevan, 2012), *Penicillium* (Shrivastava et al., 2012; Silva et al., 2018; Cardoso et al., 2020; Andrade et al., 2021), *Fusarium* (Radhika, 2012; Meghavarnam e Janakiraman, 2017) e *Cladosporium* (Mohan e Manonmani, 2013); levedura, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae* (Dunlop e Roon, 1975; Oliveira et al., 1999); além das bactérias *E. coli* e *D. chrysantemi*.

A fonte fúngica é considerada a segunda maior produtora de L-asparaginase e, devido ao alto rendimento econômico e de produção, espera-se que ultrapasse as bactérias. Na indústria alimentícia, a L-asparaginase obtida de *A. oryzae* e *A. niger* é usada como agente de processamento em alimentos. O setor de saúde exige uma fonte de L-asparaginase com mínima ou nenhuma reatividade cruzada para minimizar reações de efeitos adversos e com maior rendimento (Hendriksen et al., 2009; WHO, 2008; 2009 apud Chand et al., 2020).

Uma das abordagens de estudo com finalidade de diminuição da imunogenicidade e reações adversas da enzima L-asparaginase, corresponde a produção da enzima por organismo eucarioto. Essa estratégia parte da consideração que um microrganismo eucarioto aproxima-se das características genéticas humanas. Sendo os fungos organismos eucariotos estão evolutivamente mais próximos dos seres humanos em comparação às bactérias. Espera-se que enzimas isoladas de fungos apresentem menor imunogenicidade (Vimal, A. e Kumar, A., 2017).

Os fungos filamentosos são organismos eucariotos metabolicamente ativos e, por isso, são usados como fontes celulares para a produção de uma variedade de enzimas e metabólitos. Como fonte de compostos bioativos, diversas espécies de fungos são conhecidas e as pesquisas que visam o isolamento desses produtos são expressivas em todo o mundo (Sun et al., 2011). Vários fungos filamentosos já foram descritos como produtores de L-asparaginase. Dentre as espécies produtoras, destacam-se as dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* (Imada, 1973; Gulati, 1997; Mohan e Manonmani, 2013).

Em abordagem diferente, outros estudos visam a resposta de melhora no perfil de qualidade envolvendo análise de bioinformática, predição de peptídeo antigênico, predição de epítomos de células B e mutagênese dirigida ao local. Alguns estudos, observaram vários epítomos na superfície da L-asparaginase de *E. coli* responsável pela imunogenicidade. E, para transpor essa limitação, numerosas variantes de L-

asparaginase foram criadas (Jianhua *et al.*, 2006; Mehta *et al.*, 2014; Mahboobi *et al.*, 2017; Brumano *et al.*, 2018).

A partir de trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Pérola Magalhães no Laboratório de Controle de Qualidade e Produtos Naturais – Faculdade de Ciências da Saúde; UnB; Brasília (DF) - foi abordada a produção de L-Asparaginase por fungos filamentosos presentes no solo e em espécies vegetais do bioma Cerrado brasileiro, localizado na região Centro-Oeste. Em um dos resultados apresentados, uma espécie de *Penicillium*, foi revelado como produtor de L-asparaginase (Almeida, 2015; Freitas *et al.*, 2021) e posteriormente identificada morfomolecularmente como uma nova espécie do gênero, *Penicillium cerradense* sp. nov (Andrade *et al.*, 2021).

A produção por fungo filamento em expressão heteróloga da isoforma de L-asparaginase em *E. coli* permite facilitar o manuseio do microrganismo, o aumento em escala de produção e a manipulação do gene.

### **2.3 Produção de proteínas heterólogas**

As proteínas são sintetizadas como parte do metabolismo de todas as formas de vida e possuem inúmeras funções importantes nos processos celulares. Em geral, as proteínas nativas e recombinantes são amplamente utilizadas como reagentes na pesquisa científica e beneficiam diversos processos industriais mediados por enzimas, na indústria farmacêutica, diagnóstico de doenças e em setores agrícolas (Demain e Vaishnav, 2009; Egelkrout *et al.*, 2012; Archanjo *et al.*, 2021).

Na indústria farmacêutica, o primeiro produto a partir de proteína foi a insulina em 1922. O setor ficou marcado, nos anos 70, com a era da biotecnologia moderna, um pouco antes da descoberta de DNA recombinante. Logo depois, anos 80 e 90, observou-se a expansão da indústria de enzimas com o uso das enzimas microbianas, sendo economicamente mais favoráveis e sobrepondo ao uso das enzimas de origem animal e vegetal. Por avanço no setor, mais de 200 produtos farmacêuticos por peptídeos ou proteínas aprovadas estão na lista do FDA (Food and Drug Administration) (Demain e Vaishnav, 2009).

Por meio da tecnologia de manipulação de DNA, a produção de proteína heteróloga revolucionou as indústrias farmacêutica e de enzimas industriais (Egelkrout *et al.*, 2012). Proteína heteróloga pode ser definida como proteína produzida em

organismos diferentes dos de sua origem, em sistemas eucariotos ou procariotos de expressão (Rai e Padh, 2001; Cançado, 2002).

A engenharia de DNA recombinante proporcionou avanços na produção de enzimas. Com essa tecnologia, as enzimas que apresentavam difícil expressão passaram a ser produzidas por organismos geneticamente modificados. E ainda, possibilitou o aumento da estabilidade, atividade enzimática, especificidade, inibição de feedback, além do aumento da produção enzimática. Com o avanço, exemplo de produtos: a insulina humana, albumina, anti-inflamatórios, hormônio do crescimento humano e vacinas (Demain e Vaishnav, 2009; Tripathi e Shrivastava, 2019).

Para o sucesso da expressão da proteína recombinante, destaca-se a necessidade de cuidado na escolha do sistema e vetor de expressão. Em resumo, os diferentes sistemas hospedeiros disponíveis para a expressão de proteínas recombinantes são *E. coli*, *Bacillus subtilis*, leveduras, fungos filamentosos, células de insetos, células de mamíferos, plantas transgênicas, animais transgênicos e *in vitro* (Demain e Vaishnav, 2009; Gomes *et al.*, 2016).

Para sustentar a escolha do sistema de expressão, vale considerar a quantidade de proteínas produzidas, funcionalidade, velocidade de produção e o rendimento (Demain e Vaishnav, 2009). Por comparação aos tipos de sistemas de expressão de proteína heteróloga, cada um apresenta diferentes vantagens e desvantagens de uso, possibilitando variedade para escolha (Gomes *et al.*, 2016).

Em citação, o sistema de produção por *E. coli* apresenta os seguintes méritos para uso: fácil manipulação; produção em curto período; baixo custo; alta capacidade de crescimento celular; possível aplicação de fermentação contínua. Como desvantagem, esse sistema apresenta ausência da remoção de íntrons das transcrições; possibilidade de terminação prematura da transcrição pela presença de genes de terminação; ausência de modificação pós traducionais; produção de proteínas em corpos de inclusão; degradação de proteínas; presença de endotoxinas (Gomes *et al.*, 2016). O quadro 2 resume as características de sistemas de expressão heteróloga.

Para a produção de proteína heteróloga, o primeiro passo consiste em identificar e isolar o gene responsável por codificar a proteína alvo e a geração de um pedaço apropriado de DNA recombinante contendo a sequência de codificação da proteína. Em seguida, determinar o sistema de expressão e introduzir este DNA recombinante na célula hospedeira apropriada, de modo que a proteína alvo seja

produzida por essa célula manipulada (Walsh, 2007 *apud* Archanjo *et al.*, 2021). As propriedades da proteína determinam a preferência por um sistema específico de expressão (Demain e Vaishnav, 2009).

**Quadro 2:** Sistemas hospedeiros de produção e suas principais características, adaptado de Tripathi e Shrivastava (2019).

<b>Sistema de produção</b>	<b>Características</b>
Animais transgênicos	Alto custo total, alto custo de purificação, alto tempo de produção, baixa capacidade de aumento de escala, propagação viável, alto rendimento do produto, alta qualidade do produto, alto risco de contaminação (vírus, DNA oncogênico, príons).
Células de inseto	Boa dobragem de proteínas, baixa taxa de crescimento, alto rendimento do produto, custo geral médio, propagação viável, difícil cultivo, tempo de produção médio, produção de proteínas glicosiladas, boa capacidade da secreção de proteínas, custo de purificação médio, baixo risco de contaminação, facilidade na capacidade para escalonamento, produto qualidade intermediário.
Células de mamífero	Boa dobragem de proteínas, padrão de glicosilação humanizada, boa secreção, taxa de crescimento lenta, livre de pirogênio, alto custo de produção total, longo tempo de produção, propagação difícil, rendimento médio a alto, alta qualidade do produto, capacidade de expansão muito baixa, alto custo de purificação, alto risco de contaminação (vírus, príons, DNA oncogênico).
<i>E. coli</i>	Baixo custo geral, baixo tempo de produção, facilidade de cultivo, fácil de propagação, produção de proteínas não-glicosiladas, alta taxa de crescimento, baixa capacidade de secreção das proteínas, risco médio de contaminação (endotoxinas), facilidade de modificação no genoma, rendimento médio do produto, baixa qualidade do produto, alta capacidade para escalonamento, alto custo de purificação, livre de vírus.
Leveduras	Custo total médio, boa dobragem de proteínas, produção de proteínas glicosiladas, tempo de produção médio, propagação fácil, taxa de crescimento rápido, alto rendimento, qualidade média do produto, facilidade de modificação do genoma, boa capacidade de secreção das proteínas, livre de pirogênio, facilidade de cultivo, alta capacidade de escalonamento, baixo risco de contaminação, custo médio de purificação.
Plantas transgênicas	Boa dobragem de proteínas, produção de proteínas glicosiladas, custo geral muito baixo, tempo médio de produção, capacidade de escalonamento muito alta, fácil propagação, alto rendimento do produto, alta qualidade do produto, baixo risco de contaminação, alto custo de purificação.

## 2.4 Expressão heteróloga de L-asparaginase

A expressão heteróloga corresponde a possibilidade de propor inúmeras técnicas para superar as desvantagens do tratamento com a enzima L-asparaginase. Nessa oportunidade de manipulação genética, permite inúmeras abordagens de melhorias nas propriedades da enzima como: redução da atividade de glutaminase (Ardalan *et al.*, 2018), estabilidade aumentada *in vivo* (Patel *et al.*, 2009; Maggi *et al.*, 2017) e redução da imunogenicidade (Jianhua *et al.*, 2006; Mehta *et al.*, 2014; Mahboobi *et al.*, 2017; Brumano *et al.*, 2018).

Os últimos anos apresentaram muitos esforços para produção de L-asparaginase recombinante de diferentes fontes. Em destaque, o hospedeiro para a produção aumentada de L-asparaginase recombinante encontra-se a *E. coli*. Nessa fonte, o sistema de expressão gênica mais usado é o pET com indução de isopropil- $\beta$ -Dtiogalactosídeo (IPTG). No entanto, estudos adicionais foram apresentados com hospedeiros alternativos, como *Bacillus subtilis* e *Komagatella phaffii* (*Pichia pastoris*). Em diferente estratégia, esses hospedeiros podem tornar o processo downstream mais fácil e de menor custo por possuírem status GRAS (Generally Regarded Safe) e pela possibilidade em projeção de secretarem a enzima para o meio. Além disso, *K. phaffii* apresenta capacidade de adicionar modificações pós-traducionais a enzima (Castro *et al.*, 2021). A *K. phaffii* pode ser projetada para uma L-asparaginase com padrão de glicosilação semelhante ao humano e apresentar imunogenicidade reduzida (Lima *et al.*, 2020). Cada um dos sistemas para produção recombinantes apresenta suas próprias características em relação à capacidade de produção, custo, complexidade, segurança e impacto de processamento (Santos *et al.*, 2018).

### 2.4.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* consiste em bacilos anaeróbios facultativos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A *E. coli* desse gênero é uma espécie amplamente distribuída e corresponde ao principal anaeróbio facultativo habitando o intestino grosso dos humanos e animais endotérmicos. A maioria das cepas de *E. coli* vivem inofensivamente no cólon e raramente causa doença em indivíduos saudáveis, embora uma série de cepas patogênicas podem causar doenças intestinais e extra intestinais em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos (Ewing, 1986; Conway, 1995; Kaper *et al.*, 2004).

A *E. coli* é um sistema procarioto mais atraente para a produção de proteínas heterólogas e usado para a produção em massa de muitas proteínas comercializadas. A expressão nesse sistema tende a ser mais fácil, rápido e barato. Esse sistema pode ser excelente para a expressão funcional de proteínas, posto que a genética, fisiologia, bioquímica de *E. coli* é bem compreendida em comparação a qualquer outro microrganismo devido a sua biologia molecular ser bem caracterizada (Demain e Vaishnav, 2009; Gomes *et al.*, 2016).

O progresso na compreensão fundamental em *E. coli* sobre a transcrição, tradução e dobramento de proteínas, junto com a disponibilidade de ferramentas genéticas melhoradas, torna essa bactéria atrativa para a expressão de complexos proteínas eucarióticas. Em consideração, o genoma de *E. coli* pode ser modificado com rapidez e precisão; o controle do promotor pode ser fácil; e o número de cópias do plasmídeo pode ser prontamente alterado. Este sistema também apresenta alteração do metabolismo fluxo de carbono, evitando a incorporação de análogos de aminoácidos, formação de ligações de dissulfeto intracelular, e desempenho reproduzível com controle informático. Ainda, a *E. coli* pode acumular proteínas recombinantes em até 80% de seu peso seco, possui rápido crescimento e sobrevive a uma diversidade de condições ambientais de baixo custo de produção (Demain e Vaishnav, 2009; Gomes *et al.*, 2016).

O sistema de expressão por *E. coli* apresenta algumas desvantagens, como: a falta de processamentos pós-traducionais, como a glicosilação; acúmulo intracelular de corpos de inclusão - agregados constituídos de proteínas desnaturadas ou incorretamente enoveladas; a presença de lipopolissacarídeo em sua superfície; capacidade limitada de formar pontes dissulfeto; viés de códon; toxicidade por formação de acetato em altas densidades; acúmulo de endotoxinas; e a falta de um sistema para secretar as proteínas ao meio extracelular (Groves, 2006; Gomes *et al.*, 2016; Walsh, 2007 apud Archanjo *et al.*, 2021).

Essas desvantagens podem ser superadas pela eficiente expressão de proteínas e algumas alternativas para contornar têm sido analisadas e empregadas. A formação de acetato em crescimentos de alta densidade geralmente evita-se controlando os níveis de oxigênio. Algumas técnicas, como a adição de marcadores de fusão à sequência do gene (Liu *et al.*, 2019), uso de cofator e co-expressão com chaperonas, podem evitar a formação de corpos de inclusão (Gupta *et al.*, 2019) e melhorar a expressão solúvel (Malekian *et al.*, 2019). Ainda assim, a produção de

proteínas recombinantes em corpos de inclusão tem algumas vantagens, como baixa degradação do produto por proteases pelo hospedeiro (Tripathi e Shrivastava, 2019). Para a expressão de proteína mais solúvel, marcas diferentes, como Fh8, SUMO, His, TRX e MBP no terminal N ou C são empregadas, e igualmente, auxiliam na purificação por afinidade (Paraskevopoulou e Falcone, 2018). A expressão da proteína no período após indução no cultivo com redução de temperatura conduz à uma produção de proteína solúvel. Do mesmo modo, essa estratégia pode aumentar a estabilidade e o dobramento adequado da proteína. Além disso, novos promotores e células de glicoengenharia de *E. coli* igualmente podem levar ao aumento da expressão de uma proteína recombinante (Gupta e Shukla, 2016). A falta de modificação pós-traducional e de um sistema para secretar as proteínas ao meio extracelular, trazem a necessidade de purificação mais extensa para separar a proteína de interesse das demais produzidas pelas células de *E. coli* (Demain e Vaishnav, 2009; Archanjo *et al.*, 2021). De forma similar, a presença de endotoxinas pode ser solucionada empregando um processo de purificação adequado para aumentar a segurança de terapêuticas (Mamat *et al.*, 2015). As modificações pós-traducionais (glicosilação, formação de ligação dissulfeto, fosforilação ou processamento proteolítico) comumente estão envolvidas em processos de dobramento, atividade biológica e estabilidade da proteína (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). O uso de peptídeo sinal adequado para direcionar a proteína ao periplasma ou no espaço extracelular auxilia no dobramento correto e pode contribuir para o mínimo de degradação proteolítica (Gupta e Shukla, 2016). O uso de diversas fontes de carbono/nitrogênio e cepas específicas podem redirecionar os fluxos de carbono de *E. coli* para diferentes vias, e, ainda, resultar em aumento da produção de proteína (Terol *et al.*, 2019). A escolha de uma linhagem adequada proporciona uma expressão mais favorável. Para o sistema de expressão por *E. coli*, existem diversas cepas disponíveis comercialmente para clonagem e expressão, exemplificando: BL21 (Novagen), BL21 (DE3) (Novagen), BLR (DE3) (Addgene), DH10B (Invitrogen Corp.), Origami B (Novagen), T7 Express (Novagen) (Demain e Vaishnav, 2009; Archanjo *et al.*, 2021).

O sistema de expressão de *E. coli* foi utilizado na produção de diversos medicamentos disponíveis no mercado. Em 1982, a insulina humana foi o primeiro medicamento aprovado nos Estados Unidos, a partir desse sistema. Em 1994, a aprovação do hormônio do crescimento bovino estabeleceu um novo padrão para a fabricação, apresentado por sua relação custo-benefício. Além desses, os

medicamentos filgrastim, interferon  $\alpha$ 2b, interferon  $\alpha$ 2a, interferon  $\beta$ -1b, ranibizumabe, hormônio paratireóide humano, hormônio da paratireoide são produzidos em sistema de expressão de *E. coli* (Baeshen *et al.*, 2015).

A *E. coli* DH10B foi utilizada nesse trabalho como célula competente na propagação dos plasmídeos. DH10B serve geralmente como hospedeiro para a construção, clonagem de grandes plasmídeos, mutagênese dirigida e apresenta alta eficiência de transformação (Durfee *et al.*, 2008). Após, a transformação foi continuada com *E. coli* BL21 (DE3). Essa linhagem corresponde a células competentes deficiente de algumas proteases, produz pouco acetato e adequadas para a expressão de genes não tóxicos ( ThermoFisher Scientific, USA . As proteases ausentes nessa cepa são a OmpT e a Lon. A OmpT pertence a família de proteases de membrana externa - omptinas, responsável pela virulência das bactérias gram-negativas patogênicas. A protease Lon pertence a superfamília de proteases ATNases associadas a diversas atividades celulares sendo responsável pela degradação seletiva de proteínas anormais e mutantes (Vandeputte-Rutten *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2010).

#### 2.4.2 Vetor pET-28a

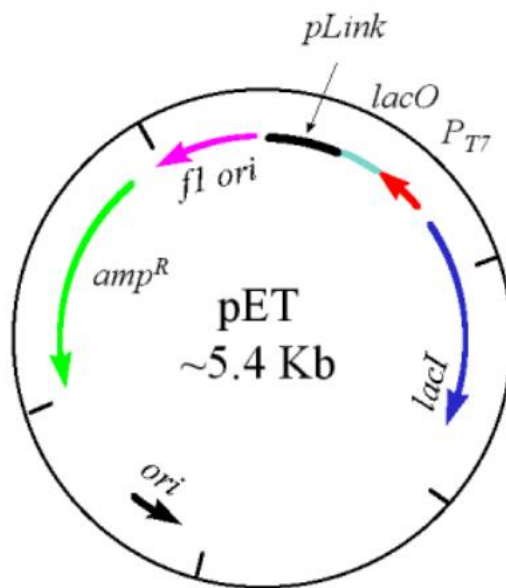
O vetor de clonagem é o elemento responsável em transferir o fragmento de DNA que contém o gene de interesse para uma célula hospedeira. O vetor deve essencialmente ser capaz de autorreplicar na célula em que será introduzido, além de possuir marcador de seleção e locais de restrições únicos para inserção das sequências em estudo (Ferrier, 2017 apud Archanjo *et al.*, 2021). Esses vetores devem possuir pelo menos um local de clonagem e uma sequência que pode ser clivada por uma enzima de restrição para permitir ligação a um fragmento de DNA clivado de maneira análoga (Groves, 2006).

Os vetores mais utilizados são os plasmídeos - moléculas circulares de fita dupla separadas do DNA cromossômico de uma célula. Os plasmídeos ocorrem naturalmente em bactérias ou em algumas células eucarióticas inferiores, capazes de se reproduzir independente do DNA cromossômico - o DNA é duplicado antes de cada divisão celular e as cópias compõem cada célula filha. Esses vetores, com frequência carregam um ou mais genes para resistência a antibióticos (Groves, 2006; Alberts *et al.*, 2017; Archanjo *et al.*, 2021).

Para *E. coli*, apresenta-se uma ampla gama de vetores de expressão com diferenças para regulação de níveis de expressão, capacidade de solubilidade,



sequência de clivagem de proteases e purificação. Os vetores de expressão mais utilizados são os da série pET (Figura 4), que contêm vários elementos importantes: o promotor T7 altamente específico para T7 RNA polimerase diferente do que aparece no genoma de procaríotos; o gene *lacI* codificador da proteína repressora *lac*; operador *lac* bloqueador de transcrição; sítio de policlonagem; origem f1 de replicação; e gene de resistência a um determinado antibiótico, como exemplo a ampicilina (Hunt, 2005; Cabrita *et al.*, 2006; Feliciano, 2009).



**Figura 4:** Esquema do vetor da série pET.  $amp^R$  (região marcadora para resistência a ampicilina), *lacI* (gene *lac1*),  $P_{T7}$  (promotor de transcrição T7), *lacO* (região do operador *lac*), pLink (sítio de policlonagem). (Feliciano, 2009).

Os vetores da série pET são plasmídeos desenhados para proporcionar rápida e grande produção de proteínas. O sítio de policlonagem recebe o gene de interesse. A transcrição rápida desse gene ocorre quando T7 RNA polimerase está presente e o operador *lac* não está reprimido. O promotor T7 apresenta alta seletividade, quando totalmente induzido quase todos os recursos da célula são convertidos para a expressão do gene alvo, sendo capaz de induzir mRNA em alta quantidade por consequência resulta em grande produção de proteínas. T7 é um promotor viral, então, enquanto a T7 RNA polimerase estiver presente a transcrição é rápida. O gene de interesse nos vetores pET são transcritos apenas na presença de T7 RNA polimerase (Hunt, 2005; Feliciano, 2009).

A célula hospedeira para esse sistema de expressão geralmente é uma bactéria geneticamente modificada recebendo em seu genoma o gene T7 RNA polimerase, promotor *lac* e operador *lac*. A transcrição de T7 RNA polimerase estará ativa quando dentro da célula estiver presente a lactose ou molécula similar, como IPTG (isopropil- $\beta$ -D-galactosídeo) (Feliciano, 2009).

Neste trabalho, o vetor de expressão para *E. coli* foi o pET-28a (+) (Novagen). Além das características mencionadas para vetores de série pET, no pET-28a o gene que codifica a enzima precede uma sequência codificadora que permite a expressão da proteína fusionada a uma cauda de histidina (His-Tag) na porção N-terminal. Esse vetor apresenta mais uma sequência His-Tag opcional C-terminal. A região moderadora para resistência a antibiótico nessa construção é para Canamicina (Feliciano, 2009).

A produção heteróloga da enzima L-asparaginase no sistema de expressão *E. coli* já foi explorada em alguns trabalhos – como *Aspergillus terreus* (Saeed et al., 2018; Jebur et al., 2019), *Rhizomucor miehei* (Huang et al., 2014), *Synechococcus elongatus* (Kebeish et al., 2016), *Bacillus subtilis* (Agrawal et al., 2021), *Erwinia carotovora* (Kotzia e Labrou, 2005), *Erwinia Chrysanthemi* (Kotzia e Labrou, 2007), *Pseudomonas fluorescens* (Kishore et al., 2015), microrganismos extremofílicos (Dumina et al., 2021) e *E. coli* (Wang et al., 2001; Jianhua et al., 2006; Barros et al., 2021); no entanto nenhum desses abordou sobre a expressão por gene da enzima de *Penicillium*.

## 2.5 Bioinformática e engenharia de proteínas

Algumas situações podem deixar inviável o uso de um medicamento. Para as enzimas, tanto a estabilidade como a imunogenicidade e alergenicidade podem comprometer a eficácia e segurança de uso clínico. Então, para a comunidade científica é de interesse desenvolver novas alternativas a biofarmacêutica comprometida que ultrapassem as desvantagens. A ciência da bioinformática disponibiliza à comunidade emprego de ferramentas computacionais no estudo de problemas e questões biológicas relacionadas a sequências e estrutura de biomoléculas, e podem reduzir as cargas de trabalho de identificação e triagem de ensaios experimentais. A esse respeito, as ferramentas *in silico* têm sido muito úteis, como da mesma forma, base de dados e diversas ferramentas são intensamente melhoradas (Verli, 2014; Saeed et al., 2018; Belen et al., 2019). Da mesma maneira,

diversos estudos têm objetivado incluir as ferramentas de bioinformática para prever características e analisar possíveis comportamentos da enzima L-asparaginase (Ln *et al.*, 2011; Schalk *et al.*, 2014; Ramya, L. N. e Pulicherla, Krishna Kanth, 2015; Pola *et al.*, 2018; Saeed *et al.*, 2018; Belen *et al.*, 2019).

Todo o conhecimento no campo da bioinformática oferece uma oportunidade de descobrir e desenvolver novos produtos mais eficazes e seguros. O conhecimento de DNA recombinante e a engenharia de proteínas possibilitou facilidade para caracterizar os candidatos à enzima de diversas fontes e manipular de acordo com o certo interesse (Vidya, Jalaja *et al.*, 2017; Belén *et al.*, 2020). Em revisão, Vidya, Jalaja *et al.* (2017) identificaram diversas estratégias de uso das ferramentas de bioinformática para o melhoramento da enzima L-asparaginase. As estratégias são usadas desde a predição de características para engenharia de mutantes para produção heteróloga, ao uso da evolução dirigida - ferramenta que imita o processo de evolução natural para fazer desenvolver uma proteína para uma forma pré-definida (Kotzia e Labrou, 2009).

Considerando os desafios como efeitos imunogênicos, novas funcionalidades, tempo de meia-vida e razão L-glutaminase/L-asparaginase, a bioinformática apresenta-se como uma ciência inestimável para contornar as deficiências da enzima e melhorar a importância terapêutica. Os resultados por essa abordagem, pode disponibilizar uma terapia por L-asparaginase melhorada sob medida para o paciente (Vidya, J. *et al.*, 2017; Fonseca *et al.*, 2021).

Dentre as capacidades de bioinformática, o conhecimento da estrutura tridimensional da enzima L-asparaginase é essencial para esclarecer o delicado equilíbrio de forças entre os átomos que permite que a enzima seja flexível e estável. E, corresponde a entrega de um passo crítico para mutantes mais estáveis e potentes terapeuticamente (Fonseca *et al.*, 2021). Offman *et al.* (2011) empregaram uma combinação de amostragem mutante para investigar o impacto de uma alça presente no sítio catalítico que funciona como uma “tampa”. Na correlação dos resultados, observaram que mutações que aumentam a flexibilidade da alça reduzem a reação catalítica, enquanto mutações que estabilizam a alça apresentam aumento no efeito catalítico. Freitas *et al.* (2022) em predição estrutural da L-asparaginase de *Penicillium sizovae*, apresentaram uma análise de similaridade de L-asparaginases tetraméricas

para as interfaces poliméricas (Hinge Region-HR e o Active Site Flexible Loop-ASFL) responsáveis pela atividade catalítica.

Alguns trabalhos sugerem o uso de mutações para apresentar enzima mais estáveis e maior tempo de meia vida. Kotzia *et al.* (2007) utilizaram-se da engenharia de proteína para direcionar um mutante de *Erwinia carotovora* com maior resistência a degradação proteolítica, maior estabilidade térmica e mantendo a resposta de atividade catalítica da enzima nativa. Long *et al.* (2016), por mutagênese sítio dirigida apresentaram uma variante por *Bacillus subtilis* com melhor termoestabilidade e eficiência catalítica comparada a enzima nativa. Em análise as alterações pelas mutações, observaram que essas melhorias advêm de pequenas alterações conformais e redistribuição potencial eletrostática superficial da estrutura da enzima. Com uma única mutação pontual, Maggi *et al.* (2017) apresentaram a geração de uma variante de *E. coli* com maior estabilidade térmica, maior resistência às proteases de células tumorais, e mantendo níveis de atividade catalítica equivalentes a nativa.

A des-imunização de proteínas terapêuticas pode ser uma estratégia para a produção de biofármacos mais seguros (Onda, 2009). Jianhua *et al.* (2006) apresentou variante com imunogenicidade substancialmente menor em *E. coli*, utilizando-se de varredura de alanina. Com o mapeamento dos epítomos de células-T ou de células B permite-se por mutagênese dirigida direcionar e manifestar variantes menos imunogênicas. Ramya, L. N. e Pulicherla, K. K. (2015) observaram os resíduos mais conservados em epítomos de diferentes microrganismos e estreitaram a busca para mutações mais propensas. Em resultado *in silico* os resíduos histidina, tirosina, treonina e serina podem ser responsáveis pelas regiões antigênicas na enzima L-asparaginase. Cantor *et al.* (2011), em estratégia oposta, apresentaram por saturação uma variante de *E. coli* menos imunogênica mesmo com muitas mutações. Belen *et al.* (2019), *in silico* apresentou estudo para L-asparaginase comparativo entre *E. coli* e *D. chrysanthemi* com diferentes alelos. Nessa abordagem, não observaram diferença significativa na caracterização imunogênica entre essas duas enzimas, enquanto a L-asparaginase de *E. coli* apresentou maior frequência para alergenicidade.

Com a abordagem de bioinformática, sugere-se aumento de produção e qualidade desejada de L-asparaginase recorrendo a uma ou mais estratégias. Além disso, concede-se o caminho para identificação e escolha alternativa de L-

asparaginase a partir de outras fontes além das de *E. coli* e *D. chrysanthemi*, e possibilita a criação de uma enzima ideal para aplicação clínica (Vidya, Jalaja *et al.*, 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar a enzima L-asparaginase produzida pelo fungo filamentoso *Penicillium cerradense* isolado do solo bioma Cerrado brasileiro e a expressão dessa enzima em sistema heterólogo em *E. coli* visando desenvolver uma formulação para aplicação clínica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Produzir a enzima L-asparaginase de *Penicillium cerradense* em meio líquido;
- Identificar a região gênica de L-asparaginase em *Penicillium cerradense*;
- Avaliar a relação evolutiva da enzima;
- Identificar funções biofísico-químicas *in silico* da enzima;
- Identificar *in silico* regiões de influência imunogênica da enzima;
- Avaliar toxicidade *in silico* da enzima;
- Comparar imunogenicidade da enzima a L-asparaginases clínicas;
- Avaliar modelagem estrutural *in silico* e propor modelo estrutural da enzima;
- Expressar em sistema heterólogo em *E. coli* BL21 (D3) a enzima L-asparaginase em meio líquido.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Preservação do fungo**

O fungo selecionado encontra-se depositado na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5.

O fungo selecionado foi mantido e preservado pelo método do congelamento a - 80 °C (UltraFreezer Panasonic - 80°C). A solução contendo glicerol e tween 80,

utilizada no armazenamento fúngico, foi preparada a partir da dissolução de 0,9 g de cloreto de sódio (NaCl) em 50 mL de água purificada. Após a completa dissolução, foram acrescentados a mistura salina 50 mL de glicerol e 0,2 mL de tween 80. A solução foi fracionada em criotubos (1,0 mL) e autoclavada durante 20 minutos a 121 °C.

## 4.2 Preparação do inóculo

O fungo isolado, previamente armazenado em glicerol a – 80 ° C, foi reativado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), a  $25 \pm 2$  °C, durante cerca de sete dias ou até seu completo crescimento. Discos de cinco mm de micélio foram utilizados nos testes para a produção da enzima em meio líquido.

A pureza genética foi obtida pela repicagem monohifal do isolado. Após o crescimento em meio ágar-água (AA) por 24 horas, foi removida uma pequena porção da extensão marginal de uma hifa individual, com auxílio de uma agulha previamente esterilizada, e transferida para uma nova placa de Petri contendo meio extrato de malte-ágar (MEA) (Alfenas e Mafia, 2016).

Preparo de meio de cultivo:

- Meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA)

Foi pesado 39 g Ágar batata dextrose (Himedia<sup>®</sup>) e solubilizado em 1000 mL de água destilada.

- Meio de cultivo extrato de malte (MEA)

Foi pesado 20 g ágar e 20 g extrato de malte (Acumedia<sup>®</sup>) e solubilizado em 1000 mL de água destilada.

## 4.3 Condições de cultivo

O cultivo em meio líquido para o isolado *P. cerradense* foi realizado em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido (m/v). Os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

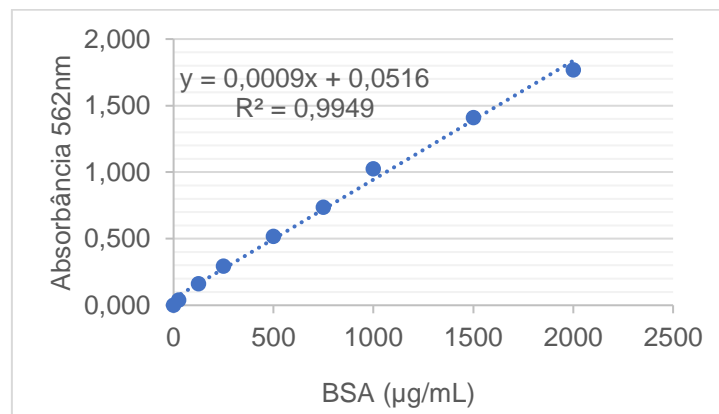
O cultivo em meio líquido juntamente com o inóculo foi realizado a 30°C e agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm) por 4 dias. Após o cultivo, o meio foi filtrado em funil do tipo Büchner com papel de filtro (Whatman n°1) e a biomassa armazenada a – 20 °C.

- Meio Czapek Dox modificado (Baskar e Renganathan, 2012)

L-prolina	1,71 %
L-asparagina	1,38 %
NaNO <sub>3</sub>	1,99 %
Glicose	0,65 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0152 %
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,052 %
KCl	0,052 %
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 %
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 %
CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 %
Ajustar pH para 6,5 com KOH 5M	

#### 4.4 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais pelo método de BCA (ácido bicinconínico) (Smith *et al.*, 1985). Nesta análise, foi usado o Kit de BCA *Pierce Protein Assay Kit*® (ThermoFisher Scientific, USA). Como padrão foi utilizado soro albumina bovino (BSA) em diferentes concentrações finais (2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 125; 25 e 0 µg/mL). A Figura 5 apresenta a curva padrão de soro albumina bovino (BSA) para quantificação de proteínas totais. A dosagem de proteínas totais foi expressa em µg/mL. Este método tem detecção sensível até 5 µg/mL de proteína com o uso aprimorado do protocolo.



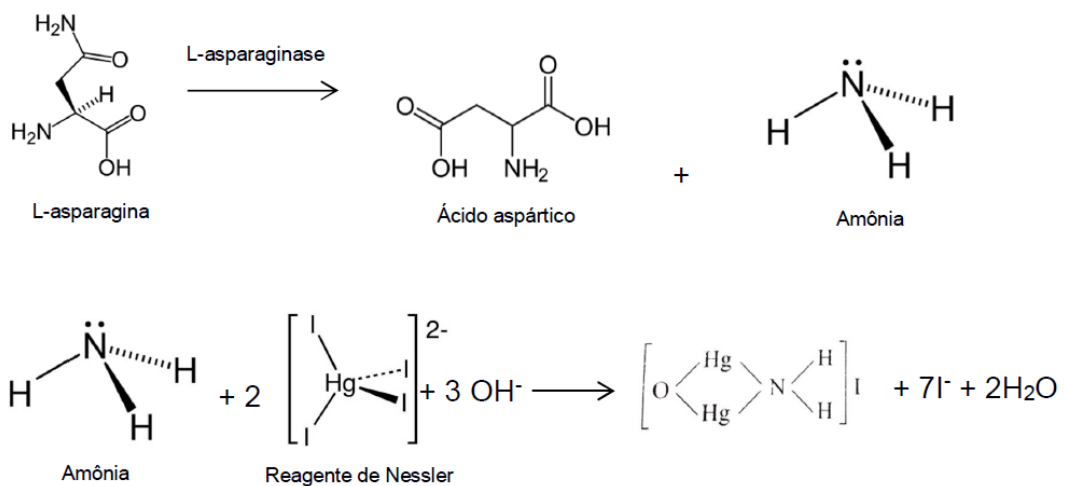
**Figura 5:** Curva padrão em µg/mL de soro albumina bovino (BSA) para quantificação de proteínas totais.

#### 4.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade de L-asparaginase foi determinada por duas metodologias, por quantificação da amônia livre no meio (Imada, 1973) ou do produto ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato (Drainas *et al.*, 1977). O método de Nessler utiliza a amônia livre no meio para quantificar a atividade da L-asparaginase. De forma alternativa, o método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato utiliza o ácido aspártico para quantificação, sendo apropriado para extratos microbianos brutos que podem apresentar amônia interferente.

##### 4.5.1 Método de Nessler

A reação de Nessler ocorrem em duas etapas (Figura 6). Na primeira ocorre a reação enzimática da L-asparaginase na presença do substrato L-asparagina. Na segunda etapa forma-se um complexo entre o produto da primeira etapa e o reagente de Nessler® (Merck). O reagente de Nessler® é uma solução alcalina de tetraiodomercurato(II) de potássio que complexa com a amônia livre produzida na primeira etapa do ensaio, formando uma coloração amarelo-acastanhado que foi lida no espectrofotômetro a 436 nm (Imada, 1973).



**Figura 6:** Mecanismo de reação do agente colorimétrico de Nessler em interação com amônia livre, produto da hidrólise por L-asparaginase.

Na primeira etapa do ensaio, a mistura da reação foi preparada em tubos cônicos de 5 mL e constituída de 1,0 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8,6; 0,1 mL de L-asparagina 189 mM; e 0,9 mL de água ultrapura. A mistura foi mantida em estufa 37°C por 5 minutos para equilibrar a temperatura. Após, foi adicionado e 100  $\mu$ L de



amostra e agitado os tubos por inversão. Em seguida, a mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após este tempo, foi adicionado 0,1 mL da solução de TCA 1,5 mM. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante utilizado para segunda etapa. Em novos tubos de ensaio foram adicionados 4,3 mL de água ultrapura, 0,2 mL do sobrenadante e 0,5 mL do reagente de Nessler®. Os tubos foram agitados por inversão e após 1 minuto realizada a leitura em espectrofotômetro (UV Spectrophotometer UV-1800®, Shimadzu) a 436 nm.

Para todas as determinações da atividade enzimática as amostras foram verificadas em triplicata. Foi preparado o branco da amostra onde o volume amostra foi adicionado após a presença do TCA. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um  $\mu\text{mol}$  de amônia livre por minuto por volume de amostra (U/mL), calculada conforme a equação a seguir.

$$\frac{U}{mL} \text{ de ASNase} = \left[ \frac{(\mu\text{mol amônia livre})(\text{volume da etapa 1})}{(\text{vol. etapa 1 para etapa 2})(\text{tempo da reação etapa 1})(\text{vol. amostra})} \right]$$

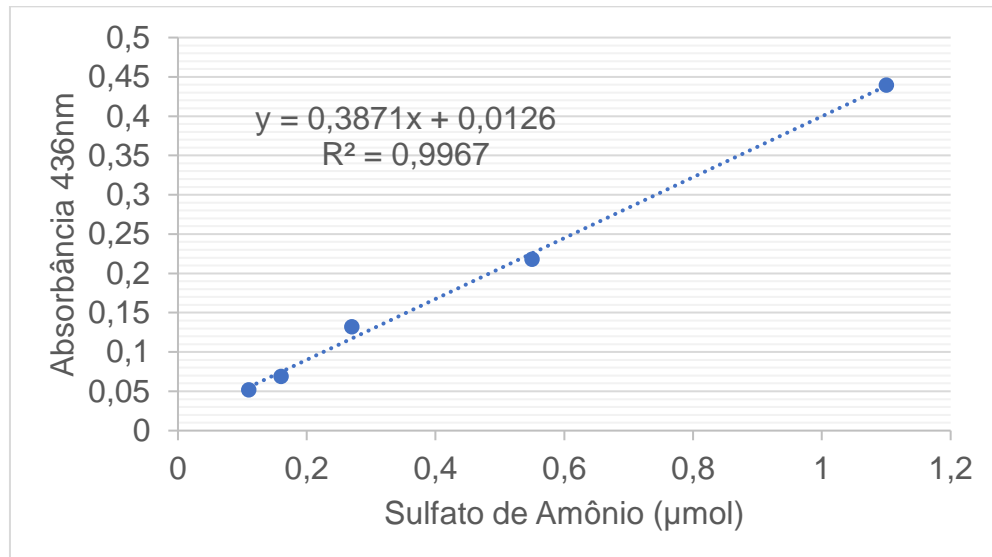
$$\frac{U}{mL} \text{ de ASNase} = \left[ \frac{(\mu\text{mol amônia livre}) \times 2,2 \text{ mL}}{(0,2 \text{ mL})(30 \text{ min})(0,1 \text{ mL})} \right]$$

A curva padrão foi construída com a solução padrão de sulfato de Amônio (6 mM) que equivale a 12 mM de amônia livre (Sigma-Aldrich) em cinco pontos com diferentes massas, de 0,11 a 1,1  $\mu\text{mol}$  (Figura 7). O preparo das soluções da curva padrão está descrito no Quadro 3.

**Quadro 3:** Preparação das soluções padrão para o método de Nessler.

Solução padrão	Mols ( $\mu\text{mol}$ )	Solução 12 mM de amônio ( $\mu\text{L}$ )	Água ultrapura (mL)	Tampão Tris-HCl pH 8,6 (50 mM) (mL)
Branco	0,0	0	1,100	1,00
Padrão 1	0,11	100	1,000	1,00
Padrão 2	0,16	150	0,950	1,00
Padrão 3	0,27	250	0,850	1,00
Padrão 4	0,55	500	0,600	1,00
Padrão 5	1,1	1000	0,100	1,00

As misturas dessas preparações foram submetidas as mesmas condições e etapas descritas para quantificação da enzimática.



**Figura 7:** Curva padrão em μmol de sulfato de amônio para quantificação da atividade enzimática de L-asparaginase.

Preparo das soluções:

- Tampão Tris-HCl 50 mM

Foi pesado 3,035 g de Tris-HCl adicionado em 500 mL de água destilada e ajustado o pH para 8,6 com HCl 1,0 M.

- Solução de L-asparagina 189 mM

Foi pesado 0,249 g de L-asparagina (A0884; Sigma) adicionado em 10 mL de água destilada. Solução preparada momentos antes ao início do ensaio.

- Solução de TCA 1,5 mM

O TCA foi pesado 12,255 g e solubilizado em 50 mL de água destilada. A solução de TCA foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração.

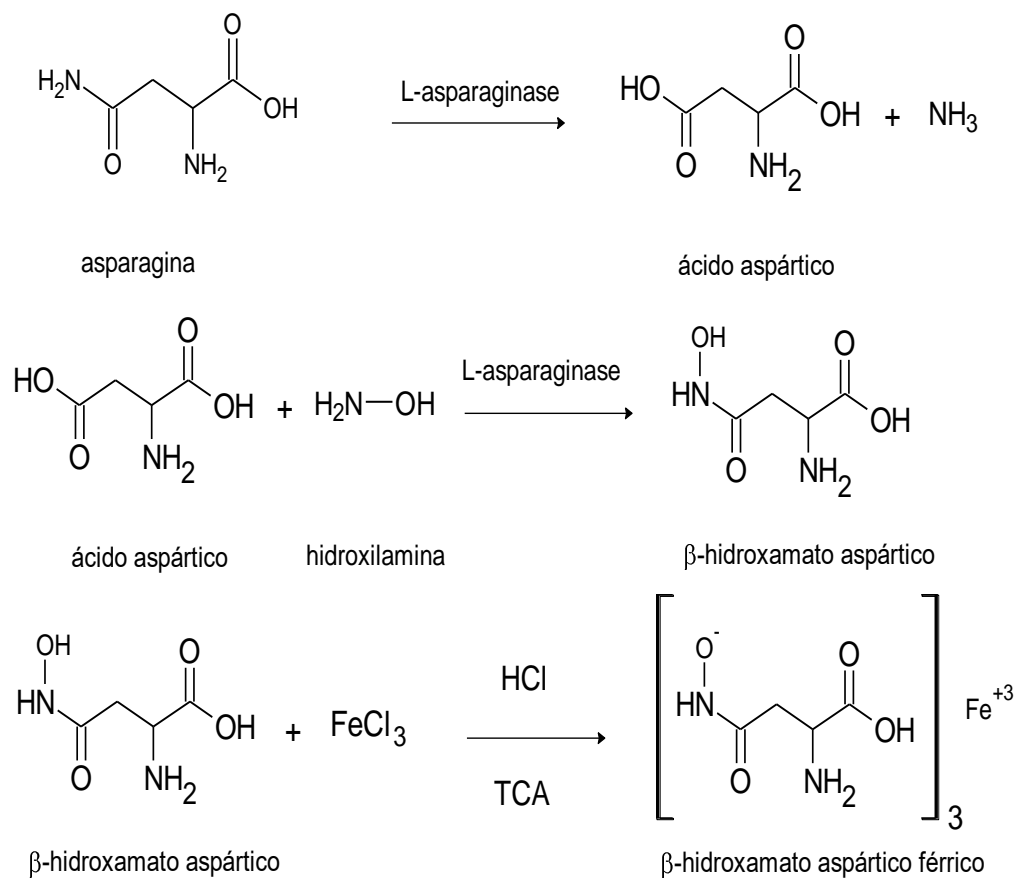
- Solução padrão de sulfato de Amônio (6 mM) – equivalente a 12mM de amônia.

A solução mãe de sulfato de amônio em uma concentração de 6 mM que equivale a 12 mM de amônia livre foi preparada. Para isso foram pesados 79,28 mg e solubilizado em 100 mL de água ultrapura.

#### 4.5.2 Método do ácido L-aspartil-β-hidroxamato

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o método fundamentado na formação de  $\beta$ -hidroxamato aspártico a partir da reação de hidroxilaminólise efetuada pela enzima L-asparaginase na presença de hidroxilamina (Figura 8) (Drainas *et al.*, 1977), com modificações, descrito abaixo.

A mistura da reação foi constituída de 1,5 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8,6; 0,2 mL de L-asparagina 100 mM; 0,2 mL de hidroxilamina 1M pH 7,0; e 0,10 g de amostra de micélio pesado em balança analítica de precisão (Shimadzu). A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos sob agitação a 0,12 g, e foi interrompida com a adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl. Após esse período de incubação as amostras foram centrifugadas a 4 °C em 3.000 g por 5 minutos e com 1,0 mL do sobrenadante em cubeta foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV Spectrophotometer UV-1800®, Shimadzu) a 500nm. A reação entre o hidroxamato aspártico produzido e o  $\text{FeCl}_3$  produz cor avermelhada que absorve em comprimento de onda de 500 nm.



**Figura 8:** Mecanismo de reação da asparagina e hidroxilamina mediado pela L-asparaginase para a formação do complexo  $\beta$ -hidroxamato aspártico férrico.

Para todas as determinações da atividade enzimática as amostras foram verificadas em triplicata. Foi preparado o branco da amostra onde o volume de L-asparagina e da solução de hidroxilamina foi substituído pelo mesmo volume em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,6. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um  $\mu\text{mol}$   $\beta$ -hidroxamato aspártico por minuto por grama de células da amostra ( $U/g_{\text{células}}$ ), calculada conforme a equação a seguir.

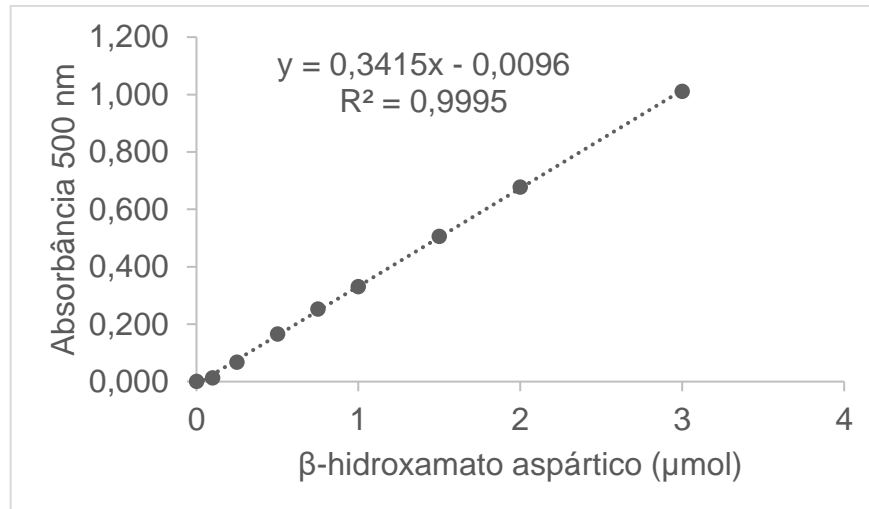
$$\frac{U}{g} \text{ de ASPase} = \left[ \frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{volume de amostra})(\text{tempo da reação})} \right]$$

$$\frac{U}{g} \text{ de ASPase} = \left[ \frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(0,1 \text{ g})(30 \text{ min})} \right]$$

A curva padrão foi construída com a solução padrão de  $\beta$ -hidroxamato aspártico 5 mM (Sigma-Aldrich) em diferentes massas de 0,1 a 3,0  $\mu\text{mol}$  (Figura 9). O preparo das soluções da curva padrão está descrito no Quadro 4.

**Quadro 4:** Preparação das soluções padrão para o método de  $\beta$ -hidroxamato aspártico.

Solução padrão	Mols ( $\mu\text{mol}$ )	$\beta$ -hidroxamato aspártico 5 mM ( $\mu\text{L}$ )	Tampão Tris-HCl pH 8,6 (20 mM) (mL)	Cloreto férrico/TCA/HCl (mL)
Branco	0,0	0	2,000	0,50
Padrão 1	0,1	20	1,980	0,50
Padrão 2	0,25	50	1,950	0,50
Padrão 3	0,50	100	1,900	0,50
Padrão 4	0,75	150	1,850	0,50
Padrão 5	1,0	200	1,800	0,50
Padrão 6	1,5	300	1,700	0,50
Padrão 7	2,0	400	1,600	0,50
Padrão 8	3,0	600	1,400	0,50



**Figura 9:** Curva padrão em μmol de β-hidroxamato aspártico para quantificação da atividade enzimática de L-asparaginase.

Preparo das soluções:

- Tampão Tris-HCl 50 mM

Foi pesado 3,035 g de Tris-HCl adicionado em 500 mL de água destilada e ajustado o pH para 8,6 com HCl 1,0 M.

- Solução de L-asparagina 0,1 M

Foi pesado 0,132 g de L-asparagina (A0884; Sigma-Aldrich) adicionado em 10 mL de água destilada. Solução preparada momentos antes ao início do ensaio.

- Solução de hidroxilamina 1M

Inicialmente foi preparado a solução estoque de hidroxilamina 2 M, mantida a 5° C – denominada Solução A. Também foi preparado uma solução estoque de hidróxido de sódio 2 M – denominada Solução B.

Para o preparo da solução 1 M de hidroxilamina foi misturada a solução A com solução B na proporção de 1:1, sendo a mistura final com pH próximo de 7,0. Esta solução de hidroxilamina neutralizada é instável, portanto, a preparação foi neutralizada no momento do uso.

- Solução de Cloreto Férrico / TCA / HCl

Inicialmente foi pesado 10g de cloreto férrico e solubilizada a 100mL de água purificada – denominada solução C. O cloreto férrico tem característica fotossensível então foi manipulado sob a proteção de luz. Posteriormente foi preparada a solução D contendo 7mL de HCl 37% e 20mL de TCA 6,1M solubilizados a 100mL de água purificada. Ao final a solução C foi adicionada à solução D e armazenada em frasco âmbar sob refrigeração.

- Solução padrão de  $\beta$ -hidroxamato aspártico 5 mM

Foi pesado 7,4 mg de  $\beta$ -hidroxamato aspártico (Sigma-Aldrich) adicionado em 10mL de água ultrapurificada.

#### 4.6 Extração de DNA

##### 4.6.1 Condições de cultivo para isolamento de DNA

O isolado previamente armazenado em glicerol a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi reativado em meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) a  $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante cerca de sete dias ou até seu completo crescimento. Para o isolamento de DNA o fungo foi cultivado em meio batata-dextrose-água (BDA) com água na concentração de 2,0% a  $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  em estufa num período de quatro dias com o interesse de coletar micélio novo.

##### 4.6.2 Manipulação de DNA genômico

A extração do DNA genômico do fungo isolado foi realizada utilizando o protocolo adaptado de *Wizard Genomic DNA Purification Kit*<sup>®</sup> (Promega), como descrito abaixo. Este procedimento garante um DNA de alta qualidade, necessário para a etapa posterior de sequenciamento.

Aproximadamente 40 mg de micélio com sete dias de crescimento em BDA foram transferidos para microtubo de 1,5 mL contendo 4 esferas de aço (3 mm de diâmetro), 600  $\mu\text{L}$  de solução de *lise* (*Nuclei Lysis Solution*<sup>®</sup>) e 100 mg de polivinilpirrolidona (PVP). No equipamento L-Beader 6<sup>®</sup> (Loccus Biotecnologia) a amostra foi macerada por 90 segundos a 1.777 g e em seguida incubadas em banho seco a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, nesse intervalo o microtubo foi invertido a cada 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 3  $\mu\text{L}$  de RNase A (20 mg/mL) e misturados sob um vortex e incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Logo, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da solução *Precipitation Protein Solution*<sup>®</sup> para precipitação de proteínas, o tubo foi invertido cuidadosamente e centrifugado a 18.407 g por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para microtubo de 1,5 mL com 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol (100%) resfriado e cuidadosamente invertidos manualmente por 5 minutos, após incubado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Logo, centrifugados a 18.407 g por 5 minutos e descartado o sobrenadante conservando apenas o *pellet* formado no fundo do microtubo. O *pellet* foi lavado com 600  $\mu\text{L}$  de etanol (70%) resfriado, o microtubo foi invertido manualmente por 2 minutos e centrifugado a 18.407 g/ 5 minutos e o sobrenadante descartado. O microtubo foi invertido sob o papel a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos para secagem do *pellet*. Após essa secagem o *pellet* de DNA foi ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  de T.E pH 8,0 e incubado em

banho seco a 65 °C por 1 hora, ou deixado a – 20 °C por 24 horas. A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% e corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain®* (Biotium).

#### 4.6.3 Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose 1%

Para o preparado do gel de agarose a 1% foi pesado 0,4g de agarose e adicionado 40 mL de tampão TAE 1X. Para solubilização foi aquecido por 30 segundos ou até total dissolução sem atingir fervura. Após atingir 55 °C o preparado foi vertido na cuba e aguardado 10 minutos para completa polimerização. Foi depositado no gel 3 $\mu$ L de amostra juntamente com 3 $\mu$ L de *GelRed Nucleic Acid Gel Stain®* (Biotium) previamente preparado. A corrida aconteceu em tampão TAE 1X em 100 V, 500 mA, 150W por 40 minutos. Após a separação, para visualização e fotodocumentação utilizou-se transiluminador sob luz ultravioleta. O resultado foi avaliado de acordo com a presença ou ausência de banda. A estimativa dos tamanhos dos produtos amplificados foi feita a partir de comparação com o marcador padrão *1Kb DNA Ladder Ready-to-use®* (Kasvi).

Preparo de solução:

- Solução TAE 50X

Para o preparo da solução TAE 50X foi dissolvido 242 g de Tris base em 500 mL de água destilada. Logo após solubilização foi adicionado 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 500 mM e completado o volume para 1 L com água destilada, com auxílio de balão volumétrico. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

#### 4.6.4 Coloração com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain®* (Biotium)

*GelRed®* é um corante ultrasensível de ácido nucleico fluorescente, estável e ambientalmente seguro, projetado para substituir o brometo de etilo altamente tóxico por coloração de dsDNA, ssDNA ou RNA em géis de agarose ou géis de poliacrilamida. O *GelRed®* foi diluído 1:500 em água ultrapurificada e autoclavada, e logo acrescido 1:2 em tampão de amostra (glicerol, 3%; EDTA 500mM ph 8,0, 0,1mM; azul de bromofenol, 0,025%). O preparado foi mantido em temperatura ambiente e quando realizado eletroforese foi utilizado 3 $\mu$ L deste preparado acrescido nas amostras.

#### 4.7 Purificação de produto de PCR e sequenciamento de DNA

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando ExoSAP-IT® (ThermoFisher Scientific, USA). O produto da PCR com volume de 9,5 µL foi diluído com a adição de 6 µL de água ultrapura. Em outro tubo foi colocado 5 µL desse produto diluído adicionado a 2 µL de ExoSAP-IT® sob refrigeração. Para atividade das enzimas de ExoSAP-IT®, as amostras foram colocadas em termociclador por 15 minutos a 37 °C seguido por 15 minutos a 80 °C. A 37 °C a enzima exonuclease I digere o excesso de indicadores (*primers*) e a *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) degrada o excesso de nucleotídeos. Enquanto a 80 °C as enzimas são inativadas. As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa MacroGen Inc. Korea, Seul, República Da Coréia (<http://www.macrogen.com>). As sequências obtidas foram analisadas com auxílio do programa MEGA v. 7 (KUMAR et al., 2016). A sequência consenso foi submetida a comparação com aquelas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando-se o BLAST (basic local alignment tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e alinhadas.

#### 4.8 Sequenciamento do gene da L-asparaginase

##### 4.8.1 Desenho dos *primers* iniciadores

Em trabalho anterior realizado por este grupo de pesquisa (Andrade, 2019), para identificação da sequência de L-asparaginase do fungo *P. cerradense*, a primeira busca foi realizada utilizando sequências da enzima de fungos do gênero *Penicillium* disponíveis no Banco de Dados – GenBank (website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Centro Nacional de Informação em Biotecnologia – NCBI) para desenho dos *primers*. Essas sequências foram alinhadas no programa *Clustal Omega*® para a verificação da existência de regiões conservadas. Os alinhamentos resultantes foram analisados e os *primers* desenhados de acordo com os requisitos básicos para maior eficiência das reações de PCR. No entanto, o pareamento das sequências de L-asparaginase identificadas revelou a presença bases nitrogenadas não-homólogas entre as espécies fúngicas analisadas.

Por esse motivo, *primers* degenerados que compreendem diferentes trechos do gene da L-asparaginase – sequência anterior ao início do gene da L-asparaginase, regiões flanqueadoras, íntrons e sequência posterior ao gene da L-asparaginase - foram desenhados e sintetizados (Invitrogen) (Quadro 5).



**Quadro 5:** *Primers* degenerados construídos para identificação de L-asparaginase de *P. cerradense*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
F1.2	AACAARGCGGAACCAACG
F2	GACARTCGRTACGATAAGC
F-ASP2	TGAGGGTTCAAGTATCCAC
F-ASP3	AGGAATCCCATTTCATTGC
F-ASP6	CGTYGAGCTTGAATCTGAG
R-ASP2.1	TGCYAGTGGATACTTGAACC
R-ASP6	CAGGCTCAGATTCAAGCTC
R-ASP8	ATGGTGYCAATWAARAG
R1	TTAAGAATGGCATAAATCGTTG
R2	GAAGYAGTACGATAAGATCAC
R3.2	CTAGWAGATTCACAATTCCAC

Após resultados inconclusivos para a identificação da sequência de L-asparaginase, uma nova estratégia de desenho de *primers* foi realizada. Inicialmente foi tomado como referência o sequenciamento do gene L-asparaginase do fungo *Penicillium sizovae*, identificado por este grupo de pesquisa. Essa estratégia foi escolhida considerando que o *P. sizovae* pertencente a mesma seção - seção citrina que o fungo em estudo, na relação evolutiva.

Para o desenho dos primers, a sequência de L-asparaginase foi submetida a análise utilizando OligAnalyzer Tool® (<https://www.idtdna.com/pages>). Nesta análise foi observado a proporção de guanina/citosina, temperatura de Melt e verificado a possibilidade de formação de dímeros. No quadro 6 está apresentada a sequência do *primers* de L-asparaginase desenhados. Os *primers* foram desenhados para um fragmento esperado com aproximadamente 1.200 pb.

**Quadro 6:** *Primers* de L-asparaginase a partir de *P. sizovae*.

<b>Primers</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência (5'- 3')</b>
Asn_Psiz	Senso	ATG GTG TCA ATT AAG AGC TTC CTC
	Antissenso	CTA GGC ATT TGT ATT AAG AGA AAA GGT TG

#### 4.8.2 Amplificação da região gênica L-asparaginase

Para identificação da região gênica que expressa a enzima L-asparaginase do isolado foi realizada PCR com os *primers* citados no item 4.8.1. As reações foram preparadas em volume final de 12,5 µL, contendo 6,25 µL de MyTaq PCR Master Mix, 1 µL de DNA genômico, 0,3 µL de cada iniciador (10 pmol/ µL) e 4,65 µL de água ultrapura. A reação controle consistiram na adição de todos os componentes da reação, exceto o DNA genômico. O ciclo da PCR foi programado para desnaturação inicial a 95 °C por 1 min e 30 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu em 20 segundos a 95 °C, 45 segundos na temperatura de anelamento e 1 min a 72 °C e extensão final por 5 min a 72 °C. A temperatura de anelamento utilizada no ciclo foi determinada conforme desenho dos *primers*. Com isso, foram verificadas as temperaturas 52°C, 53°C, 55°C e 57°C. Os produtos das PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% juntamente corado com GelRed e marcador 1Kb DNA Ladder RTU com concentração conhecida e a visualização ocorreu sob luz UV.

#### 4.8.3 Purificação de fragmentos de amplificação em gel de agarose

O produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5 % por 1 hora e 30 minutos e visualizado sob UV. Os fragmentos da amplificação foram cortados do gel com auxílio de uma lâmina e mantidos à – 20 °C até extração do gel de agarose. Para purificação do fragmento e extração do gel de agarose foi utilizado o kit e protocolo Quick-Start® (Quiagem). As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen Inc. Korea, Seul, República Da Coréia (<http://www.macrogen.com>). A sequência consenso foi submetida a comparação com aquelas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando-se o BLAST (basic local alignment tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 4.9 Sequenciamento do genoma

Para o sequenciamento do genoma foi extraída uma amostra de DNA genômico do micélio de *P. cerradense* (isolado de DCFS6a – um espécime de *P. cerradense*) após fermentação submersa em meio Sabouraud dextrose, por 3 dias a 30 °C. A extração do DNA genômico do fungo isolado foi realizada utilizando o protocolo adaptado de *Wizard Genomic DNA Purification Kit®* (Promega), e uma amostra de DNA genômico na concentração de 5612,245ng/µL (260/280 = 2,01) NanoDrop foi

enviada para sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq 2500, empresa StabVida® (STABVIDA, Lda, Portugal). Este processo foi realizado em colaboração com o Professor João Inácio Silva e o Professor David Timson da University of Brighton, Brighton – UK.

#### **4.10 Sequência gênica de L-asparaginase**

A sequência nucleotídica da L-asparaginase de *P. cerradense* obtida do genoma foi traduzida utilizando a tradução e analisada contra sequências de bases de dados utilizando o NCBI BLAST.

Para comparação às fontes de L-asparaginase disponíveis em uso clínico, foram utilizadas as sequências de aminoácidos de *E. coli* (3ECA) e *D. chrysanthemi* (2JK0) obtidas no Protein Data Bank (PDB). Em comparação às outras fontes de L-asparaginase para o Gênero *Penicillium*, foram utilizadas as seguintes fontes *Penicillium chrysogenum* (XP\_002563013), *Penicillium digitatum* (XP\_014538187.1), *Penicillium griseofulvum* (KXG45967.1), *Penicillium italicum* (KGO77393.1), *Penicillium sizovae* (MW291568) e *Penicillium steckii* (OQE28485.1). Em adicional, espécies do gênero *Aspergillus* foram adicionados ao estudo após resultados de proximidade na relação evolutiva de L-asparaginase, sendo eles *Aspergillus idologenus* (PYI32151.1), *Aspergillus ibericus* (XP\_025570260.1), *Aspergillus sclerotiicarbonarius* (PYI04731.1) e *Aspergillus niger* (XP\_001389884.1). Os fungos filamentosos selecionados para o estudo apresentaram atividade de L-asparaginase anteriormente provado, sendo esses, *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. sizovae* e *A. niger* (Mishra, 2006; Shrivastava *et al.*, 2012; Vimal, Archana e Kumar, Awanish, 2017; Freitas *et al.*, 2021). E, os isolados: *P. griseofulvum* (Banani *et al.*, 2016), *P. italicum* (Ballester *et al.*, 2015), *P. steckii* (Nielsen *et al.*, 2017), *A. idologenus*, *A. ibericus* e *A. sclerotiicarbonarius* (Vesth *et al.*, 2018) apresentam a identificação de L-asparaginase por estudo de seus genomas. Todas as sequências aparecem em material suplementar (Material Suplementar A).

#### **4.11 Caracterização da proteína *in silico***

A sequência traduzida foi submetida a SMARTBLAST para realizar o alinhamento de sequências múltiplas às proteínas traduzidas.

A análise evolutiva para L-asparaginase foi realizada após uma curadoria de diversas sequências que apresentam similaridade a L-asparaginase de *P. cerradense* obtidas do GenBank/PSIBlast. PSI-BLAST é útil para detectar relações frágeis, mas

biologicamente importantes entre proteína. O alinhamento de 35 taxas foi realizado, a partir do domínio conservado para L-asparaginase, o software IQ-TREE® (Nguyen *et al.*, 2014) empregando métodos Maximum Likelihood com 1000 bootstrap replicatas. O *E. coli* (ETI79984.1) foi escolhido como grupo externo (outgroup) para a análise.

As massas moleculares, valores teóricos de pI, e outras propriedades físico-químicas da sequência de aminoácidos deduzidos foram previstos utilizando a ferramenta ProtParam® do ExPasy. O SignalP 5.0® foi utilizado para prever a presença de qualquer peptídeo de sinal na sequência traduzida. Para confirmar a predição pelo SignalP foi utilizado o Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) (Käll *et al.*, 2007) com HMM no mecanismo de validação semelhante ao SignalP. O software Phobius prediz a porção de cada região – N, H e C, do peptídeo sinal e toda sequência proteica. Na predição completa da proteína, o Phobius prediz se a proteína madura atua no interior ou exterior do citoplasma.

Além disso, para determinar o tipo de L-asparaginase (I ou II) de *P. cerradense* a base de dados de domínios conservados (CDD) da NCBI e a ferramenta InterPro® de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) foram utilizados para a análise de superfamília e domínio da proteína. Os sítios funcionais e os motifs foram inspecionados com Prosite/ExPASy® (<https://prosite.expasy.org/>). A Hinge Region (HR) e Active Site Flexible Loop (ASFL), regiões essenciais para estabilização do sítio catalítico (Lubkowski, Jacek *et al.*, 2020), foram alinhadas e comparadas.

Os trabalhos de análise *in silico* foram realizados em parceria com os professores Mauricio Homem de Mello coordenador do Laboratório InSiliTox do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde e o professor Georgios Pappas Junior do CEL/Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

#### **4.12 Modelagem estrutural da proteína *in silico***

A modelagem molecular da estrutura tridimensional foi realizada utilizando o software SwissModel® (<https://swissmodel.expasy.org/>) criando uma possível estrutura para determinada sequência de aminoácidos com base em um modelo específico. SwissModel® analisa a sequência de aminoácidos e compara com estruturas homologas disponíveis na literatura em bancos de dados de proteínas (PDB). Assim, o software cria uma possível estrutura para determinada sequência de aminoácidos com base em um modelo específico. A fiabilidade do modelo de

homologia tridimensional proposto foi avaliada utilizando análise de Ramachandran, e a validação posterior foi feita Verify3D (Eisenberg *et al.*, 1997).

Para verificar um melhoramento da previsibilidade da estrutura tridimensional da L-asparaginase, optou-se por uma modelagem utilizando o sistema de inteligência artificial AlphaFold2® (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2021) (DeepMind/EMBL). Nessa abordagem a rede neural profunda do algoritmo AlphaFold combina recursos derivados de modelos homólogos e de alinhamento de múltiplas sequências para prever e gerar uma estrutura. Esse algoritmo mostra-se com precisão notável na previsão da estrutura tridimensional de proteínas com dobras desconhecidas e com precisão comparável à de estruturas experimentais (David *et al.*, 2022).

Em discussão aos resultados, as informações dos dois softwares foram consideradas. Então, os parâmetros para fiabilidade da avaliação *in silicio* foram: GMQE (*Global Model Quality Estimation*) - estima a qualidade por comparação ao alinhamento alvo-modelo com pontuação entre 0 e 1, refletindo a precisão esperada para o modelo construído por homologia; QMEANDisCo – pontuação média por resíduo correlacionada com a pontuação LDDT, fornece uma estimativa da qualidade das características estruturais quanto as diferenças de distância local de todos os átomos em um modelo, incluindo a validação da plausibilidade estereoquímica (ref STUDER e MARIANI) com pontuação entre 0 e 1; QSQE – estima a qualidade da estrutura quaternária da proteína prevista no processo de modelagem com pontuação entre 0 e 1; Ramachandran.

O princípio de Ramachandran representa as possíveis combinações de ângulos nos aminoácidos em uma proteína, permitindo maior facilidade a determinação da estrutura secundária em certas sequências. Em uma proteína, para cada ligação entre resíduos de aminoácidos pode-se avaliar dois ângulos de torção no carbono  $\alpha$ :  $\Psi$  (psi) versus os  $\phi$  (phi). A partir desse conceito do Princípio de Ramachandran permite-se observar o grau de confiabilidade nos cálculos realizados em comparação alvo/modelo (Ramachandran, 1963; Hollingsworth and Karplus, 2010).

#### **4.13 Alinhamento de Estrutura por Pares**

O alinhamento de estrutura permite a comparação entre proteínas mesmo com relação evolutiva distante, e permite análise de variação estrutural, mudanças conformacionais e identificação de domínios estruturais comuns.

Para comparação estrutural entre a enzima L-asparaginase de *P. cerradense* às fontes de L-asparaginase disponíveis em uso clínico, foram utilizadas as sequências de aminoácidos de *E. coli* (3ECA) e *D. chrysanthemi* (2JK0) obtidas no Protein Data Bank (PDB). Em comparação às outras fontes de L-asparaginase para o Gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, foram considerados depósitos junto ao GenBank e com presença de domínio conservado para a enzima.

O alinhamento de estrutura por pares foi realizado em RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB) (<https://www.rcsb.org/alignment>) com o algoritmo jFATCAT – flexibel. Os parâmetros de avaliação do alinhamento foram RMSD (desvio quadro médio da raiz) compara estrutura molecular entre alinhamento dos átomos C-alfa, onde pontuações menores representam melhor alinhamento; TM-score apresenta a medida de similaridade topológica com pontuação entre 0 e 1, onde valores > 0,5 representa modelos com mesma dobra de proteína.

#### **4.14 Conservação sequência-estrutura L-asparaginase de *Penicillium***

Para verificar a conservação de resíduos para L-asparaginase de espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* foram considerados depósitos junto ao GenBank e com presença de domínio conservado para a enzima. O alinhamento dessas sequências foi realizado utilizando o servidor T-Coffee Express (<https://tcoffee.crg.eu/apps/tcoffee/do:expresso>). Para sobreposição da variação de aminoácidos a estrutura molecular de L-asparaginase foi utilizado o modelo estrutural proposto neste estudo para L-asparaginase de *P. cerradense*. O mapeamento da conservação das sequências em estrutura foi realizado utilizando o programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

#### **4.15 Predição de epítopos nas células-T e determinação de densidade de epítopos**

O MHC-II Binding Predictions a base de dados Immune Epitope Database (IEDB) (<http://tools.iedb.org/mhcii/>) foi utilizado para predição de epítopos de células-T. Para esse efeito, o métodos IEDB recomendado (2023.05 - NetMHCIIpan 4.1 EL) foi selecionado (Reynisson *et al.*, 2020) (aceso em 20 junho 2023) e utilizado os parâmetros predefinidos do programa. O servidor prevê a ligação de peptídeos a moléculas MHC II. O programa foi suplementado com a sequência de aminoácidos a ser avaliada e a sequência foi fragmentada em peptídeos com comprimentos de 15 resíduos. Os alelos a serem avaliados foram selecionados e a análise foi iniciada.

Os peptídeos preditos como epítomos imunogênicos foram estabelecidos ao linear com percentil < 2 ("aglutinante forte") e < 10 ("aglutinante fraco"). Para determinação densidade de epítomos, o cálculo de frequência relativa foi utilizado:

$$f_i = \frac{n_i}{N} = \frac{n_i}{\sum_j * n_j}$$

Onde:

$n_i$  = número de epítomos imunogênicos preditos

$N$  = número total de epítomos preditos pelo programa (imunogênicos e não imunogênicos).

$\sum_j n_j$  = epitopes predicted immunogenic and non-immunogenic

A densidade dos epítomos de cada proteína foi determinada para os alelos *HLA-DRB1\*01:01*, *HLA-DRB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*04:01*, *HLA-DRB1\*07:01*, *HLA-DRB1\*08:01*, *HLA-DRB1\*11:01*, *HLA-DRB1\*13:01* e *HLA-DRB1\*15:01*. Esses alelos do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) foram selecionados para predição por referência com alta distribuição global (Gonzalez-Galarza et al., 2011; Southwood et al., 1998) e conferem uma ligação de alta afinidade a epítomos de L-asparaginase que levam a uma maior frequência de reações imunogênicas (Fernandez *et al.*, 2014).

#### 4.16 Predição de alergenicidade dos epítomos

Para realizar a predição de alergenicidade das L-asparaginases o servidor AllerTOP v.2.0® (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) (Dimitrov et al., 2014) foi utilizado. Com este propósito, cada um dos epítomos de células T previstos como imunogênicos para os alelos *HLA-DRB1\*07:01* foi avaliado usando este programa. O programa retorna resultados como "provável alérgeno" e "provável não-alérgeno". A frequência relativa dos epítomos alergênicos foi calculada, dividindo o número de epítomos alergênico para o alelo *HLA-DRB1\*07:01* sobre o total de epítomos imunogênicos previamente determinados para este alelo conforme descrito para cada L-asparaginase na seção anterior 4.15.

#### 4.17 Predição de epítomos nas células-B

A predição de epítomos de células B (epítomos conformacionais) foi realizado utilizando o servidor BepiPred-3.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/>) (Clifford *et al.*, 2022) da base de dados DTU Health Tech, com os parâmetros predefinidos do programa (limiar

de predição 0,1512). O servidor prevê epítomos conformacionais de células B a partir da sequência da proteína.

#### **4.18 Predição da toxicidade**

Para prever a toxicidade da L-asparaginase foi utilizado o webserver ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>) (Gupta *et al.*, 2013) para prever os peptídeos tóxico/não tóxico identificando regiões que contribuem para a toxicidade da proteína. Para esse efeito o método SVM (Swiss-Prot) based foi selecionado. O programa foi suplementado com a sequência de aminoácidos a ser avaliada e a sequência foi fragmentada em peptídeos com comprimentos de 10 resíduos.

#### **4.19 Mapeamento de epítomos**

O mapeamento de epítomos foi realizado nas estruturas monoméricas modeladas de asparaginase com Dassault Systèmes BIOVIA (<https://www.3ds.com/products-services/biovia/>). BIOVIA Discovery Studio v. 2021 foi usado para gerar os resultados gráficos (Biovia, 2021).

#### **4.20 Clonagem e expressão de L-asparaginase em *E. coli* por pET28a**

O desenho e engenharia realizados neste trabalho, para clonagem e expressão heteróloga de L-asparaginase em *E. coli*, foram construídos em parceria com a professora Eliane Ferreira Noronha, coordenadora do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

A sequência fúngica codificante para a enzima L-asparaginase de *P. cerradense* foi identificada em parceria com o Prof. João Inácio Silva, da University of Brighton, Brighton - UK, e posteriormente foi clonada em *E. coli*. Os vetores pET28a contendo a sequência de L-asparaginase foram obtidos da empresa Genome® e inicialmente clonados em *E. coli* DH10B para aumentar o número de plasmídeo e possibilitar posterior transformação em *E. coli* BL21(D3). O vetor de expressão utilizado como *backbone* foi pET-28a(+) (Novagen).

##### **4.20.1 Preparo de células termocompetentes**

Para a transformação genética, o preparo de células termocompetentes das cepas de *E. coli* DH10B e BL21 (DE3) foi realizado conforme protocolo descrito por Chang *et al.* (2017). As cepas de *E. coli* DH10B e BL21 (DE3) foram cedidas pela



professora Eliane Ferreira Noronha, coordenadora do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

O pré-inóculo foi realizado em cultivo com meio líquido 1 mL LB (Luria Bertani) em tubo de 2mL, pH 7,5 com uma colônia da linhagem de *E. coli* desejada. Inicialmente, o cultivo foi incubado em agitador orbital sob 200 rpm, à 37 °C, *overnight*. Após, esse conteúdo da cultura foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 99 mL de meio LB e incubado novamente em agitador orbital à 200 rpm, 37 °C por 4 h. Posteriormente, o cultivo foi dividido em dois tubos cônicos de 50 mL e mantidos em banho de gelo, durante 20 minutos. Após esse período, o cultivo foi centrifugado por 1680 x g, 10 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e incubou-se no gelo, durante 30 minutos. Para uma segunda lavagem, a cultura foi centrifugada nas mesmas condições, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1M + 15% de glicerol. Por fim, alíquotas de 200 µL foram transferidas para criotubos. As culturas de células competentes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer – 80 °C.

Preparo das soluções e meio de cultivo:

- Meio de cultivo LB (Luria Bertani - KASVI)  
Foi pesado 25 g de meio LB (Luria Bertani) em 1000 mL de água destilada.
- Solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M  
O preparado de solução estoque CaCl<sub>2</sub> 1 M foi realizado pesando 11,1 g de CaCl<sub>2</sub> anidro solubilizado em água destilada para 100 mL e submetida a filtração a 0.22µm. Para a solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M foi adicionado 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 1M em 90 mL de água destilada.
- Solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1M + 15% de glicerol  
Foi adicionado 6mL de CaCl<sub>2</sub> 1M com 9mL de glicerol a 45mL de água destilada.

#### 4.20.2 Transformação genética de cepas de *E. coli*

Após o preparo de células termocompetente, a transformação genética das cepas de *E. coli* DH10B e BL21 (DE3) foi realizada conforme descrito por Aragão; Rech (2015), utilizando os vetores pET28a(+)-L-ASNase\_Pc e pET28a(+). Sendo

esse último, o vetor a ser considerado como controle negativo em todos os experimentos por não conter o gene de expressão para L-asparaginase.

Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL previamente refrigerado foi transferido uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana de células termocompetentes e adicionado o volume correspondente para 20 ng de plasmídeo às células, misturando-o cuidadosamente, e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, transferiu os microtubos para o banho-maria a 42 °C durante 90 segundos. Logo em seguida, os microtubos foram novamente submetidos a banho de gelo durante 2 minutos. Após esse período, foi adicionado de 900 µL meio LB em cada microtubo e homogeneizado suavemente. Para crescimento, os microtubos foram transferidos para estufa à 37 °C por 45 minutos. Após esse período, as células foram concentradas por meio de centrifugação a 20590 x g por 30 segundos. Em seguida, foi eliminado 900 µL do sobrenadante e as células ressuspensas com 100 µL de meio LB restante no tudo. Por fim, a cultura bacteriana foi semeada em placa de Petri contendo meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL. As placas foram então incubadas em estufa de crescimento à 37 °C *overnight*.

Após o período de crescimento foram selecionadas: 1 colônia de *E. coli* DH10B pET28a(+)-L-ASNase\_Pc; 1 colônia de *E. coli* DH10B pET28a(+); 1 colônia de *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+); e 10 colônias de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor pET28a(+)-L-ASNase\_Pc. Essas colônias foram devidamente isoladas em uma nova placa meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL, e, posteriormente, submetidas à extração de DNA plasmidial e confirmação da transformação por PCR

#### 4.20.3 Preparo de estoque de células

Para o preparo do estoque padronizado, os clones foram submetidos ao processo de criopreservação, conforme descrito por Barros (2020). O microrganismo foi inoculado em 50 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL em Erlenmeyer® de 250 mL, sob agitação 180 rpm a 37 °C. Em fluxo laminar, a cada duas horas foi retirada assepticamente uma alíquota de 500 µL do cultivo e transferida para microtubo. A alíquota foi centrifugada a 10.000 g, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspendido em 1 mL de NaCl 0,85%. Em seguida, a suspensão foi submetida a leitura da densidade ótica a 600nm (OD<sub>600</sub>) em espectrofotômetro junto ao branco da amostra (1 mL de NaCl 0,85%). Quando a

densidade atingiu 1,5 - 2,0 o cultivo foi interrompido e transferiu-se uma alíquota de 40 mL para um tubo cônico de 50 mL e centrifugada a 10000 g, 4 °C por 10 minutos. Após essa concentração, o sobrenadante foi descartado e *pellet* celular ressuscitado em 40 mL de meio de criopreservação (85% LB estéril suplementado com Canamicina 50 µg/mL / 15% de glicerol estéril). Alíquotas de 500 µL da suspensão celular foram transferidas para criotubos, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* -80 °C.

#### 4.20.4 Extração de DNA plasmidial

Após o crescimento em placa, os clones foram levados ao crescimento em tubo cônico de 50 mL contendo 15 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL sob agitação constante de 200 rpm à 37 °C *overnight*. Após o cultivo, as células foram submetidas à extração de DNA plasmidial conforme protocolo Kit Pure Link – Quick Plamid Miniprep® (Invitrogen). Após isolamento de DNA plasmidial, as amostras foram conferidas por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE coradas com SYBR Safe DNA Gel Stain® (Invitrogen), conforme especificações dos fabricantes. O marcador molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder® (Thermo Scientific). A pureza do DNA foi avaliada espectrofotometria pela relação de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  (De-Souza et al., 2016).

#### 4.20.5 Seleção de clones transformantes por PCR

Para confirmação da transformação genética dos clones isolados foi realizada PCR com preparação em volume final de 20 µL, conforme descrito a seguir: 0,1 µL de GoTaq DNA Polymerase® (5 U/µL) (Promega); 4 µL de GoTaq Reaction Buffer® (Promega); 0,4 µL de PCR Nucleotide Mix 10 mM (Promega); 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> Solution (Promega); 2 µL *primer forward*. 10 µM (5'-GGTGCAATGGTCGTTATGAA-3'); 2 µL *primer reverse* 10 µM (5'-TGGCATGGTTGAAGGAAGTA-3') e 9,3 µL de água destilada autoclavada e 1 µL de DNA molde (100 ng/µL). Ao controle negativo da reação, foi adicionado 1 µL de água em substituição ao DNA. O ciclo da PCR foi programado para desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu em desnaturação a 94 °C por 30 segundos; anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Por fim, extensão final a 72 °C por durante 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain®

(Invitrogen) e marcador 1Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen) para visualização dos amplicons.

#### 4.20.6 Cultivo de *E. coli* BL21(DE3)

No primeiro momento, um pré-inóculo foi preparado em tubos cônicos de 15 mL contendo 5 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL adicionados de 50 µL de cultura criopreservada e levado ao agitador a 200 rpm, 37 °C, *overnight*.

Em seguida, foram preparados inóculos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL para OD<sub>600</sub> 0,1 inicial. As culturas foram submetidas à cultivo em agitador a 200 rpm, 37 °C. Após 5 horas, as culturas foram induzidas com 0,5 mM de IPTG e retornaram para o agitador, sob as mesmas condições previamente descritas, por 18 h.

Após o processo fermentativo, o cultivo foi submetido à centrifugação em tubos cônicos de 50 mL a 8000 x g, 15 min, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10 mL de tampão PBS 1x. A suspensão foi submetida à agitação em vórtex para homogeneização. Em seguida, a amostra foi sonicada em banho de gelo, em processador ultrassônico de ponteira (Vibra-Cell®), ponteira 1/8", durante 7 minutos (pulse 30 seg ON, 45 seg OFF), amplitude 30%. O lisado celular foi centrifugado a 10000 x g, 10 min, 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico de 15 mL, e passa a ser denominado de fração solúvel. O pellet restante foi ressuspensionado em 10 mL de tampão PBS 1x, e passa a ser denominado de fração insolúvel. As amostras foram congeladas em freezer -20 °C.

Os extratos proteicos tiveram seu teor de proteínas totais determinados pelo método BCA por Kit de BCA Pierce Protein Assay Kit® (ThermoFisher Scientific, USA), conforme descrito no item 4.4., e, foram utilizados nos ensaios de determinação de atividade enzimática de L-asparaginase, conforme descrito no item 4.5.1.

Prepara de solução:

- Tampão PBS 1x

Foi pesado  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1,14 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2 g, NaCl – 8 g, KCl – 0,2 g solubilizados em água destilada para 1 L, e pH ajustado para 7,4 com HCl.

## 4.21 Avaliação da expressão de L-ASNase<sup>PC</sup>

### 4.21.1 Precipitação de proteínas com TCA

Para precipitação de proteínas, o volume equivalente a 40 µg de proteínas, foi transferido para um microtubo, e à ele foi adicionado volume suficiente para a proporção de 1000 µL extrato proteico : 133 µL de ácido tricloroacético 75% (TCA) (Migliolo e Oliveira, 2014) previamente gelado, homogeneizada cuidadosamente em vórtex e incubada overnight a 4°C. Posteriormente a amostra foi centrifugada em 10000 x g, 4°C por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o concentrado foi lavado com 1 mL acetona fria por 3 vezes seguido de centrifugações conforme descrito anteriormente. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 3 minutos para eliminação total do solvente restante. O pellet formado foi ressuspenso em 20 µL de tampão adequando a metodologia de análise posterior.

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

A avaliação da expressão de L-ASNase foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme (Laemmli, 1970). Géis de poliacrilamida foram formados por copolimerização de acrilamida 29,2% e bis-acrilamida 0,8% na presença de persulfato de amônio (APS) 10% e tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel concentrador foi preparado a 4,5% (v/v).

Após determinação de proteínas totais das amostras, 40 µg de proteína foi diluída em 20 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,01%; glicerol 25% e β-mercaptanol 5%) e aquecida por 5 minutos a 100°C. Uma alíquota de 20 µL das amostras concentradas foi aplicada no gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese foi realizada em sistema cuba vertical (miniVE- GE Healthcare Life Science) com tampão de corrida (Tris-HCl 125 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (v/v), pH 8,3) a temperatura ambiente com amperagem constante inicial de 13 mA e voltagem variando de 200V percorrendo o gel concentrador e 300V no gel separador. Como marcador de massa molecular foi utilizado kit de baixo peso molecular (Low Molecular Weight GE Healthcare) contendo as proteínas fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (30,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue para visualização das bandas das proteínas.

O gel foi imergido em solução de coloração (Azul de Coomassie R-250 0,25%, metanol 45%, ácido acético 10% e água destilada), incubado *overnight* à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi imergido em solução para descoloração (metanol 45%, ácido acético 10% e água destilada) e incubado sob leve agitação, trocando a solução quando necessário.

#### 4.21.3 Western Blotting

A partir da avaliação por SDS-PAGE foram selecionados os três melhores clones quanto a expressão de L-asparaginase. E, em seguida, avaliada a expressão da enzima por Western Blotting utilizando o marcador PageRuler Prestained Protein Ladder® (ThermoFisher Scientific, USA) variando 10 kDa a 180 kDa.

Após a separação das frações proteicas em gel de poliacrilamida, conforme item 4.21.2, foi realizada a transferência eletroforética para uma membrana para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) previamente umedecida em tampão de transferência. A transferência de proteínas foi realizada em sistema semi-seco sob corrente constante de 14 V por 1h30min. A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com Comassie Blue e tampão de transferência. No processo de imunodeteção, o bloqueio inespecífico foi realizado com leite (solução de bloqueio) durante 2 h, em temperatura ambiente, sob leve agitação. Por fim, a membrana foi submetida em solução de incubação contendo o anticorpo primário – Anticorpo monoclonal Anti-HisTag fusionado à HRP (Invitrogen), na diluição de 1:5000 (ou seja, 1 µL para cada 5 mL de solução de incubação), por 1 h, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Após a incubação com o anticorpo, a membrana recebeu três lavagens com tampão TBSt por 10 min cada. Para detecção das bandas, a membrana foi exposta a Pierce™ ECL Western Blotting Substrate Kit® (ThermoFisher Scientific, USA) por 1 min com revelação por quimioluminescência, por detecção de peroxidase de *horseradish*, enzima fusionada ao anticorpo. O filme foi revelado em fotodocumentador sendo evidenciado os “*blots*” correspondente a L-asparaginase HisTag.

Preparo das soluções:

- Tampão de transferência

Foi preparado o tampão Tris/Glicina 5x pesando 15,15 g e 72g de glicina solubilizados em água destilada para 1 L e pH ajustado para 8,3.

Para o tampão de transferência (Tris 12,5 mM, glicina 960 mM, metanol 20%, pH 8,3) foi dissolvido 20 mL de metanol em 60 mL de água. Em seguida, adicionar 20 mL do tampão Tris/Glicina 5x.

- Tampão Tris-Base Salino + Tween-20 (TBSt)

Para o preparo do tampão foi pesado 2,4 g de Tris base, 8,8 g de NaCl e adicionado 1 mL de Tween-20 solubilizados em água destilada para 1 L. O pH foi ajustado para 7,6. (TBSt – Tris 20mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,6)

- Solução de bloqueio

A solução foi preparada pesando 2,5 g de leite em pó desnatado e solubilizado em TBSt para 50 mL.

- Solução de incubação

Foi adicionado 1 µL do anticorpo a 5 mL da solução de bloqueio.

#### **4.22 Avaliação da extração de proteínas de *E. coli* BL21 (DE3)**

Após seleção do clone transformado de *E. coli* BL21 (DE3), as células microbianas foram submetidas a ruptura por processador ultrassônico (Vibra-Cell®) e verificado três metodologias de sonicação para a extração de proteínas.

Para essa avaliação, o pré-inóculo *E. coli* BL21 (DE3) foi realizado em um tubo cônico de 50 mL, contendo 15 mL de meio LB, suplementado com Canamicina 50 µg/mL e incubado em agitador a 200 rpm, 37 °C, *overnight*. Para etapa de indução, um inóculo desse cultivo foi realizado com O.D.<sub>600</sub> 0,1 em Erlenmeyer de 1 L contendo 300 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL, e incubado em agitador a 200 rpm, 37 °C por 3 h. Após esse período, foi adicionado IPTG para concentração final de 1 mM e incubado novamente no agitador por 18 h.

Em seguida, foi transferido o conteúdo de 50 mL de caldo fermentado em 3 tubos cônicos de 50 mL. O caldo foi centrifugado a 8.000 x g a 4 °C por 15 minutos e descartado o sobrenadante. Repetiu-se a etapas anterior, a fim de utilizar todo fermentado. Para ressuspender as células, foi adicionado 10 mL de tampão de lise

Tris-HCl 50 mM + 1mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) + 5 mM EDTA, pH 8,6 e homogeneizada sob agitação em vórtex.

Para avaliar a extração de proteínas, as amostras foram submetidas à três diferentes programas de sonicação em banho de gelo – Sonicador Vibra Cell®, Ponteira VC-50 ¼” Microtip.

- Método 1, conforme descrito por Costa-Silva et al. (2018);
  - a. 7 minutos;
  - b. Pulse:
    - i. 30 seg ON;
    - ii. 45 seg OFF;
  - c. Amplitude: 30%.
- Método 2, adaptado de Upadhyay et al. (2014);
  - a. 10 minutos;
  - b. Pulse:
    - i. 1 min ON;
    - ii. 1 min OFF;
  - c. Amplitude: 30%.
- Método 3, adaptado de Lima (2019)
  - a. 15 minutos;
  - b. Pulse:
    - i. 1 seg ON;
    - ii. 1 seg OFF;
  - c. Amplitude: 30%.

Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 8 000 x g, 10 min, 4 °C, o sobrenadante recuperado (fração solúvel) e o *pellet* foi lavado com 40 mL de água ultrapura gelada. O lisado celular foi novamente lavado, seguindo centrifugação a 8 000 x g, 10 min, 4 °C, descarte de sobrenadante e o *pellet* lavado com 20 mL de água ultrapura, homogeneizado em vórtex. Posteriormente, centrifugado a 8 000 x g, 10 min, 4 °C, descarte de sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de tampão de *lise* celular (fração insolúvel). Os extratos proteicos foram congelados em freezer - 80 °C. O perfil da extração de proteínas foi avaliado por eletroforese em SDS-PAGE 12%, conforme descrito no item 4.21.2.



#### 4.23 Curva de crescimento

Após seleção do clone transformado de *E. coli* BL21 (DE3), a curva de crescimento foi construída utilizando o meio de cultivo LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL. Inicialmente, com pré-inóculo de 50 µL de suspensão de células em tubo cônico de 50 mL, contendo 15 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL, incubado em agitador a 200 rpm, 37 °C, *overnight*. O volume de 1 mL do cultivo foi coletado em condições assépticas e mensurado a densidade celular (OD<sub>600</sub>). A partir dessa cultura, foi preparado em triplicata cultivos em Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL, e OD<sub>600</sub> inicial de 0,1. Em seguida, os cultivos foram incubados em agitador a 200 rpm e 37 °C. A cada duas horas, o volume de 1 mL de cultura foi retirado em condições assépticas para determinação da densidade ótica em espectrofotômetro (OD<sub>600</sub>). As leituras foram realizadas até que o cultivo atingisse a fase estacionária.

#### 4.24 Avaliação dos parâmetros de cultivo

Os parâmetros de cultivo avaliados foram concentrações de IPTG (0,1, 0,5 e 1 mM) e tempo (0, 2, 4, 8, 12, 20 e 24 h), em temperatura a 37 °C pós indução. Para essa avaliação, o pré-inóculo foi realizado com 50 µL de células de *E. coli* BL21 (DE3) e 20 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL em tubos cônicos de 50 mL e incubado em agitador a 200 rpm, 37 °C, *overnight*.

Em seguida, o experimento foi conduzido em triplicata para cada ponto de análise. O inóculo foi preparado com 10 mL de meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL em tubos cônicos de 50 mL, para OD<sub>600</sub> 0,1 inicial. Os inóculos foram incubados em agitador a 200 rpm, 37 °C.

A indução ocorreu após 2h30 horas (OD<sub>600</sub>  $\cong$  0,9), corresponde a OD de fase log estabelecida anteriormente pela curva de crescimento. Nesse tempo, as culturas foram induzidas com IPTG e retornaram para o agitador sob as mesmas condições previamente descritas. Para verificar as condições em relação ao tempo pós indução, foram coletados cultivos de cada concentração de IPTG (0,1, 0,5 e 1 mM), nos tempos 0, 2, 4, 8, 12, 20 e 24 h.

Após o cultivo, a extração de proteínas do caldo fermentado foi realizado conforme Método 2, adaptado de Upadhyay et al. (2014) descrito no item 4.22. Para verificar o perfil de expressão de proteínas, as amostras das frações solúvel e

insolúvel foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE, conforme descrito no item 4.21.2.

#### 4.25 Análise estatística

Para análise estatística foi usado o software GraphPad Prism® Version 6.01. Avaliou-se a distribuição dos dados, de modo que dados com distribuição normal, aplicou-se teste paramétrico (dados representados por média e desvio padrão) e dados com distribuição não normal aplicou-se testes não paramétrico (dados representados por mediana e intervalos interquartis). Os testes utilizados para cada análise dos experimentos estão descritos nas legendas dos gráficos representativos. A diferença significativa foi considerada para os valores de  $p < 0,05$ .

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Produção de L-asparaginase

O fungo filamentoso deste estudo foi selecionado a partir de triagem de produtores de L-asparaginase isolados do solo do Cerrado do Centro-oeste, em trabalho realizado por este grupo do Laboratório de Controle de Qualidade e Produtos Naturais – Faculdade de Ciências da Saúde; UnB; Brasília (DF) (Freitas *et al.*, 2021). No trabalho de caracterização morfo-molecular em colaboração com o Laboratório de Fitopatologia (IB) Prof. Dr. Danilo Pinho, o isolado foi identificado como nova espécie do gênero *Penicillium* (*Penicillium cerradense*) pertencente a seção Citrina (Andrade *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2021).

Para a determinação da produção de L-asparaginase pelo fungo *Penicillium cerradense* isolado do solo do Cerrado brasileiro, foram conduzidos experimentos em triplicata. A atividade encontrada no micélio foi  $0,82 \pm 0,032$  U/g<sub>células</sub> em meio de cultivo Czapek Dox® modificado (CDM). Shrivastava e colaboradores (2012) produziram L-asparaginase a partir de *Penicillium digitatum*, espécie do mesmo gênero em estudo, utilizando o meio composto por glicose 2 g/L, L-asparagina 10 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,52 g/L, KCl 0,52 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,52 g/L, traços de CuNO<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O em pH 6,2. Nessas condições mensuraram 363,80 UI/mL de atividade da enzima no extrato bruto (Shrivastava *et al.*, 2012). Em meio de cultura semelhante, Gurunathan e Sahadevan (2012) em trabalho de otimização da produção de L-asparaginase pela espécie *Aspergillus terreus* obtiveram 43,29 UI/mL. Sarquis *et*

*al.* (2004) utilizaram o meio CDM comparando fontes diferentes de nitrogênio utilizando as espécies *Aspergillus terreus* e *Aspergillus tamarri* e quantificaram 58,8 U/L e 38 U/L, respectivamente, de L-asparaginase em suas melhores condições.

Mesmo buscando na literatura trabalhos com meio de cultivo semelhante para a produção da enzima L-asparaginase, identifica-se uma dificuldade na comparação dos resultados obtidos entre os trabalhos, uma vez que as unidades de atividade reportadas nem sempre são as mesmas entre os trabalhos existentes e os métodos aplicados para quantificar a enzima são diferentes. Neste estudo, a quantificação da atividade de L-asparaginase foi realizada pelo método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato (Drainas *et al.*, 1977) e a maioria dos estudos reportados na literatura quantificam a enzima pelo método de Nessler (Freitas *et al.*, 2019).

É importante destacar que o método de Nessler quantifica a atividade de L-asparaginase por medida indireta, com a determinação da concentração de amônia livre no meio (Imada, 1973). No entanto, sabe-se que a amônia também pode ser gerada em processos de cultivo submerso por microrganismos. Desta forma, essa amônia proveniente do processo “fermentativo” ou do próprio meio de cultivo superestimar a concentração da enzima L-asparaginase quando quantificada pelo reagente de Nessler, interferindo no resultado com valores de atividade enzimática maiores do que o real (Freitas *et al.*, 2019).

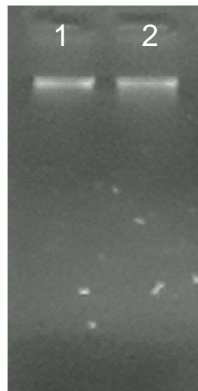
Em trabalho de avaliação da fermentação submersa por *P. cerradense*, os resultados obtidos com Placket-Burman Experimental Design mostraram uma variação de atividade de L-asparaginase de 0,47 a 1,77 U/g<sub>células</sub> e com Delineamento Fatorial Fracionado mostraram uma variação de de 1,10 a 2,36 U/ g<sub>células</sub> (Andrade *et al.*, 2021).

Para verificar o aumento da produção de L-asparaginase por *P. cerradense*, este trabalho propõe a expressão heteróloga desta enzima em sistema de *E. coli* BL21 (DE3) utilizando o vetor pET-28a. Os resultados da expressão heteróloga de L-asparaginase de *P. cerradense* em sistema de *E. coli* estão apresentados no item 5.7.

Em paralelo, foi realizado o trabalho de identificação da sequência codificante para a enzima L-asparaginase de *P. cerradense* juntamente com a sua caracterização de funções biofísico-químicas e caracteres imunogênicos, e elucidação da estrutura molecular.

## 5.2 Extração, amplificação e purificação de DNA genômico

A extração de DNA genômico de *P. cerradense* foi realizada utilizando dois espécimes e seguindo o protocolo adaptado de Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega). A qualidade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose 1% e revelado por GelRed® (Biotium) em transluminador ultravioleta, conforme ilustrado pela Figura 10. O DNA extraído dos espécimes *P. cerradense* por este protocolo está depositado sob a inscrição 2088 (*P. cerradense* a) e 2089 (*P. cerradense* b), e preservado a -20 °C, na coleção de DNAs do Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Brasília-DF) sob a supervisão do Prof. Dr. Danilo Batista Pinho.



**Figura 10:** Gel de quantificação da extração de DNA genômico do fungo *P. cerradense*. Espécime: (1) *Penicillium cerradense* a; (2) *Penicillium cerradense* b.

## 5.3 Identificação do gene de L-asparaginase

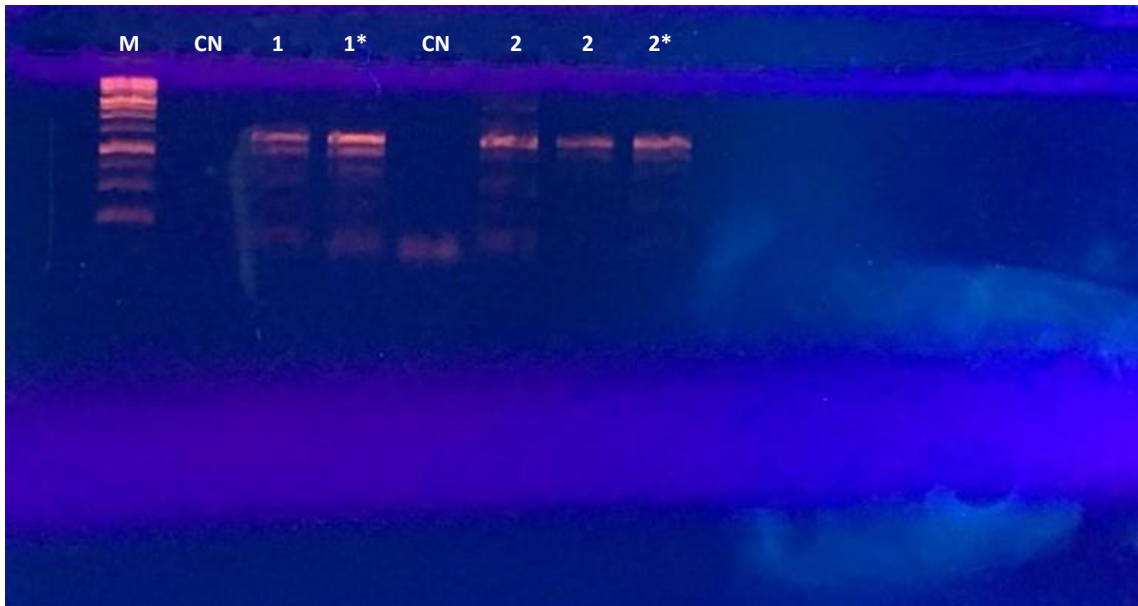
A partir dos genomas completos de *Penicillium citrinum* DSM1997, *Penicillium citrinum* JCM22607 e *Penicillium steckii* MLKD01000003 encontrados na base de dados GenBank®, a sequência do gene da L-asparaginase desses isolados foi avaliada por homologia à outras sequências do gene descritas em outras espécies de fungos e publicadas na base de dados. Desta forma, *primers* degenerados foram desenhados e testados na amplificação de regiões do DNA genômico de *P. cerradense* devido à sua proximidade taxonômica com *P. citrinum* e *P. steckii* (Quadro 7).

**Quadro 7:** Combinação de *primers* testados para a identificação do gene da L-asparaginase de *P. cerradense*.

<b>Primers</b>		<b>Amplicon (pb)</b>
<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
F1.2	RASP2.1	560
F2	R2	1709
FASP3	R2	863
FASP2	RASP6	863
F2	RASP2.1	1020

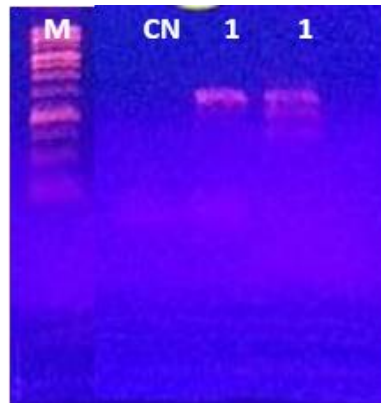
No entanto, a PCR realizada com essas combinações de *primers* desenhados a partir das sequências da L-asparaginase de *P. citrinum* e *P. steckii* não revelou à amplificação de regiões do DNA genômico de *P. cerradense*. Um estudo das variáveis presentes em uma reação de PCR, como variações de temperatura, concentrações de DNA foi realizado com o intuito de otimizar as ampliações desejadas. Porém, mesmo assim, nas condições avaliadas não foi possível amplificar regiões do DNA genômico do fungo em estudo.

Sendo assim, foi realizada outra estratégia utilizando o *primer* desenhado a partir região gênica de *P. sizovae* que expressa a enzima L-asparaginase – identificada pelo grupo. Por início, foi realizado o trabalho de otimização da temperatura de anelamento com amostras do DNA genômico do fungo *P. cerradense*. Inicialmente as temperaturas verificadas foram 53°C e 55°C, correspondendo as temperaturas indicadas para todos os *primers* desenhados. E, ainda comparado a concentração de DNA na reação. Nessas condições, o *primer AsnPsiz* apresentou amplificação inespecífica (Figura 11).



**Figura 11:** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os *primers AsnPsiz* à 53 °C (1) e 55 °C (2) temperatura de anelamento, (\*) DNA diluído 1/5. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN).

Com a finalidade de maior especificidade na etapa anelamento, um aumento na temperatura foi estipulado, sendo verificada a amplificação à 57°C. Nessa condição, o *primer AsnPsiz* ainda continuou inespecífico com vários fragmentos de amplificação (Figura 12).



**Figura 12:** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os *primers AsnPsiz* à 57 °C (1) temperatura de anelamento, Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN).

Das temperaturas verificadas para amplificação do *primer* sintetizado, à 55 °C foi possível observar em gel de agarose um fragmento próximo de 1.300 pb, tamanho esperado para a enzima L-asparaginase. Sendo assim, essa condição foi considerada

para etapa de purificação do fragmento de amplificação em gel de agarose. Dois fragmentos foram considerados para sequenciamento. Ambos os fragmentos não apresentaram boa qualidade de sequenciamento e não apresentou equivalência ou semelhança a nenhuma sequência de L-asparaginase depositada no GenBank®.

Os resultados de amplificação com o *primer* sintetizado utilizando as temperaturas 53, 55 e 57 °C não corresponderam a indicação da região gênica de L-asparaginase mesmo as PCR sendo conduzidas com MyTaq PCR Master Mix, equivalente a um mix otimizado para a reação. Esses resultados podem contribuir como informações preliminares para desenho de novos experimentos quanto à amplificação da região L-asparaginase para o fungo *P. cerradense* e outras espécies do gênero *Penicillium*.

Após algumas buscas para obter a sequência da enzima L-asparaginase do fungo *P. cerradense* por meio de metodologias empregando *primers* conservados e degenerado, juntamente com o professor João Inácio Silva, colaborador deste trabalho da *University of Brighton*, Brighton, UK, compreendeu-se que a melhor estratégia para o sequenciamento do gene da enzima de interesse seria o sequenciamento do genoma completo deste fungo.

Com o sequenciamento do genoma e análise dos dados obtidos em comparação a outras sequências de L-asparaginase presentes na literatura e nos bancos de dados (Clustal Omega® e BLAST), obteve-se a sequência consenso para a enzima L-asparaginase de *P. cerradense* (Figura 13). A sequência de nucleotídeos de L-asparaginase de *P. cerradense* foi submetida no GenBank® sob o número de acesso MT742156.

O gene da L-asparaginase foi identificado a partir dos *contigs* de sequenciamento do genoma de *P. cerradense*. O produto da análise por Clustal Omega® e BLAST/NCBI para a sequência de L-asparaginase apresenta 1251 pb. Esse comprimento de fragmento assemelha-se a sequências de L-asparaginase de espécies de *Penicillium* como *P. chrysogenum* Wisconsin (143695) 1140 pb, *P. digitatum* (9096) 1218pb, *P. brevicompactum* (61615) 1140pb, *P. canescens* (394109) 1134pb, *P. lanosocoeruleum* (383846) 1140pb, *P. thymicola* (250489) 1140pb e *P. sizovae* (MW291568) 1278 pb.

ATGGTTATCAGAACGATCATCATCTCCCTCTTGGCAATTGTCGCCTCGGGCTCACCTGTTACAAAACC  
 CCAGAGCAGCAGCACAAAATATGTTTACACCAATTCAAATGGATTGAATTTACGCAGATGAATCCCG  
 GTCTTCCTAATATAACCATTTTTGGCACT**GGTAAGTTGATAAGTTCACCCTGCTGACTCTTGTGACGT**  
**TATTCATATAATGACATCTTGTATA**GGAGGAACTATTGCGGGTTCTGGATCAAGTTCAACAGCAACAA  
 CTGGGTATACAGCCGGCGCTGTTCGGTATATTGGATTTGATCGATGCTGTTCCATCTATGCTCAATGTG  
 TCAAATATTGCTGGTGTTCAGGTGGCAAATGTTGGCAGTGAAGATATCACGTCCGACATCCTAATTTT  
 GCTATCGAAGAGTATTAATAAATTGGTGTGTGATGACTCTACTATGGCTGGCGCTGTCATCACCCACG  
 GAACCGATACTTTAGAGGAACTGCTTTTTTTCCTTGATGCGACAATCAACTGCGGCAAGCCCGTCTGTG  
 ATTGTTGGAGCAATGCGCCCTTCTACTGCTACATCTGCTGATGGTCCCTTCAACCTGTTGGAGGCAGT  
 CACTGTGGCAGCATCTCCGAAAGCTGTCAACCGTGGTGCAATGGTAGTTATGAATGATCGGATTGCAT  
 CTGCTTACTACGTTACCAAGACTAATGCCAACCCATGGACACATTTAAGGCGATCGAAATGGGCTTC  
 CTAGGGGAGATGATCTCCAATACTCCTTTCTTCTTCTACCCTCCTGTAAACCTACTGGCAAGGTAGA  
 ATTTGATATCACCGCTACCAAGGAAATCCCGCGGGTGGATATACTCTACGCATACGAGGATATGCATA  
 ATGACACTCTGTACAGTGCTGTTGAGAATGGCGCTCAGGGTATTGTG**GTAAAGTTTCTCTCATGTTTCA**  
**GTGAAGATCTCAGTCTGATCACAGTAACAG**ATTGCTGGAGCCGGAGCCGGAGGTGTTAGCACTTCAT  
 TCAATCATGCCATTGAGGATGTCATTAACCGCTTCAAATTCGGGTCGTACAGAGTATGCGTACGGTC  
 AACGGAGAAGTTCCTTATCAGATGTCAATAGCACTAGTGCAATTCATATTGCCAGTGGCTACTTGAA  
 CCCCAGAAGTCTCGTATTTTACTCGGCTTATTGCTTTCAGAAGCAAGGACTTTGACTGACATTAGAT  
 CCGTGTCTCTCTTGGTACTGTTTCAT

**Figura 13:** Sequência do gene da enzima L-asparaginase identificada do *contigs* de *Penicillium cerradense*. Em negrito encontram-se os *itrons* presentes na sequência.

Com a base de dados do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foi realizada a tradução "Six Frame" da sequência obtida (Figura 14) e foi possível verificar a identidade de sequências com as demais L-asparaginases depositadas no GenBank®.

MVIRTTIIISLLAIVASGSPVHKPQSSSTKYVYTNSNGLNFTQMNPGLPNITIFGTGGTIAGSGSSSTA  
 TTGYTAGAVGILDLDIDAVPSMLNVSNIAGVQVANVGSEDTSDILISLSKSKINKLVCDDSTMAGAVIT  
 HGTDTLEETAFFLDATINCGKPVVIVGAMRPSTATSADGPFNLLEAVTVAASPKAVNRGAMVVMNDRI  
 ASAYYVTKTNANTMDTFKAIEMGFLGEMISNTFFFFYPPVKPTGKVEFDITATKEIPRVDILYAYEDM  
 HNDTLYSAVENGAQGIVIAAGAGGVSTSFNHAIEDVINRFKIPVVQSMRTVNGEVPLSDVNSTSAIH  
 IASGYLNPQKSRILLGLLLSEARTLTDIRSVFSLGTVS

**Figura 14:** Tradução "six frame" do gene da enzima L-asparaginase de *P. cerradense* por Clustal Omega® e BLAST do NCBI.

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos de L-asparaginase do isolado *P. cerradense* mostrou homologia com o gene de L-asparaginase tipo II derivado de



*Penicillium sizovae*, *Aspergillus niger* e *A. ibericus* (Figura 15). Com base nesse alinhamento, observou-se diferença marcante entre a sequência em estudo com outras L-asparaginases derivadas *Penicillium* spp. Em destaque, por análise Clustal Omega® e BLAST, a homologia com genes de L-asparaginase foi encontrado apenas nesta única sequência apresentada neste trabalho. Portanto, a atividade enzimática relatada neste estudo sugere ser codificada pelo único gene identificado para L-asparaginase em *P. cerradense*.

```

Penicillium -----ATGGT TATCAGAACGAT CATCAI CTCCTT CTTGGCAATTGT CGCCTCGGGC
P. sizovae ATGGTGTCAATTAAAGAGCTT CCTCGTAGCGTT GGCTACTTTTGT TTGTCAGAGTTCGGCT
A. ibericus -----ATGACTATCAAACCGCT TCTTCT CTCGGCCCTGGCCACCCT CGGGTCGGCA
A. niger -----ATGGCTCTCAAAGCCGAT TCTCTT GTCTGCGCCTGGCCAGTCT CGCCTCGGGC
          **      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Penicillium TCACCTGT TCACAAACCCC---AGAGCAGCAGCACAAAATATGT TTACACCAATTCAAAT
P. sizovae TCGCCCTGCTGTATGGCCGTGGAAACCAATGGCACAGGGTTTGT TITCACC AATGCGAAT
A. ibericus TCGCCCTCCTCTATCCCC---GGGCCACCAAAGAGACTATGT CTTACCAATGCGAAT
A. niger TCCTCGCTGCTCTACTCGC---GGACCACCAAATGAAACCTTCGT CTTACCAATGCGAAT
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium GGATTGAATTCACGCAGAT GAATCCCGGTCT TCCTAATAATAACCATTTT TGGCAC TGGT
P. sizovae GGTCGTGAATTCACCCAGAT GAATCA TACCCT TCCTAATAATAACCATTTT TGCTACAGGT
A. ibericus GGCTGTGAATTCACGCAGAT GAACACCGTCT GCCCAA TGTACTATCTT TGCTACCGGT
A. niger GGCTCAACTTCACCCAGAT GAACACCACTT GCCGAA CGTGACCATTT CGCAACGGGT
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium AAGTTGATAAGTTCACCCGTCT-GACTCTTGT CAGCTTATTCATAATAATGACATCTTGTA
P. sizovae CAGTCCGACTCCTTATCCAC-----GTTTCTATCTAATTTT TATCTAAACCTCC
A. ibericus AAGCAACCACTCCATTTCTCTATCCC TCTATCCTCCGACCGCTCTCTAAAGCGATCAA
A. niger AAGTGGACCGAGTATACCTCA-----GGTAGTGGACCGGATAGTTAACCGCACTCA
          *
Penicillium TAGGAGGAAC TATTGCGGGT TCTGGATCAAGT TCAACAGCAACCACTGGGTATACAGCCG
P. sizovae TAGGAGGAACCAATTGCGAGCTCAGAT TCAAGCTCAACGGCAACGACAGGCTACACT TCTG
A. ibericus CAGGAGGCACCAATCGCCGGCTCCGAT TCCAGCTCGACCGCCACCAACCGGCTACACTCCG
A. niger CAGGTGGTACCAATCGCGGGCTCCGAT TCCAGCTCAACGGCAACGAGGCTACACTCCG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium GCGCTGICGGTATATTGGATTGATCGATGCT GTTCCATCTAIGCTCAAT GTGTCAAATA
P. sizovae GAGCGGTT GCGGTT CGTGCT CTAATCGATGCCCTTCCA TCCATGCTCGATATTGCAAATG
A. ibericus GTCCGCTGGGGT TTAACCTCATCGACGCCGTCCCAAGCATGCTCGACGTGCGCAATG
A. niger GAGCAGTCGGGGTCTGTCCCTCATCGATGCGGTGCCATCCATGCTGGATGTGGCAATG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium TTGCTGGT GTTCAGGTGGCAAAATGTTGGCAGT GAAGATATCACGTCGGACATCTAATTT
P. sizovae TCGCGGGT GTCCAGACAGCAAAATGTTGGAAGT GAAGATATCACATCTGACATCTTAATTT
A. ibericus TGCGTGGCTGCGAGGTGGCCAACTGCGCAGC GAGGACATCACCTCCGACATTTCTCATCT
A. niger TTCCGCGCTCCAGGTGGCCAACTGGAAGCGAGGATATCACCTCTGACATCTCGATTT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium CGTATCGAAGAGTATTAATAAATGGTGTGTGATGACTCTACTATGGCTGGCGCTGTCA
P. sizovae CACTATCAAAGCAGATCAACAAATTTGTCTCGACGAT CCAACCAATGGCTGGGCTGTG
A. ibericus CCATGTCCAAGGAGATCAACCGGCTCCTGCGACGCCACCCATATGGCCGGCGGTCA
A. niger CCATGTCCAAGAGCTGAACCGGTTGTATGTGAGGACCCGACCATGGCCGGTGTGTCA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium TCACCCACGGAAACCGATACTTTAGAGGAAACTGCTTTTTCCTT GATGCGACAATCAACT
P. sizovae TTACTCATGGAACCGATACTTTGAGGAAACTGCTTTTTCCTT GACGCTACGATCAAT
A. ibericus TCACCCATGGGACGACACCCCTCGAGGAGACC GCTTCTTCAITGACGCGACCATCAACT
A. niger TCACCCACGGCACC GACACCCCTCGAGGAGACTGCTTCTTCCCTGACGCCACTGTCAACT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium GCGGCAAGCCCGTCTGATTGTTGGAGCAATGCGCCTTCTACTGCTACATCTGCTGATG
P. sizovae GTGGTAAACCCGTCATCATTTGTTGGC GCAATGCGTCTTCAAACCGCATCTCGACTGATG
A. ibericus GTGGCAAGCCCGTCTGATGTTGGGTGCCATGCGCCTTCCACGCGCATCTCCGCGGACG
A. niger GTGGCAAGCCCAATGTATCTGGGTGCCATGCGCCTTCCACGCGCATCTCGACTGACG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium GTCCITTCACCTGTGGAGGCACTGTGGCAGCATCTCCGAAAGCTGTCAACCGTG
P. sizovae GACCCITCAATCTCCTTGAATCCGTTACCGTCCAGCATCTCCGAAAGCTAAGAACCGCG
A. ibericus GCCCTTCAACCTGCTCGAGGCGGTCACCGTGGCTGCTCTCCAAAGGCCGCGGACCGCG
A. niger GGCCCTCAATCTGCTCGAAAGCGGTGACGGTGGCTGCC TCCAGTCCGCGCGCATCGCG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Penicillium GTGCAATGGTAGTTATGAATGATCGGATTGCACTGCTTACTACGTTACCAAGACTAATG
P. sizovae GTGCCATGATTGTCAATGAATGATCGCATCGCATCCGCTTACTACAGGACC AAGACCAACG
A. ibericus CGCGCATGGTGTGATGAACGACCGATTGCTCGGCTTACTACGTGACCAAGACCAACG
A. niger GTGCCATGTTGTCATGAACGATCGCATGCTCGGCTTACTATGTGACCAAGACCAAGT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

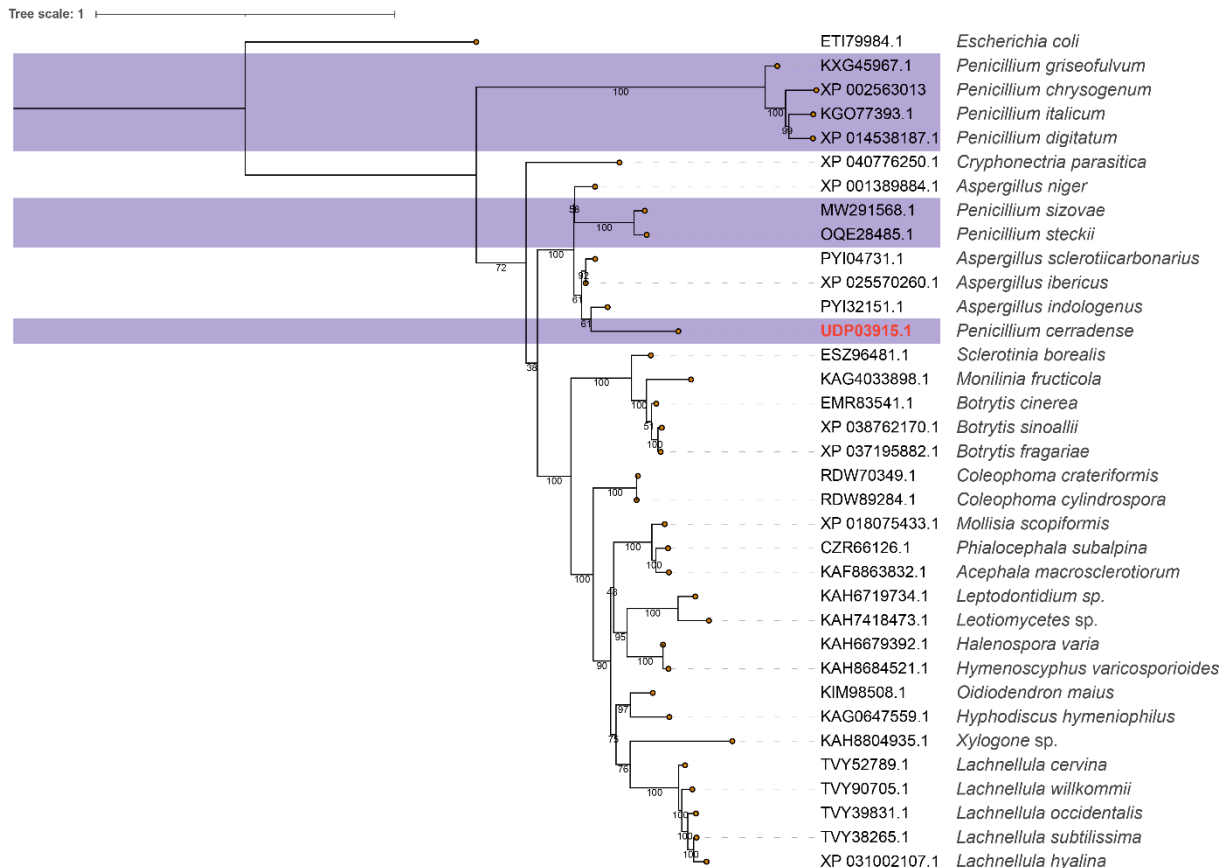
**Figura 15:** Sequência de nucleotídeos de *P. cerradense*. Homologia com o gene da asparaginase tipo II derivado de *P. sizovae*, *Aspergillus niger* e *A. ibericus*, por Clustal Omega® e BLAST do NCBI.

Com base no alinhamento das sequências de aminoácidos pode-se observar diferença de relatos anteriormente derivados de L-asparaginase de outras espécies de *Penicillium*. A baixa similaridade com os relatos pode estar relacionada ao número de depósitos de sequências de L-asparaginase de *Penicillium*, a quantidade de regiões conservadas para a expressão da enzima, e, ainda, distância entre os grupos filogenéticos.

Da mesma forma, entre os procariotos a similaridade entre os genes de L-asparaginase apresenta baixa conservação. Huerta-Saquero *et al.* (2013) em análise por BLAST comparou o gene de L-asparaginase entre procariotos. Nesse estudo, observou intimidade relacionada entre *E. coli* e *D. chrysantemi* 47% de identidade, e, em comparação a essas duas, a L-asparaginase de *Rhizobium etli* apresentou diferença notável (6% de identidade) em relação as regiões conservadas (Huerta-Saquero *et al.*, 2013). Em perspectiva, os resultados de baixa similaridade para região gênica de L-asparaginase estiga a prospecção em verificar a identidade e conservação do gene. Bonthron e Jaskólski (1997) em análise a mutação em uma região do gene de L-asparaginase de *Saccharomyces cerevisiae*, observou por análise de distanciamento diferença notável desse gene aos de outras bactérias e fungos.

#### **5.4 Análise *in silico* de L-asparaginase**

Em avaliação a relação evolutiva da enzima, o alinhamento de sequências de aminoácidos de L-asparaginases fúngicas foi realizado compreendendo 35 taxa, incluindo a espécie em estudo – *P. cerradense*. A matriz alinhada foi submetida ao método Maximum likelihood. Na relação filogenética (Figura 16) é possível identificar um distanciamento entre as espécies e revela que as L-asparaginases de *Penicillium* formam um grupo parafilético com representantes do gênero *Aspergillus*, com a sequência de *P. cerradense* colocada mais próxima de várias enzimas de *Aspergillus* sp. do que das instâncias mais próximas de *Penicillium* (*P. sizovae* e *P. steckii*).



**Figura 16:** Relação evolutiva *Maximum likelihood* de L-asparaginases fúngicas, incluindo *P. cerradense*. A árvore consenso foi inferida usando o IQ-TREE com 1.000 réplicas de *bootstrap* ultrarrápidas. A árvore foi enraizada usando a sequência de *E. coli* como grupo externo e os valores de suporte de *bootstrap* são indicados abaixo das bordas dos nós. Os representantes de *Penicillium* sp. estão destacados.

A relação evolutiva para o gene de L-asparaginase difere da árvore em nível de espécie apresentando incongruências. Esse conflito pode ocorrer devido classificação de linhagem incompleta (ILS) e/ou introgressão por hibridização (Zhou *et al.*, 2017). As L-asparaginases de diferentes espécies de *Penicillium* podem apresentar comportamentos funcionais distintos ou discrepantes, ou comportamentos similares a espécies do gênero *Aspergillus*. Esta é a primeira vez que a relação evolutiva para L-asparaginase de *Penicillium* é relatada na literatura. As diferenças na região gênica de L-asparaginase podem representar complexidade e dificuldade aos estudos de comparação pelas sequências de aminoácidos. Da mesma maneira, essa diferença pode sugerir uma vasta variedade da enzima, em relação a sua imunogenicidade, especificidade e estabilidade, conforme fontes distintas (Huerta-Saquero *et al.*, 2013).

Além disso, a análise SMARTBLAST revelou as cinco melhores combinações de proteínas de diferentes organismos de espécies de referência depositadas em base de dados. *Schizosaccharomyces pombe* (NP\_595021.1) revelou identidade de 48,26%; *Saccharomyces cerevisiae* (NP\_013256.1), 47,73%; *Bacillus subtilis* (NP\_388151.1), 48,17%; *E. coli* (NP\_311860.1), 44,55% e *E. coli* (NP\_417432.1), 43,64%.

A tradução “*Six Frame*” da sequência de L-asparaginase de *P. cerradense* foi submetida a caracterização *in silico*. Por ProtParam-expasy, o fragmento proteico de 378 aminoácidos apresenta massa molecular de 39 kDa.

O pI da proteína foi previsto em 5.13 com um número mais elevado de resíduos de aminoácidos carregados negativamente (32) do que os carregados positivamente (23). Em caracterização por Saeed *et al.* (2018), o cálculo predito de pI da enzima de *Aspergillus terreus* foi 5,0. A estimativa de meia-vida foi de 30 h em reticulócitos de mamíferos. A instabilidade index foi calculada como 29,85 o que classifica como proteína estável (Guruprasad *et al.*, 1990). O índice alifático foi estimado em 97,25, o que pode indicar a estabilidade da enzima. A hidropatia positiva (0,256) indicativo de baixa interação com moléculas de água (Kyte e Doolittle, 1982).

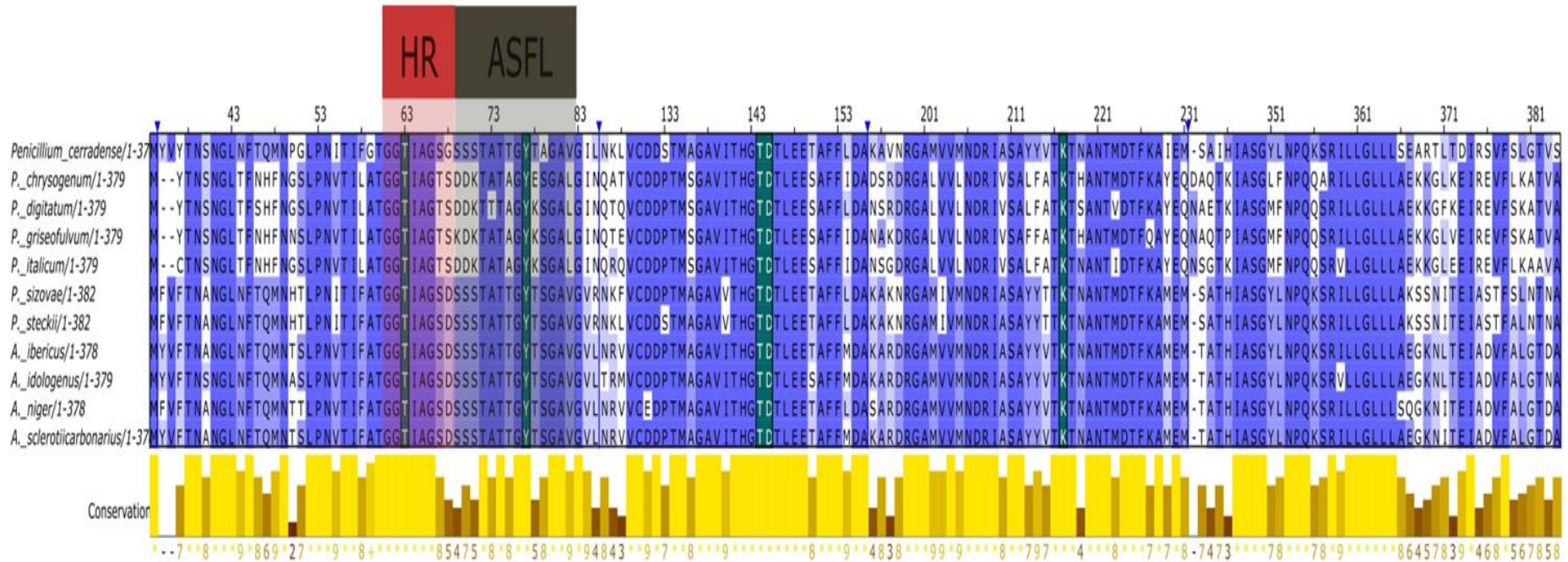
Para o peptídeo sinal, uma possível sequência 17 aminoácidos foi prevista na sequência de proteína com uma probabilidade de 0,99 (Figura 17), e isto indica que a L-asparaginase de *P. cerradense* é uma enzima extracelular (Tashiro, 1983). Alguns trabalhos identificaram uma sequência de sinal pequena para L-asparaginase - 19 aminoácidos em um basideomiceto *Flammulina velutipes*, e 15 aminoácidos em uma levedura *Yarrowia lipolytica*. (Eisele *et al.*, 2011; Darvishi *et al.*, 2019). Para confirmar a predição do peptídeo sinal foi utilizado o Phobius. Em resultado, o tamanho do peptídeo sinal apresenta-se o mesmo, em 17 aminoácidos, com as seguintes posições das regiões N-terminal 1-4, H-terminal 5-13 e C-terminal 14-17. E, quanto a porção madura (posição 18-378) apresenta-se como proteína não-citoplasmática (Figura 18).



A análise da sequência de aminoácidos revelou que o gene da enzima L-asparaginase codificada pertence à família Asparaginase/glutaminase-like (adesão ao CDD: cd00411) com um domínio L-asparaginase tipo II (IPR004550).

Em adicional, duas regiões relevantes para a atividade enzimática (Hinge Region-HR e a Active Site Flexible Loop-ASFL) foram comparadas com L-asparaginases cristalizadas de *E. coli* (3ECA) (Lubkowski, Jacek *et al.*, 2020) e alinhado a L-asparaginases de espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* (Figura 19). As regiões HR e ASFL não são essenciais para a ligação do substrato, mas apresentam mudanças conformacionais responsáveis pela atividade catalítica (conformações cat+ e cat-) após ligação do substrato (Strzelczyk *et al.*, 2020). Nas L-asparaginases tetraméricas, o HR é um octapeptídeo altamente conservado rico em glicina. A sequência padrão GGTxyGGG é observada (x = Ile or Leu; y = Ala or Gly). Em *P. cerradense*, o HR apresenta sequência G<sup>56</sup>GTIAGSG<sup>63</sup>. The ASFL em *P. cerradense* apresenta a sequência S<sup>64</sup>SSTATTG YTAGAV<sup>77</sup>. Entretanto, não haja fronteira preciso entre as duas regiões. Entre as espécies de fúngicas em estudo, a região HR é altamente conservada com diferença apenas nos dois últimos resíduos dessa região (Figure 19). A região ASFL geralmente é observada com uma região variável para L-asparaginases de diferentes microrganismos (Freitas *et al.*, 2022). Para as L-asparaginases fúngicas, ASFL revelou-se com alta conservação em grupos distintos diferenciando-se apenas na posição de dois resíduos, onde L-asparaginase de *P. cerradense*, *P. sizovae*, *P. steckii* aproximam-se de representantes do gênero *Aspergillus*, e outro grupo entre *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. griseofulvum* e *P. italicum*.

O sítio ativo de diferentes L-asparaginases é bem conservado e rígido apresentando 5 resíduos críticos para a catálise. Esses resíduos são bem posicionados, sendo uma treonina no HR, uma tirosina no ASFL e três outros resíduos (um par Thr-Asp e Lys) localizados cerca de 64-67 e 137-140 resíduos separados, respectivamente, do Tyr da ASFL (Lubkowski, Jacek *et al.*, 2020). Na L-asparaginase de *P. cerradense* estes resíduos são Thr58 (HR), Tyr72 (ASFL), Thr139, Asp140 e Lys212. Os dados sobre interface polimérica e sítio ativo são resultado de comparação à resíduos conservados com as estruturas de L-asparaginase cristalizada.

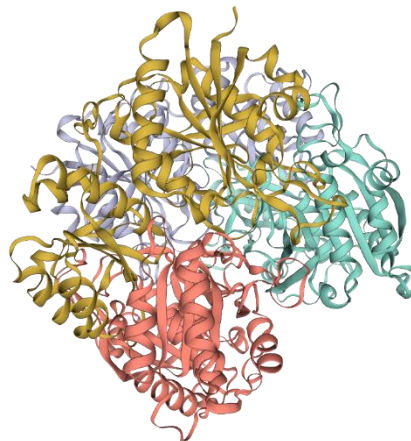


**Figura 19:** Alinhamento de Hinge Region (HR), Active Site Flexible Loop (ASFL) e resíduos do sítio ativo para L-asparaginases de *Penicillium* and *Aspergillus* incluindo *P. cerradense*. HR é indicado em vermelho, ASFL em cinza e os resíduos relevantes para a atividade catalítica estão destacados em verde. Porcentagem de identidade e diferenças de resíduos do alinhamento completo (em amarelo) entre as L-asparaginases comparadas.

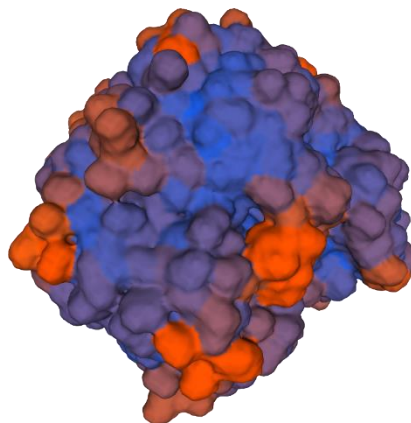
### 5.5 Modelagem estrutural da proteína *in silico*

O modelo de homologia tridimensional de L-asparaginase *P. cerradense* foi desenvolvido através da utilização do software SwissModel-Expasy®. A biblioteca de modelos foi explorada, tendo-se obtido um total de 480 acessos ao modelo. A estrutura de L-asparaginase para a sequência de aminoácidos do fungo *P. cerradense* definida pelo software SwissModel-Expasy® (Figura 20) foi calculada a partir do template de L-asparaginase *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase E63Q +S254N mutation + L-Aspartic acid (cód: PDB 5i4b.1.A). O GMQE para a estrutura foi calculado em 0,71 e o QMEANDisCo Global em  $0,77 \pm 0,05$ . A sequência foi identificada como formadora de um tetrâmero (QSQE 0,81) e com um alinhamento de 46,30% (Figura 21) com a sequência utilizada em comparação.

(A)

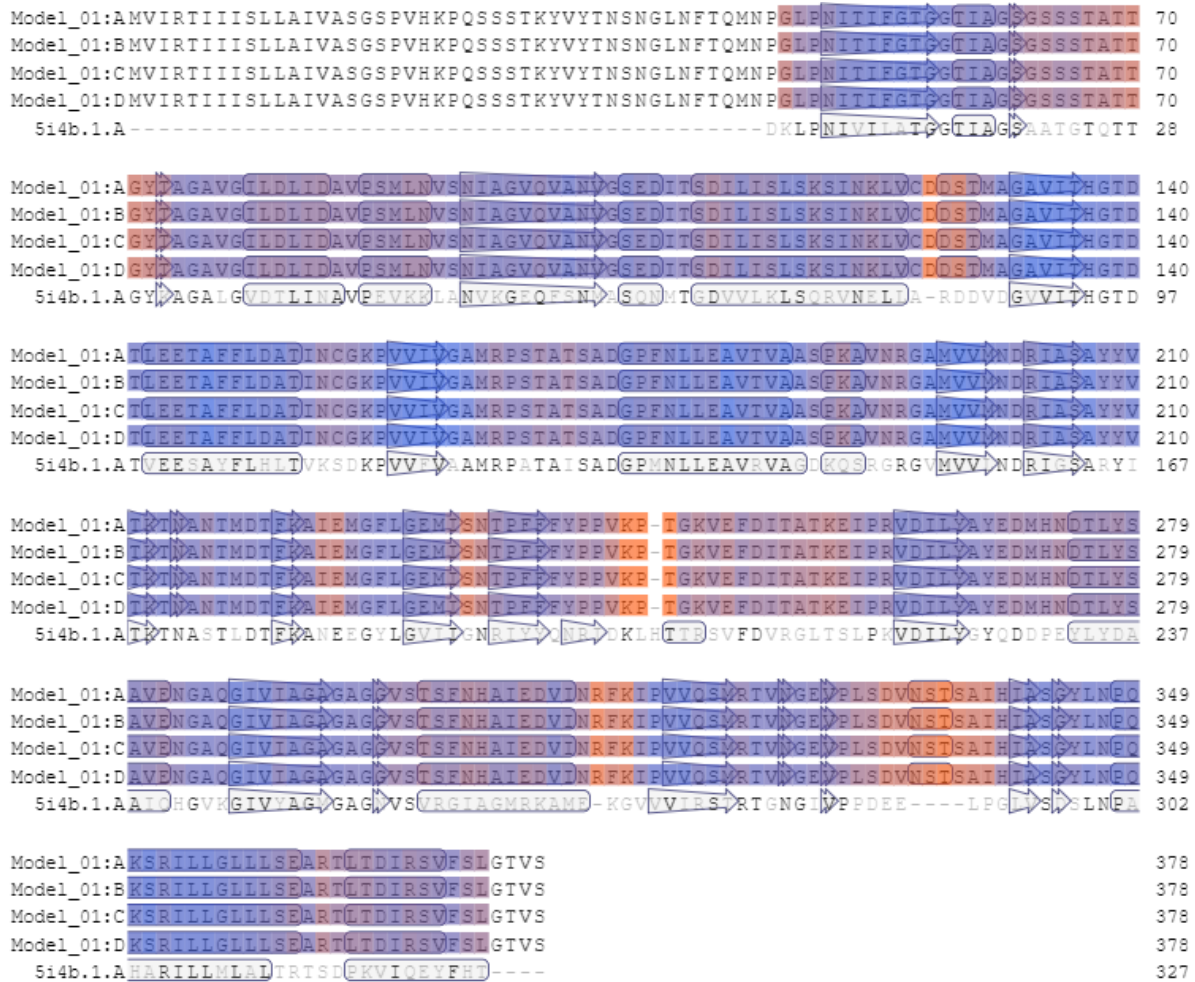


(B)



**Figura 20:** Previsão da estrutura tridimensional da L-asparaginase de *Penicillium cerradense* por SwissModel®. (A) *Cartoon* - Estrutura tetramérica com monômeros apresentados por cores distintas e (B) Superfície.

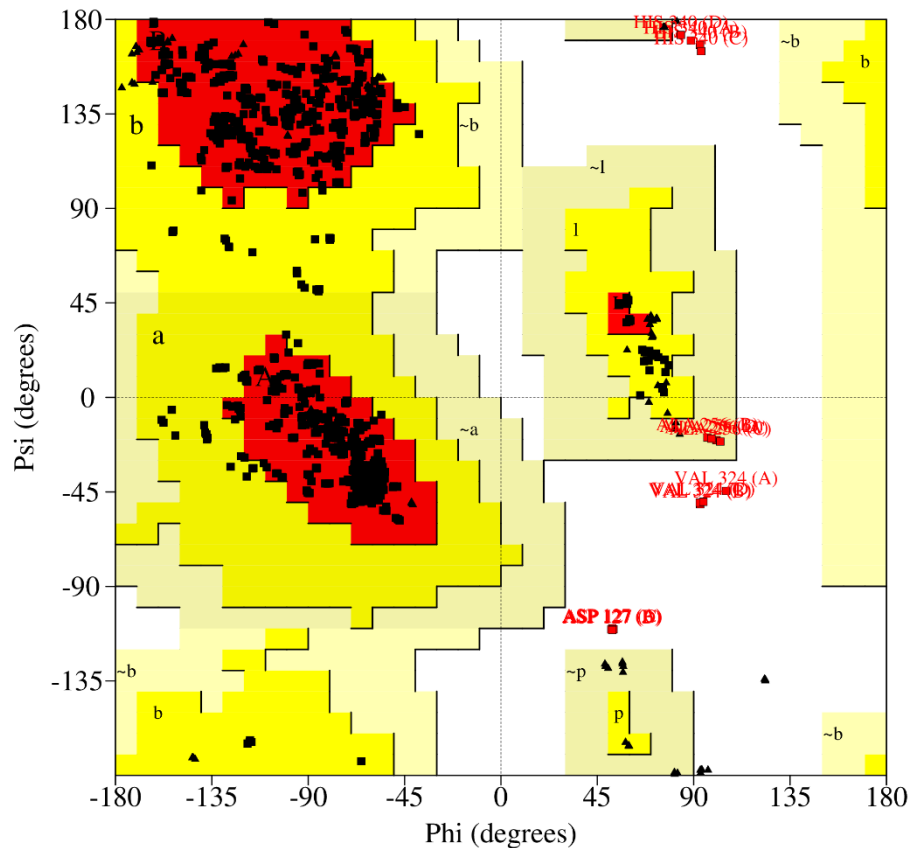




**Figura 21:** Alinhamento da sequência de L-asparaginase de *Penicillium cerradense* com o modelo proposto pelo software SwissModel®.

Na representação da Figura 21, as regiões azuis demonstram resíduos de aminoácidos bem-posicionados dentro da conformação estrutural da proteína em relação ao modelo proposto (baixa desordem). E, as regiões em laranja apresentam tendências de ligações ruins (bad-bonds), e choques de átomos dentro da estrutura, incompatível com o Princípio de Ramachandran.

A enzima L-asparaginase do fungo *P. cerradense* quando comparada ao modelo proposto, apresentou um percentual de 95,57 % (Figura 22). O dado referido apresenta-se em bom acordo com a qualidade do modelo proposto. A estrutura modelada apresenta similaridade com relato anterior a estrutura tetramérica de L-asparaginases (Swain *et al.*, 1993). A enzima L-asparaginase é encontrada normalmente como um tetrâmero, mas as formas monomérica, dimérica e hexamérica também foram encontrados para isolados de diferentes fontes (Batool *et al.*, 2016).



**Figura 22:** Estrutura. ProCheck Ramachandran Plot da estrutura tridimensional de L-asparaginase de *P. cerradense* prevista por SwissModel® representando 95,57% de resíduos presentes na região favoravelmente permitida (vermelho, brilhante e amarelo claro), enquanto 0,7% de resíduos de aminoácidos consistiam na região não permitida (pálido amarelo).

O alinhamento para L-asparaginase com o modelo proposto pelo software SwissModel-Expasy® apresenta uma sequência inicial de 45 aminoácidos que não estão alinhados com o modelo, sugere-se que esses primeiros aminoácidos poderiam estar relacionados a localização da enzima.

Em predições funcionais por termos *Gene Ontology* em consenso, a sequência codificante em análise foi apresentada com função molecular de atividade de asparaginase (C-score 0,97); processo metabólico da asparagina (C-score 0,97); e componente celular do espaço periplasmático (C-score 0,76). Para a função molecular, nesses termos apresenta-se em baixa pontuação (C-score 0,49) para atividade dupla asparaginase/glutaminase.

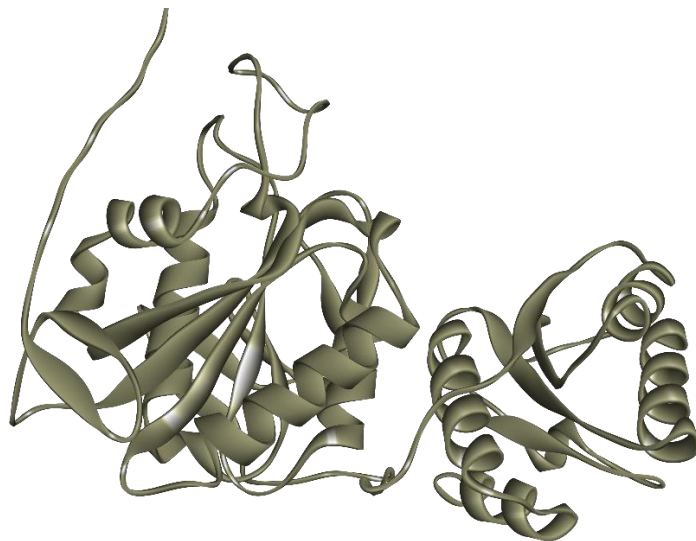
O modelo estrutural tridimensional de L-asparaginase de *P. cerradense*, por SwissModel-Expasy®, foi submetido a estudos de comparação de estrutura molecular. Em alinhamento de estrutura por pares a L-asparaginase de *P. cerradense*

apresenta proximidade estrutural às L-asparaginases tanto de *E. coli* (0,87 Å e 43% identidade de sequência), como *D. chrysanthemi* (0,88 Å e 47% identidade de sequência) (Tabela 1).

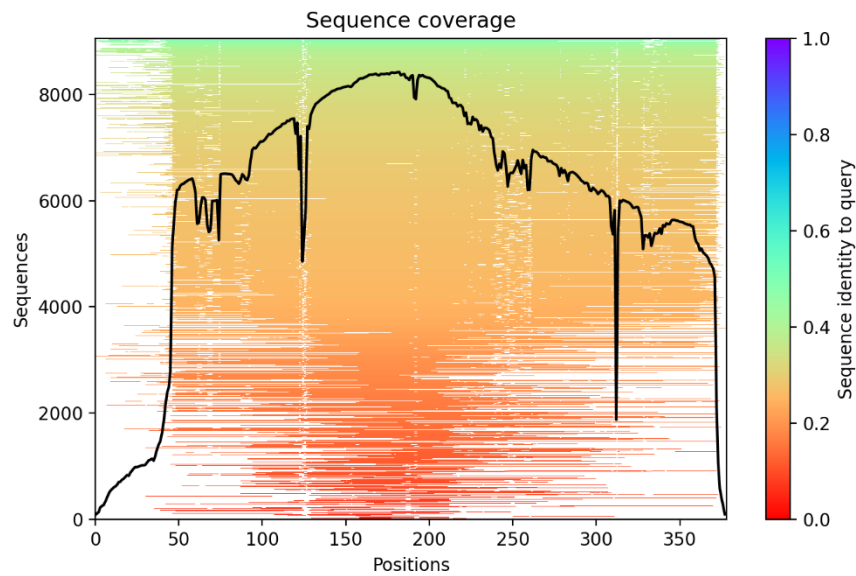
**Tabela 1:** Alinhamento de estrutura em pares de L-asparaginase de *P. cerradense* (SwissModel®) com outros microrganismos.

Microrganismos	RMSD	TM-score	Identidade da sequência	Equivalência dos resíduos
<i>E. coli</i>	0,87	0,84	43%	324
<i>D. chrysanthemi</i>	0,88	0,85	47%	324

Na oportunidade em utilizar um algoritmo de alta precisão, o AlphaFold2® foi utilizado para prever a estrutura tridimensional de L-asparaginase de *P. cerradense*. Esse método propõe a estrutura tridimensional por meio recursos derivados de modelos homólogos e de alinhamento de múltiplas sequências, e obtendo desde a sua publicação sucesso em termos de adoção da comunidade (David *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2023). O modelo estrutural proposto para L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta-se na figura 23. O perfil de confiabilidade da predição é apresentado na figura 24. A análise de Ramachandran mostrou 96,00% de seus resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis ao modelo proposto (Figura 25). Os dados acima concordam com a qualidade do modelo proposto e, portanto, ajudam a validar o modelo tridimensional da L-asparaginase de *P. cerradense*.



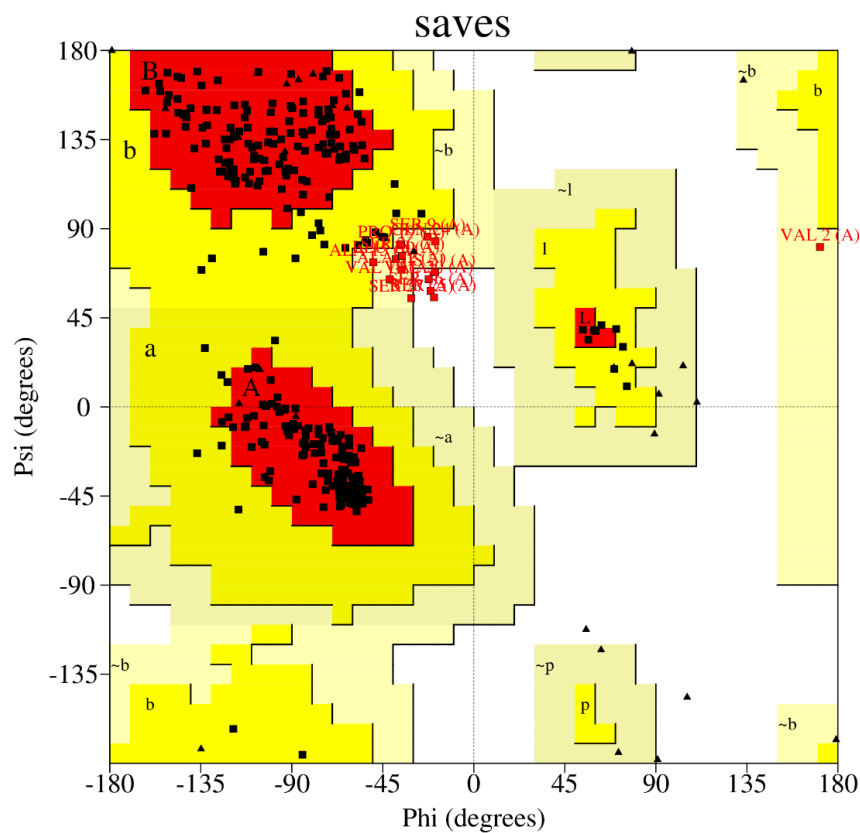
**Figura 23:** Modelagem da estrutura tridimensional para a sequência de L-asparaginase de *Penicillium cerradense* por AlphaFold2®.



**Figura 24:** Perfil de confiabilidade da predição da estrutura tridimensional de L-asparaginase de *P. cerradense* por codificação de cores baseada em medidas internas do AlphaFold2®.

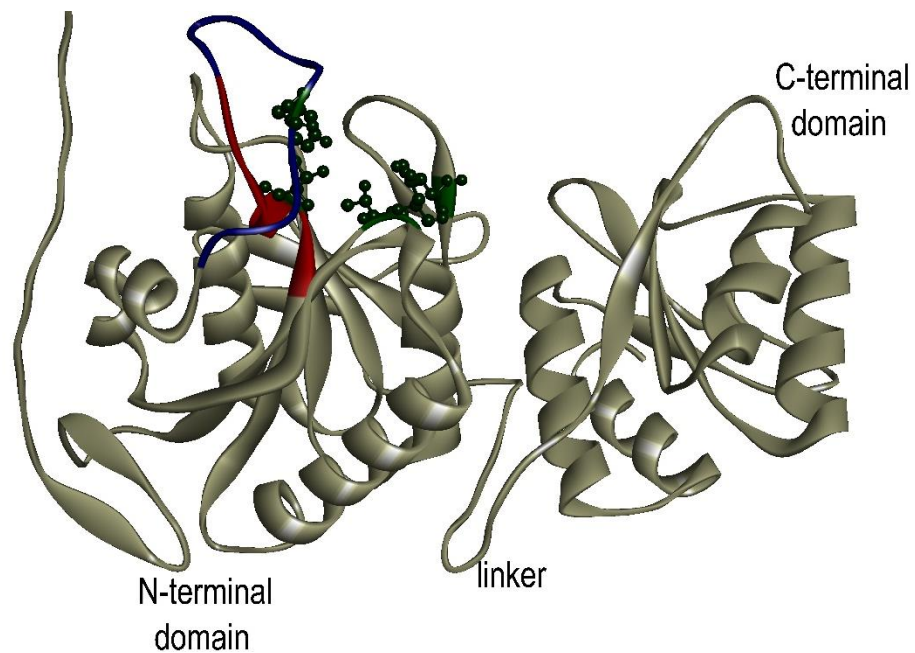
PROCHECK

## Ramachandran Plot



**Figura 25:** ProCheck Ramachandran Plot da estrutura de L-asparaginase de *P. cerradense* prevista por AlphaFold2® representando 96,0% de resíduos presentes na região favoravelmente permitida (vermelho, brilhante e amarelo claro).

A subunidade revelada para L-asparaginase de *P. cerradense* pelo AlphaFold2® exibiu presença de dois domínios  $\alpha/\beta$  conectados por um loop que serve como uma sequência de ligação entre os dois (Figura 26). Isso corresponde às mesmas características estruturais de acordo com a proteína *E. coli* nativa 3ECA relatada no banco de dados PDB (Swain *et al.*, 1993).



**Figura 26:** Monômero de L-asparaginase de *P. cerradense* com a indicação do domínio N-terminal, o domínio C-terminal, o linker, a região HR em vermelho, o elemento ASFL em azul e os resíduos conservados do sítio catalítico em verde.

A região inicial da porção N-terminal apresenta-se em loop, aproximadamente 50 aminoácidos, com baixa identidade a similaridade de consulta por AlphaFold2® (Figura 23) e pode corresponder a região não predita pelo programa. Para avaliar este caso, foi realizado BLASTp contra o banco nr (todas as proteínas) e somente contra o banco PDB. Contra o banco nr, a distribuição filogenética apresenta-se concentrada em fungos e, contra o PDB apresenta-se apenas para bactérias e *Archaea*. Nesse cenário, a não predição para essa região pode ser devido à ausência de outras regiões similares, em termo sequenciais, no PDB, limitando o sistema no aprendizado para esta estrutura. No entanto, eventualmente a região pode ser intrinsecamente desordenada na L-asparaginase de *P. cerradense*. Isso foi observado nos resultados por homologia no SwissModel®, onde a mesma região, sendo 45 aminoácidos, não se alinhou ao modelo.

O modelo estrutural tridimensional de L-asparaginase de *P. cerradense*, por AlphaFold2®, também foi submetido a estudos de comparação ou representação de estrutura molecular. Em alinhamento de estrutura por pares as L-asparaginases de *P. cerradense* apresenta proximidade estrutural às L-asparaginases de *E. coli* (1,51 Å e 43% identidade de sequência), como *D. chrysanthemi* (1,40 Å e 47% identidade de sequência) (Tabela 2).

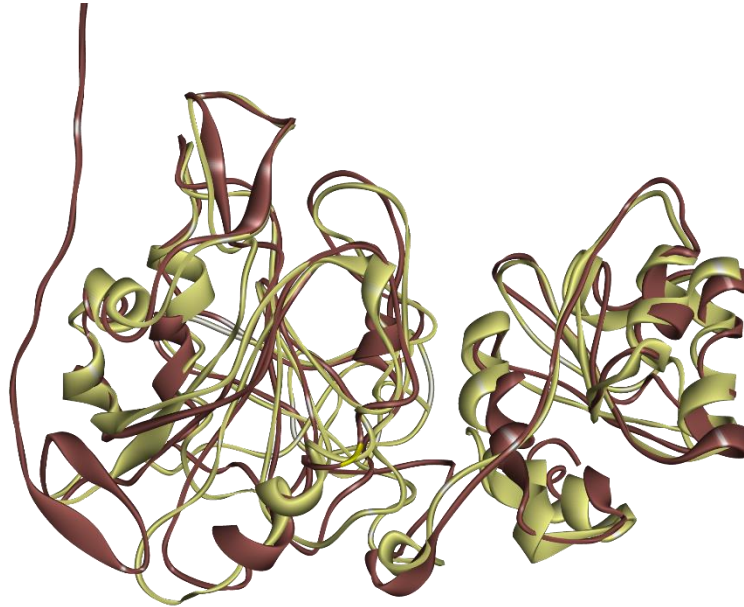
**Tabela 2:** Alinhamento de estrutura em pares de L-asparaginase de *P. cerradense* (AlphaFold2®) com outros microrganismos.

Microrganismos	RMSD	TM-score	Identidade da sequência	Equivalência dos resíduos
<i>E. coli</i>	1,51	0,82	43%	322
<i>D. chrysanthemi</i>	1,40	0,82	47%	322

Os dados de alinhamento estrutural entre comparação aos dois modelos estruturais, por SwissModel® e AlphaFold2®, revelam uma diferença de distanciamento (RMSD) entre a L-asparaginase de *P. cerradense* e às de fonte bacteriana. Sendo que, o alinhamento usando o modelo por SwissModel® apresenta-se com menores valores de RMSD do que o modelo por AlphaFold2®. A diferença de valor de distanciamento suscitou um questionamento relacionado ao viés presente nas abordagens de modelagem por homologia. Onde o baixo valor de RMSD estaria relacionado ao resultado de uma replicação aos modelos estruturais presente no PDB (*Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase E63Q +S254N mutation + L-Aspartic acid (cód: PDB 5i4b.1.A) por SwissModel®, ao invés de capturar a real avaliação estrutural para L-asparaginase de *P. cerradense*. Dado que, a L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta baixa identidade à L-asparaginase bacteriana (46,30%) quanto as suas sequências primárias.

A figura 27 apresenta a sobreposição entre os modelos estruturais proposto por SwissModel® e AlphaFold2®, e revela um distanciamento entre as estruturas preditas (RMSD 2,27 Å), principalmente nas regiões de loop. Os cálculos de modelagem estrutural por homologia baseiam-se em estruturas disponíveis e ainda não se têm depositado de nenhuma estrutura de L-asparaginase fúngica cristalizada para comparação. Essa condição pode representar um viés a esse tipo de abordagem.

Diante desse cenário, apresenta-se a necessidade de purificação desta enzima e realizar a cristalografia com finalidade de melhor entendimento da estrutura tridimensional, dos parâmetros cinéticos e dinâmicos.



**Figura 27:** Sobreposição estrutural de L-asparaginase de *P. cerradense* modelo SwissModel® (amarelo) ao modelo AlphaFold2® (vermelho). RMSD 2,27 Å.

O AlphaFold2® apresenta em resultado apenas modelos estruturais terciários e a não apresenta a proteína em sua conformação final, mas corresponde a resultados mais precisos na previsão da estrutura tridimensional de proteínas com dobras desconhecidas (David *et al.*, 2022). Além disso, o algoritmo AlphaFold2® permitiu prever e incluir estruturas de outras L-asparaginases fúngicas, espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* próximas à *P. cerradense* na relação evolutiva. Considerando a maior precisão e oportunidade de maior robustez filogenética, os modelos preditos por AlphaFold2® foram considerados para as comparações e representações estruturais a partir deste tópico.

Em alinhamento de estrutura por pares a L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta proximidade estrutural a todos os microrganismos utilizados em comparação por este estudo (Tabela 3), com RMSD < 2,0 Å. No que se refere as estruturas dos monômeros de L-asparaginase para os microrganismos em estudos, é notável a conservação da estrutura tridimensional, mesmo com baixa identidade de

sequência. Essa relação de similaridade apresenta-se em conformidade ao relatado no estudo de da Silva et. al (2022) onde indicaram que L-asparaginases de classe 1 apresentam alta conservação na estrutura terciária mesmo com baixa identidade de aminoácidos, sugerindo uma ancestralidade evolutiva comum (Da Silva *et al.*, 2022).

**Tabela 3:** Alinhamento de estrutura em pares de L-asparaginase de *P. cerradense* com outros microrganismos.

Microrganismos	RMSD	TM-score	Identidade da sequência	Equivalência dos resíduos
<i>E. coli</i>	1.51	0.82	43%	322
<i>D. chrysanthemi</i>	1.40	0.82	47%	322
<i>P. chrysogenum</i>	1.23	0.4	54%	377
<i>P. digitatum</i>	1.11	0.38	57%	375
<i>P. griseofulvum</i>	1.02	0.38	57%	375
<i>P. italicum</i>	0.95	0.65	57%	364
<i>P. steckii</i>	1.03	0.67	77%	377
<i>P. sizovae</i>	0.97	0.69	76%	377
<i>A. ibericus</i>	0.98	0.41	79%	373
<i>A. idologenus</i>	0.7	0.71	79%	374
<i>A. niger</i>	0.85	0.59	80%	369
<i>A. sclerotii carbonarius</i>	1.12	0.31	79%	375

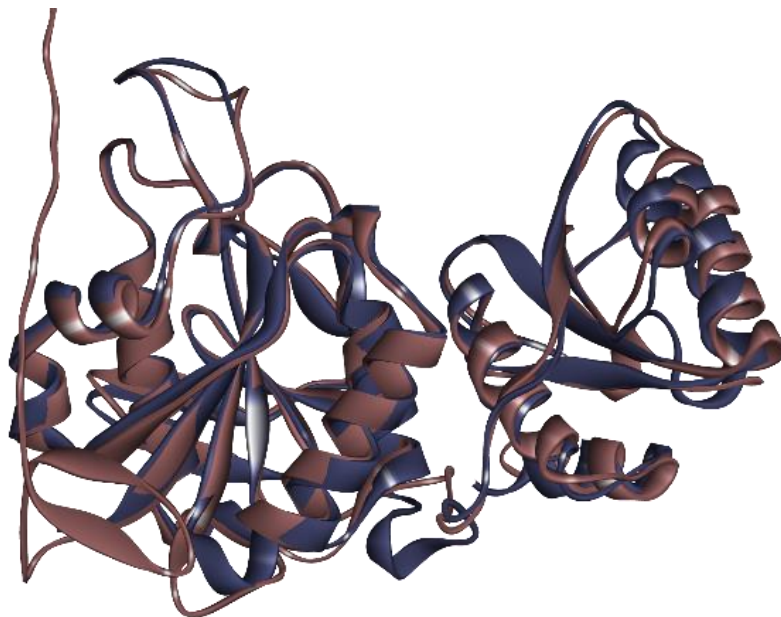
Nesta ocasião a L-asparaginase de *P. cerradense* aproxima-se mais às enzimas fúngicas do que às de bactéria, o que se considera esperado pela maior identidade quanto a sequência primária entre L-asparaginases de fungos. Isso, diferente do observado aos resultados de alinhamento com modelo SwissModel®, que aproximava *P. cerradense* às L-asparaginases bacterianas mesmo apresentando baixa identidade quanto a sequência primária entre eles. Esse resultado corrobora com pressuposto de possível replicação de modelo quando se utiliza abordagem por homologia.

A L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta maior proximidade estrutural a enzima de *A. idologenus* (0,7 Å e 79% identidade de sequência). Quando correlacionado apenas ao gênero, *P. cerradense* apresenta proximidade estrutural a enzima de *P. sizovae* (0,97 Å e 76% identidade de sequência). Aos fungos em estudo, a similaridade estrutural revelou-se em resultado consistente com a característica de



agrupamento da relação evolutiva para enzima L-asparaginase e formação de grupo parafilético.

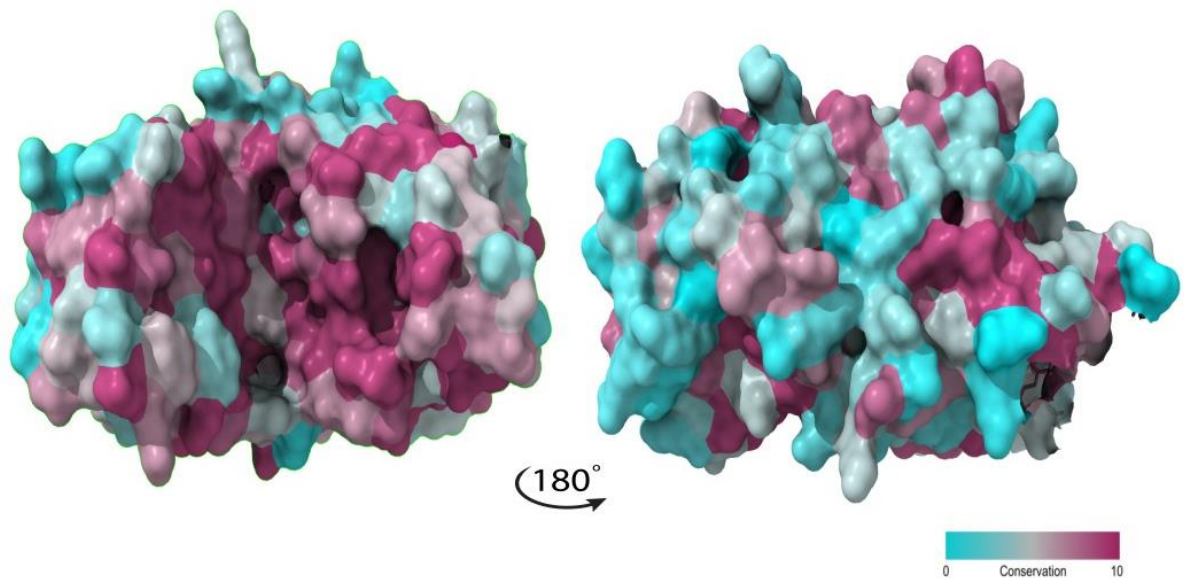
Mesmo com relação evolutiva distante, a L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta proximidade estrutural às L-asparaginases bacterianas e mantêm uma dobra quase idêntica (TM-score > 0,5). Essa proximidade sugere uma enzima ativa e funcional. A Figura 28 apresenta a proximidade estrutural entre a L-asparaginase de *P. cerradense* às enzimas bacterianas, utilizando a L-asparaginase de *E. coli* como o modelo de uso comercial. Em análise as duas fontes bacterianas, a L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta maior proximidade estrutural a L-asparaginase de *D. chrysanthemi* (1,40 Å e 47% identidade de sequência) do que a enzima de *E. coli* (1,51 Å e 43% identidade de sequência) – resultado consistente ao apresentado pelo modelo estrutural homólogo à L-asparaginase cristalizada de *D. chrysanthemi* por SwissModel®.



**Figura 28:** Sobreposição estrutural de L-asparaginase de *P. cerradense* (vermelho) à L-asparaginase de *E. coli* (3ECA pdb) (azul).

A análise de sequências múltiplas usando as sequências de L-asparaginase de *P. cerradense*, *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. griseofulvum*, *P. italicum*, *P. sizovae*, *P. steckii*, *A. idologenu*, *A. ibericus*, *A. sclerotii carbonarius* e *A. niger* exibiu resíduos de aminoácidos conservados e consensuais. Nesta análise com 11 taxa de espécies

de *Penicillium* com matriz de 384 resíduos foram observados 174 sítios conservados e 176 sítios informativos a parcimônia. A região que apresenta maior conservação em L-asparaginase de *Penicillium* e *Aspergillus* está no domínio N-terminal (IPR027474\_PF00710), entre 49-236 resíduo para L-asparaginase de *P. cerradense*. Nesta região de maior conservação encontram-se as regiões HR e ASFL e os resíduos críticos para a catálise da enzima. Essa alta conservação no posicionamento dos elementos responsáveis pela atividade catalítica de L-asparaginase pode sugerir resposta semelhante a atividade enzimática entre os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. A Figura 29 apresenta a conservação dos resíduos para L-asparaginase fúngica de *Penicillium* e *Aspergillus* mapeada na estrutura molecular modelo deste estudo, *P. cerradense*.



**Figura 29:** Mapeamento da conservação seqüência-estrutura para L-asparaginases de espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, em modelo estrutural L-asparaginase de *P. cerradense*. Conservação expressa em uma escala de cores, de turquesa (0 – baixa conservação) para rosa (10 – alta conservação).

## 5.6 Predição de imunogenicidade, alergenicidade e toxicidade

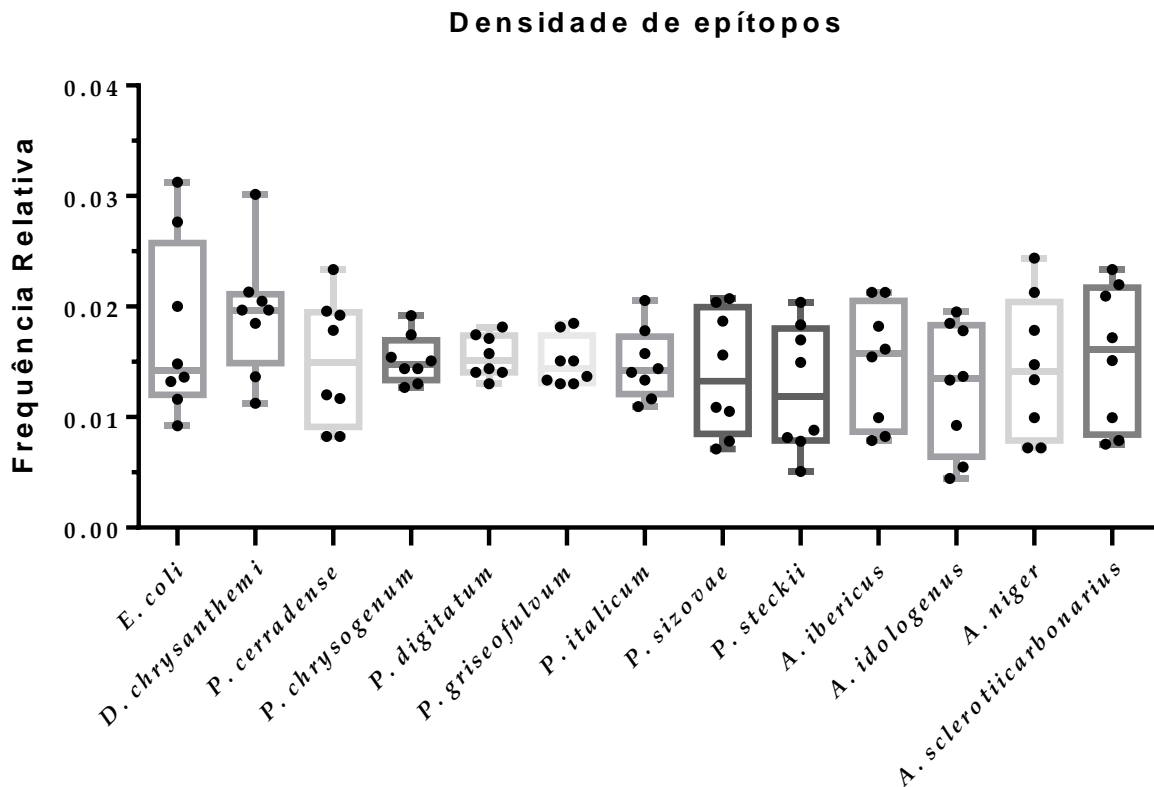
A L-asparaginase é considerada um dos exemplos notáveis de proteína terapêutica bem estabelecida com potencial para induzir uma resposta imune em pacientes. A hipersensibilidade é a principal razão para a interrupção do tratamento com L-asparaginase. Esse cenário impulsiona estudos de gerenciamento a imunogenicidade da enzima (Asselin e Fisher, 2014; Fonseca *et al.*, 2021).

A presença de epítomos de células-T na sequência da proteína corresponde a um dos principais impulsionadores da imunogenicidade, com resultado de produção sustentada de anticorpos que podem neutralizar o efeito terapêutico (Fonseca *et al.*, 2021). A predição de epítomos de células-T foi mensurada pela determinação da densidade de epítomos.

A densidade de epítomo permite estimar o grau de resposta do sistema imunológico. Em resumo, essa alternativa de medida conceitua e compara uma proteína mais imunogênica a outra se a densidade de epítomos for maior. A abordagem de correlação entre densidade de epítomos e imunogenicidade vem sendo apresentada em estudos que demonstram a estreita relação entre essas duas variáveis (Feldmann *et al.*, 1975; Liu *et al.*, 2004; Liu e Chen, 2005). Nesse sentido, o estudo de predição do grau de imunogenicidade de proteínas de interesse terapêutico tem usado amplamente a medida por densidade de epítomos (Groot e Martin, 2009; Vider-Shalit *et al.*, 2009; Lissabet, 2018).

Neste estudo foi aplicado o mesmo conceito de densidade de epítomos para avaliar o grau de imunogenicidade (GI) da enzima L-asparaginase de *P. cerradense* em comparação com L-asparaginase de uso clínico (*E. coli* e *D. chrysanthemi*) e L-asparaginase de outras espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. A frequência relativa foi a medida utilizada para determinar a densidade de epítomos e prever o grau imunogenicidade das proteínas. Para essa determinação do grau de imunogenicidade foram utilizados oito alelos *HLA-DRB1\*01:01*, *HLA-DRB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*04:01*, *HLA-DRB1\*07:01*, *HLA-DRB1\*08:01*, *HLA-DRB1\*11:01*, *HLA-DRB1\*13:01* e *HLA-DRB1\*15:01*, que apresentam ampla distribuição global (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011; Southwood *et al.*, 1998)

O GI de L-asparaginase de *P. cerradense* não apresenta diferença significativa comparada a enzima de *E. coli*, *D. chrysanthemi*, *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. griseofulvum*, *P. italicum*, *P. sizovae*, *P. steckii*, *A. ibericus*, *A. idologenus*, *A. niger* e *A. sclerotii carbonarius* (Figura 30). Em comparação com L-asparaginases clínicas, a enzima de *P. cerradense* (0,0149) apresenta maior GI comparado a *E. coli* (0,0142) e menor que a enzima de *D. chrysanthemi* (0,0197). A L-asparaginase de *D. chrysanthemi* apresenta o maior GI. O resultado obtido assemelha-se ao reportado por Belen *et al.* (2019), sendo GI da L-asparaginase de *D. chrysanthemi* maior do que L-asparaginase *E. coli*.



**Figura 30:** Gráfico *box plot* (mediana e mínima/máxima) representando o grau de imunogenicidade de L-asparaginase por frequência relativa por predição de epítomos imunogênicos de células T para oito alelos (*HLA-DRB1\*01:01*, *HLA-DRB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*04:01*, *HLA-DRB1\*07:01*, *HLA-DRB1\*08:01*, *HLA-DRB1\*11:01*, *HLA-DRB1\*13:01* e *HLA-DRB1\*15:01*), para L-asparaginase de *P. cerradense* e outros microrganismos. Os pontos no box representam os oito alelos avaliados. Não apresenta diferença significativa ( $p < 0.05$  – Kruskal-Wallis com teste posterior Dunn's test).

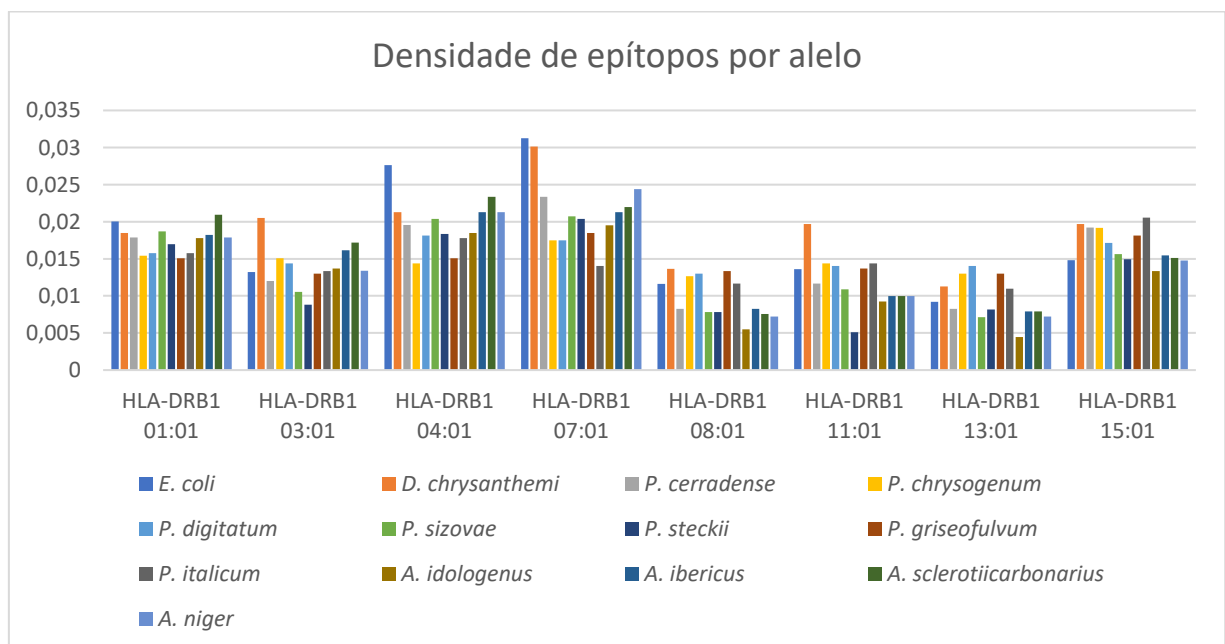
Ao avaliar o GI, foi verificado que não existe diferença significativa na imunogenicidade prevista entre as L-asparaginases dos microrganismos avaliados neste estudo. No entanto, quando comparando as frequências relativas das L-asparaginases fúngicas com as de uso clínico por *E. coli* e *D. chrysanthemi*, o GI previsto para L-asparaginases fúngicas foi equivalente ou menor ao das enzimas bacterianas.

Entre espécies de *Penicillium*, os valores de GI exibem similar frequência relativa: *P. cerradense* (0,0149), *P. chrysogenum* (0,0147), *P. digitatum* (0,0150), *P. griseofulvum* (0,0144) e *P. italicum* (0,0142), enquanto L-asparaginase de *P. sizovae* e *P. steckii* apresentam um valor de 0,0132 e 0,0119 respectivamente, que é o mais próximo do valor que foi calculado para *E. coli* (0.0142). Observando as espécies de *Aspergillus*, os valores de GI exibem maior variação na frequência relativa: *A. ibericus*

(0.0158) e *A. sclerotii carbonarius* (0.0161), enquanto *A. idologenus* (0.0135) and *A. niger* (0.0141). Em observação aos GI por gênero (*Penicillium* e *Aspergillus*), os resultados apresentados podem sugerir uma tendência de GI por gênero, mas concomitantemente percebe-se possíveis particularidades a cada espécie.

Estes resultados podem representar um grau de imunogenicidade compatível ao uso clínico para L-asparaginase de *P. cerradense*, considerando que o seu GI se apresenta entre as enzimas obtidas de *E. coli* e *D. chrysanthemi*. Com isso, uma resposta imunológica compatível ao uso clínico pode ser provável a enzima de *P. cerradense*, aos epítomos de células T.

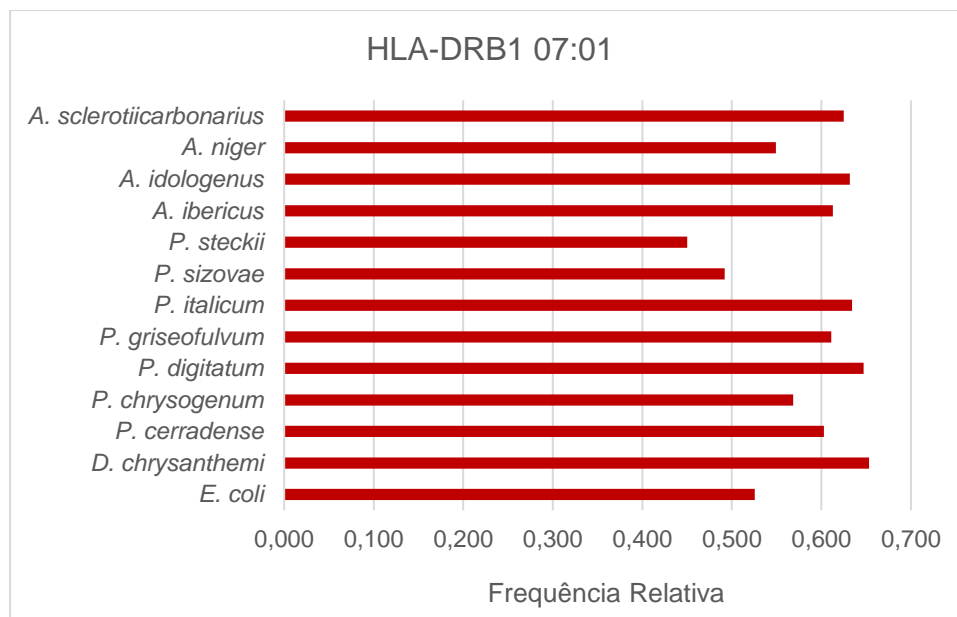
De maneira mais detalhada, a Figura 31 representa a frequência relativa da densidade de epítomos de células T de cada um dos oito alelos (*HLA-DRB1\*01:01*, *HLA-DRB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*04:01*, *HLA-DRB1\*07:01*, *HLA-DRB1\*08:01*, *HLA-DRB1\*11:01*, *HLA-DRB1\*13:01* e *HLA-DRB1\*15:01*). Os epítomos imunogênicos previstos de células T são apresentados em tabela no Material Suplementar B. Quando comparada com as enzimas de uso clínico (*E. coli* e *D. chrysanthemi*), a L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta valor de densidade próximo ou menor aos 08 alelos avaliados. Em geral, pode-se notar um comportamento de distribuição semelhante com tendência por alelo para as L-asparaginases avaliadas.



**Figura 31:** Gráfico de barras representando o grau de imunogenicidade de L-asparaginase por predição de epítomos imunogênicos de células T para oito alelos independentes (*HLA-DRB1\*01:01*, *HLA-DRB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*04:01*, *HLA-*

*DRB1\*07:01*, *HLA-DRB1\*08:01*, *HLA-DRB1\*11:01*, *HLA-DRB1\*13:01* e *HLA-DRB1\*15:01*) de L-asparaginase de *P. cerradense* e outros microrganismos

De modo específico, para o alelo *HLADRB1\*07:01* foi bem estabelecido a sua associação a um elevado risco de reações de hipersensibilidade após tratamento com L-asparaginase bacteriana, possivelmente devido ao fato de ser um alelo que confere ligação de alta afinidade (Fernandez *et al.*, 2014; Nóra *et al.*, 2017). Baseado neste pressuposto, as frequências relativas e predição dos peptídeos alergênicos de L-asparaginase de *P. cerradense* para o alelo *HLA-DRB1\*07:01* foi comparado a *E. coli*, *D. chrysanthemi*, e espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* para determinar os resíduos e regiões da enzima que poderiam contribuir para a alergenicidade. A figura 32 apresenta a frequência relativa de epítomos de células T alergênicos para o alelo *HLADRB1\*07:01* da L-asparaginase de *P. cerradense* e outros microrganismos em comparação.

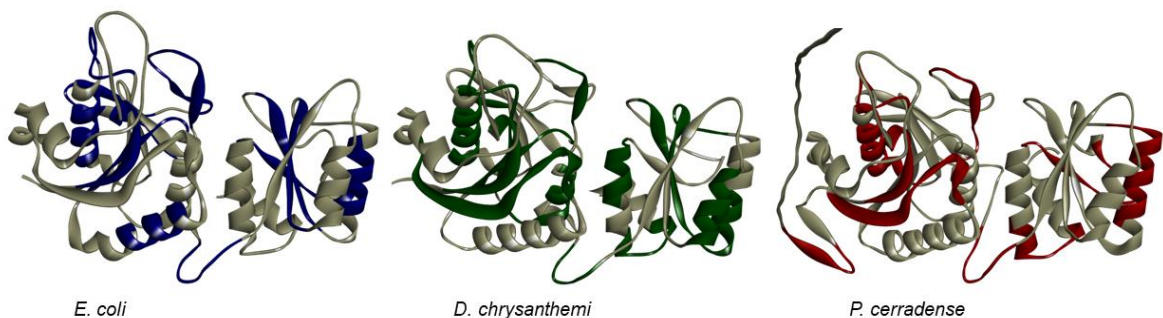


**Figura 32:** Gráfico em barras representando a frequência relativa dos epítomos alergênicos de células T para o alelo *HLA-DRB1\*07:01* da L-asparaginase de *P. cerradense* e outros microrganismos.

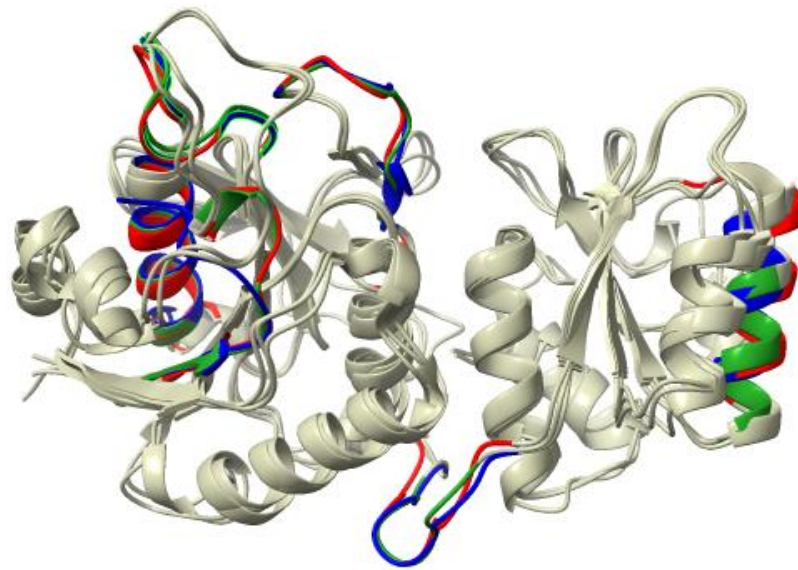
A L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta a densidade de epítomos alergênicos (0,603) maior do que a enzima de *E. coli* (0,526) e menor do que a enzima de *D. chrysanthemi* (0,653). A L-asparaginase de *D. chrysanthemi* apresenta a maior densidade de epítomos alergênicos (0,653), seguida de *P. digitatum* (0,647), *P.*

*italicum* (0,634), *A. idologenus* (0,632) e *A. scleroiticarbonarius* (0,625). Enquanto, a L-asparaginase de *P. steckii* e *P. sizovae* apresentam a menor densidade de epítomos alergênicos (0,450 e 0,492, respectivamente).

O mapeamento dos fragmentos de peptídeos alergênicos nas estruturas da L-asparaginase mostrou um perfil de distribuição diferente para a enzima de *P. cerradense* em comparação com *E. coli* e *D. chrysanthemi* (Figura 33). Os determinantes estruturais para fornecer as características de alergenicidade estão resumidos em quadro Material Suplementar C. Apesar da diferença de distribuição, as L-asparaginases de *P. cerradense*, *E. coli* e *D. chrysanthemi* apresentam regiões estruturais semelhantes em concentração de epítomos alergênicos (Figura 34). Sendo essas, 6 regiões: cadeia N $\beta$ 1/HR, Ncoil7, hélice N $\alpha$ 4, cadeia N $\beta$ 6, *linker inter* domínio e hélice C $\alpha$ 2 – respectivas regiões I<sub>52</sub>FGTGGTIA<sub>60</sub>, M<sub>165</sub>RPSTATSA<sub>173</sub>, F<sub>177</sub>NLLEAVTV<sub>192</sub>, Y<sub>208</sub>YVTKTNAN<sub>218</sub>, F<sub>252</sub>DITATKEI<sub>260</sub> e F<sub>298</sub>NHAIEDVI<sub>310</sub>, no modelo asparaginase *P. cerradense*. Os epítomos concentrados nessas regiões apresentam divergência quanto a sequência de aminoácidos apesar da mesma localização espacial, o que sugere tratar-se de regiões alergênicas determinadas principalmente pela conformação espacial e exposição superficial.



**Figura 33:** Distribuição estrutural dos epítomos alergênicos de células T para o alelo HLA-DRB1\*07:01 no monômero de L-asparaginase. Zonas azuis representam epítomos alergênicos de *E. coli*. Zonas verdes representam epítomos alergênicos de *D. chrysanthemi*. Zonas vermelhas representam epítomos alergênicos de *P. cerradense*. Cinza representam as zonas não alergênicas.



**Figura 34:** Mapeamento da conservação estrutural dos epítomos alergênicos de células T para o alelo *HLA-DRB1\*07:01* para L-asparaginases de *P. cerradense*, *E. coli* e *D. chrysanthemi*. Zonas azuis representam epítomos alergênicos de *E. coli*. Zonas verdes representam epítomos alergênicos de *D. chrysanthemi*. Zonas vermelhas representam epítomos alergênicos de *P. cerradense*. Cinza representam as zonas não alergênicas.

Com a apresentação em semelhança a densidade de epítomos, mas com diferente distribuição estrutural do epítomos alergênicos da L-asparaginase de *P. cerradense* comparado as enzimas de *E. coli* e *D. chrysanthemi*, predispõem a resposta diferente a alergenicidade já relatada na observação ao tratamento com a L-asparaginase, mas compatível ao uso clínico. No entanto, com os resultados desta análise quanto alergenicidade podem impulsionar e direcionar estratégias de melhoria caso as respostas clínicas da L-asparaginase de *P. cerradense* apresentem-se desafiadoras.

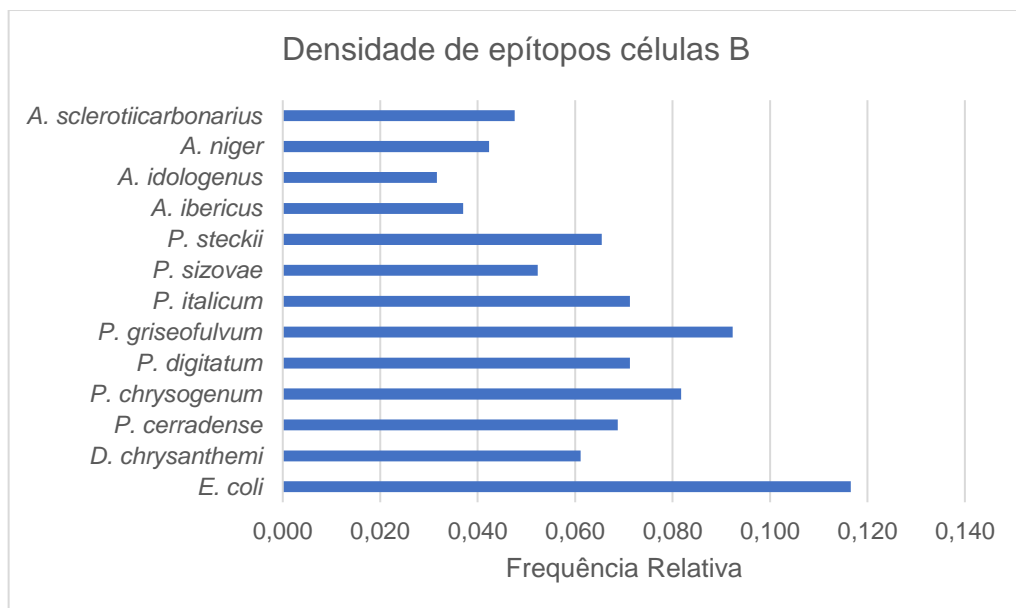
A predição de epítomos células B lineares foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade da enzima de gerar anticorpos. O diagnóstico linear de epítomos de células B foi realizado para L-asparaginase de *P. cerradense* comparado a *E. coli*, *D. chrysanthemi* e espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* para determinar os resíduos e regiões que contribuem para a geração de anticorpo. A Figura 35 representa a GI células B para essa comparação. A tabela, no Material Suplementar D, apresenta os epítomos de células B identificados nas sequências de aminoácidos dessas L-asparaginases.

A L-asparaginase de *P. cerradense* apresenta um GI (0,069) similar comparado a *D. chrysanthemi* (0,061) e menor que a enzima por *E. coli* (0,117). A L-



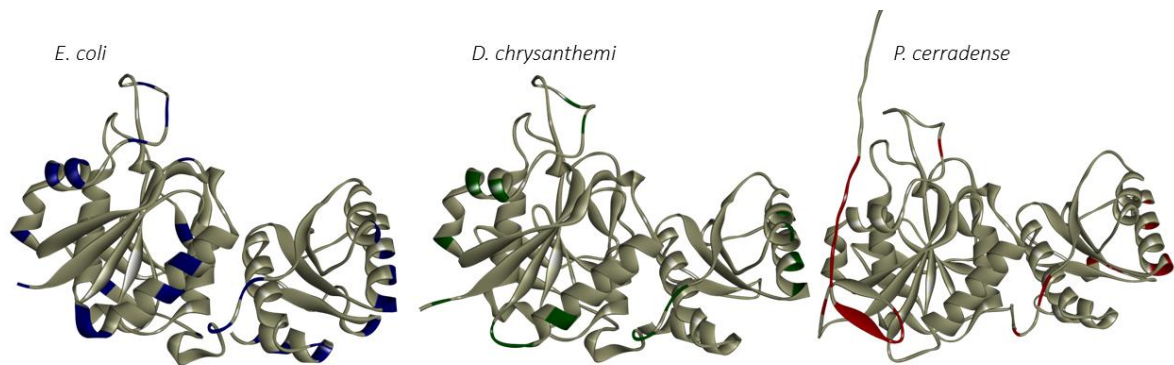
asparaginase de *E. coli* apresenta o maior GI relacionado a células B. Esse resultado assemelha-se aos relatos de maior hipersensibilidade e formação de anticorpos por L-asparaginase de *E. coli* (60% dos pacientes em tratamento) do que por *D. chrysanthemi* (8-33% dos pacientes em tratamento), descritas como imunogenicamente distintas (Albertsen *et al.*, 2002; Asselin e Rizzari, 2015; Van Der Sluis *et al.*, 2016)

Ao avaliar L-asparaginases fúngicas com as de uso clínico por *E. coli* e *D. chrysanthemi*, o GI previsto para L-asparaginases fúngicas foi equivalente ou menor ao das enzimas bacterianas. As espécies de *Penicillium*, os valores para o GI exibem variação na frequência relativa: *P. cerradense* (0,069), *P. chrysogenum* (0,082), *P. digitatum* (0,071), *P. griseofulvum* (0,092) e *P. italicum* (0,071), *P. steckii* (0,065), enquanto a L-asparaginase de *P. sizovae* (0,052) apresenta o menor GI que é o mais próximo do valor que foi calculado para *D. chrysanthemi* (0.061). Entre espécies de *Aspergillus*, valores do GI exibem similar frequência relativa: *A. ibericus* (0.037), *A. idologenus* (0.032), *A. niger* (0.042) and *A. sclerotii carbonarius* (0.048), e curiosamente todas as espécies do gênero apresentam os menores valores do GI para células B aos microrganismos avaliados neste estudo. Os resultados apresentados podem sugerir que L-asparaginases fúngicas de *Aspergillus* apresentam menor capacidade em gerar anticorpos.



**Figura 35:** Gráfico em barras representando a frequência relativa dos epítomos imunogênicos de células B da L-asparaginase de *P. cerradense* e outros microrganismos.

O mapeamento dos epítomos de células B nas estruturas monoméricas foi realizado para L-asparaginase de *P. cerradense* comparado *E. coli* e *D. chrysanthemi* (Figura 36). A distribuição estrutural apresenta diferente perfil para L-asparaginase de *P. cerradense*, *E. coli* e *D. chrysanthemi*. Na resposta imunológica a epítomos de células B, a L-asparaginase de *P. cerradense* pode apresentar-se de uma forma imunogênica distinta.



**Figura 36:** Distribuição estrutural dos epítomos de células B para L-asparaginase monômero. Zonas azuis representam epítomos de *E. coli*. Zonas verdes representam epítomos de *D. chrysanthemi*. Zonas vermelhas representam epítomos de *P. cerradense*. Cinza representam as zonas não imunogênicas.

Quanto a toxicidade, a partir da análise no servidor ToxinPred®, curiosamente, não foi encontrado peptídeos tóxicos na sequência de L-asparaginase de *P. cerradense*, resultado indicativo para proteína não tóxica. Em contraste, a L-asparaginase *E. coli* tem sido relatada com uma região de alta toxicidade responsável por suas propriedades tóxicas (Mahboobi *et al.*, 2017). Dos fungos avaliados neste estudo, *P. italicum* e *P. sizovae* apresentaram fragmentos de peptídeos tóxicos em suas sequências de L-asparaginase.

Este estudo mostrou que não existem diferenças significativas no nível de imunogenicidade entre as L-asparaginases fúngicas e bacterianas, enquanto as L-asparaginases bacterianas de *D. chysanthemi* apresentou a maior frequência relativa de epítomos T-cell e alergênicos, e *E. coli* apresentou a maior frequência relativa de epítomos B-cell.

Os dados apresentados em predição *in silico* apresentam a L-asparaginase de *P. cerradense* compatível ao uso clínico quanto sua imunogenicidade, alergenicidade e toxicidade, considerando os resultados de comparação as L-

asparaginases atualmente disponíveis ao uso clínico (fonte de *E. coli* e *D. chrysanthemi*). Do mesmo modo, *Penicillium* e *Aspergillus* mostram um grau de imunogenicidade para a L-asparaginase compatível com o uso clínico, e observa-se que a imunogenicidade parece estar associada ao tipo de microrganismo, mas apresenta uma individualidade de comportamento para cada enzima. Dentre os microrganismos avaliados, *P. steckii* apresentou os melhores resultados quanto a predição de resposta imunogênica.

As reações de hipersensibilidade causadas por L-asparaginase de *E. coli* têm sido amplamente estudadas *in vivo* (Müller *et al.*, 2001; August *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017). No entanto, para asparaginase fúngica não se observa exploração de investigação a esse respeito. Os dados apresentados neste estudo podem impulsionando uma exploração de investigação maior para aplicação de L-asparaginases fúngicas ao uso clínico e direcionar uma mudança no regime terapêutico de tratamentos que incluem L-asparaginase para uma terapia menos imunogênica. Em avaliação aos resultados gerais de hipersensibilidade, a L-asparaginase fúngica apresenta potencial para ser aplicada como primeira escolha, especialmente substituindo a enzima produzida por *D. chrysanthemi*, possivelmente como alternativa terapêutica aos pacientes que apresentam sensibilização

Para elevar o padrão de análise, a validação clínica dos epítomos imunogênicos e alergênicos previstos constituiria para corroborar a estrutura preditas *in silico*. O potencial da análise bioinformática alcançado para L-asparaginase de *P. cerradense* poderia ser validado gerando mutantes e avaliando a capacidade destes de obterem reações de hipersensibilidade, considerando que uma diminuição das respostas deve ser esperada após a intervenção dos epítomos identificados.

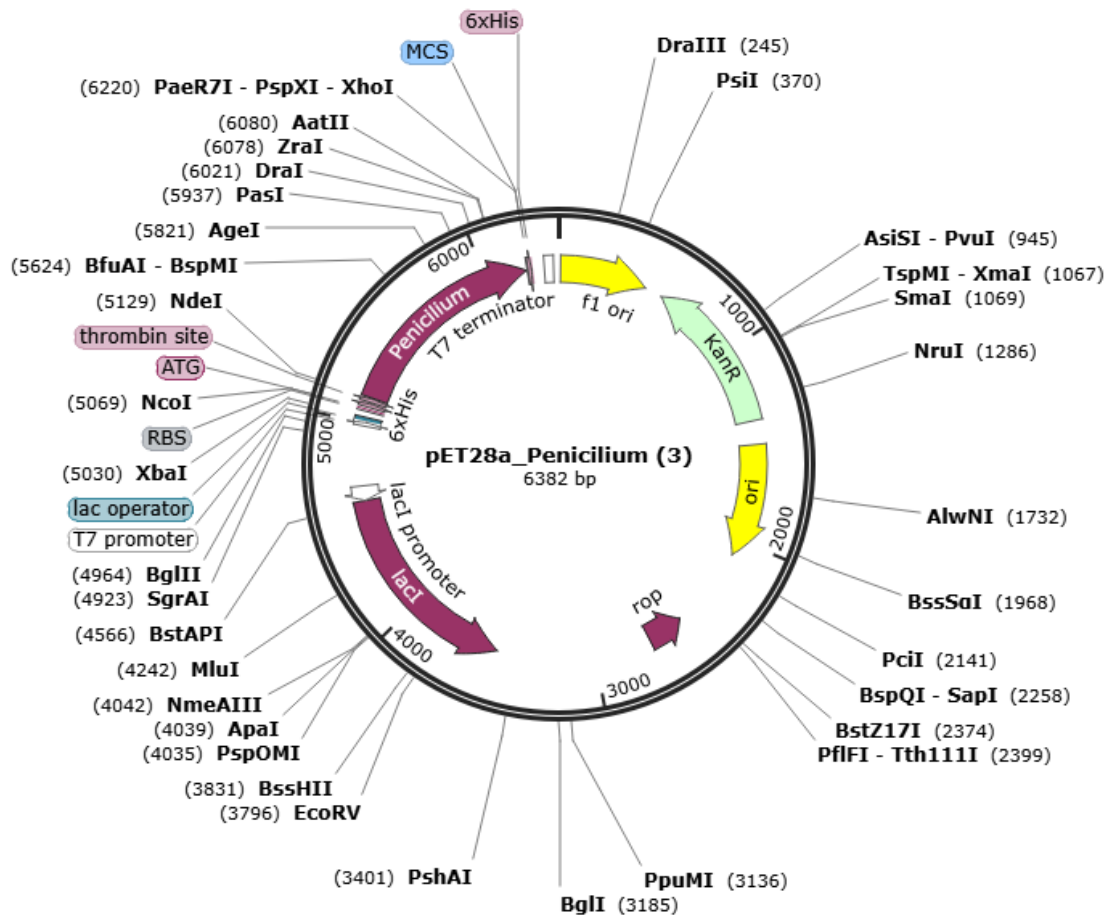
De modo abrangente, os dados apresentados são relevantes para pavimentar o caminho em busca de um entendimento dos comportamentos funcionais das L-asparaginases do gênero *Penicillium*, e apresenta a oportunidade de comparação com fontes de L-asparaginase de uso clínico disponíveis comercialmente (*E. coli* e *D. chrysanthemi*).

## **5.7 Expressão de L-asparaginase *P. cerradense* em *E. coli* pET28a**

### **5.7.1 Construção dos vetores e transformação genética**

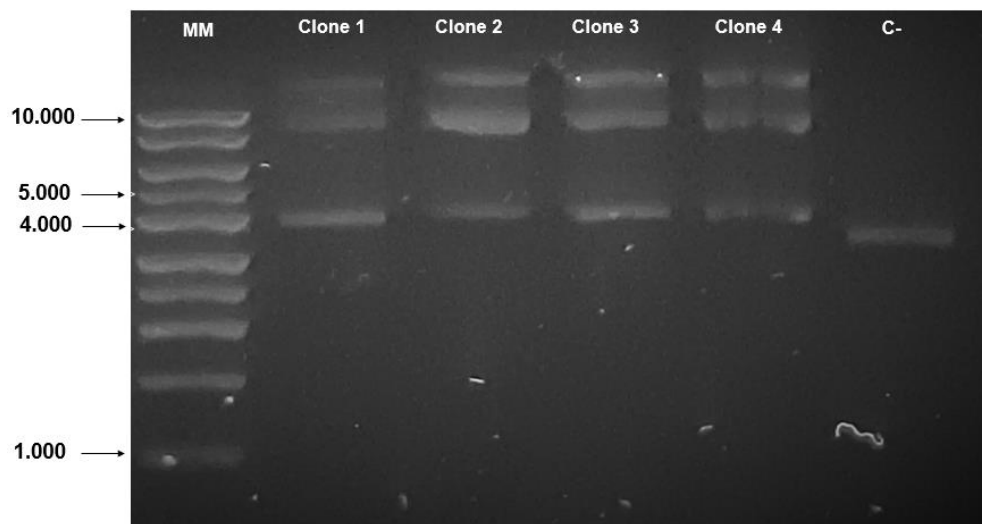
Após observação da baixa atividade de L-asparaginase produzida diretamente por *P. cerradense*, optou-se por iniciar expressão heteróloga da enzima em sistema

de *E. coli*. Para a expressão da sequência de L-asparaginase em *E. coli* foram utilizados os vetores de expressão pET28a (Figura 37). A construção do vetor foi realizada pela empresa Genome, em detalhe apresentado na Figura Suplementar 1. O vetor apresenta o gene de L-asparaginase de *P. cerradense* com o peptídeo sinal deletado e os códons foram otimizados para expressão em *E. coli*. Os sítios de restrição escolhidos foram NdeI/XhoI compatível ao desenho e comum a outros vetores, caso ocorra a necessidade de inseri-lo em outras estratégias. A His-Tag foi adicionada à região N-terminal para ser removida após etapa de purificação por tratamento com protease. O códon de parada da tradução foi acrescentado para não ocorrer a expressão de His-Tag na porção C-terminal. Como marcador seletivo, o vetor apresenta o gene de resistência à Canamicina. A expressão heteróloga da sequência de L-asparaginase, a secreção da proteína de interesse em *E. coli* foi analisada.

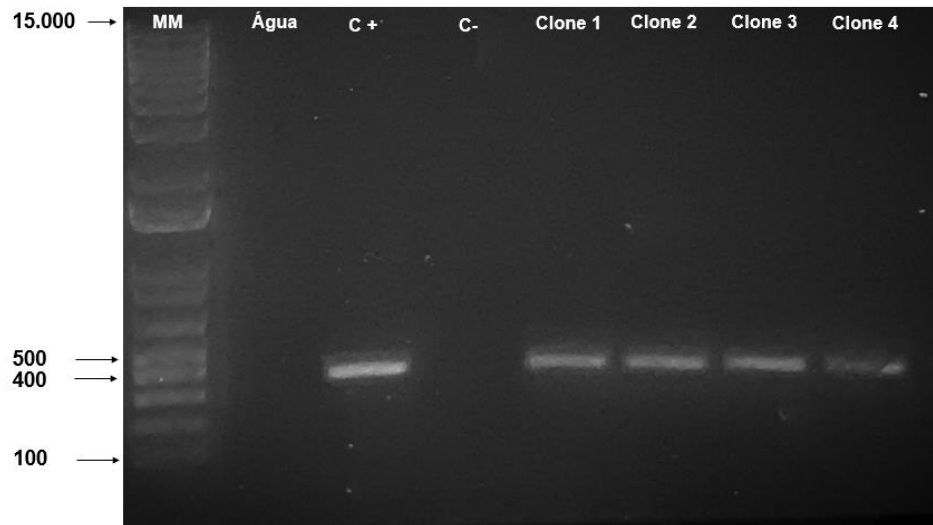


**Figura 37:** Mapa do vetor pTE28a utilizado para expressão heteróloga da L-asparaginase de *P. cerradense* em *E. coli*.

Após transformação genética das células competentes de *E. coli* DH10 com os respectivos vetores por meio de choque térmico, foram selecionados 4 clones transformados de *E. coli* DH10B com o vetor pET28a(+)-L-ASNase\_Pc e 1 clone transformado com o vetor pET28a(+). A extração de DNA plasmidial das cepas de *E. coli* DH10B foram confirmadas em gel de agarose (Figura 38). As transformações genéticas foram confirmadas por PCR (Figura 39), sendo observado amplicons de tamanho aproximado de 335pb. Esse resultado apresenta amplicom compatíveis ao fragmento estimado pelo *primer* (*forward* 5'-GGTGCAATGGTCGTTATGAA-3', *reverse* 5'-TGGCATGGTTGAAGGAAGTA-3'). Com isso, apresenta-se a confirmação para transformação da cepa de *E. coli* DH10B pET28a(+)-L-ASNase\_Pc.

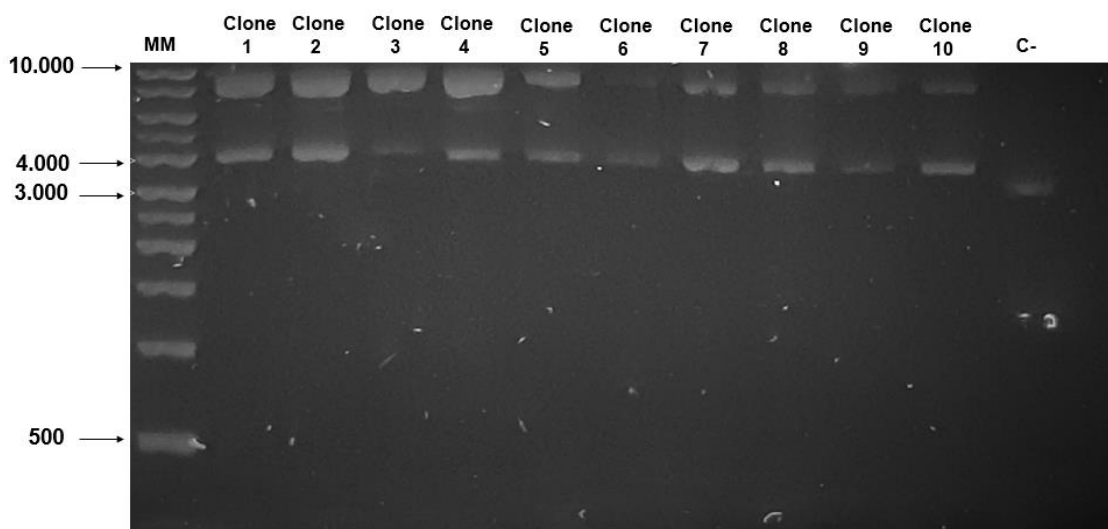


**Figura 38:** Gel de quantificação da extração de DNA plasmidial para cepas de (Clone 1, 2, 3, e 4) *E. coli* DH10B pET28a(+)-L-ASNase\_Pc e (Clone -) Controle negativo por *E. coli* DH10B pET28a(+). (MM) Marcador Molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder® (Thermo Scientific).

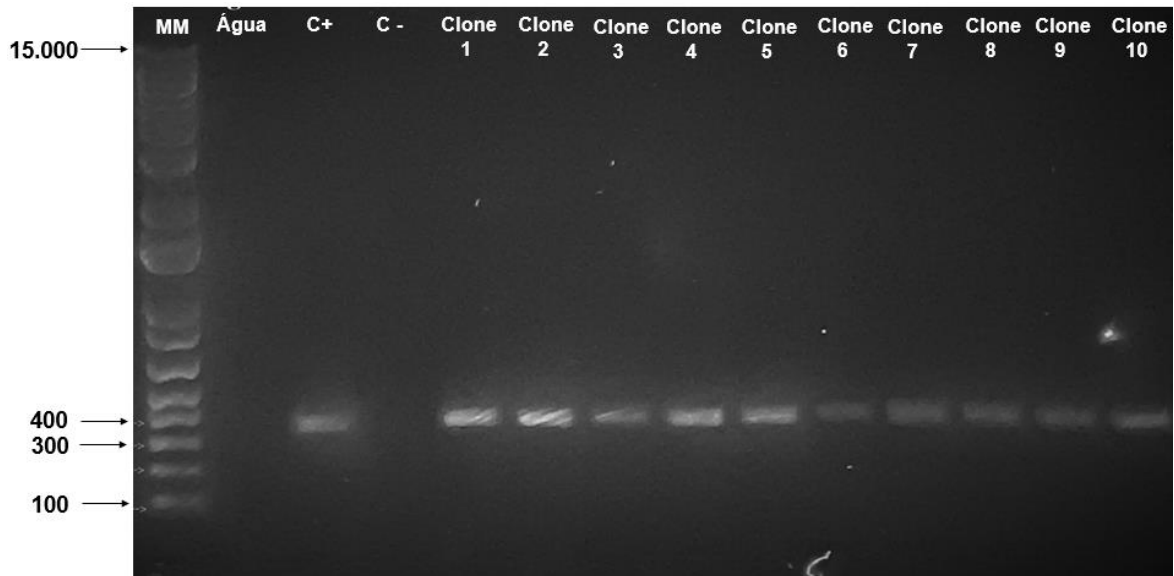


**Figura 39:** Perfil eletroforético em gel de agarose 1,2% para os fragmentos amplificados na seleção por PCR dos clones transformantes de *E. coli* DH10B pET28a(+)-L-ASNase\_Pc. (C+) Controle positivo por plasmídeo vetores pET28a(+)-L-ASNase\_Pc - Genome . (C-) Controle negativo por *E. coli* DH10B pET28a(+). (MM) Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen).

Com a confirmação da transformação de *E. coli* DH10B pET28a(+)-L-ASNase\_Pc e aumento do número de plasmídeo, a linhagem de expressão, *E. coli* BL21(DE3) foi transformada com os respectivos vetores. Após isolamento das colônias transformantes, foram selecionados 10 clones transformados de *E. coli* BL21 (DE3) com o vetor pET28a(+)-L-ASNase\_Pc e 1 clone transformado com o vetor pET28a(+). Os clones selecionados foram submetidos à extração do DNA plasmidial (Figura 40) e transformação confirmada por PCR (Figura 41).



**Figura 40:** Gel de quantificação da extração de DNA plasmidial para 10 cepas de *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-L-ASNase\_Pc. (Clone - ) Controle negativo por *E. coli* DH10B pET28a(+). (MM) Marcador GeneRuler 1Kb DNA Ladder® (Thermo Scientific).

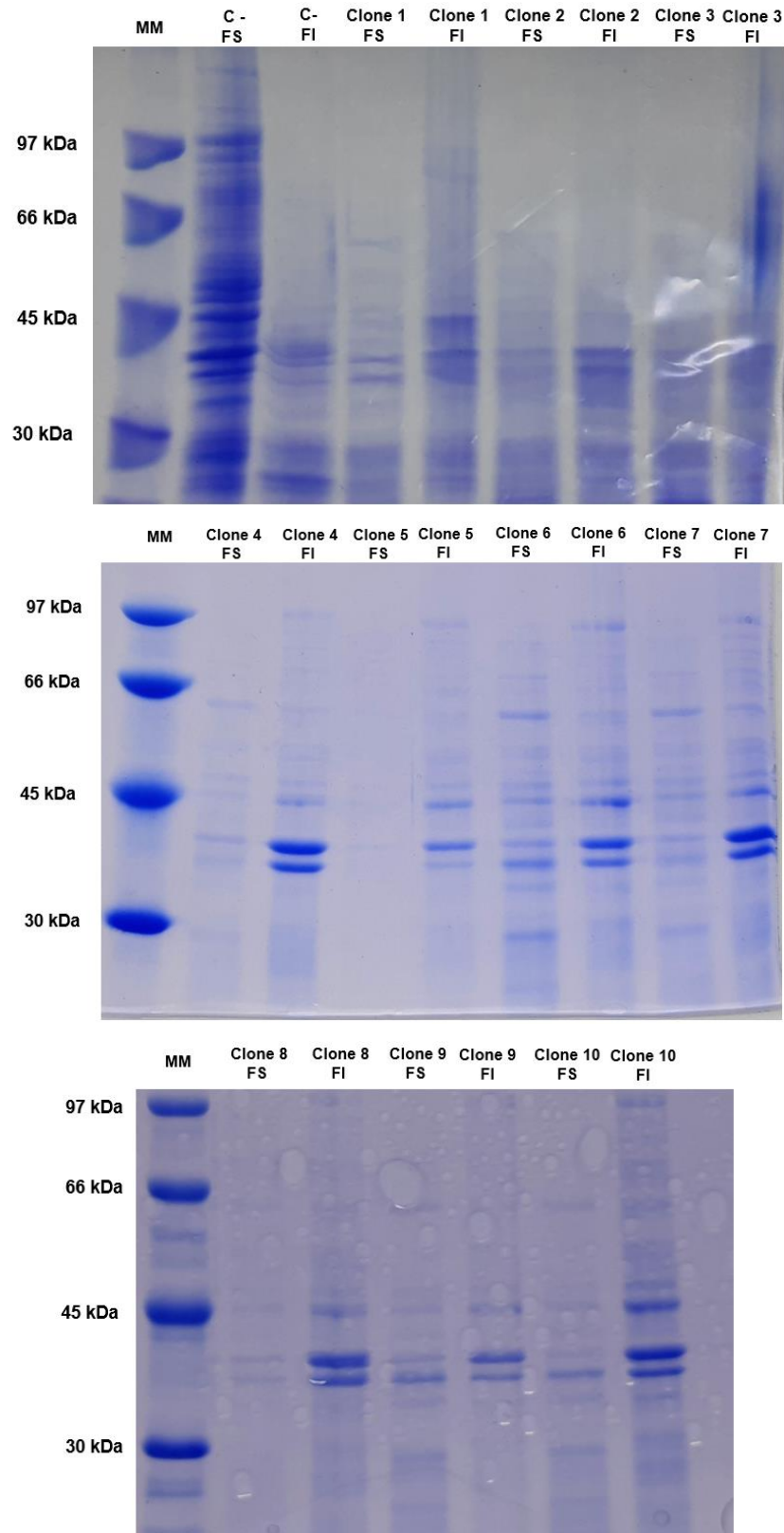


**Figura 41:** Perfil eletroforético em gel de agarose 1,2% para os fragmentos amplificados na seleção por PCR dos 10 clones transformantes de *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-L-ASNase\_Pc. (C+) Controle positivo por plasmídeo vetores pET28a(+)-L-ASNase\_Pc extraído de *E. coli* DH10B. (C-) Controle negativo por *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+). (MM) Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen).

Nessa confirmação de transformação genética por PCR, os dez clones apresentaram tamanho aproximado de 335 pb. Esse tamanho de amplicom apresenta compatibilidade ao fragmento estimado pelo *primer* (forward 5'-GGTGCAATGGTCGTTATGAA-3', *reverse* 5'-TGGCATGGTTGAAGGAAGTA-3'). Com isso, manifesta-se a confirmação para transformação da cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-L-ASNase\_Pc. Essa cepa foi denominada neste presente estudo por *E. coli* ASNase\_Pc. Após a confirmação de transformação genética, seguiu-se em trabalho com todos os 10 clones para a avaliação da expressão da enzima L-asparaginase.

#### 5.7.2 Expressão de L-asparaginase

A primeira verificação de expressão da L-asparaginase foi realizada por SDS-PAGE considerando as frações solúvel e insolúvel obtidas na extração da enzima. No perfil eletroforético os 10 clones de *E. coli* ASNase\_Pc apresentam a expressão da enzima L-asparaginase com tamanho de fragmento esperado aproximado de 45 kDa, e com maior expressão na fração insolúvel (Figura 42), indicando a localização da enzima e perfil de formação de corpos de inclusão na expressão pelas condições de cultivo utilizadas nessa etapa.

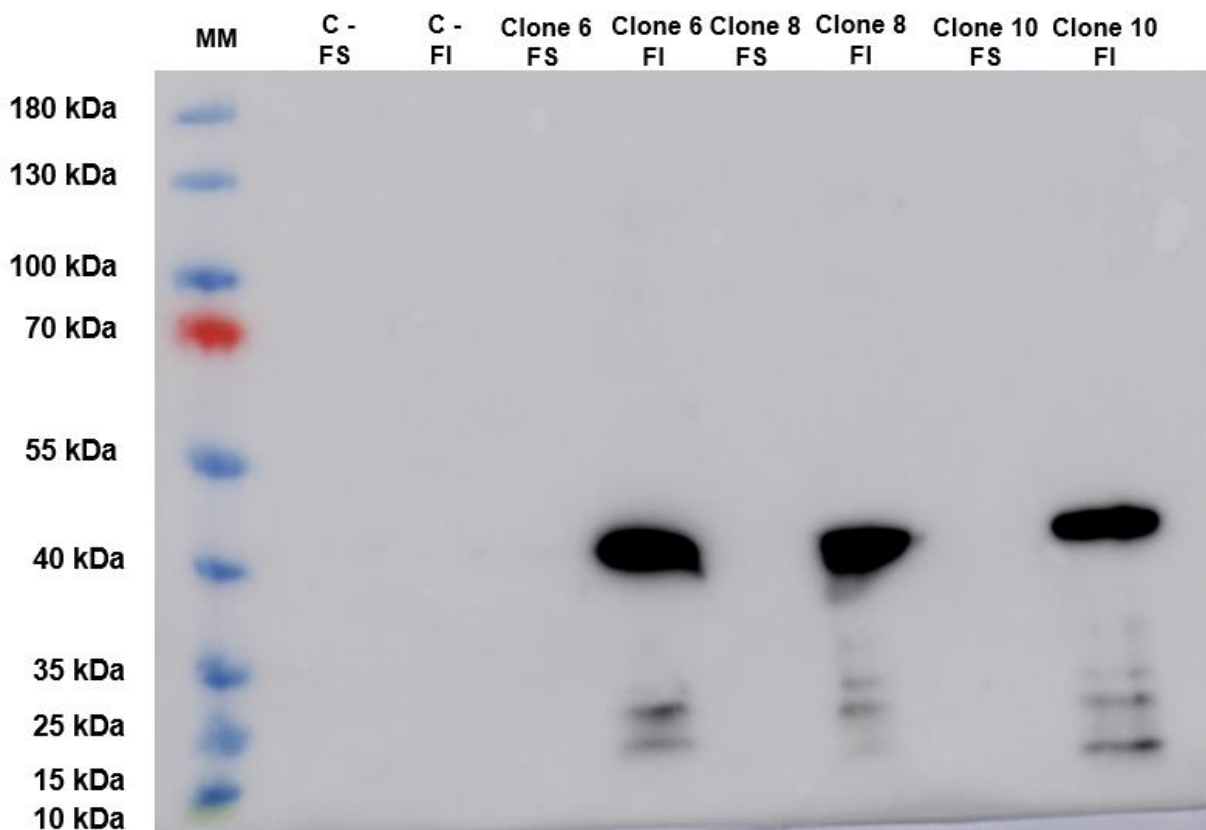


**Figura 42:** Perfil eletroforético da expressão da enzima L-asparaginase por SDS-PAGE de 10 clones de *E. coli* ASNase\_Pc. Frações solúvel (FS) e insolúvel (FI). (MM) Marcador Low-Molecular-Weight. (C-) Controle negativo *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+), vetor vazio.



Desses clones apresentados, foram selecionados os identificados como 6, 8 e 10 com perfil de maior intensidade de expressão da enzima L-asparaginase por *E. coli* ASNase\_*Pc*. A partir dessas melhores expressões da enzima L-asparaginase observadas em SDS-PAGE, os três clones foram avaliados por *Western Blot* com anticorpo anti-HisTag para confirmação e triagem mais refinada. Para essa avaliação foram consideradas as frações solúvel e insolúvel obtidas na extração da enzima. Os três clones de *E. coli* ASNase\_*Pc* apresentam a expressão da enzima L-asparaginase indicado pelo fragmento de tamanho aproximado de 45 kDa apenas na fração insolúvel (Figura 43), confirmando a localização da enzima e perfil de formação de corpos de inclusão na expressão pelas condições de cultivo utilizadas nessa etapa.

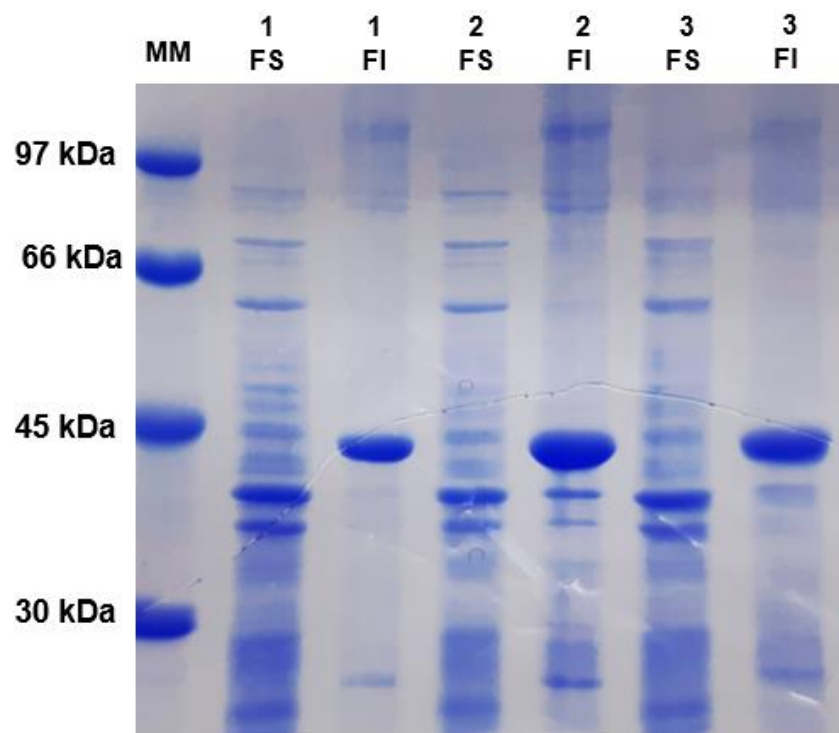
Desse resultado de perfil e confirmação da expressão, o clone 10 foi selecionado por apresentar maior intensidade de expressão da enzima L-asparaginase por *E. coli* ASNase\_*Pc*.



**Figura 43:** Perfil eletroforético da expressão da enzima L-asparaginase por *Western Blot* dos clones 6, 8 e 10 de *E. coli* ASNase\_*Pc*. Frações solúvel (FS) e insolúvel (FI). Marcador PageRuler Prestained Protein Ladder® (MM). Controle negativo por *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+) (C-).

### 5.7.3 Avaliação da extração de proteínas de *E. coli* ASNase\_*Pc*

Para verificar a extração de proteínas, as células de *E. coli* ASNase\_*Pc* foram submetidas a ruptura por processador ultrassônico (Vibra-Cell®) e verificadas três metodologias de sonicação para a extração de proteínas. Os métodos avaliados diferem-se no tempo de ciclos e pulse (Costa-Silva *et al.*, 2018) Upadhyay *et al.* (2014) Lima (2019). O perfil dos extratos proteicos foi avaliado por SDS-PAGE (Figura 44). Em resultado, observa-se que o método 2 de sonicação adaptado de Upadhyay *et al.* (2014) apresenta maior extração de proteínas tanto na fração solúvel como fração insolúvel.



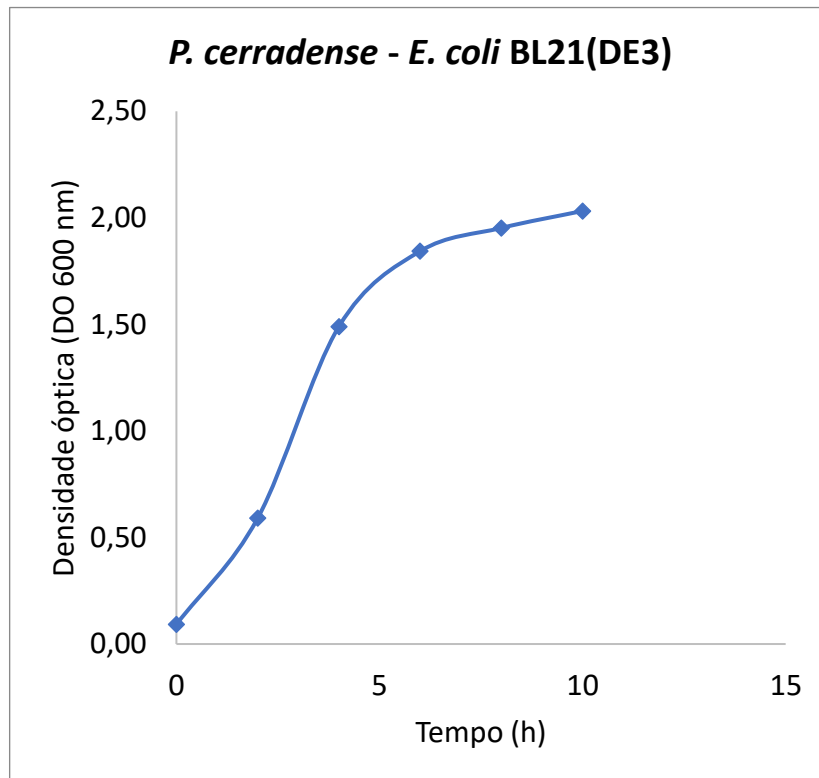
**Figura 44:** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% para avaliação de diferentes métodos (1, 2 e 3) de lise celular para *E. coli* ASNase\_*Pc* por processador ultrassônico. (MM) Marcador Molecular Low Molecular Weight Calibration® (GE Healthcare). (FS) Fração solúvel. (FI) Fração insolúvel.

### 5.7.4 Curva de crescimento bacteriano

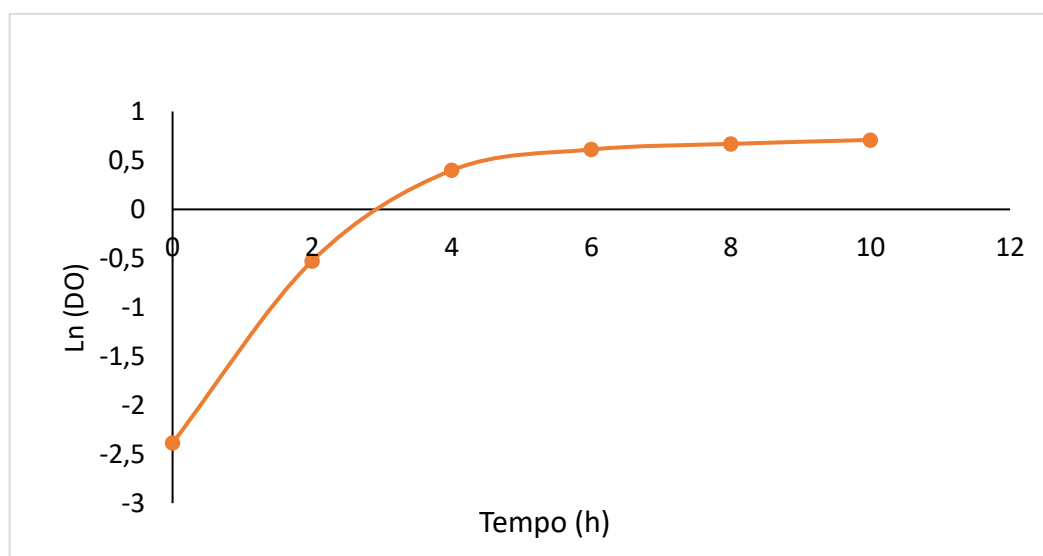
Para conhecimento do perfil cinético de crescimento de *E. coli* ASNase\_*Pc*, foram realizados ensaios em incubador térmico na temperatura de 37 °C. Sendo, a temperatura de 37 °C indicativa geral para crescimento de cepas de *E. coli*.

Os dados obtidos por meio da determinação da curva de crescimento bacteriano à 37 °C foram expressos por média e desvio padrão. O desvio padrão

apresenta-se muito pequeno, não sendo possível visualizar a barra de desvio no gráfico (Figura 45). Os dados obtidos na relação medida de densidade ótica ( $OD_{600nm}$ ) em função do tempo foram ajustados para logaritmo natural (ln) (Figura 46).



**Figura 45:** Curva de crescimento bacteriano de *E. coli* ASNase\_*Pc* a 37°C em meio líquido LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL com agitação de 200 rpm.



**Figura 46:** Gráfico referentes a curva de crescimento de *E. coli* ASNase\_*Pc* a 37°C, em meio líquido LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL com agitação de 200 rpm, ajustado para logaritmo natural (ln).

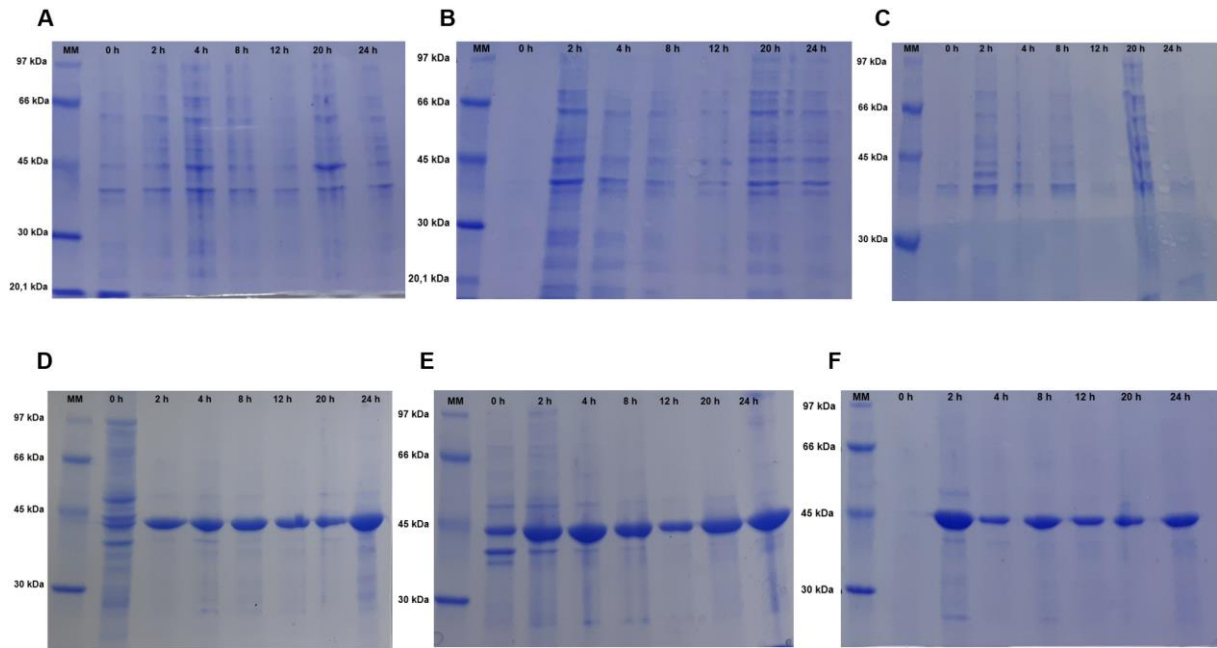
Na temperatura de 37 °C, *E. coli* ASNase\_*Pc* apresenta lag/log a partir do tempo 0h (OD<sub>600nm</sub> 0,1) ao tempo de 4h (OD<sub>600nm</sub> 1,5), e fase estacionária alcançada com aproximadamente 4h (Figura 46). Os resultados de perfil cinético são utilizados para determinar a correlação entre densidade ótica e tempo de cultivo, e podem ser úteis na determinação do momento da indução da expressão.

A partir dos dados de perfil cinético, estimou-se que OD<sub>600nm</sub> da fase mid-log foi de 0,4 de absorbância. Considerando que essa densidade pode corresponder a uma concentração celular baixa, foi então utilizada uma densidade ótica correspondente a 80% da fase exponencial, equivalente a uma DO<sub>600nm</sub> de 0,9, tempo de 2 h 30 min para a indução de expressão de L-asparaginase.

#### 5.7.5 Avaliação dos parâmetros de cultivo para *E. coli* ASNase\_*Pc*

A avaliação de parâmetros de cultivo dispõe-se a indicar as condições ótimas na expressão da enzima. Com isso, a escolha dos parâmetros a serem analisados foi empregada para identificar as condições que mais influenciam na expressão de L-asparaginase por *E. coli* ASNase\_*Pc*. Nesse planejamento, foram analisados dois parâmetros do processo pós indução na expressão da enzima. Os parâmetros de cultivo avaliados foram concentrações de IPTG (0,1, 0,5 e 1 mM) e tempo (0, 2, 4, 8, 12, 20 e 24 h) pós indução. Esses parâmetros contribuem para uma produção com êxito de proteínas heterólogas (Hayat *et al.*, 2018). O perfil dos extratos proteicos na expressão da enzima L-asparaginase por *E. coli* ASNase\_*Pc* estão apresentados nas Figuras 47.

No cultivo a 37 °C, a enzima L-asparaginase de *E. coli* ASNase\_*Pc* não é apresentada na fração solúvel em nenhuma condição de concentração de indutor e tempo pós indução avaliados. A enzima L-asparaginase de *E. coli* ASNase\_*Pc* é apresentada na fração insolúvel indicando a localização da enzima e expressão com formação de corpos de inclusão. A expressão da enzima na fração insolúvel é observada nas três concentrações de IPTG (0,1, 0,5 e 1 mM) e desde o tempo 2 horas após a indução.



**Figura 47:** Gel SDS-PAGE 12% para avaliação da expressão de L-asparaginase de *E. coli* ASNase\_*Pc* a 37 °C sob diferentes condições - concentrações de IPTG (0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM) e tempo de cultivo após indução (0 h; 2 h; 4 h; 8 h; 12 h; 20 h e 24 h). A. Frações solúveis de cultivos induzidos com 0,1 mM de IPTG. B. Frações solúveis de cultivos induzidos com 0,5 mM de IPTG. C. Frações solúveis de cultivos induzidos com 1 mM de IPTG. D. Frações insolúveis de cultivos induzidos com 0,1 mM de IPTG. E. Frações insolúveis de cultivos induzidos com 0,5 mM de IPTG. F. Frações insolúveis de cultivos induzidos com 1 mM de IPTG.

Os corpos de inclusão são agregados de polipeptídeos que ocorrem principalmente em proteínas recombinantes armazenadas intracelularmente e frequentemente presente quando proteínas eucarióticas são expressas em vetores procariotos. A principal causa deste dobramento das proteínas recombinantes, resultante em corpos de inclusão, é a sobrecarga das chaperonas, quando grandes quantidades de um mesmo peptídeo são expressas (Choe *et al.*, 2006; Jhamb *et al.*, 2008).

Para L-asparaginase *Aspergillus terreus* em *E. coli* BL21 (DE3) pLys pET28a, Saaed *et. al* (2018) observaram a expressão heteróloga em corpos de inclusão, em cultivos a 37 °C, 18 h, induzidos com 2 mM de IPTG. No entanto, com a otimização de condições de cultivo, estes mesmos autores obtiveram a expressão de L-asparaginase ativa, com redução na temperatura para 22 °C e concentração de IPTG a 0,1 mM. Zhang *et al.* (2021), ao avaliar a expressão de L-asparaginase fúngica em *E. coli* BL21 (DE3) com pET28a, induzindo com 0,5 mM de IPTG, por 18 h, à 25 °C,

identificou a expressão em corpos de inclusão para a enzima de *Aspergillus niger* e *Cyberlindnera jadinii*. Nesse mesmo trabalho, a expressão de L-asparaginase na fração solúvel foi apresentada para a enzima de *Rhizomucor miehei* com nível de 4,1 U/mL.

As frações insolúveis foram submetidas à avaliação de atividade enzimática por método de Nessler para verificar a possibilidade de enzima ativa em corpo de inclusão. Em nenhuma condição de concentração de indutor e tempo pós indução avaliada foi apresentada atividade enzimática de L-asparaginase, com variação entre 0,014 e 0,060 U/mL. A presença de expressão da enzima foi verificada por perfis eletroforéticos (PCR, Western Blot e SDS-PAGE) durante os estudos do vetor e condições de cultivo para L-asparaginase de *E. coli* ASNase\_*Pc*. No entanto, a presença de expressão dessa enzima apenas nas frações insolúveis e a ausência de atividade enzimática após diferentes condições de cultivo corroboram com indicação da localização da enzima e expressão apenas com formação de corpos de inclusão típico.

Diante destes resultados observados na avaliação dos parâmetros de cultivo para expressão de L-asparaginase por *E. coli* ASNase\_*Pc*, sugerem continuidade com estratégias de solubilização e renaturação da enzima recombinante com finalidade de recuperação da enzima na sua forma ativa. Ainda, incluir a avaliação de redução de temperatura na etapa de indução, que sugere minimizar a formação de corpos de inclusão e melhorar a expressão solúvel de proteínas recombinantes (Shirano e Shibata, 1990; Francis e Page, 2010; Hayat *et al.*, 2018). De maneira complementar, sugere-se seguir a avaliação do uso de outros vetores e linhagens procariotas de expressão heteróloga com finalidade em expressar a enzima ativa.

#### 5.7.6 Avaliação *in silico* do gene de L-asparaginase recombinante (*E. coli* ASNase\_*Pc*)

Na avaliação das condições de cultivo com influência na expressão solúvel e ativa da L-asparaginase de *E. coli* ASNase\_*Pc*, não foi possível correlacionar os parâmetros verificados com os problemas de expressão da enzima.

Com o objetivo de compreender melhor os problemas associados com a expressão heteróloga por *E. coli* ASNase\_*Pc*, a sequência do gene de expressão de L-asparaginase foi submetida a avaliação *in silico* para caracterização e modelagem

molecular. A sequência do gene de expressão de *E. coli* ASNase\_*Pc* foi traduzida (Figura 48). Em comparação com a enzima nativa de *P. cerradense*, essa sequência de expressão apresenta adição da calda de histidina (6HisTag), deleção do peptídeo sinal e códons otimizados para *E. coli*.

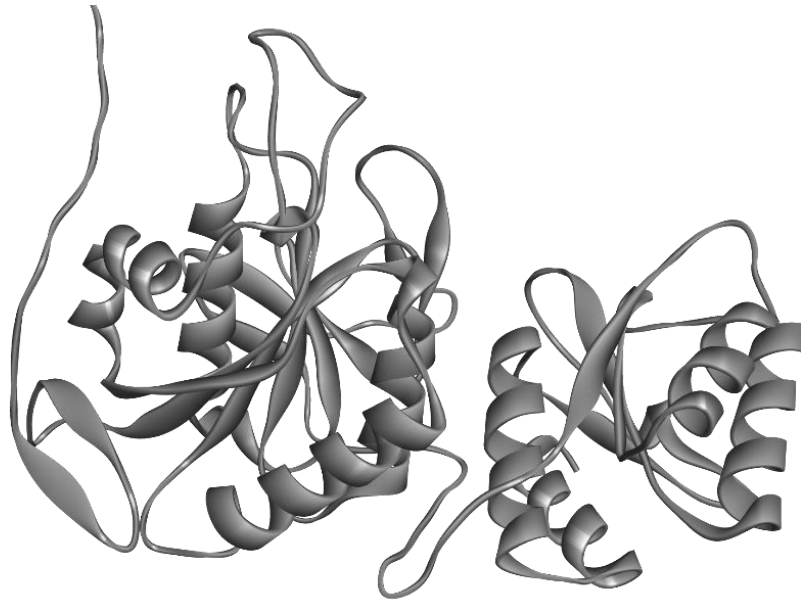
```
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSPVHKPQSSSTKYVYTNSNGLNFTQMNPGLPNITIFGTGGTIAGSGS
SSTATGTYTAGAVGILDLDLIDAVPSMLNVSNIAGVQVANVGSEDTSDILISLSKSKINKLVCDDSTMAG
AVITHGTDLTLEETAFFLDATINCGKPVVIVGAMRPSTATSADGPFNLLEAVTVAASPKAVNRGAMVVM
NDRIASAYYVTKTNANTMDTFKAIEMGFLGEMISNTPFFFYPPVKPTGKVEFDITATKEIPRVDILYA
YEDMHNDTLYSAVENGAQGI VIAGAGAGGVSTSFNHAIEDVINRFKIPVVQSMRTVNGEVPLSDVNST
SAIHIASGYLNPQSRILLGLLLSEARTLTDIRSVFSLGTVS
```

**Figura 48:** Tradução "six frame" do gene para expressão heteróloga da enzima L-asparaginase por *E. coli* ASNase\_*Pc*

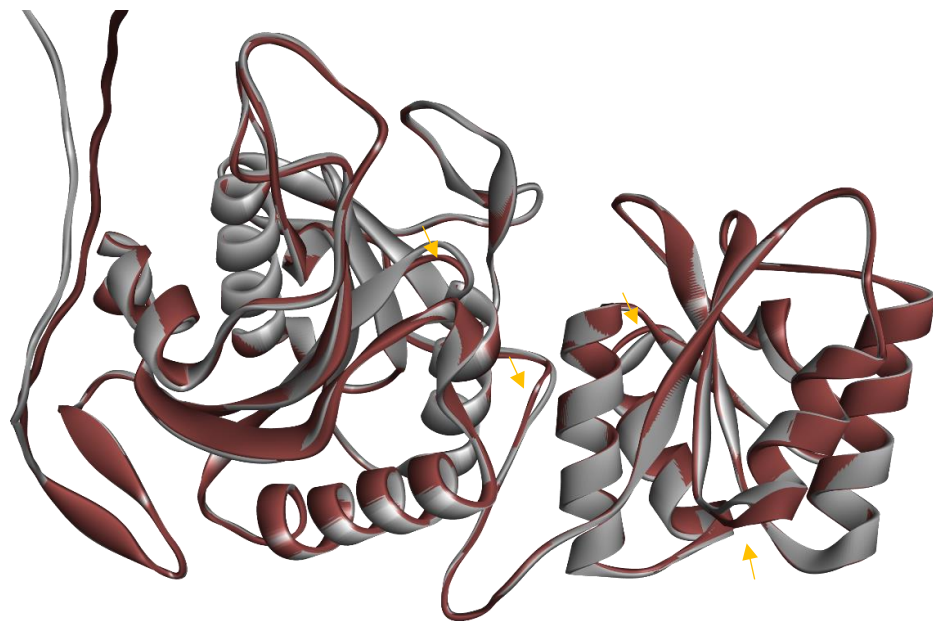
Por ProtParam-ExPasy®, o fragmento proteico apresenta 382 aminoácidos. O pI da proteína foi previsto em 5,80, sendo mais elevado ao predito para a enzima nativa (5,13). A instabilidade index foi calculada para 32,11 e índice alifático de 88,82. Em comparação a enzima nativa (instabilidade index 29,85 e índice alifático 97,25), essas alterações de valores podem representar diminuição na estabilidade da proteína. O índice de hidropaticidade foi predito em 0,099, apresentando indicativo de maior interação com moléculas de água contraposta a enzima nativa (0,256).

A previsão tridimensional da sequência do gene para expressão em *E. coli* ASNase\_*Pc* foi realizada utilizando o AlphaFold2®. Com essa abordagem, buscou-se uma modelagem *ab initio* da proteína, por identificação de possíveis interações, com a criação de modelo próprio sem comparações. O desenho de um modelo para L-asparaginase foi proposto (MODELO 1) (Figura 49).

Em comparação ao proposto para L-asparaginase nativa de *P. cerradense*, o gene de expressão em *E. coli* apresenta bom alinhamento as hélices e diferencia-se em modelo tridimensional em porções loop (Figura 50) e, região inicial da porção N-terminal não foi predita pelo programa. As alterações na estrutura com regiões de baixa complexidade e outras propriedades biofísicas da proteína, como hidrofobicidade, podem influenciar os rendimentos da expressão (Francis e Page, 2010; Long *et al.*, 2016).



**Figura 49:** Modelagem *ab initio* da estrutura tridimensional para a sequência de L-asparaginase de *E. coli* ASNase\_Pc.



**Figura 50:** Sobreposição estrutural de L-asparaginase de *P. cerradense* (vermelho) à *E. coli* ASNase\_Pc (cinza). RMSD 1,08 Å. Regiões de distanciamento sinalizadas em seta amarela.

A adição de calda de histidina em modelos expressão de proteínas pode resultar em alterações de desempenho. Araújo *et al.* (2000) observaram a influência da calda de histidina na estrutura e atividade enzimática de clorocatecol 1,2-dioxigenase de *Pseudomonas putida* em *E. coli* BL21(DE3). Em resultado, observaram a redução da atividade catalítica associada a um efeito local da extensão



N-terminal no próprio site ativo. Singh *et al.* (2020) observaram alteração de conformação estrutural da proteína de superfície SP0845 de *Streptococcus pneumoniae*. Nesse estudo, a alteração da estrutura secundária por influência da calda de histidina aumentou a imunogenicidade da proteína. Em estudo com potenciais variantes de L-asparaginase de *E. coli* menos imunogênicas, Caetano (2020) observou ausência de atividade enzimática para os variantes mutados expressos em *E. coli*. Em análise por simulação de dinâmica molecular evidenciou a ocorrência de interações interatômicas entre os resíduos do sítio catalítico e o resíduo mutado, presente em todas as variantes, prejudicando sua interação com o substrato.

Os resultados de predição apresentados para L-asparaginase de *E. coli* ASNase\_*Pc* sugerem que os problemas da expressão heteróloga da enzima de *P. cerradense* podem estar associados a construção do DNA recombinante com as modificações no gene na porção N-terminal.

## 6 CONCLUSÃO

A sequência gênica de L-asparaginase de *P. cerradense* foi identificada e expressa em sistema heterólogo de *E. coli* BL21(DE3).

Na análise de identificação do gene da expressão, a enzima foi caracterizada em funções biofísico-químicas e caracteres imunogênicos.

O modelo estrutural para L-asparaginase de *P. cerradense* foi proposto e validado. A análise *in silico* combinada a ferramentas de bioinformática revelaram características de propriedades enzimáticas e predição de respostas imunológicas ao uso de L-asparaginase de *P. cerradense*.

A enzima apresenta resposta de imunogenicidade semelhante as enzimas de uso clínico – de *E. coli* e *D. chrysanthemi* e revelou-se como proteína não tóxica.

Na expressão heteróloga, após a confirmação da inserção correta do plasmídeo e análise de parâmetros de cultivo não foi possível quantificar a atividade enzimática de interesse o que sugere a formação de um corpo de inclusão típico.

Os *insights* apresentados podem impulsionar estratégias de melhoria na produção da enzima e levar a uma potencial produção com características funcionais desejáveis para uma melhoria nas aplicações terapêuticas de LLA.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS. **Cancer facts & figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

\_\_\_\_\_. **Leukemia in children**. Atlanta: American Cancer Society, 2021.

AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, n. 19, p. 5655-64, May 15 2001. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960.

AGRAWAL, S.; JANA, U. K.; KANGO, N. Heterologous expression and molecular modelling of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* ETMC-2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 28-37, 2021/12/01/ 2021. ISSN 0141-8130. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021021140> >.

ALBERTS, B.; JOHNSON; LEWIS. **Biologia Molecular da Célula**. Porta Alegre: Artmed, 2017. 1464 ISBN 978-85-8271-423-2.

ALBERTSEN, B. K. et al. Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase. **Med Pediatr Oncol**, v. 38, n. 5, p. 310-6, May 2002. ISSN 0098-1532 (Print)

0098-1532.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016.

ALMEIDA, R. P. C. **Avaliação da produção de L-asparaginase por fungos isolados do bioma Cerrado** 2015. 104 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

ANDRADE, K. C. R. **Caracterização Morfo-Molecular de uma nova espécie do gênero *Penicillium* para a produção de L-asparaginase** 2019. 106 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

ANDRADE, K. C. R. et al. Sequencing and characterization of an L-asparaginase gene from a new species of *Penicillium* section *Citrina* isolated from Cerrado. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 17861, Sep 9 2021. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34504186> >.

ANVISA. Nota – Autorização para importação da L-Asparaginase. 2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/nota--autorizacao-para-importacao-da-l-asparaginase> >. Acesso em: 17 de Abril.

ARAÚJO, A. P. U. et al. Influence of the Histidine Tail on the Structure and Activity of Recombinant Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 2, p. 480-484, 2000/06/07/ 2000. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X0092802X> >.

ARAÚJO, T. S. et al. Biophysical characterization of two commercially available preparations of the drug containing *Escherichia coli* L-Asparaginase 2. **Biophys Chem**, v. 271, p. 106554, Apr 2021. ISSN 0301-4622.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 19 2016. ISSN 0006-4971.

ARCHANJO, A. B. O.; BORÇOI, A. R. O.; MENDES, S. O. O. **Avanços Metodológicos em Biologiamolecular e Biotecnologia**. Ponta Grossa - Pr: Athena, 2021. 100 ISBN SBN 978-65-5983-175-3.

ARDALAN, N. et al. Novel mutant of *Escherichia coli* asparaginase II to reduction of the glutaminase activity in treatment of acute lymphocytic leukemia by molecular dynamics simulations and QM-MM studies. **Medical Hypotheses**, v. 112, p. 7-17, 2018/03/01/ 2018. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030698771731126X> >.

ARIF, H.; HUSSAIN, Z. Important sources and medicinal applications of L-asparaginase. **Int J Pharm Sci Rev**, v. 3, p. 35-45, 01/01 2014.

ASSELIN, B.; GELBER, R.; SALLAN, S. Relative toxicity of *E. coli* Lasparaginase (ASP) and pegasparcase (PEG) in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Blood**, v. 86, p. 695, 1995.

ASSELIN, B.; RIZZARI, C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. **Leuk Lymphoma**, v. 56, n. 8, p. 2273-80, 2015. ISSN 1042-8194 (Print)  
1026-8022.

ASSELIN, B. L.; FISHER, V. Impact of clinical and subclinical hypersensitivity to asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. **Clin J Oncol Nurs**, v. 18, n. 6, p. E107-12, Dec 2014. ISSN 1092-1095.

ASSELIN, B. L. et al. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **J Clin Oncol**, v. 11, n. 9, p. 1780-6, Sep 1993. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183x.

AUGUST, K. J. et al. Comparison of Hypersensitivity Reactions to PEG-Asparaginase in Children After Intravenous and Intramuscular Administration. v. 35, n. 7, p. e283-e286, 2013. ISSN 1077-4114. Disponível em: < [https://journals.lww.com/jpho-online/Fulltext/2013/10000/Comparison\\_of\\_Hypersensitivity\\_Reactions\\_to.26.aspx](https://journals.lww.com/jpho-online/Fulltext/2013/10000/Comparison_of_Hypersensitivity_Reactions_to.26.aspx) >.

AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. **Anticancer Research**, v. 32, n. 7, p. 2423-2438, Jul 2012. ISSN 1791-7530 (Electronic)

0250-7005 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753699> >.

BAESHEN, M. N. et al. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. **J Microbiol Biotechnol**, v. 25, n. 7, p. 953-62, Jul 2015. ISSN 1017-7825.

BALLESTER, A. R. et al. Genome, Transcriptome, and Functional Analyses of *Penicillium expansum* Provide New Insights Into Secondary Metabolism and Pathogenicity. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 28, n. 3, p. 232-48, Mar 2015. ISSN 0894-0282 (Print)

0894-0282.

BANANI, H. et al. Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. **BMC Genomics**, v. 17, p. 19, Jan 5 2016. ISSN 1471-2164.

BARROS, T. et al. Development of Processes for Recombinant L-Asparaginase II Production by *Escherichia coli* BI21 (De3): From Shaker to Bioreactors. v. 13, n. 1, p. 14, 2021. ISSN 1999-4923. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/1/14> >.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 212-220, 2012. ISSN 19322135.

BATOOL, T. et al. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 178, n. 5, p. 900-23, Mar 2016. ISSN 0273-2289.

BELÉN, L. H. et al. Immunogenicity assessment of fungal L-asparaginases: an in silico approach. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 2, 2020. ISSN 2523-3963  
2523-3971.

BELEN, L. H. et al. A structural in silico analysis of the immunogenicity of L-asparaginase from *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. **Biologicals**, v. 59, p. 47-55, May 2019. ISSN 1095-8320 (Electronic)

1045-1056 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30871932>>.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 1, p. 138-45, Jan 2007. ISSN 0091-6765 (Print)  
0091-6765.

BIOVIA, D. S. **BIOVIA Discovery Studio** Discovery Studio Modeling Environment: San Diego 2021.

BONTHRON, D. T.; JASKÓLSKI, M. Why a "benign" mutation kills enzyme activity. Structure-based analysis of the A176V mutant of *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase I. **Acta Biochim Pol**, v. 44, n. 3, p. 491-504, 1997. ISSN 0001-527X (Print)  
0001-527x.

BROOME, J. D. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. **Nature**, v. 191, n. 4793, p. 1114-1115, 1961/09/01 1961. ISSN 1476-4687. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1038/1911114a0>>.

\_\_\_\_\_. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **J Exp Med**, v. 118, n. 1, p. 99-120, Jul 1963a. ISSN 0022-1007 (Print)  
0022-1007.

\_\_\_\_\_. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. **J Exp Med**, v. 118, n. 1, p. 121-48, Jul 1963b. ISSN 0022-1007 (Print)  
0022-1007.

\_\_\_\_\_. 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. **J Natl Cancer Inst**, v. 35, n. 6, p. 967-74, Dec 1965. ISSN 0027-8874 (Print) 0027-8874.

BRUMANO, L. P. et al. Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 6, p. 212, 2018. ISSN 2296-4185 (Print)

2296-4185 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30687702>>.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Porta Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012.

BURKE, M. J.; ZALEWSKA-SZEWCZYK, B. Hypersensitivity reactions to asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia: immunology and clinical consequences. v. 18, n. 10, p. 1285-1299, 2022. Disponível em: <  
<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fon-2021-1288>>.

CABRITA, L. D.; DAI, W.; BOTTOMLEY, S. P. A family of *E. coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. **BMC Biotechnol**, v. 6, p. 12, Mar 1 2006. ISSN 1472-6750.

CAETANO, L. F. **Produção e caracterização preliminar de variantes de L-asparaginase II de *Escherichia coli* de menor potencial imunogênico: combinação de estudos *in silico* e *in vitro*** 2020. 74 (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CANÇADO, L. J. **Utilização de Sementes de Tabaco Transgênico como Biorreatores para Produção de um Fragmento scFv de um Anticorpo Monoclonal**. . 2002. 92 (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas - SP.

CANTOR, J. R. et al. Therapeutic enzyme deimmunization by combinatorial T-cell epitope removal using neutral drift. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 4, p. 1272-7, Jan 25 2011. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

CARDOSO, S. L. et al. Optimization of aqueous two-phase micellar system for partial purification of L-asparaginase from *Penicillium* sp. grown in wheat bran as agro-industrial residue. **Braz J Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 979-988, Sep 2020. ISSN 1678-4405 (Electronic)

1517-8382 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32424715> >.

CASTRO, D. et al. L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 105, n. 11, p. 4515-4534, Jun 2021. ISSN 1432-0614 (Electronic)

0175-7598 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34059941> >.

CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. Localization of the two-L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. **J Biol Chem**, v. 242, n. 16, p. 3753-5, Aug 25 1967. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

CHAND, S. et al. A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 67, n. 4, p. 619-647, Jul 2020. ISSN 0885-4513.

CHOE, W.-S.; NIAN, R.; LAI, W.-B. Recent advances in biomolecular process intensification. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 3, p. 886-906, 2006/02/01/2006. ISSN 0009-2509. Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250905006470> >.

CLEMENTI, A. Presence of L-asparaginase in animals and its significance. **Arch Int Physiol**, v. 19, p. 369–398, 1922.

CLIFFORD, J. N. et al. BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models. **Protein Sci**, v. 31, n. 12, p. e4497, Dec 2022. ISSN 0961-8368 (Print)

0961-8368.

CONWAY, P. L. **Microbial ecology of the human large intestine, In Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1995.

CORTIJO-CASCAJARES, S.; JIMÉNEZ-CEREZO, M. J.; HERREROS DE TEJADA, A. Review of hypersensitivity reactions to antineoplastic agents. **Farm Hosp**, v. 36, n. 3, p. 148-58, May-Jun 2012. ISSN 1130-6343.

COSTA-SILVA, T. A. et al. Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. **Blood Rev**, v. 43, p. 100651, Sep 2020. ISSN 1532-1681 (Electronic)

0268-960X (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32014342> >.

COSTA-SILVA, T. A. et al. Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 48, n. 8, p. 707-717, 2018. ISSN 1532-2297 (Electronic)

1082-6068 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29995576> >.

DA SILVA, L. S. et al. Structural and functional diversity of asparaginases: Overview and recommendations for a revised nomenclature. v. 69, n. 2, p. 503-513, 2022. ISSN 0885-4513. Disponível em: <  
<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bab.2127> >.

DARVISHI, F.; FARAJI, N.; SHAMSI, F. Production and structural modeling of a novel asparaginase in *Yarrowia lipolytica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 955-961, 2019/03/15/ 2019. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018360367> >.

DAVID, A. et al. The AlphaFold Database of Protein Structures: A Biologist's Guide. **J Mol Biol**, v. 434, n. 2, p. 167336, Jan 30 2022. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 3, p. 297-306, May-Jun 2009. ISSN 1873-1899 (Electronic)

0734-9750 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500547> >.

DEPUTADOS, C. D. Esclarecimentos L-asparaginase. Brasília, DF., 2017. Disponível em: < <https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cssf/arquivos/audiencia-publica-do-dia-10-e-11-05.17/apresentacao-ms> >. Acesso em: 17 Abril.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. v. 98, n. 2, p. 493-501, 1977. ISSN 1465-2080. Disponível em: <  
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-98-2-493> >.

DUMINA, M. V. et al. Comparison of Enzymatic Activity of Novel Recombinant L-asparaginases of Extremophiles. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 594-602, 2021/09/01 2021. ISSN 1608-3024. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1134/S0003683821050057> >.



DUNLOP, P. C.; ROON, R. J. L-asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an Extracellular Enzyme. **J Bacteriology**, p. 1017-1024, 1975.

DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597-2606, 2008. ISSN 1098-5530

0021-9193. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18245285>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2293198/> >.

EGELKROUT, E.; RAJAN, V.; HOWARD, J. A. Overproduction of recombinant proteins in plants. **Plant Sci**, v. 184, p. 83-101, Mar 2012. ISSN 0168-9452.

EHRMAN, M.; CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. L-asparaginase II of *Escherichia coli*. Studies on the enzymatic mechanism of action. **J Biol Chem**, v. 246, n. 1, p. 88-94, Jan 10 1971. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

EISELE, N. et al. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3316-3321, 2011/02/01/ 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410017542> >.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.277, 1997. p.396-404. ISBN 0076-6879.

EL-NAGGAR, N.; EL-EWASY, S.; EL-SHWEIHY, N. Microbial L-asparaginase as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, 04/01 2014.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. New York: Elsevier, 1986.

FEDERAL, M. P. MPF-SP recomenda que Ministério da Saúde adote ações imediatas para normalizar abastecimento de medicamento para leucemia. São Paulo, 2013. Disponível em: < [https://www.mpf.mp.br/sp/migracao/sala-de-imprensa-unidadeprsp/noticias\\_prsp/11-04-13-2013-mpf-sp-recomenda-que-ministerio-da-saude-adote-aco-es-imediatas-para-normalizar-abastecimento-de-medicamento-para-leucemia-1](https://www.mpf.mp.br/sp/migracao/sala-de-imprensa-unidadeprsp/noticias_prsp/11-04-13-2013-mpf-sp-recomenda-que-ministerio-da-saude-adote-aco-es-imediatas-para-normalizar-abastecimento-de-medicamento-para-leucemia-1) >. Acesso em: 17 de Abril.

FELDMANN, M.; HOWARD, J. G.; DESAYMARD, C. Role of Antigen Structure in the Discrimination between Tolerance and Immunity by B Cells. v. 23, n. 1, p. 78-97, 1975.

ISSN 0105-2896. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-065X.1975.tb00150.x> >.

FELICIANO, P. R. **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em *Leishmania major***. 2009. 112 (Mestre). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FERNANDEZ, C. A. et al. HLA-DRB1\*07:01 is associated with a higher risk of asparaginase allergies. **Blood**, v. 124, n. 8, p. 1266-1276, 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-563742> >. Acesso em: 8/10/2022.

FERRER-MIRALLES, N. et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microb Cell Fact**, v. 8, p. 17, Mar 24 2009. ISSN 1475-2859 (Electronic)

1475-2859 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19317892> >.

FONSECA, M. H. G. et al. Circumventing the side effects of L-asparaginase. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111616, 2021/07/01/ 2021. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221004017> >.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. v. 61, n. 1, p. 5.24.1-5.24.29, 2010. ISSN 1934-3655. Disponível em: < <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471140864.ps0524.s61> >.

FREITAS, M. et al. Filamentous Fungi Producing L-Asparaginase with Low Glutaminase Activity Isolated from Brazilian Savanna Soil. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 8, Aug 17 2021. ISSN 1999-4923 (Print)

1999-4923.

FREITAS, M. et al. L-Asparaginase from *Penicillium sizovae* Produced by a Recombinant *Komagataella phaffii* Strain. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 15, n. 6, Jun 14 2022. ISSN 1424-8247 (Print)

1424-8247.

FREITAS, M. M. et al. Interferences that impact measuring optimal L-asparaginase activity and consequent errors interpreting these data. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 103, n. 13, p. 5161-5166, Jul 2019. ISSN 0175-7598.

GÉRINIÈRE, L. et al. Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. **Ann Oncol**, v. 5, n. 5, p. 437-40, May 1994. ISSN 0923-7534 (Print)

0923-7534.

GOMES, A. R. et al. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 7, p. 346-356, 2016. ISSN 23078316.

GONZAGA, S. O.; OSHIRO, M. L. Levantamento de suspeita de reações adversas em crianças no setor de oncologia. In: OLIVEIRA, A. C. (Ed.). **Princípios em Farmácia**. Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. cap. 6,

GOSSAI, N. et al. Symptomatic Hyperammonemia With *Erwinia chrysanthemi*-derived Asparaginase in Pediatric Leukemia Patients. v. 40, n. 4, p. 312-315, 2018. ISSN 1077-4114. Disponível em: < [https://journals.lww.com/jpho-online/Fulltext/2018/05000/Symptomatic\\_Hyperammonemia\\_With\\_Erwinia.11.aspx](https://journals.lww.com/jpho-online/Fulltext/2018/05000/Symptomatic_Hyperammonemia_With_Erwinia.11.aspx) >.

GROOT, A. S.; MARTIN, W. Reducing risk, improving outcomes: Bioengineering less immunogenic protein therapeutics. **Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. 189-201, 2009/05/01/ 2009. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661609000084> >.

GROVES, M. J. **Pharmaceutical Biotechnology**. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

GULATI, R. S., R. K. AND GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organism. **Letters in Appl Microbiol** v. 24, p. 23-26, 1997.

GUPTA, S. et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73957, 2013. ISSN 1932-6203.

GUPTA, S. K. et al. Chapter 11 - Effectual Bioprocess Development for Protein Production. In: SHUKLA, P. (Ed.). **Applied Microbiology and Bioengineering**: Academic Press, 2019. p.203-227. ISBN 978-0-12-815407-6.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1089-1098, 2016/11/01 2016. ISSN 0738-8551. Disponível em: < <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264> >.

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus*

MTCC 1782. **J Microbiol Biotechnol**, v. 22, n. 7, p. 923-9, Jul 2012. ISSN 1738-8872 (Electronic)

1017-7825 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580311> >.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 4, n. 2, p. 155-161, 1990. ISSN 1741-0126. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155> >. Acesso em: 11/5/2021.

HAYAT, S. M. G. et al. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E.coli*): What We Need to Know. **Curr Pharm Des**, v. 24, n. 6, p. 718-725, 2018. ISSN 1381-6128.

HEINEMANN, B.; HOWARD, A. J. Production of tumor-inhibitory L-asparaginase by submerged growth of *Serratia marcescens*. **Appl Microbiol**, v. 18, n. 4, p. 550-4, Oct 1969. ISSN 0003-6919 (Print)

0003-6919.

HENDRIKSEN, H. V. et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 10, p. 4168-76, May 27 2009. ISSN 1520-5118 (Electronic)

0021-8561 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388639> >.

HERTZBERG, L. et al. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. **Blood**, v. 115, n. 5, p. 1006-17, Feb 4 2010. ISSN 0006-4971.

HIJIYA, N.; VAN DER SLUIS, I. M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 57, n. 4, p. 748-57, 2016. ISSN 1029-2403 (Electronic)

1026-8022 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457414> >.

HUANG, L. et al. Biochemical Characterization of a Novel L-Asparaginase with Low Glutaminase Activity from *Rhizomucor miehei* and Its Application in Food Safety and Leukemia Treatment. v. 80, n. 5, p. 1561-1569, 2014. Disponível em: <  
<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.03523-13> >.

HUERTA-SAQUERO, A. et al. *Rhizobium etli* asparaginase II: an alternative for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment. **Bioengineered**, v. 4, n. 1, p. 30-6, Jan-Feb 2013. ISSN 2165-5979 (Print)

2165-5979.

HUNT, I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. **Protein Expr Purif**, v. 40, n. 1, p. 1-22, Mar 2005. ISSN 1046-5928 (Print)

1046-5928.

IMADA, A., IGARASI, S., NAKAHAMA, K. & ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **J. Gen. Microbiol**, v. 76, n. 1, p. 85-89, 1973.

INCA. **Leucemias Agudas na Infância e Adolescência**. Leucemias Agudas na Infância e Adolescência, 2001.

\_\_\_\_\_. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

\_\_\_\_\_. **Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional de Câncer, 2022a. 162 ISBN 978-65-88517-10-9. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf> >.

\_\_\_\_\_. Leucemia. 2022b. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia> >. Acesso em: 25 Mar.

JEBUR, I. M. et al. Cloning and expression of L-Asparaginase gene from *Aspergillus terreus* in *E. coli*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 11, n. 3, p. 961-965, 2019.

JHAMB, K.; JAWED, A.; SAHOO, D. K. Immobilized chaperones: A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body proteins. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 587-597, 2008/06/01/ 2008. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308000640> >.

JIANHUA, C. et al. Probing the antigenicity of *E. coli* L-asparaginase by mutational analysis. **Mol Biotechnol**, v. 33, n. 1, p. 57-65, May 2006. ISSN 1073-6085 (Print)

1073-6085.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021/08/01 2021. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2> >.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Web Server issue, p. W429-32, Jul 2007. ISSN 0305-1048 (Print)

0305-1048.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic Escherichia coli. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, Feb 2004. ISSN 1740-1526 (Print)

1740-1526.

KEATING, M. J. et al. L-asparaginase and PEG asparaginase--past, present, and future. **Leuk Lymphoma**, v. 10 Suppl, p. 153-7, 1993. ISSN 1042-8194 (Print)

1026-8022.

KEBEISH, R. et al. Molecular cloning, biochemical characterization, and antitumor properties of a novel L-asparaginase from *Synechococcus elongatus* PCC6803. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 10, p. 1173-1181, 2016/10/01 2016. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <https://doi.org/10.1134/S000629791610014X> >.

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. **J Exp Med**, v. 98, n. 6, p. 565-82, Dec 1953. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007.

KISHORE, V.; NISHITA, K. P.; MANONMANI, H. K. Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large scale production in E. coli BL21. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p. 975-981, 2015/12/01 2015. ISSN 2190-5738. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0300-y> >.

KNOTT, S. R. V. et al. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. **Nature**, v. 554, n. 7692, p. 378-381, Feb 15 2018. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29414946> >.

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* l-asparaginase. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 4, p. 309-323,

2005/10/10/ 2005. ISSN 0168-1656. Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816560500180X>>.

\_\_\_\_\_. L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 657-669, 2007/01/20/2007. ISSN 0168-1656. Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165606006912>>.

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. Engineering thermal stability of L-asparaginase by in vitro directed evolution. **Febs j**, v. 276, n. 6, p. 1750-61, Mar 2009. ISSN 1742-464x.

KOTZIA, GEORGIA A.; LAPPA, K.; LABROU, NIKOLAOS E. Tailoring structure–function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. **Biochemical Journal**, v. 404, n. 2, p. 337-343, 2007. ISSN 0264-6021. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1042/BJ20061708>>. Acesso em: 11/9/2022.

KRALL, A. S. et al. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. **Nat Commun**, v. 7, p. 11457, Apr 29 2016. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27126896>>.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J Mol Biol**, v. 157, n. 1, p. 105-32, May 5 1982. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970/08/01 1970. ISSN 1476-4687. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1038/227680a0>>.

LIAO, J.-H. et al. Binding and cleavage of *E. coli* HUbeta by the *E. coli* Lon protease. **Biophysical journal**, v. 98, n. 1, p. 129-137, 2010. ISSN 1542-0086 0006-3495. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20085725>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2800966/>>.

LIMA, G. M. et al. Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, 2020. ISSN 1369703X.

LISSABET, J. F. B. A large-scale immunoinformatics analysis of the human papillomaviruses reveals a common E5 oncoprotein-pattern to evade the immune response. **Gene Reports**, v. 10, p. 1-6, 2018/03/01/ 2018. ISSN 2452-0144.

Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S245201441730078X> >.

LIU, M. et al. Soluble expression of single-chain variable fragment (scFv) in *Escherichia coli* using superfolder green fluorescent protein as fusion partner. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 15, p. 6071-6079, 2019/08/01 2019. ISSN 1432-0614. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09925-6> >.

LIU, W.; CHEN, Y.-H. High epitope density in a single protein molecule significantly enhances antigenicity as well as immunogenicity: a novel strategy for modern vaccine development and a preliminary investigation about B cell discrimination of monomeric proteins. v. 35, n. 2, p. 505-514, 2005. ISSN 0014-2980. Disponível em: <  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eji.200425749> >.

LIU, W. et al. High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. **Vaccine**, v. 23, n. 3, p. 366-371, 2004/12/02/ 2004. ISSN 0264-410X. Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X04004396> >.

LLS. Leukemia. 2020. Disponível em: <  
<https://www.lls.org/leukemia> >. Acesso em: 02 Mar 2021.

LN, R. et al. In silico engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 33, n. 8, p. 617-21, Dec 2011. ISSN 1077-4114.

LONG, S. et al. Amino acid residues adjacent to the catalytic cavity of tetramer L-asparaginase II contribute significantly to its catalytic efficiency and thermostability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 82, p. 15-22, 2016/01/01/ 2016. ISSN 0141-0229. Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022915300442> >.

LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Crit Rev Biotechnol**, v. 37, n. 1, p. 82-99, Feb 2017. ISSN 1549-7801 (Electronic) 0738-8551 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26694875> >.

LOUREIRO, C. B. **Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A)**. 2010. 67 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.



LUBKOWSKI, J. et al. Mechanism of Catalysis by L-Asparaginase. **Biochemistry**, v. 59, n. 20, p. 1927-1945, 2020/05/26 2020. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00116> >.

LUBKOWSKI, J. et al. Mechanism of Catalysis by L-Asparaginase. **Biochemistry**, v. 59, n. 20, p. 1927-1945, May 26 2020. ISSN 0006-2960.

LUBKOWSKI, J.; WLODAWER, A. Geometric considerations support the double-displacement catalytic mechanism of L-asparaginase. **Protein Sci**, v. 28, n. 10, p. 1850-1864, Oct 2019. ISSN 0961-8368 (Print)

0961-8368.

LUBKOWSKI, J.; WLODAWER, A. Structural and biochemical properties of L-asparaginase. v. 288, n. 14, p. 4183-4209, 2021. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.16042> >.

MAGGI, M. et al. A protease-resistant *Escherichia coli* asparaginase with outstanding stability and enhanced anti-leukaemic activity in vitro. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 14479, Nov 3 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29101342> >.

MAHBOOBI, M. et al. Applying Bioinformatic Tools for Modeling and Modifying Type II *E. coli* L-Asparaginase to Present a Better Therapeutic Agent/Drug for Acute Lymphoblastic Leukemia. v. 10, n. 3, p. e5785, 2017. ISSN 2538-4422

2538-497X. Disponível em: < <https://sites.kowsarpub.com/ijcm/articles/5785.html> >.

MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 395, n. 10230, p. 1146-1162, 2020. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1) >. Acesso em: 2021/11/05.

MALEKIAN, R. et al. Improvement of soluble expression of GM-CSF in the cytoplasm of *Escherichia coli* using chemical and molecular chaperones. **Protein Expression and Purification**, v. 160, p. 66-72, 2019/08/01/ 2019. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592819300476> >.

MAMAT, U. et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 57, 2015/04/16 2015. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0241-5> >.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum*

(ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 124-130, 2017. ISSN 18788181.

MEHTA, R. K. et al. 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, Feb 7 2014. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A. S. Precipitação de proteínas. . In: FRANCO, O. L. G., C. P. C. G; DIAS, S. C. (ORG.) (Ed.). **Manual para estudo de proteínas**. 1ª Ed. Santa Catarina: BOOKESS, 2014. p.63-72.

MISHRA, A. Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 135, n. 1, p. 33-42, Oct 2006. ISSN 0273-2289 (Print)

0273-2289.

MOHAN, N. S. K.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, n. 4, p. 577-87, Apr 2013. ISSN 0959-3993.

MÜLLER, H.-J. et al. Pharmacokinetics of native *Escherichia coli* asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment. v. 114, n. 4, p. 794-799, 2001. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2141.2001.03009.x> >.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 28, n. 2, p. 97-113, Aug 1998. ISSN 1040-8428 (Print)

1040-8428.

MULLIGHAN, C. G. New strategies in acute lymphoblastic leukemia: translating advances in genomics into clinical practice. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 3, p. 396-400, Feb 1 2011. ISSN 1078-0432.

NGUYEN, H. A.; SU, Y.; LAVIE, A. Structural Insight into Substrate Selectivity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 55, n. 8, p. 1246-53, Mar 1 2016. ISSN 1520-4995 (Electronic)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26855287> >.

NGUYEN, L.-T. et al. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.

32, n. 1, p. 268-274, 2014. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300> >. Acesso em: 9/11/2023.

NIELSEN, J. C. et al. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 17044, 2017/04/03 2017. ISSN 2058-5276. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.44> >.

NOMME, J. et al. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, v. 51, n. 34, p. 6816-26, Aug 28 2012. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960.

NÓRA, K. et al. HLA-DRB1\*07:01–HLA-DQA1\*02:01–HLA-DQB1\*02:02 haplotype is associated with a high risk of asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 102, n. 9, p. 1578-1586, 09/01 2017. Disponível em: < <https://haematologica.org/article/view/8193> >. Acesso em: 2022/08/10.

OFFMAN, M. N. et al. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood**, v. 117, n. 5, p. 1614-21, Feb 3 2011. ISSN 0006-4971.

OLIVEIRA, E. M.; CARVAJAL, E.; BON, E. P. L-asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Activity profile during growth using an ure2 mutant P40-3C and a P40-3C + URE2p strain. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 77-79, p. 311-6, Spring 1999. ISSN 0273-2289 (Print) 0273-2289.

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 23, n. 4, p. 655-74, Aug 2009. ISSN 1558-1977 (Electronic) 0889-8588 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577163> >.

ONDA, M. Reducing the immunogenicity of protein therapeutics. **Curr Drug Targets**, v. 10, n. 2, p. 131-9, Feb 2009. ISSN 1389-4501.

PARASKEVOPOULOU, V.; FALCONE, F. H. Polyionic Tags as Enhancers of Protein Solubility in Recombinant Protein Expression. v. 6, n. 2, p. 47, 2018. ISSN 2076-2607. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2076-2607/6/2/47> >.

PATEL, N. et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug l-asparaginase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7,

p. 1964-1973, 07/01/ 2009. ISSN 0021-9738. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1172/JCI37977> >.

PEDIÁTRICA, S. B. D. O. **GBTLI-LLA-2009. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda na infância**. Campinas: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica 2009.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605-12, Oct 2004. ISSN 0192-8651 (Print)

0192-8651.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-49, Jan 15 2011. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543x.

POLA, M. et al. In silico modelling and molecular dynamics simulation studies on L-Asparaginase isolated from bacterial endophyte of *Ocimum tenuiflorum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 117, p. 32-40, 2018/10/01/ 2018. ISSN 0141-0229. Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022918303521> >.

PUI, C.-H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030-1043, 2008. ISSN 01406736.

QUINTANILLA-FLORES, D. L. et al. Acute Pancreatitis and Diabetic Ketoacidosis following L-Asparaginase/Prednisone Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Case Rep Oncol Med**, v. 2014, p. 139169, 2014. ISSN 2090-6706 (Print).

RADHIKA, T. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 15, 2012. ISSN 16845315.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Current Science**, v. 80, n. 9, p. 1121-28, May, 10 2001.

RAMYA, L. N.; PULICHERLA, K. K. Studies on Deimmunization of Antileukaemic L-Asparaginase to have Reduced Clinical Immunogenicity--An in silico Approach. **Pathol Oncol Res**, v. 21, n. 4, p. 909-20, Sep 2015. ISSN 1219-4956.

RAMYA, L. N.; PULICHERLA, K. K. Studies on Deimmunization of Antileukaemic L-Asparaginase to have Reduced Clinical Immunogenicity- An in silico Approach.

**Pathology & Oncology Research**, v. 21, n. 4, p. 909-920, 2015/09/01 2015. ISSN 1532-2807. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9912-0> >.

REYNISSON, B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Res**, v. 48, n. W1, p. W449-w454, Jul 2 2020. ISSN 0305-1048 (Print)

0305-1048.

RIZZARI, C. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Oncol**, v. 25 Suppl 1, p. S1-9, Mar 2013. ISSN 1040-8746.

SAEED, H. et al. Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* I. asparaginase in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1041-1051, 2018/01/01/ 2018. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017325825> >.

SANTOS, A. C. D. et al. Reactions related to asparaginase infusion in a 10-year retrospective cohort. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 4, p. 337-342, 2017/10/01/ 2017. ISSN 1516-8484. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1516848417301068> >.

SANTOS, N. V. et al. Liquid–liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: trends and future prospects. v. 93, n. 7, p. 1845-1863, 2018. ISSN 0268-2575. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.5476> >.

SARQUIS, M. I. et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489-92, Aug 2004. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276.

SCHALK, A. M. et al. Identification and structural analysis of an L-asparaginase enzyme from guinea pig with putative tumor cell killing properties. **J Biol Chem**, v. 289, n. 48, p. 33175-86, Nov 28 2014. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

SEHGAL, S. et al. High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 63-7, Jan-Mar 2010. ISSN 0377-4929.

SHIRANO, Y.; SHIBATA, D. Low temperature cultivation of *Escherichia coli* carrying a rice lipoxygenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level. **FEBS Lett**, v. 271, n. 1-2, p. 128-30, Oct 1 1990. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 100, p. 1-10, Apr 2016. ISSN 1040-8428.

SHRIVASTAVA, A. et al. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 42, n. 6, p. 574-81, 2012. ISSN 1532-2297 (Electronic)

1082-6068 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030468> >.

SILVA, L. F. et al. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 11, p. 162, Oct 28 2018. ISSN 1573-0972 (Electronic)

0959-3993 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30368630> >.

SIM. Atlas On-line de Mortalidade. 2020. Disponível em: <  
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def> >. Acesso em: 07 Nov 2022.

SINGH, M. et al. Effect of N-terminal poly histidine-tag on immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* surface protein SP0845. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1240-1248, 2020/11/15/ 2020. ISSN 0141-8130. Disponível em: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020338010> >.

ŚLIWA-TYTKO, P. et al. Neurotoxicity Associated with Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia Chemotherapy and Immunotherapy. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 10, May 15 2022. ISSN 1422-0067.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697.

STECHEER, A. L. et al. Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. **Pharm Acta Helv**, v. 74, n. 1, p. 1-9, Dec 1999. ISSN 0031-6865 (Print)

0031-6865.

STRZELCZYK, P. et al. Generalized enzymatic mechanism of catalysis by tetrameric L-asparaginases from mesophilic bacteria. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 17516, Oct 15 2020. ISSN 2045-2322.

SUN, R. et al. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 101-105, 2011/06/15/ 2011. ISSN 1874-3900. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187439001000114X> >.

SWAIN, A. L. et al. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 4, p. 1474-1478, 1993.

TASHIRO, Y. Subcellular compartments and protein topogenesis. **Cell Struct Funct**, v. 8, n. 2, p. 91-107, Jun 1983. ISSN 0386-7196 (Print) 0386-7196.

TEROL, G. L. et al. Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 151, 2019/09/04 2019. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1202-1> >.

THERMOSCIENTIFIC. **BL21 ( DE3 ) Competent Cells**. 21: 6-7 p.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. v. 7, n. 420, 2019-December-20 2019. ISSN 2296-4185. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2019.00420> >.

VAN DER SLUIS, I. M. et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. **Haematologica**, v. 101, n. 3, p. 279-85, Mar 2016. ISSN 0390-6078 (Print) 0390-6078.

VAN TRIMPONT, M. et al. Novel Insights on the Use of L-Asparaginase as an Efficient and Safe Anti-Cancer Therapy. v. 14, n. 4, p. 902, 2022. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/4/902> >.

VANDEPUTTE-RUTTEN, L. et al. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. **Embo j**, v. 20, n. 18, p. 5033-9, Sep 17 2001. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189.

VARADI, M. et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D439-D444, 2021. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061> >. Acesso em: 2/1/2023.

VERLI, H. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. 282.

VESTH, T. C. et al. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section Nigri. **Nat Genet**, v. 50, n. 12, p. 1688-1695, Dec 2018. ISSN 1061-4036.

VIDER-SHALIT, T. et al. Viruses selectively mutate their CD8+ T-cell epitopes—a large-scale immunomic analysis. **Bioinformatics**, v. 25, n. 12, p. i39-i44, 2009. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp221> >. Acesso em: 7/20/2022.

VIDYA, J. et al. Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: An overview. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1775-1781, 2017/12/01/ 2017. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417307113> >.

VIDYA, J. et al. Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: An overview. **Bioresour Technol**, v. 245, n. Pt B, p. 1775-1781, Dec 2017. ISSN 1873-2976 (Electronic)

0960-8524 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28596071> >.

VIMAL, A.; KUMAR, A. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v. 33, n. 1, p. 40-61, Apr 2017. ISSN 2046-5556 (Electronic)

0264-8725 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28766374> >.

VIMAL, A.; KUMAR, A. In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 9-17, 2017/03/01/ 2017. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022916302459> >.

WANG, Y. et al. Cloning and expression of L-asparaginase gene in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 2, p. 93-101, 2001/08/01 2001. ISSN 1559-0291. Disponível em: < <https://doi.org/10.1385/ABAB:95:2:093> >.

WOODS, D. et al. From the Children's Oncology Group: Evidence-Based Recommendations for PEG-Asparaginase Nurse Monitoring, Hypersensitivity Reaction Management, and Patient/Family Education. **J Pediatr Oncol Nurs**, v. 34, n. 6, p. 387-396, Nov/Dec 2017. ISSN 1043-4542 (Print)

1043-4542.



YANG, Z. et al. AlphaFold2 and its applications in the fields of biology and medicine. **Signal Transduct Target Ther**, v. 8, n. 1, p. 115, Mar 14 2023. ISSN 2095-9907 (Print) 2059-3635.

YELLIN, T. O.; WRISTON, J. C., JR. Antagonism of purified asparaginase from guinea pig serum toward lymphoma. **Science**, v. 151, n. 3713, p. 998-9, Feb 25 1966. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

YUN, M. K. et al. Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase I. **J Mol Biol**, v. 369, n. 3, p. 794-811, Jun 8 2007. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836.

ZENATTI, P. P. et al. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of *E. coli* L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine**, v. 30, p. 158-166, Apr 2018. ISSN 2352-3964 (Electronic)

2352-3964 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29550241> >.

ZHOU, Y. et al. Importance of incomplete lineage sorting and introgression in the origin of shared genetic variation between two closely related pines with overlapping distributions. **Heredity**, v. 118, n. 3, p. 211-220, 2017/03/01 2017. ISSN 1365-2540. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.72> >.