



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

SARAH CRISTINA DA SILVA ROCHA

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE L-ASPARAGINASE TIPO II DE *Penicillium*
cerradense EM SISTEMA DE EXPRESSÃO DE *Escherichia coli* BL21(DE3)**

BRASÍLIA

2025

SARAH CRISTINA DA SILVA ROCHA

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE L-ASPARAGINASE TIPO II DE *Penicillium cerradense*
EM SISTEMA DE EXPRESSÃO DE *Escherichia coli* BL21(DE3)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Ciências em Saúde, Universidade
de Brasília, como requisito à obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Coorientador: Me. Joel Antonio Cordeiro de Abreu

BRASÍLIA

2025

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças às pessoas que caminharam ao meu lado e me ajudaram a ter a oportunidade de chegar até aqui. Agradeço profundamente à minha orientadora Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista e ao meu coorientador e grande amigo de profissão, Me. Joel Antonio Cordeiro de Abreu, por toda a orientação, paciência, dedicação e conselhos durante este processo.

À minha família e ao meu companheiro, deixo meu amor e gratidão pelo apoio incondicional, pela força nos momentos difíceis e por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidei

Aos meus amigos e colegas, vocês foram fundamentais em cada etapa da minha vida. Obrigada por tornarem esta jornada mais leve.

Quero agradecer também aos que se foram durante esse processo. A saudade é presente e me ensinaram a contemplar cada segundo de forma completamente diferente. A vida vale a pena ser vivida.

A todos que contribuíram de alguma forma, meu sincero muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração do mecanismo de reação da L-ASNase.** Na primeira etapa há um ataque nucleofílico na amida da L-asparagina, liberando a amônia. Assim, com a formação do intermediário β -acil-asparaginase ocorre a hidrólise do éster, produzindo o ácido aspártico e L-asparaginase. **Fonte:** Lefin et al., (2023)..... 9
- Figura 2. Mapa esquemático do vetor de expressão pET21-a.** No mapa é representada a origem em fl, o promotor T7, terminador T7 e gene de resistência à ampicilina. **Fonte:** LLC, Biotech..... 13
- Figura 3. Curva de calibração para determinação da concentração de β -hidroxamato aspártico pelo método de AHA.** O eixo X, correspondem às diferentes concentrações de β -hidroxamato aspártico, enquanto no eixo Y, correspondem à absorbância mensurada a 500 nm, sob estas respectivas concentrações – 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 2,00 e 3,00 μ M. **Fonte:** LaProNat..... 20
- Figura 4. Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas totais pelo método do ácido bicinonínico.** O eixo X, corresponde às diferentes concentrações de BSA, enquanto no eixo Y, correspondem à respectiva absorbância mensurada. **Fonte:** LaProNat..... 22
- Figura 5. Avaliação da enzimática Clones E. coli BL21(DE3). O gráfico acima apresenta a atividade enzimática dos clones de E. coli BL21(DE3) transformados com o vetor de expressão pET21a contendo o gene L-ASNase II de P. cerradense – Clones 1 ao 10.** O Clone 0 corresponde ao clone transformado com pET21a sem nenhum gene clonado, sendo utilizado como controle negativo. O eixo X, corresponde aos diferentes clones, enquanto no eixo Y, corresponde à respectiva atividade em UI/mL. **Fonte:** do autor. 24
- Figura 6. Concentração de proteína total de diferentes clones de E. coli BL21(DE3).** O eixo X, corresponde aos diferentes clones, enquanto no eixo Y, corresponde à respectiva concentração de proteínas totais em mg/mL. **Fonte:** do autor..... 25
- Figura 7. Avaliação da expressão de L-asparaginase por diferentes clones de E. coli BL21(DE3).** A) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo fração insolúvel do extrato protéico, resultantes da expressão de L-ASNase por diferentes clones de E. coli BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, C1 - clone 1 e assim sucessivamente. B) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo fração solúvel do extrato protéico, resultantes da expressão de L-ASNase por diferentes clones de E. coli BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, C1 - clone 1 e assim sucessivamente. **Fonte:** do autor..... 26
- Figura 8. Atividade específica de L-ASNase calculada para os diferentes clones de E. coli BL21(DE3).** O eixo X, corresponde aos diferentes clones, enquanto no eixo Y, corresponde à respectiva atividade específica em UI/mg proteína. **Fonte:** do autor. 27
- Figura 9. Atividade L-ASNase do clone 6 de E. coli BL21(DE3), cultivado em diferentes meios – M9, mLB e mTB - sob regulação de diferentes indutores – 0,1 mM IPTG, 0,4 mM de galactose, 0,4 mM de lactose.** O eixo X representa os diferentes meios e o eixo y, as respectivas atividades enzimáticas em UI/mL extrato. **Fonte:** do autor..... 29
- Figura 10. Gráfico apresentando a atividade específica de L-ASNase expressa pelo clone 6 de E. coli BL21(DE3), cultivado em sistema de autoindução, a 20° C, em diferentes meios de cultivo e sob efeito de diferentes agentes indutores.** O eixo x representa os diferentes meios utilizados e o eixo y, representa a atividade específica em UI/mg proteína. **Fonte:** do autor..... 30
- Figura 11, Avaliação da expressão de L-asparaginase por diferentes clones de E. coli BL21(DE3).** A) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo frações solúveis e insolúveis do extrato protéico em meio M9, resultantes da expressão de L-ASNase clone 6 de E. coli BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, GT - galactose, IP - IPTG, LAC - lactose. B) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo frações solúveis e insolúveis do extrato protéico em meio mLB, resultantes da expressão de L-ASNase clone 6 de E. coli BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, C0 - clone 0, GT - galactose, IP - IPTG, LAC - lactose. C) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo frações

solúveis e insolúveis do extrato protéico em meio mTB, resultantes da expressão de L-ASNase clone 6 de *E. coli* BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, C0 - clone 0, GT - galactose, IP - IPTG, LAC - lactose. **Fonte:** do autor..... 32

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	8
1.2. L-ASPARAGINASE.....	9
1.2.1. L-ASNase de <i>Penicillium cerradense</i>	10
1.3. EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. MEIOS DE CULTIVO.....	15
3.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES	17
3.3. CLONES.....	19
3.4. CULTIVO E SELEÇÃO DO CLONE.....	19
3.5. ROMPIMENTO CELULAR.....	19
3.6. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE L-ASNase.....	20
3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	21
3.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	22
3.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA L-ASNASE SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE AUTOINDUÇÃO.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. SELEÇÃO DOS CLONES.....	24
4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE L-ASNASE DE <i>P. cerradense</i> SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE AUTOINDUÇÃO	28
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é um câncer hematológico caracterizado pela proliferação descontrolada de precursores linfóides e apresenta elevada incidência em crianças e adolescentes. A L-asparaginase (L-ASNase) é um biofármaco essencial no tratamento da LLA, atuando pela depleção sistêmica de L-asparagina, levando à apoptose de células leucêmicas incapazes de sintetizar esse aminoácido. Entretanto, as L-ASNases atuais, derivadas de bactérias, estão associadas a reações adversas imunológicas, o que motiva a busca por fontes alternativas da enzima. O fungo *Penicillium cerradense*, isolado do Cerrado brasileiro, apresentou uma L-ASNase do tipo II, com baixa atividade da glutaminase e potencial imunológico favorável, configurando-se como uma promissora fonte fúngica para o desenvolvimento biofarmacêutico. Para possibilitar sua caracterização bioquímica e futura aplicação terapêutica, este trabalho avaliou a expressão heteróloga da L-ASNase II de *P. cerradense* em *Escherichia coli* BL21(DE3) utilizando o vetor pET21 e diferentes condições de autoindução. Inicialmente, foram cultivados dez clones recombinantes e selecionado o clone com maior atividade específica e banda proteica mais expressiva (~38 kDa) em SDS-PAGE 12%, destacando-se o clone 6. Em seguida, sua expressão foi analisada em diferentes meios (mLB, mTB e M9) e sob indução com IPTG 0,1 mM, galactose 0,4 mM e lactose 0,4 mM separadamente, com cada indutor e os respectivos meios. Os resultados demonstraram que a expressão ocorreu predominantemente na fração insolúvel. A maior atividade específica foi observada no cultivo em meio quimicamente definido M9, na ausência de indutor. Assim, o estudo indica que a L-ASNase de *P. cerradense* pode ser eficientemente expressa em *E. coli* BL21(DE3) por sistemas de autoindução, embora em pequenas quantidades, que podem posteriormente ser otimizadas, representando um passo fundamental para futuras etapas de purificação, caracterização e avaliação de seu potencial biofarmacoterapêutico.

Palavras-chave: L-asparaginase; *Penicillium cerradense*; expressão heteróloga; *Escherichia coli* BL21(DE3); autoindução; biofármacos; leucemia linfoblástica aguda.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematological malignancy characterized by the uncontrolled proliferation of lymphoid precursors and has a high incidence in children and adolescents. L-asparaginase (L-ASNase) is an essential biopharmaceutical in the treatment of ALL, acting through the systemic depletion of L-asparagine, which leads to apoptosis of leukemic cells unable to synthesize this amino acid. However, currently available L-ASNases, derived from bacteria, are associated with immunological adverse reactions, motivating the search for alternative enzyme sources. The fungus *Penicillium cerradense*, isolated from the Brazilian Cerrado, produces a type II L-ASNase with low glutaminase activity and a favorable immunological profile, representing a promising fungal source for biopharmaceutical development. To enable its biochemical characterization and future therapeutic application, this study evaluated the heterologous expression of *P. cerradense* L-ASNase II in *Escherichia coli* BL21(DE3) using the pET21 expression vector and different autoinduction conditions. Initially, ten recombinant clones were cultured, and the clone exhibiting the highest enzymatic activity and the most prominent protein band (~38 kDa) on 12% SDS-PAGE was selected, with clone 6 standing out. Subsequently, its expression was analyzed in different media (mLB, mTB, and M9) and under induction with 0.1 mM IPTG, 0.4 mM galactose, and 0.4 mM lactose individually, using each inducer in the corresponding media. The results demonstrated that expression occurred predominantly in the insoluble fraction. The highest specific activity was observed in cultures grown in the chemically defined M9 medium in the absence of an inducer. Thus, this study indicates that *P. cerradense* L-ASNase can be efficiently expressed in *E. coli* using autoinduction systems, albeit in small amounts, which may be further optimized, representing a fundamental step toward future purification, characterization, and evaluation of its biopharmaceutic potential.

Keywords: L-asparaginase; *Penicillium cerradense*; heterologous expression; *Escherichia coli* BL21(DE3); autoinduction; biopharmaceuticals; acute lymphoblastic leukemia.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma doença hematológica que afeta células linfoides imaturas de linhagem B (BCP-LLA), que corresponde a 80% dos casos, sendo aproximadamente 23% das LLAs em adultos classificadas como positivas para o cromossomo Filadélfia (Ph) ou T, que corresponde a 20% dos casos de LLA. O diagnóstico inclui análises clínicas e hematológicas, podendo incluir análises citogenéticas e moleculares, que conferem o cromossomo Filadélfia (Ph) positivo, translocação (12;21) (Rafei et al., 2019).

Esta neoplasia decorre da proliferação descontrolada de precursores na medula óssea (MO) e é caracterizada pelo aumento da proliferação de blastos leucêmicos e pela metástase. A LLA acomete independentemente da idade, com a maioria dos casos em crianças e adolescentes (< 19 anos). Além disso, pode apresentar infiltração de blastos na medula óssea e em órgãos como fígado, baço e linfonodos, levando ao aumento da contagem de leucócitos, à redução na contagem de glóbulos vermelhos e plaquetas (pancitopenia) e pode ainda atingir o sistema nervoso central, podendo ser um local de recidiva da doença (Pagliaro et al., 2024).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer, 2022), a leucemia ocupa a décima posição entre os tipos de câncer mais frequentes. Mundialmente, em 2020, foram estimados 475 mil casos de leucemia, o que equivale a 2,5% de todos os tipos de câncer. Em relação à mortalidade, em 2020, ocorreram, no Brasil, 6.738 óbitos por leucemia (3,18 por 100 mil). O número estimado de novos casos de leucemia no Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 11.540, o que corresponde a um risco estimado de 5,33 por 100 mil habitantes.

A mortalidade global aumentou de 41.240 mortes em 1990 para 47.650 em 2019. Taxas de mortalidade elevadas foram observadas na América Latina e Central (1,72 por 100.000). A China e a Índia tiveram o maior número de mortes em 2019, com mais de 11.000 e 4.000, respectivamente. Dentre os fatores de risco e condições que indicam predisposição estão o sexo masculino, genética e diagnóstico familiar, exposição à radiação ionizante, quimioterapia ou radioterapia, e exposição a toxinas, incluindo micotoxinas e hidrocarbonetos como o benzeno (Pagliaro et al., 2024).

Os diagnósticos disponíveis nos países da América Latina incluem testes citogenéticos ou de biologia molecular. Por exemplo, no Brasil para diagnosticar leucemia aguda incluem exame citológico da medula óssea (MO), sangue periférico (SP) e imunofenotipagem (Colunga-Pedraza et al., 2022).

Há uma necessidade urgente de desenvolver novas opções de diagnóstico e tratamento com custo acessível, medicamentos genéricos, alternativas de menor custo e protocolos de tratamento simplificados. Além disso, estratégias para melhorar a infraestrutura de saúde, treinar profissionais locais e apoiar ensaios clínicos são essenciais para avançar nos resultados do tratamento (Adomako et al., 2025).

O tratamento envolve uma combinação de agentes quimioterápicos para a indução da remissão, como inibidores de tirosina quinase, glicocorticoides como a prednisona e quimioterápicos como a vincristina, citarabina, mercaptopurina, metotrexato e L-ASNase. Esses tratamentos evoluíram por meio de estudos clínicos, com pesquisas em andamento explorando a intensidade e a duração ideais da terapia para equilibrar eficácia e minimizar toxicidade (Adomako et al., 2025). Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a L-ASNase na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais, recomendando seu uso no tratamento da LLA (World Health Organization, 2025).

1.2. L-ASPARAGINASE

A enzima L-ASNase (amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é responsável pela catálise da reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia. O mecanismo de ação sobre a L-asparagina ocorre através de um ataque nucleofílico no carbono da amida, com a liberação de amônia. Assim, a molécula de água age sobre o carbono do éster formando o ácido aspártico, como mostrado na Figura 1 (Chand et al., 2020).

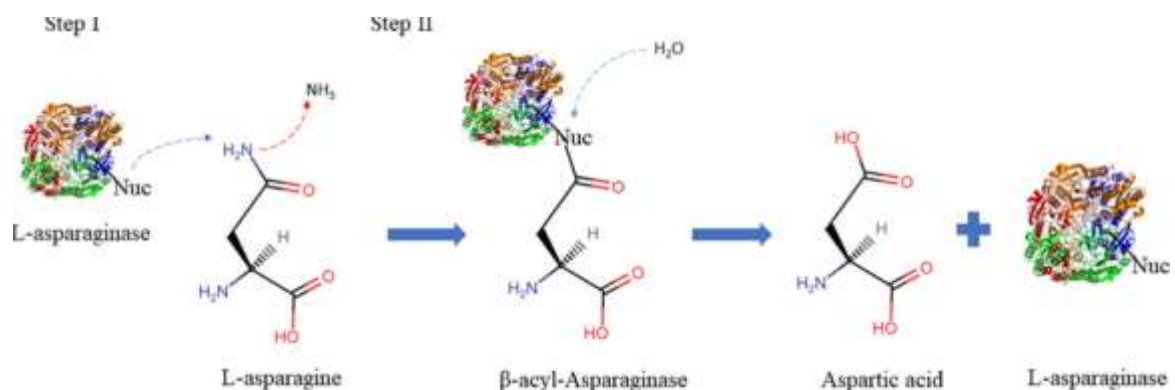


Figura 1. Ilustração do mecanismo de reação da L-ASNase. Na primeira etapa há um ataque nucleofílico na amida da L-asparagina, liberando a amônia. Assim, com a formação do intermediário β-acil-asparaginase ocorre a hidrólise do éster, produzindo o ácido aspártico e L-asparaginase. **Fonte:** Lefin et al., (2023).

Como mencionado anteriormente, esta enzima é amplamente reconhecida tanto pelo seu papel LLA, como na leucemia mieloblástica aguda (LMA). Além do uso como biofármaco antineoplásico, o uso da enzima é descrito na literatura como importante para a indústria

alimentícia, pois é capaz de reduzir a formação de acrilamida, um composto potencialmente classificado como grupo 2A pela IARC (Labrou et al., 2010; Pietropaoli et al., 2022).

A L-ASNase pode ser encontrada em animais, plantas e microrganismos como bactérias, fungos e leveduras, no entanto, nem todas as fontes são equivalentes (Castro et al., 2021). Existem hoje no mercado diferentes formulações de L-ASNase disponíveis para uso clínico, destacam-se as de origem bacteriana, como as variantes nativa, PEGuilada e recombinante derivadas de *Escherichia coli*, além da formulação nativa obtida de *Dickeya dadamtii* (sinônimo: *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotova* e *Dickeya chrysanthemi*). No entanto, também existem relatos da utilização de fungos e leveduras como sistemas de expressão de L-ASNase (Cai et al., 2025; Cardoso et al., 2023; Freitas et al., 2022).

O mecanismo de ação do tratamento à base de ASNase está na mutação do gene que codifica a *L-asparagina sintetase*. As células neoplásicas não conseguem sintetizar L-asparagina devido à ausência da *L-asparagina sintetase*, sendo assim, dependem da asparagina exógena para sua manutenção e proliferação. Dessa forma, as células sofrem apoptose devido a alterações nas vias de sinalização causadas pela diminuição dos níveis de L-asparagina plasmática, que é hidrolisada pela L-ASNase. Assim, a L-ASNase é um agente quimioterápico utilizado para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) e do linfossarcoma (Lefin et al., 2023).

No entanto, apesar de seu potencial antileucêmico, a utilização de L-ASNase de fonte bacteriana tem causado sintomas, como edema, erupções cutâneas, febre, disfunção hepática, diabetes, leucopenia, pancreatite, convulsões neurológicas e hemorragia. Com isso, a busca por L-ASNase em novas fontes tornou-se imprescindível. Dentre as opções, os fungos demonstraram maior proximidade com os seres humanos em comparação com as bactérias, portanto, as chances de reação imunológica contra a L-ASNase fúngica serão menores. Esta enzima fúngica ganhou importância por sua produção de forma extracelular e fácil purificação (Batoool et al., 2016).

1.2.1. L-ASNase de *Penicillium cerradense*

O fungo filamentoso *Penicillium cerradense* é uma espécie isolada do solo do Cerrado brasileiro e identificada pelo grupo de pesquisa do LaProNat, O extrato proteico deste fungo apresentou baixa atividade de glutaminase, o que o torna um potencial produtor de L-ASNase com potencial farmacoterapêutico (Andrade et al., 2021; Freitas et al., 2021).

Entre os produtores de L-ASNase eucarióticos, os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporidium* são significativos, e entre as leveduras, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Andrade et al., 2023).

O fungo do gênero *Penicillium* é produtor da enzima L-ASNase e tem se mostrado como uma alternativa à isoenzima de origem bacteriana. Conforme indicaram Andrade et al. (2024), na relação evolutiva, a *L-asparaginase* de *P. cerradense* apresenta maior semelhança com espécies de *Aspergillus*. A resposta imunogênica é semelhante (epítomos de células T e B) em comparação às enzimas de *E. coli* e *D. chrysanthemi*, sugerindo uma L-ASNase com potencial de melhoria para a produção da enzima. A segurança imunológica da ASNase de *P. cerradense* necessária para uso clínico é semelhante à das já comercializadas, se apresenta como uma proteína não tóxica, diferente da *E. coli*, que contém uma região altamente tóxica responsável em parte por seus efeitos adversos.

Ademais, após a identificação e o sequenciamento do gene da L-ASNase tipo II, foi possível caracterizar *in silico* esta enzima. Essas análises, realizadas por Andrade et al. (2024), indicaram a presença de um peptídeo sinal, sendo os primeiros 17 resíduos de aminoácido da porção N-terminal. Ademais, a proteína apresenta um pI predito de 5,12 e uma massa molecular estimada de 156 kDa, sendo 39 kDa por monômero. Ainda se tratando da caracterização *in silico*, a L-ASNase de *P. cerradense* apresentou uma densidade de epítomos de células-T similar às L-ASNases bacterianas disponíveis comercialmente.

Desta forma, Andrade et al. (2024) puderam inferir que se trata de uma enzima segura imunologicamente, pois é comparada às L-ASNases disponíveis clinicamente, além de tratar-se de uma enzima não-tóxica. Assim, observou-se que a L-ASNase fúngica de *P. cerradense* apresenta potencial biofarmacêutico, mas requer avaliações *in vitro* e/ou *in vivo*. Desta forma, para a realização destes ensaios, existe a necessidade de uma enzima pura e ativa.

Ao otimizar as condições de cultivo do fungo, Andrade et al. (2021) alcançaram uma atividade enzimática de até 2,36 U/g_{biomassa}. Desta forma, reforça-se a necessidade de recorrer às técnicas de engenharia genética, com o objetivo de obter maior quantidade da enzima para realizar as devidas caracterizações bioquímicas, biofísicas e citotóxicas, com o intuito de confirmar seu potencial biofarmacoterapêutico.

1.3. EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Embora diversos organismos tenham se mostrado capazes de atuar como biofábricas, algumas características da proteína de interesse, da sua aplicabilidade, bem como dos sistemas de expressão, devem ser avaliadas para a escolha da melhor estratégia para obtenção da proteína recombinante ativa.

A escolha do organismo hospedeiro é realizada em função de diversos fatores, como características da proteína a ser expressa, e do organismo hospedeiro: como modificações pós-traducionais – ligação dissulfeto, glicosilação, fosforilação, entre outras -, rendimento, custo de cultivo e manutenção, segurança da espécie hospedeira, produção de moléculas tóxicas, entre outros fatores (Rai & Padh, 2001; Sodoyer, 2004; Walsh, 2014).

A utilização da linhagem *Escherichia coli* BL21(DE3) como sistema de expressão, em combinação com vetores da família pET, é caracterizada pela produção de elevados níveis de proteínas heterólogas, devido à deficiência nas proteases Lon e OmpT. Além disso, essa linhagem contém no cromossomo o gene que codifica a RNA polimerase do fago T7, sob controle do promotor lacUV5, o qual é induzido por IPTG ou análogos. Após a indução, a RNA polimerase T7 é expressa e esta reconhece o promotor T7 presente no vetor de expressão, promovendo a intensa transcrição do gene clonado e, conseqüentemente, o acúmulo intracelular da proteína de interesse, com redução da degradação proteica durante o processo de produção (Joseph et al., 2015).

Em sistemas de expressão bacterianos de *E. coli*, os vetores de expressão mais utilizados são os da família pET, que promovem a expressão de um gene recombinante sob o controle do promotor da RNA polimerase T7 e do operador *lac*. O pET21a é um sistema eficiente, utilizado para expressão de proteínas em *E. coli*. O citoplasma é a primeira opção para expressão de proteínas devido ao seu maior rendimento. Esses vetores diferem pelo marcador seletivo (resistência à ampicilina vs. resistência à canamicina) (Sassi et al., 2017). A expressão da RNA polimerase do bacteriófago T7, presente no cromossomo, é controlada pelo promotor e operador *lac*, de *E. coli*. Durante o crescimento do cultivo, na ausência do indutor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), o *lac* previne a síntese da T7 RNA polimerase e, conseqüentemente, a proteína heteróloga não é expressa. No entanto, com a adição do IPTG há a indução da expressão da T7 RNA polimerase, pois o IPTG se liga ao repressor LacI, impedindo-o de interagir com o *operon lac*. Assim, ocorre a interação com o promotor T7

localizado no vetor de expressão, resultando na expressão da proteína heteróloga (Studier et al., 1990; Studier & Moffatt, 1986).

No caso da L-ASNase II no vetor pET21a, a ausência da cauda permite avaliar a enzima em sua forma natural, sem interferências causadas pela tag. A *His-tag* é uma cauda de histidina usada para facilitar a purificação de proteínas por cromatografia de afinidade a metal (IMAC). Essas caudas podem alterar a conformação, estrutura, atividade, interações e solubilidade da proteína (Chaucanés, 2014).

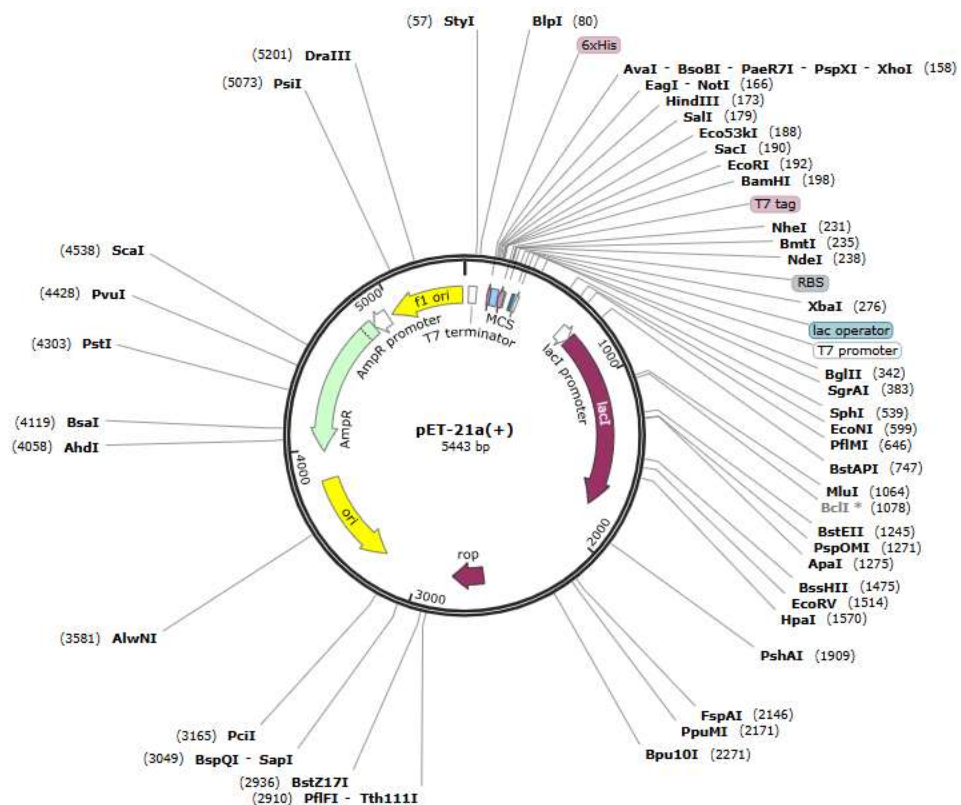


Figura 2. Mapa esquemático do vetor de expressão pET21-a. No mapa é representada a origem em f1, o promotor T7, terminador T7 e gene de resistência à ampicilina. **Fonte:** LLC, Biotech.

Desta forma, o presente trabalho se apresenta como uma alternativa à obtenção da L-ASNase recombinante de *P. cerradense* em sistema heterólogo de *E. coli*, para caracterização desta enzima com potencial biofarmacoterapêutico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão heteróloga de L-ASNase de *Penicillium cerradense*, em sistema de expressão de *Escherichia coli* BL21(DE3), através de autoindução, sob diferentes meios e indutores.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Cultivar 10 clones de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformados com o vetor de expressão pET21, além de 1 clone contendo o vetor vazio, selecionando 1 clone promissor com base na sua atividade enzimática;
- Avaliar a expressão da L-ASNase II sob diferentes condições de autoindução – meio de cultivo e indutores – por meio de atividade enzimática e SDS-PAGE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MEIOS DE CULTIVO

Meio LB - *Luria Bertani*

5 g/L de extrato de levedura
10 g/L de peptona de caseína
10 g/L de NaCl
q.s.p. 120 mL com água destilada

Meio mLB - *Luria Bertani* modificado (Xu et al., 2012):

5 g/L de extrato de levedura
10 g/L de peptona de soja
5 g/L de NaCl
q.s.p. 1 L com água destilada

Meio mTB - *Terrific Broth* modificado (Xu et al., 2012)

24 g/L de extrato de levedura
12 g/L de peptona de soja
5 g/L de glicerol
12,5 g/L de K_2HPO_4
2,3 g/L de KH_2PO_4
q.s.p. 1 L com água destilada

Meio M9 (Xu et al., 2012);

[Solução 1]

5 g/L de glicerol

[Solução 2]

6 g/L de Na_2HPO_4

3 g/L de K_2HPO_4

1 g/L de NH_4Cl

0,5 g de NaCl

[Solução 3]

0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

As soluções devem ser preparadas separadamente, esterilizadas através de calor úmido (autoclave), e reunidas no momento antes do uso. Caso necessário, q.s.p. 1 L com água destilada.

Meio definido (Horn et al., 1996);

[Solução 1] Solução de elementos traço (100 x):

6 g de citrato férrico (III) hidratado

300 mg de H_2BO_3

1500 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

840 mg de $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

250 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

800 mg de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

250 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

250 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

q. s. p. 1 L de água destilada. A solução foi filtrada em filtro 0,22 μm , e armazenada ao abrigo da luz.

[Solução 2] Solução de glicose:

10 g de glicose

q.s.p. 100 mL com água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave.

[Solução 3] Solução de sulfato de magnésio:

0,6 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

q.s.p. 90 mL com água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave.

[Solução 4] Solução de sais:

8,6 g de Na_2HPO_4

3,0 g de KH_2PO_4

3,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

3,0 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$

1,0 g de NH_4Cl

0,5 g de NaCl

0,5 g de ácido cítrico

Após a solubilização dos sais em 800 mL de água destilada, a solução foi esterilizada em autoclave.

Por fim, para o preparo de 1 L do meio quimicamente definido, após a esterilização das soluções, misturaram-se 10 mL da solução de elementos traço, 100 mL da solução de glicose, 90 mL da solução de sulfato de magnésio e 800 mL da solução de sais.

3.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES

Tampão de lise:

50 mM de Tris-base
1 mM de PMSF
5 mM de EDTA
q.s.p. 1 L com água destilada
Ajustar pH 8.6 com HCl 37%

Tampão Tris HCl 50 mM:

6,057 g de Tris-base
q.s.p. 1 L com água destilada
Ajustar pH 8.6 com HCl 37%

Solução de L-Asparagina 100 mM – Ensaio AHA

0,66 g de L-asparagina
q.s.p. 50 mL com água destilada

Solução de Hidroxilamina 1 M – Ensaio AHA

[Solução A] – Solução de estoque de cloridrato de hidroxilamina 2 M
13,9 g de cloridrato de hidroxilamina
q.s.p. 200 mL com água destilada

[Solução B] – Solução de estoque de NaOH 2 M
16 g de cloridrato de hidroxilamina
q.s.p. 200 mL com água destilada

A solução de hidroxilamina 1 M foi obtida misturando as soluções A e B, na proporção 1:1 (v/v).

Solução de Cloreto Férrico (10%)/TCA (20%)/ HCl (0,33 M) – Ensaio AHA

[Solução A] – Solução de cloreto férrico
20 g de cloreto férrico
q.s.p. 100 mL com água destilada

[Solução B] – Solução de HCl

5,45 mL de HCl 37%

40 mL de ácido tricloroacético

q.s.p. 100 mL com água destilada

A solução de parada é obtida pela mistura dessas duas soluções, A e B, em proporção 1:1.

Tampão de amostra de proteína (2x):

Tris-HCl 0,5 M (pH 6.8)

2 mL de SDS 20%

0,1 mL de β -mercaptoetanol

0,2 mL de glicerol

4 mg de azul de bromofenol

q.s.p. 10 mL com água destilada

Tampão de corrida (5x) – SDS-PAGE:

15,1 g de Tris-base

72 g de glicina

5 g de SDS

q.s.p. 1 L de água destilada

Ajustar pH 8.3 com HCl 37%

Para solução de trabalho, basta diluir 200 mL do Tampão de corrida (5x) e q.s.p. 1 L com água destilada.

Solução corante – Coomassie Blue

Uma unidade de PhastGel Blue R-350 (GE Healthcare) foi dissolvida em 80 mL de água destilada, sob agitação, por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 120 mL de metanol, mantendo-se a mistura até a completa dissolução do tablete. O conteúdo resultante foi filtrado em papel membrana e, posteriormente, foram adicionados 200 mL de uma solução de ácido acético glacial a 20%.

Solução descorante – Coomassie Blue

450 mL de metanol

100 mL de ácido acético glacial

q.s.p. 1 L com água destilada

3.3. CLONES

Os clones de *E. coli* BL21(DE3), transformados com o vetor pET 21a, contendo o gene de L-ASNase II de *Penicillium cerradense*, foram cedidos pela Profa. Dra. Eliane Noronha do Laboratório de Enzimologia da UnB.

3.4. CULTIVO E SELEÇÃO DO CLONE

Em tubos cônicos do tipo Falcon, de 15 mL, contendo 5 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, foram adicionados 50 µL da solução estoque de criopreservação e submetidos a cultivo em agitador do tipo shaker, a 200 rpm, a 37 °C, *overnight*.

Em seguida, foram preparados inóculos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 mL de meio LB, suplementados com 100 µg/mL de ampicilina. Foram adicionados volumes dos respectivos pré-inóculos, de modo que a cultura se iniciasse com O.D.₆₀₀ = 0,1. A densidade óptica foi avaliada pelo espectrofotômetro, equipamento analítico que mede a absorbância (ou densidade óptica) de uma amostra ao ser atravessada por um feixe de luz de determinado comprimento de onda. O modelo utilizado foi o *Shimadzu UV-1800*. As culturas foram submetidas a cultivo em agitador do tipo *shaker*, a 200 rpm, a 37 °C. Após 5 h, foram adicionados 0,45 mM de IPTG, e a temperatura do *shaker* foi reduzida para 20 °C, onde permaneceu por mais 19 h.

3.5. ROMPIMENTO CELULAR

Após o período de fermentação, as amostras foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 4 °C, 4.000 × g, durante 10 min. O meio de cultura foi descartado e, sobre as células, foram adicionados 3 mL de tampão de lise, pH 8,6. Após as células serem ressuspensas, a amostra foi colocada em ultrafreezer a -80 °C durante 1 h. Após o congelamento, as mesmas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C durante 15 min. Este ciclo de congelamento e descongelamento se repetiu por outras 2 vezes. Em seguida, foram centrifugadas a 4°C, 12.000 x g, durante 10 min. Assim, foram separados o sobrenadante (fração solúvel) e o pellet ressuspensos em 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,6 (fração insolúvel).

3.6. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE L-ASNase

O ensaio para avaliar a atividade enzimática foi realizado com a fração solúvel, a partir do método L-aspartil- β -hidroxamato (AHA), que quantifica o ácido-L-aspártico-hidroxamato, resultante da hidrólise da asparagina (Drainas et al., 1977).

As alíquotas foram preparadas em tubos cônicos de 5 mL para os 10 clones em triplicata, considerando o branco de cada amostra. Aos tubos, foram adicionados 1,50 mL de solução tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,6), 0,20 mL de L-asparagina (100 mM), 0,20 mL de hidroxilamina (1 M) e 0,100 mL de amostra de extrato proteico – foram avaliadas apenas as frações solúveis. Os tubos foram incubados a 37 °C, durante 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 0,50 mL de solução de parada (cloreto férrico (10%)/TCA (20%)/HCl (0,33 M)). O branco foi preparado conforme citado acima, porém, com a adição da amostra após o período de incubação. Os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ durante 5 minutos e, a absorbância foi então mensurada em espectrofotômetro a 500 nm.

A curva padrão foi previamente confeccionada pelo grupo de pesquisa, com ácido-L-aspártico e β -hidroxamato (0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 2,00 e 3,00 μmol) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,6), com 0,50 mL de solução de parada, em triplicata. A partir da equação da reta obtida a partir da curva de calibração (Figura 2), foi determinada a molaridade do produto β -hidroxamato aspártico gerado.

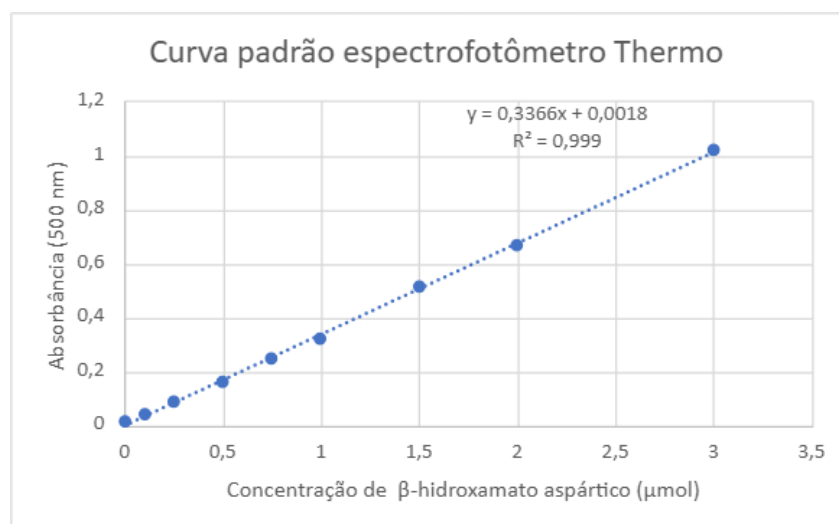


Figura 3. Curva de calibração para determinação da concentração de β -hidroxamato aspártico pelo método de AHA. O eixo X corresponde às diferentes concentrações de β -hidroxamato aspártico, enquanto no eixo Y, corresponde à absorbância mensurada a 500 nm, sob estas respectivas concentrações – 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 2,00 e 3,00 μM . **Fonte:** LaProNat.

Após a determinação da concentração de β -hidroxamato aspártico gerado pelas reações, a atividade enzimática de L-ASNase foi determinada conforme a equação abaixo (Equação 1):

$$\text{Equação (1)} \quad U/mL \text{ de ASNase} = \frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{volume de amostra}) * (\text{tempo de reação})}$$

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método BCA (ácido bicinconínico) Smith et al. (1985), utilizando-se o Kit de BCA *Pierce*TM - Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), conforme as instruções do fabricante. Neste ensaio, ocorre a redução Cu^{2+} a Cu^+ em meio alcalino, catalisada pelos grupos peptídicos das proteínas. Em seguida, o íon Cu^+ reduzido, forma um complexo estável de coloração violeta em contato com o ácido bicinconínico. A amostra que agora apresenta coloração violeta/roxa, apresenta intensidade proporcional à concentração proteica, medida por método espectrofotométrico a 562 nm, em leitora de microplacas *PerkinElmer* Multimode Plate Reader EnSpire.

Assim, para preparo da amostra, os extratos proteicos foram previamente diluídos na proporção 1:10 (foram diluídos 50 μL da amostra em 450 μL de tampão de lise) para prosseguir com a leitura. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 25 μL do extrato proteico previamente diluído, em triplicata, seguidos por 200 μL do reagente de detecção WR. A microplaca foi incubada a 37 °C, durante 30 minutos e realizada a leitura a 562 nm, em leitora de microplacas. Para o branco, foi adicionado tampão de lise, no volume correspondente a amostra de proteína,

A curva padrão foi previamente construída pelo grupo de pesquisa, no qual foram utilizadas concentrações conhecidas de soro albumina bovina (BSA) – 25; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$

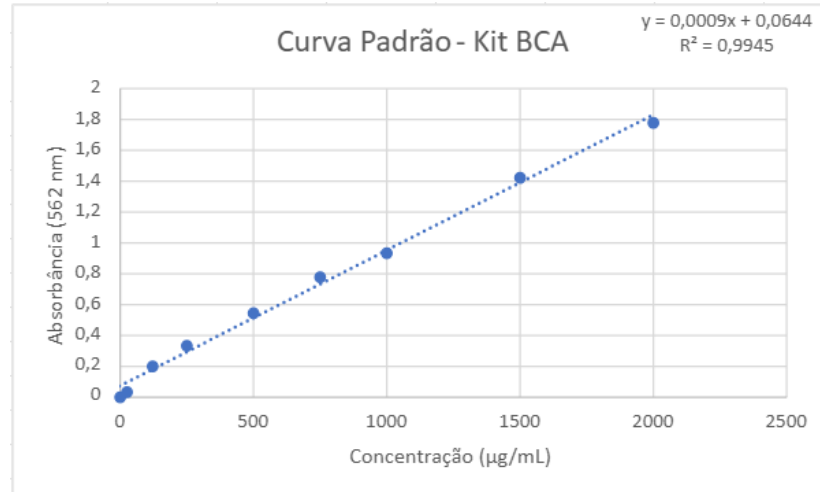


Figura 4. Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas totais pelo método do ácido bicinonínico. O eixo X corresponde às diferentes concentrações de BSA, enquanto no eixo Y, correspondem à respectiva absorvância mensurada. **Fonte:** LaProNat.

A concentração proteica foi determinada com base na equação da reta obtida através da curva de calibração e aplicando o fator de diluição.

3.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida, condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Para análise, coletaram-se 20 µL das respectivas amostras proteicas, e foram adicionados 5 µL de tampão de amostra para proteínas, em microtubos. As amostras foram submetidas a aquecimento a 100 °C, durante 5 min, em banho seco. Após a desnaturação das proteínas, as amostras foram aplicadas nos géis de poliacrilamida 12% (10 cm, x 10,5 cm x 1 mm de espessura), sendo realizada a corrida em diferença de potencial de 40 mA, durante aproximadamente 4 h, em sistema vertical com tampão de corrida 1x.

Ao final da eletroforese, os géis foram transferidos para uma placa de Petri de vidro (150 mm x 20 mm), submersos em solução corante contendo Coomassie Blue G-350, *overnight*, em mesa agitadora a 100 rpm. No dia seguinte, foram descorados com solução descorante, realizando-se sucessivas trocas desta até a possível visualização das bandas de proteína. A solução descorante foi submetida à filtração com carvão ativado para posterior reutilização.

3.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA L-ASNASE SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE AUTOINDUÇÃO

Após a seleção do clone promissor, o estudo prosseguiu com apenas ele.

O estudo foi conduzido para observar a expressão da L-ASNase sob diferentes meios de cultivo – mLB, mTB e M9 e, sob ação de diferentes indutores – sem indutor, galactose (0,4 mM), IPTG (0,1 mM) e lactose (0,4 mM), conforme descrito por Xu et al. (2012).

O pré-inóculo foi cultivado em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 mL de meio quimicamente definido (Horn *et al.*, 1996) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 30 µL da cultura criopreservada e, cultivado a 250 rpm, 37 °C, durante 8 h.

Decorrido este período, aos frascos Erlenmeyer contendo os meios complexos – mLB e mTB – foram transferidos 0,250 mL do pré-inóculo, enquanto ao meio quimicamente definido – M9 – foram transferidos 1 mL do pré-inóculo para os frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 mL dos meios citados acima. Nos meios complexos foram adicionados uma menor quantidade de pré-inóculo, pois, segundo Xu et al. (2012), a autoindução de proteínas em meios ricos complexos ocorre de forma diferente e muitas vezes sem adição do indutor, devendo assim ser avaliada a quantidade de adição tanto do pré-inóculo quanto dos indutores. Após esse processo, foram adicionados respectivos indutores em cada meio separadamente, sendo 0,1 mM de IPTG no meio mLB, mTB e M9; 0,4 mM de galactose em mLB, mTB, M9; e 0,4 mM de lactose em mLB, mTB e M9, sendo que em cada um dos frascos de cada ensaio havia a amostra “branca”, sem adição de agente indutor. Em seguida, as culturas foram incubadas em *shaker*, 200 rpm, a 20 °C, durante 16 h.

Decorrido o período de expressão, os efeitos dos diferentes meios de cultivo e indutores foram avaliados através da mensuração da atividade enzimática e visualização do perfil proteico em gel SDS-PAGE, realizadas conforme os itens acima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SELEÇÃO DOS CLONES

Após a realização dos cultivos com os 11 clones de *E. coli* BL21(DE3) – 1 clone contendo pET21 vazio e os demais, contendo o gene da L-ASNase de *P. cerradense*, em 30 mL de meio LB e do rompimento celular, foram realizadas as determinações de atividade enzimática, atividade específica e eletroforese em SDS-PAGE a 12%.

A determinação da atividade enzimática foi realizada utilizando a equação da reta, para determinação da concentração de β -hidroxamato aspártico, seguida pela aplicação na Equação 1., onde foi determinada a atividade enzimática.

Conforme pode ser observado na Figura 5, a atividade enzimática de L-ASNase encontrada para o clone 0 (controle) – sem a presença do gene da L-ASNase de *P. cerradense* – foi de $0,0054 \pm 0,001$ UI/mL de extrato proteico. Por outro lado, a atividade observada entre os clones variou de $0,0012 \pm 0,0001$ UI/mL (clone 10) com menor atividade, a $0,0391 \pm 0,0015$ UI/mL (clone 5) com maior atividade.

Embora o clone 0 não apresente o gene da L-ASNase II de *P. cerradense*, a presença de atividade enzimática pode ser justificada pelo fato de que a própria *E. coli* BL21(DE3) apresenta a atividade da enzima de forma endógena.

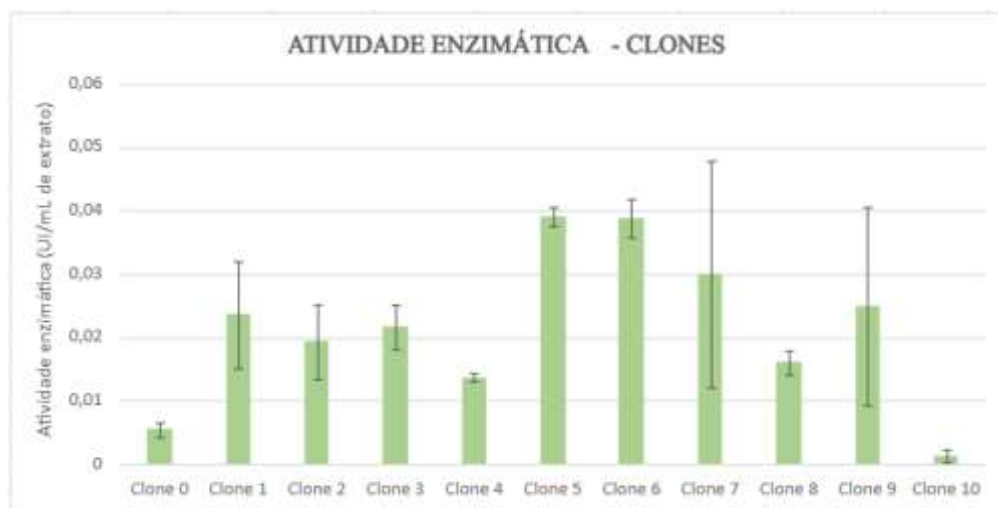


Figura 5. Avaliação da atividade enzimática de clones de *E. coli* BL21(DE3). O gráfico acima apresenta a atividade enzimática dos clones de *E. coli* BL21(DE3) transformados com o vetor de expressão pET21a contendo o gene L-ASNase II de *P. cerradense* – Clones 1 a 10. O Clone 0 corresponde ao clone transformado com pET21a sem nenhum gene clonado, sendo utilizado como controle negativo. O eixo X, corresponde aos diferentes clones, enquanto no eixo Y, corresponde à respectiva atividade em UI/mL. Fonte: do autor.

Para determinação da concentração de proteínas totais, foi utilizada a equação da reta, resultante da curva de calibração com diferentes concentrações de soroalbumina bovina. Ademais, na figura 6, no gráfico contendo os resultados obtidos da quantificação de proteínas totais, foi possível observar que a concentração de proteínas insolúveis variou de $0,5425 \pm 0,01$ mg/mL (clone 0) até $2,90 \pm 0,10$ mg/mL (clone 3). Nas frações solúveis a variação foi de $0,30 \pm 0,01$ mg/mL (clone 8) até $0,58 \pm 0,03$ mg/mL (clone 1).

Como mostrado na Figura 6, observou-se uma concentração de proteínas totais consideravelmente maior nas frações insolúveis, exceto no clone 0. Assim, observa-se que o clone 0 apresentou concentração proteica da fração insolúvel pelo menos 3 vezes menor do que a observada no clone 8. Essas informações podem ser justificadas pelo fato de que o T7 é um promotor forte e, aliado a condições de cultivo como temperatura ótima de crescimento, meio de cultivo rico e boa oxigenação, estimula ainda mais a expressão de proteínas recombinantes, e conseqüentemente, resulta na formação de corpos de inclusão, mecanismo bastante conhecido na expressão heteróloga em sistema de *E. coli*. Conforme revisão de Andrade et al. (2023), a expressão heteróloga de L-ASNase, em *E. coli*, pode resultar na produção de corpos de inclusão.

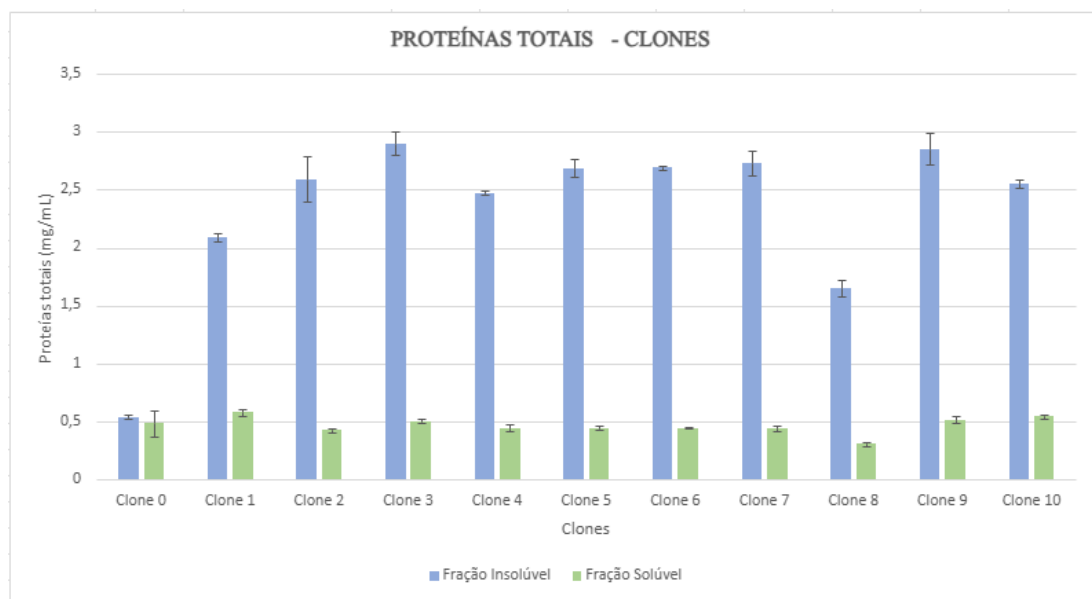


Figura 6. Concentração de proteína total de diferentes clones de *E. coli* BL21(DE3). O eixo X, corresponde aos diferentes clones, enquanto no eixo Y, corresponde à respectiva concentração de proteínas totais em mg/mL.

Fonte: do autor.

Esses resultados observados na quantificação de proteínas totais vão de encontro às informações que podem ser extraídas a partir do SDS-PAGE. A presença de L-ASNase recombinante pode ser observada em ambas as frações, solúvel e insolúvel, ao observar bandas

na altura de aproximadamente 40 kDa (Figura 7). Na Figura 7 (B), destacadas em caixa pontilhada vermelha, encontram-se as bandas correspondentes a cerca de 40 kDa, o que sugere que se trata da L-ASNase recombinante. Além disso, a banda mais intensa corresponde ao clone que apresentou a maior atividade enzimática: o clone 5, confirmando os ensaios de atividade enzimática realizados anteriormente.

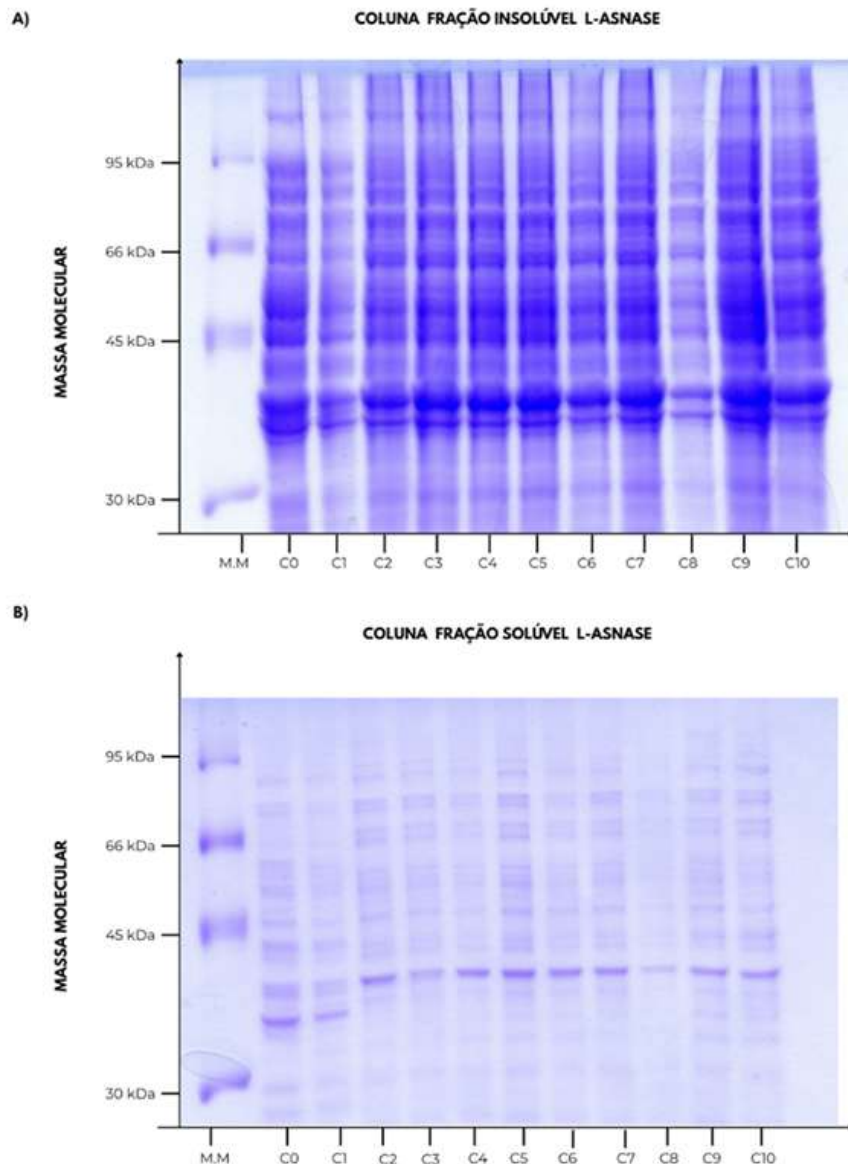


Figura 7. Avaliação da expressão de L-asparaginase por diferentes clones de *E. coli* BL21(DE3). A) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo fração insolúvel do extrato proteico, resultante da expressão de L-ASNase por diferentes clones de *E. coli* BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, C1 - clone 1 e assim sucessivamente. B) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo fração solúvel do extrato proteico, resultante da expressão de L-ASNase por diferentes clones de *E. coli* BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, C1 - clone 1 e assim sucessivamente. **Fonte:** do autor.

Foi possível concluir que a proteína recombinante ficou mais evidente nas frações insolúveis, validando o observado na quantificação de proteínas, em que se observou maior concentração de proteínas nas frações insolúveis dos clones 1-10, se comparadas com o clone 0, devido à formação de corpos de inclusão.

Após mensurar a atividade enzimática e determinar a concentração de proteínas totais, foi possível estimar a atividade específica dos diferentes clones, conforme se observa na Figura 8.

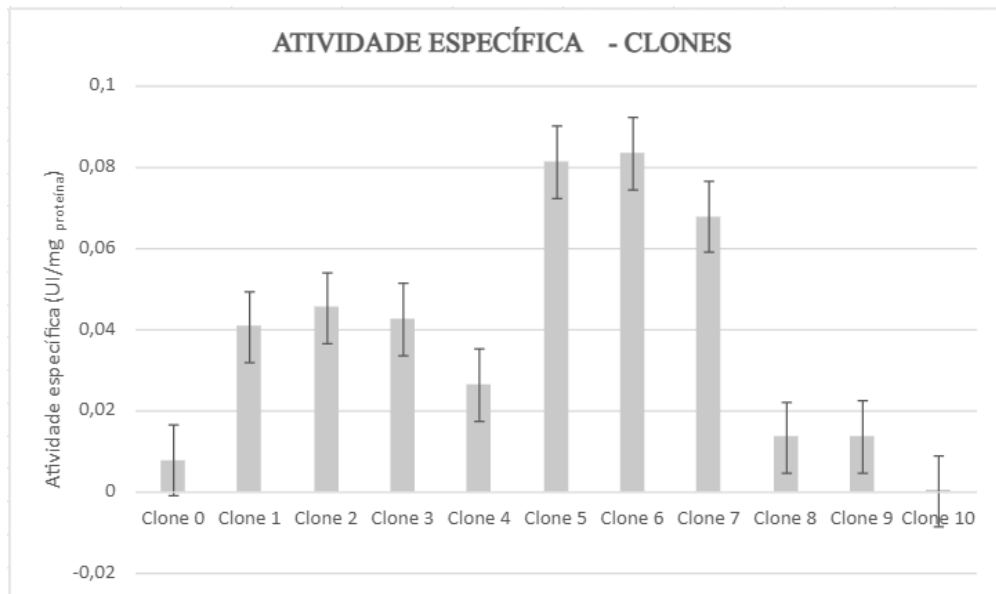


Figura 8. Atividade específica de L-ASNase calculada para os diferentes clones de *E. coli* BL21(DE3). O eixo X corresponde aos diferentes clones, enquanto no eixo Y, corresponde à respectiva atividade específica em UI/mg de proteína. **Fonte:** do autor.

A atividade específica foi obtida a partir da atividade enzimática em U/mL dividida pelas proteínas totais em mg/mL para avaliar em qual clone apresentaria maior atividade de L-asparaginase. De todos os clones avaliados, os clones com menor atividade foram o clone 10 e o clone 0. O clone controle (clone 0) apresentou uma atividade específica baixa por apresentar uma baixa expressão da L-ASNase endógena. No caso do clone 10, a baixa atividade enzimática pode ser resultante do direcionamento da L-ASNase recombinante para a fração insolúvel, a qual pode ser visualizada na Figura 7 A).

Há relatos na literatura de outros estudos expressando L-ASNase de fungos filamentosos em *E. coli* BL21(DE3), no entanto, utilizando o vetor pET28a (Andrade et al., 2023). Entre eles, está o estudo desenvolvido por Saeed et al. (2018), que utilizou *E. coli* BL21(DE3) pLysS, uma conhecida linhagem de expressão de proteínas heterólogas, utilizada para evitar o extravasamento da expressão. Neste estudo, os autores obtiveram 42,46 U/mg

proteína quando expressaram a 22 °C, durante 18 h, após indução com 0,1 mM de IPTG. Após análise do SDS-PAGE e microscopia eletrônica de transmissão, eles também observaram a formação de corpos de inclusão.

Além de sistemas procariotos, a expressão de L-ASNases fúngicas também foi estudada em sistema de expressão eucarioto. Recentemente, outros trabalhos realizados pelo grupo realizaram a expressão de L-ASNases fúngicas em um sistema de expressão eucarioto, a levedura *Komagataella phaffii*. Freitas et al. (2022), em seu estudo, observaram atividade enzimática de 3,05 UI/g_{célula}, enquanto Cardoso et al. (2023) obtiveram atividade de 2,3 UI/mL e atividade específica de 1,04 UI/mg, para L-ASNase proveniente de *Fusarium proliferatum*.

Recentemente, um estudo conduzido por Cai et al. (2025) clonou o gene da L-ASNase de *Aspergillus niger* em uma linhagem engenheirada de *Trichoderma reesei*, onde observaram uma atividade de 1562 IU/mL, após 9 dias de cultivo, em um biorreator de 30 L.

Após análise dos resultados de atividade enzimática, atividade específica e SDS-PAGE a 12%, optou-se por dar continuidade ao estudo com o clone 6, pois este apresentou a maior atividade específica.

4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE L-ASNASE DE *P. cerradense* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE AUTOINDUÇÃO

A avaliação dos sistemas de autoindução foi realizada com o Clone 6, por apresentar maior atividade específica para L-ASNase (Figura 8). Sendo assim, prosseguiu-se o cultivo em diferentes meios – mLB, mTB e M9 – e sob regulação de diferentes indutores – IPTG 0,1 mM e lactose e galactose 0,4 mM – a expressão da L-ASNase fúngica foi avaliada através da determinação enzimática, atividade específica e visualização do perfil eletroforético em SDS-PAGE 12%.

Após o cultivo do clone e a obtenção das frações, foi mensurada a atividade enzimática, que se encontra graficamente representada na Figura 9. Nestas condições avaliadas, foram observadas atividades L-ASNase que variaram de 0 UI/mL de extrato – meio M9 suplementado com lactose e mLB suplementado com IPTG – até 0,03 UI/mL – meio mTB sem indutor.

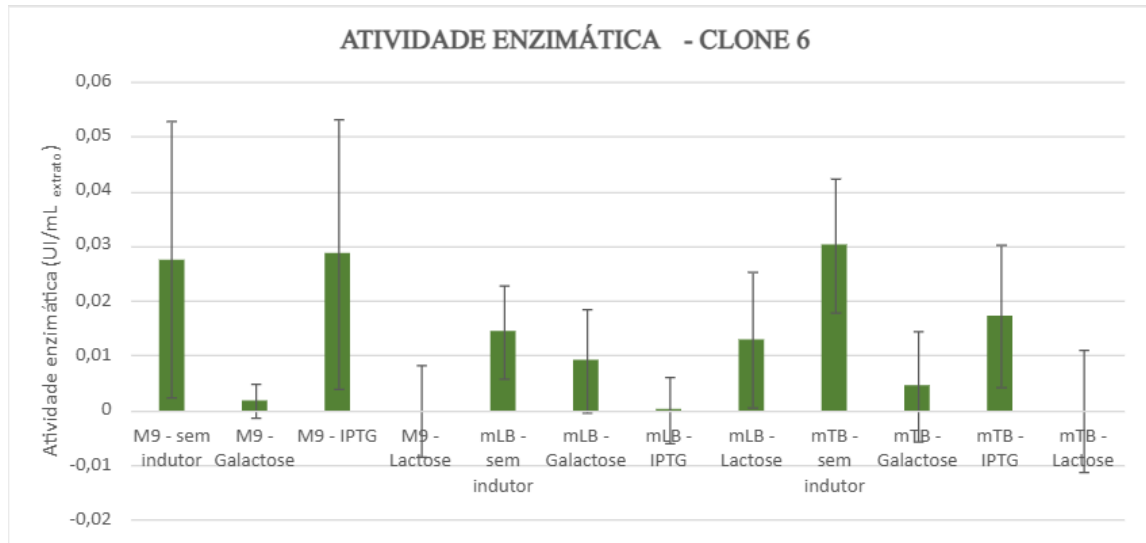


Figura 9. Atividade L-ASNase do clone 6 de *E. coli* BL21(DE3), cultivado em diferentes meios – M9, mLB e mTB – sob regulação de diferentes indutores – 0,1 mM IPTG, 0,4 mM de galactose, 0,4 mM de lactose. O eixo X representa os diferentes meios e o eixo y, as respectivas atividades enzimáticas em UI/mL de] extrato. **Fonte:** do autor.

O ensaio de atividade enzimática confirmou os ensaios anteriores e o comportamento do IPTG. A atividade de L-Asparaginase em meios sem indutores - sem IPTG - foi maior do que a de aqueles com indução de 0,1 mM de IPTG. Os cultivos sem IPTG apresentaram maior atividade enzimática do que os com adição de 0,1 mM de IPTG, indicando que o IPTG pode ter afetado a densidade celular. Ainda assim, há uma expressão endógena na *E. coli* BL21(DE3) que apresenta a atividade da enzima nos meios sem indutores.

O IPTG é um bom indutor, mesmo em concentração baixa, de 0,1 mM, apresenta atividade em M9 e mTB. Em relação ao meio mLB, a sua composição com peptona de soja influenciou na autoindução, bem maior que no meio LB padrão com triptona. Isso sugere que a peptona de soja foi responsável pela autoindução.

Como a galactose e a lactose são indutores fracos, foi necessária uma concentração superior a 0,1 mM. Observa-se que a galactose induziu a produção de L-ASNases em M9, mLB e mTB. Portanto, propõe-se que a galactose seja avaliada em diferentes concentrações para poder verificar o potencial indutor da atividade de L-asparaginase em *E. coli* BL21(DE3) com o *operon lac* de forma geral.

Por outro lado, a presença de atividade enzimática quando cultivada em meio M9, sem indutor, pode ser justificada pela regulação positiva por CAP-cAMP, um complexo transcricional que ativa a transcrição de vários genes de *E. coli*, especialmente de aqueles

envolvidos no metabolismo de açúcares alternativos à glicose. Desta forma, pouca ou nenhuma glicose no meio, como o caso do meio M9, induz uma maior expressão basal de genes regulados pelo *operon lac*, conhecido por efeito glicose ou efeito de repressão por catabólito (Ishizuka et al., 1993).

Após determinação da concentração de proteínas totais, foi possível determinar a atividade específica para cada uma das condições avaliadas, e estas, encontram-se graficamente representadas na Figura 10.

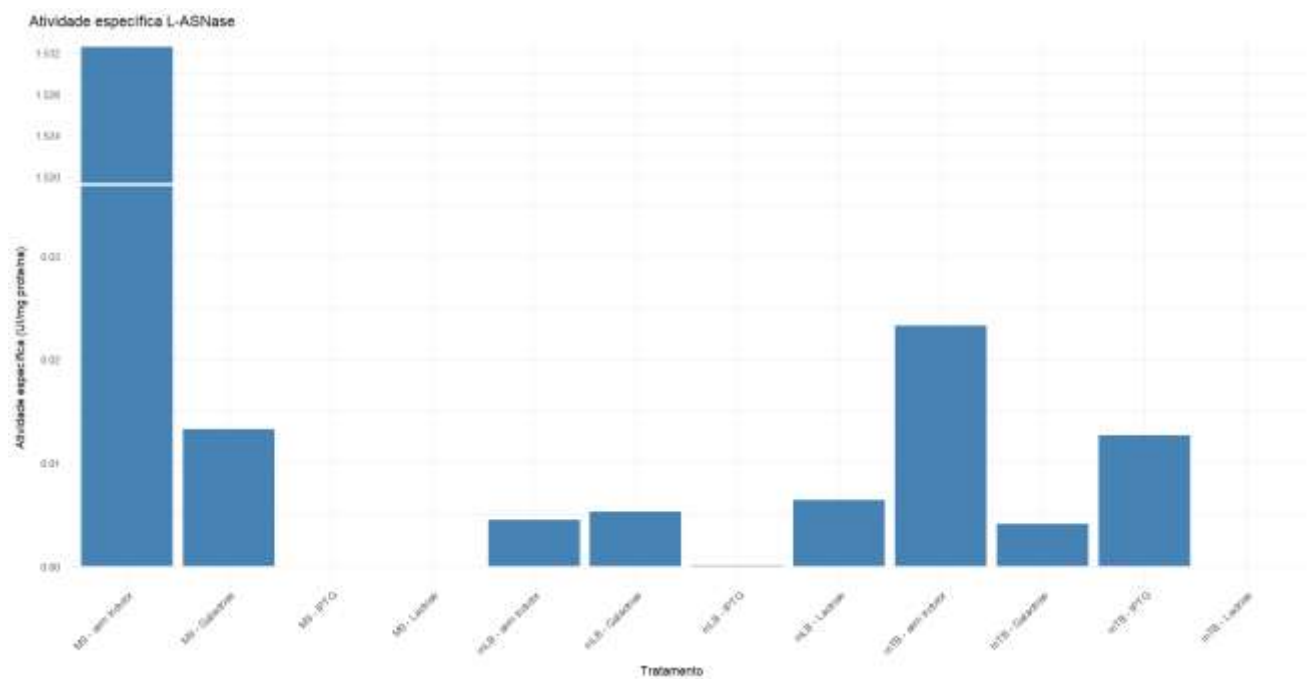


Figura 10. Gráfico apresentando a atividade específica de L-ASNase expressa pelo clone 6 de *E. coli* BL21(DE3), cultivado em sistema de autoindução, a 20 °C, em diferentes meios de cultivo e sob efeito de diferentes agentes indutores. O eixo x representa os diferentes meios utilizados e o eixo y representa a atividade específica em UI/mg de proteína. **Fonte:** do autor.

Assim, com a atividade específica, foi possível observar que o clone 6 cultivado em meio M9 - sem indutor - foi a condição que resultou em maior atividade específica (1,53 UI/mg proteína), seguida pelo cultivo em mTB, também sem indutor (0,023 UI/mg proteína). A atividade específica das condições M9 suplementado com IPTG, lactose, mLB suplementado com IPTG e mTB suplementado com lactose foi extremamente baixa, chegando muitas vezes a 0 UI/mg proteína, como o caso do meio M9 e mTB. Essa baixa concentração se justifica devido à baixa densidade celular, pois trata-se de um meio definido, e com IPTG, um componente citotóxico, pode ter afetado a atividade específica. Há também a possibilidade de

ocorrer sinergismo entre o meio e o indutor, levando ao extravasamento e também à formação de corpos de inclusão.

É importante destacar que dentre as condições avaliadas, as duas melhores atividades específicas foram alcançadas em meios com ausência de adição de indutores. No entanto, o meio complexo mTB, pode apresentar em sua composição galactose e lactose, que podem estar presentes na peptona de soja e extrato de levedura (Nakamura & Akada, 2024; Studier, 2005).

Segundo Andrade et al. (2023), a expressão heteróloga em *E. coli* pode resultar na produção de corpos de inclusão. Alguns fatores, como superprodução devido à presença de um promotor forte - como o IPTG -, incapacidade de realizar modificações pós-traducionais, instabilidade do mRNA, podem levar à formação de agregados insolúveis.

De maneira geral, o perfil proteico confirma os ensaios anteriores. A presença da L-ASNase de *P. cerradense* pode ser observada com maior intensidade nas frações sem indutor (C0), M9 e mTB, indicando que o componente do meio de cultivo pode ter afetado a indução. Em IPTG possivelmente há um extravasamento da enzima recombinante (Figura 11). Ademais, mesmo com a adição de apenas 0,4 mM de galactose e lactose, foi possível observar bandas relativas à L-ASNase de *P. cerradense*.

Nesse estudo, as cepas utilizadas de *E. coli* BL21(DE3) contém uma cópia do gene que codifica a RNA polimerase T7, sob o controle do promotor *lacUV5*, além de deleções nos genes *ompT* e *lon*, que codificam proteases, evitando a degradação da proteína recombinante, pois isso pode afetar a autoindução e expressar a enzima recombinante de forma endógena, o que explica os resultados anteriores.

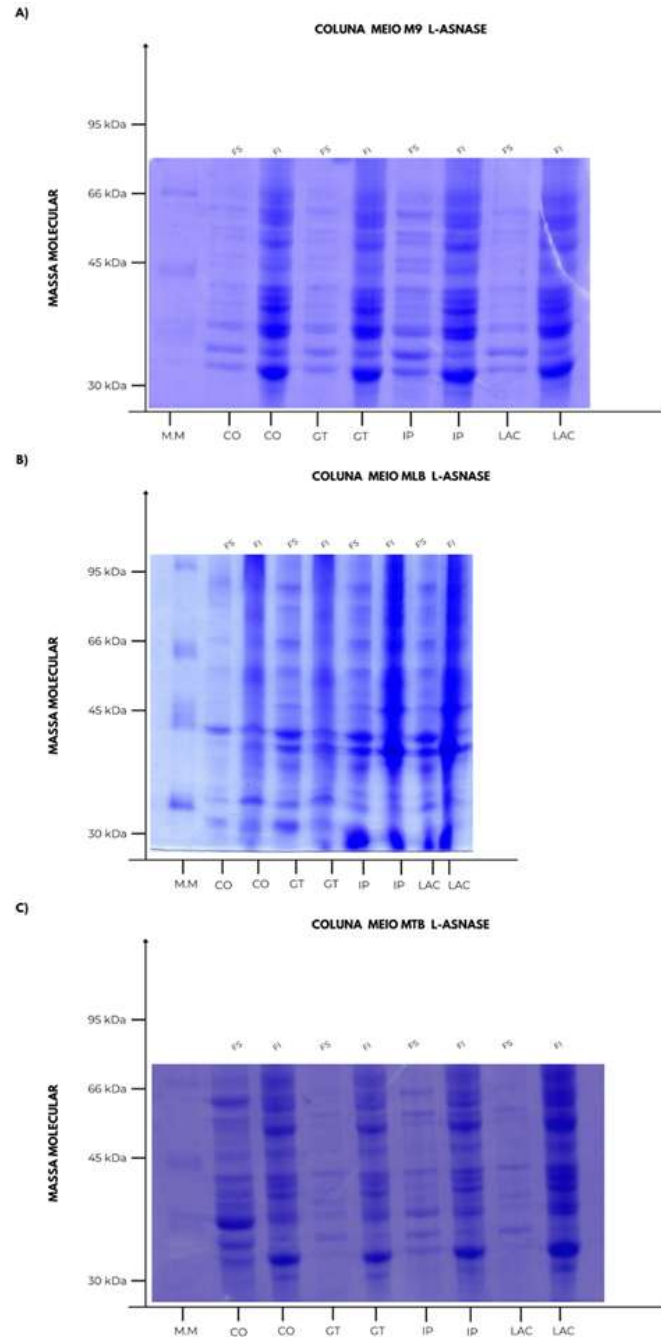


Figura 11, Avaliação da expressão de L-asparaginase por diferentes clones de *E. coli* BL21(DE3). A) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo frações solúveis e insolúveis do extrato proteico em meio M9, resultantes da expressão de L-ASNase clone 6 de *E. coli* BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, GT - galactose, IP - IPTG, LAC - lactose. B) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo frações solúveis e insolúveis do extrato proteico em meio mLb, resultantes da expressão de L-ASNase clone 6 de *E. coli* BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, C0 - clone 0, GT - galactose, IP - IPTG, LAC - lactose. C) Gel de SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue, contendo frações solúveis e insolúveis do extrato proteico em meio mTB, resultantes da expressão de L-ASNase clone 6 de *E. coli* BL21(DE3) contendo o MM - marcador molecular, C0 - clone 0, C0 - clone 0, GT - galactose, IP - IPTG, LAC - lactose. **Fonte:** do autor.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Diante dos resultados expostos, foi possível selecionar o clone 6 para ser utilizado nos estudos de expressão da L-ASNase recombinante e avaliação da expressão da L-ASNase de *P. cerradense* em diferentes meios e indutores, sob autoindução. Na segunda etapa deste trabalho, observou-se que a maior atividade específica foi obtida ao cultivar o clone 6 em sistema de autoindução, em meio M9, na ausência de indutores.

Em 0,4 mM de galactose na peptona de soja há uma indução de proteína, mesmo que em quantidades baixas. Ainda assim, é interessante explorar otimizações da autoindução mediada por galactose em *E. coli* BL21(DE3), visto que a literatura traz resultados promissores com a utilização desses indutores, conforme estudos conduzidos por Xu et al. (2012), por exemplo. Por serem indutores fracos, talvez a utilização de concentrações maiores gere resultados mais significativos. A lactose pode ser hidrolisada em galactose e glicose pelas cepas de *E. coli* BL21(DE3), onde a glicose é utilizada como fonte de carbono e a galactose permanece no meio de cultura como indutor (Xu et al., 2012). Portanto, a galactose pode ser um indutor importante após a lactose ser degradada nesses meios de autoindução que contêm lactose.

A galactose, assim como a lactose, é muito mais barata do que o IPTG para a produção industrial de proteínas recombinantes, o que proporciona ainda mais benefícios de custo (Xu et al., 2012). Além disso, a galactose não pode ser metabolizada pelas cepas de *E. coli* BL21. A autoindução mediada por galactose pode ser vantajosa em relação ao IPTG por ser um indutor mais fraco que o IPTG, pode ser adicionada ao meio sem suprimir o crescimento celular de *E. coli* BL21, permitindo que as culturas atinjam uma densidade significativamente maior, semelhante às culturas não induzidas (Xu et al., 2012).

A galactose pode ser um indutor importante, considerando sua origem natural, baixo custo, baixa toxicidade e uma velocidade de indução baixa. Como desvantagem, a lactose atua tanto como indutor quanto como fonte de carbono durante a fermentação, o que torna o processo mais difícil de controlar e requer uma quantidade maior comparada ao IPTG. Com isso, os estudos futuros devem considerar qual indutor é mais vantajoso para um processo de escalonamento. Assim, estudos posteriores podem ser conduzidos a fim de otimizar as condições de cultivo, como a redução da temperatura e a agitação, níveis de carboidratos no meio de cultivo, com o objetivo de reduzir o metabolismo celular e evitar o extravasamento da proteína recombinante para a fração insolúvel.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOMAKO, J. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia relapse: biomarkers, hopes, and challenges. **Trends in Molecular Medicine**, vol. 31, no 11, p. 1032-1046, 2025.
- ANDRADE, K. C. R. *et al.* A Structural In Silico Analysis of the Immunogenicity of L-Asparaginase from *Penicillium cerradense*. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 25, no 9, 2024.
- ANDRADE, K. C. R. *et al.* Heterologous expression of fungal L-asparaginase: a systematic review. **Future Microbiology**, vol. 19, no 2, p. 157–171, 2023.
- 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. **Scientific Reports**, vol. 11, no 1, 2021.
- BATOOL, T. *et al.* A Comprehensive Review on l-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 178, no 5, p. 900–923, 2016.
- CAI, W. *et al.* Secretory production of L-asparaginase by engineered *Trichoderma reesei* and evaluation of its acrylamide mitigation in breads. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 318, 2025.
- CARDOSO, S. L. *et al.* L-Asparaginase Type II from *Fusarium proliferatum*: Heterologous Expression and In Silico Analysis. **Pharmaceutics**, vol. 15, no 2352, 2023.
- CASTRO, D. *et al.* L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, no 105, p. 4515–4534, 2021.
- CHAND, S. *et al.* A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, vol. 67, no 4, p. 619–647, 2020.
- COLUNGA-PEDRAZA, P. R. *et al.* Diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia in Latin America. **Hematology**, vol. 27, no 1, p. 971–976, 2022.
- DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, vol. 98, no 2, p. 493–501, 1977.
- FREITAS, M. *et al.* Filamentous fungi producing L-asparaginase with low glutaminase activity isolated from Brazilian savanna soil. **Pharmaceutics**, vol. 13, no 8, 2021.
- FREITAS, M. *et al.* L-Asparaginase from *Penicillium sizovae* Produced by a Recombinant *Komagataella phaffii* Strain. **Pharmaceutics**, vol. 15, no 6, 2022.
- HORN, U. *et al.* High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 46, no 5–6, p. 524–532, 1996.

- ISHIZUKA, H. *et al.* A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, vol. 10, no 2, p. 341–350, 1993.
- JOSEPH, B. C.; PICHAIMUTHU, S.; SRIMEENAKSHI, S. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Cell Science & Therapy**, vol. 06, no 05, 2015.
- LABROU, N. E.; PAPAGEORGIOU, A. C.; AVRAMIS, V. I. Structure-Function Relationships and Clinical Applications of L-Asparaginases. **Current Medicinal Chemistry**. vol. 17, no 20, 2010 .
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, vol. 227, p. 680–685, 1970.
- LEFIN, N. *et al.* Current state of molecular and metabolic strategies for the improvement of L-asparaginase expression in heterologous systems. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 14, 2023.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, B. Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>.
- NAKAMURA, M.; AKADA, R. Blending of selected yeast extract and peptone for inducible and constitutive protein production in *Escherichia coli* using the pET system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 138, no 6, p. 548–556, 2024.
- PAGLIARO, L. *et al.* Acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Disease Primers**, vol. 10, no 1, 2024.
- PIETROPAOLI, F. *et al.* Acrylamide in widely consumed foods—a review. [**Food Additives & Contaminants: Part A**. vol. 39, no 5. 2022
- RAFEI, H.; KANTARJIAN, H. M.; JABBOUR, E. J. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, vol. 60, no. 11, p. 2606-2621,2019.
- RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Current Science**. vol. 80, no 9, p. 1121–1128, 2001.
- SAEED, H. *et al.* Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* L-asparaginase in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 106, p. 1041–1051, 2018.
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, vol. 150, no 1, p. 76–85, 1985.
- SODOYER, R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. **BioDrugs**, vol. 18, no 1, p. 51–62, 2004.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, vol. 41, no 1, p. 207–234, 2005.
- STUDIER, F. W. *et al.* Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. **Methods in Enzymology**, vol. 185, p. 60–89, 1990.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. **Journal Molecular Biology**, vol. 189, p. 113–130, 1986.

WALSH, G. **Proteins: Biochemistry and Biotechnology**. 2. ed. Chichester: Wiley Online Library, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The selection and use of essential medicines, 2025. Geneva: World Health Organization, 2025. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/382243>.

XU, J. *et al.* Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains. **Protein Expression and Purification**, vol. 83, p. 30–36, 2012.