



## RESUMO

### Expressão de L-asparaginases de fungos filamentosos em *Escherichia coli* sob promotor constitutivo.

**Palavras-chave:** Leucemias; L-Asparaginase; Expressão Heteróloga, *Penicillium*, *Fusarium*.

Vital, J. A. A.<sup>1\*</sup>; Noronha, E. F.<sup>2</sup>;

Universidade de Brasília<sup>1</sup>, UnB, DF, Mestranda; Universidade de Brasília<sup>2</sup>, UnB, DF, Brasil, Doutora;

Autores correspondentes: [elinoronha@gmail.com](mailto:elinoronha@gmail.com); [jemimaila@gmail.com](mailto:jemimaila@gmail.com);

A enzima L-asparaginase é utilizada no tratamento da Leucemia Linfoblástica aguda (LLA) no Brasil e no Mundo. No Brasil, já se tem um protocolo de tratamento desenvolvido pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) de 2001, utilizando L -asparaginases de origem bacteriana, principalmente de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, as enzimas de origem procariótica apresentam reações adversas e toxicidade, que podem levar à suspensão de sua utilização no tratamento de LLA em alguns pacientes. Desta forma, ainda existe a demanda por fontes alternativas de L-asparaginases tão eficientes quanto às já comercializadas, mas que apresentem menos reações adversas e toxicidade, assim como, sejam produzidas com maior rendimento. Ainda considerando o cenário no Brasil, o SUS apresenta dificuldade no seu abastecimento uma vez que esta enzima é importada. Neste cenário, a presente proposta de pesquisa teve como meta central a obtenção de enzimas de origem eucariótica, fungos filamentosos *Penicillium sizovae* e *Fusarium proliferatum*, por expressão heteróloga para avaliar a sua utilização no desenvolvimento de formulação estável para tratamento de LLA com menos reações adversas e toxicidade e em processo nacional que possa levar à sua produção em larga escala. As sequências dos genes de asparaginases de *P. sizovae* e *F. proliferatum* foram obtidos em trabalho anterior, sintetizados e clonados no vetor pET28A+ pela empresa genone. No presente trabalho, os genes foram subclonados nos vetores da



série pSFOXB (pSFOXB1, 11 e 15), para avaliar a viabilidade de processo de produção por expressão constitutiva em oposição ao indutivo (pET28A+). O DNA plasmidial dos clones pET28AF1 e pET28AP1 foi então digerido com as enzimas de restrição XhoI e NcoI para verificar a presença do inserto e sua eluição do gel para ligação nos vetores de expressão pSFOXB1, pSFOXB11 e pSFOXB15. A digestão foi realizada utilizando-se 1  $\mu$ L DNA plasmidial (equivalente a 300  $\mu$ g), 1  $\mu$ L das enzimas de restrição XhoI (20 U/ $\mu$ L) e NcoI (10 U/ $\mu$ L)), 1  $\mu$ L de tampão rCutSmart\_(10x) e 1  $\mu$ L água Milli-Q para completar o volume de 20  $\mu$ L. Escolha estratégica do vetor de expressão pET28a, conhecido por permitir a rápida e eficiente purificação de proteínas recombinantes de L-asparaginase. Além disso, visando otimizar a seleção e localização de colônias, foram construídos os vetores pSFOXB, cada um com um tamanho específico (pSFOXB1 com 3.859 bp, 11 com 3.858 bp e 15 com 3.857 bp). Foram obtidos clones transformantes para cada uma das construções que estão sendo analisados quanto à presença do inserto e posteriormente, serão analisados quanto à produção da proteína de interesse, presença e atividade. Uma vez obtidas as asparaginases heterólogas estas poderão ser avaliadas na formulação de um fármaco à base de L-asparaginase, meta do projeto no qual a presente proposta de pesquisa está inserida. Serão realizados estudos de toxicidade/melhoramento de fármacos através de modificações químicas ou moleculares no produto original, visando redução da toxicidade do produto final, redução da imunogenicidade. Através dos resultados das corridas em gel de agarose e das transformações que os gêneros *Penicillium* e *Fusarium* demonstraram, conclui-se que os mesmos são importantes fontes de L-asparaginases.