

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE

Jaqueline Bauer Uber (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ione Parra Barbosa-Tessmann (Orientador), e-mail: ipbtessmann@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá

Bioquímica (2.08.00.00-2).

Palavras-chave: L-Asparaginase, Microrganismos, Seleção.

Resumo

A leucemia linfocítica aguda acomete principalmente crianças. O tratamento é feito, entre outros, com a enzima L-asparaginase (L-ASNase) de bactérias. A L-ASNase cliva a L-asparagina (Asn) sanguínea, necessária às células cancerosas. O tratamento pode levar ao surgimento de reações de hipersensibilidade e toxicidade, devido à contaminação com L-glutaminase (L-GLNase) e urease. Portanto, é interessante a busca por microrganismos produtores de L-ASNase sem atividade contaminante. Neste estudo, uma coleção de bactérias e de fungos foi utilizada para a bioprospecção da produção de L-ASNase sem concomitante produção de L-GLNase e urease. Para isso, os microrganismos foram cultivados em meios sólidos com indicador de pH com Ans, L-glutamina ou ureia como fonte de nitrogênio. A alcalinização do meio indicou a quebra dos aminoácidos ou da ureia. A produção quantitativa de L-ASNase foi avaliada em cultura líquida pelos microrganismos selecionados. Os fungos *Beauveria* sp. e *Phomopsis* sp. e as bactérias *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas putida* produziram a enzima L-ASNase em meio sólido e líquido, sendo os maiores produtores o fungo *Beauveria* sp. e a bactéria *P. putida*.

Introdução

A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é a doença maligna mais comum na infância. Na LLA, as células cancerígenas perdem a capacidade de síntese do aminoácido L-asparagina (Asn). A administração de L-asparaginase (L-ASNase) intravenosa degrada a Asn do sangue e faz com que as células cancerígenas morram. A maioria da L-ASNase utilizada como medicamento é obtida das bactérias *Erwinia chrysanthemi* e *Escherichia coli*. Efeitos hepatotóxicos e de hipersensibilidade ocorrem porque a L-ASNase de bactérias tem atividade secundária significativa de L-glutaminase (L-GLNase) e urease (LOPES et al., 2017). Deste modo, há um interesse na bioprospecção de organismos capazes de sintetizar a L-ASNase sem contaminações em escala industrial. Para isso, os microrganismos se destacam, devido ao seu rápido crescimento em substratos baratos, seu alto nível de produção enzimática e sua fácil manipulação genética.

Materiais e métodos

Os microrganismos utilizados, listados nas Tabelas 1 e 2, têm sido mantidos no Laboratório de Bioquímica Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá. Inicialmente, as bactérias foram repicadas em ágar nutriente e os fungos em ágar batata dextrose (BDA). A análise da produção de L-ASNase em meio sólido foi feita em ágar M9 com vermelho de fenol, para bactérias, e em ágar MCD com azul de bromotimol, para fungos, ambos contendo Ans como única fonte de nitrogênio (GULATI et al., 1997). As placas com meio M9 ($\varnothing = 10$ cm) foram inoculadas com picadas de palitos de madeira com bactérias das culturas recentes (8 isolados por placa) e foram incubadas a 37 °C por 24-72 h. As placas com meio MCD ($\varnothing = 5$ cm) foram inoculadas da mesma maneira ou com transferência de um pequeno pedaço (3 mm³) das culturas recentes (um isolado por placa) e foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 3 a 7 dias. A produção de L-GLNase ou urease foi excluída pela substituição da Asn do meio de cultura por L-glutamina ou ureia. A alcalinização do meio pela liberação da amônia evidenciou a produção das enzimas. A alcalinização metabólica do meio foi testada pela substituição da Asn por NaNO₃. Para a avaliação quantitativa da produção de L-ASNase pelos microrganismos selecionados, foi feito um cultivo em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio M9 líquido sem o indicador de pH para bactérias ou 25 mL de meio Czapek Dox para fungos. Para bactérias, o inóculo consistiu de 1 mL de uma pré-cultura agitada (100 rpm) de 24 h, no meio M9 (5 mL em tubos), a 37 °C. Para fungos, o inóculo consistiu de 1 mL de um homogeneizado por passagem por malha de inox e agulha (16G) de uma pré-cultura estacionária de 5 dias, no meio Czapek Dox (25 ml), inoculada com um pedaço (1 cm³) da cultura em BDA, a 25 °C (fotoperíodo de 12 h). Após o inóculo, as bactérias foram cultivadas por 72 h a 37 °C sob agitação de 100 rpm e os fungos foram cultivados da mesma forma, mas a 25 °C. As culturas das bactérias foram centrifugadas (12.000g, 3 min) e as dos fungos foram filtradas em papel de filtro. O filtrado ou sobrenadante das culturas foi utilizado para o ensaio enzimático pelo método de Nessler. Uma unidade de L-ASNase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ M de amônia/mL.min, a 37 °C, com Asn como substrato.

Resultados e Discussão

Os resultados da produção das enzimas em meio sólido são mostrados nas Tabelas 1 e 2 e exemplos de resultados da produção das enzimas nos meios sólidos são mostrados na Figura 1. Os resultados da produção quantitativa de L-ASNase em meio líquido são mostrados na Figura 2. Os fungos *Beauveria* sp. e *Phomopsis* sp. e as bactérias *E. cloacae* e *P. putida* produziram a enzima L-ASNase em meio sólido e líquido, sendo os maiores produtores o fungo *Beauveria* sp. e a bactéria *P. putida*. A produção de L-ASNase por alguns destes microrganismos ou de espécies do mesmo gênero já foi descrita na literatura.

Tabela 1. Produção de atividades de L-ASNase, L-GLNase e urease pelos isolados de bactérias.

Gênero/Espécie ou Família	Isolado	A	G	U	Isolado	A	G	U	Isolado	A	G	U
<i>Klebsiella variicola</i>	CTI 13	-	-	+	FEI3 53	+	-	+	FEI5 89	+	-	+
	CTI 15	-	-	+	MVA 26	-	-	+	FEI5 127	-	-	+
	CTI 40	-	-	+	MVA 35	-	-	+	FEI5 145	-	-	+
	CTI 49	-	-	+	FEI4 3	+	-	-				
	CTI 79	-	-	+	FEI5 8	+	-	-				
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CTI 14	-	-	-	CTI 47	-	-	-	CTI 83	-	-	-
	CTI 16	-	-	-	FEI5 117	-	-	-	CTI 92	-	-	+
	CTI 37	-	-	-	CTI 63	-	-	-	CTI 96	N	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	CTI 38	+	-	-	FEI5 124	+	-	+				
<i>Pseudomonas putida</i>	FEI3 33	+	-	-	FEI3 40	+	-	-				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FEI3 62	+	-	N	FEI4 49	N	N	N	FEI4 108	N	N	N
	FEI4 6	N	N	N	FEI4 92	N	N	+				
	FEI4 13	N	N	N	FEI4 107	N	N	N				
<i>Ochrobactrum</i> sp.	FEI4 16	N	N	N	FEI5 146	-	N	+				
<i>Pantoea dispersa</i>	FEI4 65	N	N	N								
Enterobacteriaceae	FEI5 57	+	-	-								

As fontes de nitrogênio do meio de cultura são indicadas: A – Asn. G – Gln. U – Ureia. (+) Alcalinização do meio. (-) Não alcalinização do meio. N – Não cresceu. Todos os isolados de bactéria não alcalinizaram o meio contendo NaNO₃. Os isolados produtores somente de L-ASNase estão em vermelho.

Tabela 2. Produção de atividades de L-ASNase, L-GLNase e urease pelos isolados de fungos.

Gênero/Espécie	Isolado	A	G	U	NO ₃	Gênero/Espécie	Isolado	A	G	U	NO ₃
<i>Alternaria</i> sp.	UnB 1625	+	-	+	-	<i>Fusarium solani</i>	UnB 622	-	+	+	+
<i>A. alternata</i>	UnB 555	+	-	+	-	<i>F. solani</i> f. sp. piperis	UnB 883	-	N	+	+
<i>Ascochyta pisi</i>	UnB 617	+	-	+	+	<i>F. sporotrichioides</i>	UEL M1-1	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL 5490	+	+	+	+	<i>F. sulphureum</i>	UnB 298	+	+	+	-
<i>A. fumigatus</i>	LEPAC	+	+	+	+	<i>F. tricinctum</i>	UnB 1273	+	+	+	+
<i>A. nidulans</i>	UT448	+	+	+	+	<i>F. verticillioides</i>	CML 767	+	+	+	+
<i>A. westerdijkiae</i>	UEM MGA6	+	+	-	+	<i>Gibberella fugikuroi</i>	NRRL 2278	+	+	+	+
<i>A. parasiticus</i>	UEM 443	+	+	-	+	<i>Monilia fructicola</i>	UEPG 62	N	-	N	-
<i>A. wentii</i>	UEM PG18	+	+	-	-	<i>Penicillium brevicompactum</i>	CMI	+	+	+	-
<i>Beauveria</i> sp.	UEPG 43	+	-	-	-	<i>P. chrysogenum</i>	CMI 37767	-	+	+	-
<i>Cochliobolus</i> sp.	UnB 580	-	-	-	-	<i>P. citrinum</i>	CMI	+	+	+	-
<i>Colletotrichum truncatum</i>	UEPG 14	+	+	+	+	<i>P. cyclopium</i>	CMI	+	+	+	-
<i>Eurotium</i> sp.	UnB 15	+	+	+	+	<i>P. digitatum</i>	UnB 1162	-	+	-	+
<i>Fusarium avenaceum</i>	UnB 1271	+	+	-	+	<i>P. expansum</i>	CMI	+	+	-	-
<i>F. decemcellulare</i>	UnB 459	+	+	+	+	<i>Pestalotia</i> sp.	UnB 754	+	-	-	+
<i>F. decemcellulare</i>	UnB 133	+	+	+	+	<i>Phoma</i> sp.	UnB 614	+	-	+	+
<i>F. graminearum</i>	NRRL 2903	+	+	-	+	<i>Phomopsis</i> sp.	UnB 602	+	-	-	-
<i>F. moniliforme</i>	AHV 9054	+	+	-	+	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	UEPG 57	-	-	-	-
<i>F. subglutinans</i>	UnB 335a	+	+	+	+	<i>Rhizopus arrhizus</i>	CMI 83711	+	+	+	-
<i>F. subglutinans</i>	UnB 202	+	+	+	+	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	UEPG	-	-	-	-
<i>F. subglutinans</i>	UnB 820	+	+	+	+	<i>Sordaria</i> sp.	UnB 37	N	N	N	N
<i>F. oxysporum</i> f. sp. lycopersici	UnB 636	+	+	+	+	<i>Verticillium</i> sp.	UnB 1157	+	-	+	-
<i>F. oxysporum</i> f. sp. tracheiphilum	UnB 199	+	+	-	+						

As fontes de nitrogênio do meio de cultura são indicadas: A – Asn. G – Gln. U – Ureia. NO₃ – NaNO₃. (+) Alcalinização do meio. (-) Não alcalinização do meio. N – Não cresceu. Os isolados produtores somente de L-ASNase estão em vermelho.

Conclusões

Isolados de fungos e bactérias produtores de L-ASNase foram obtidos e futuros estudos de identificação ao nível de espécie dos fungos identificados e de otimização da produção poderão ser realizados, assim como de clonagem de genes e expressão recombinante da proteína.

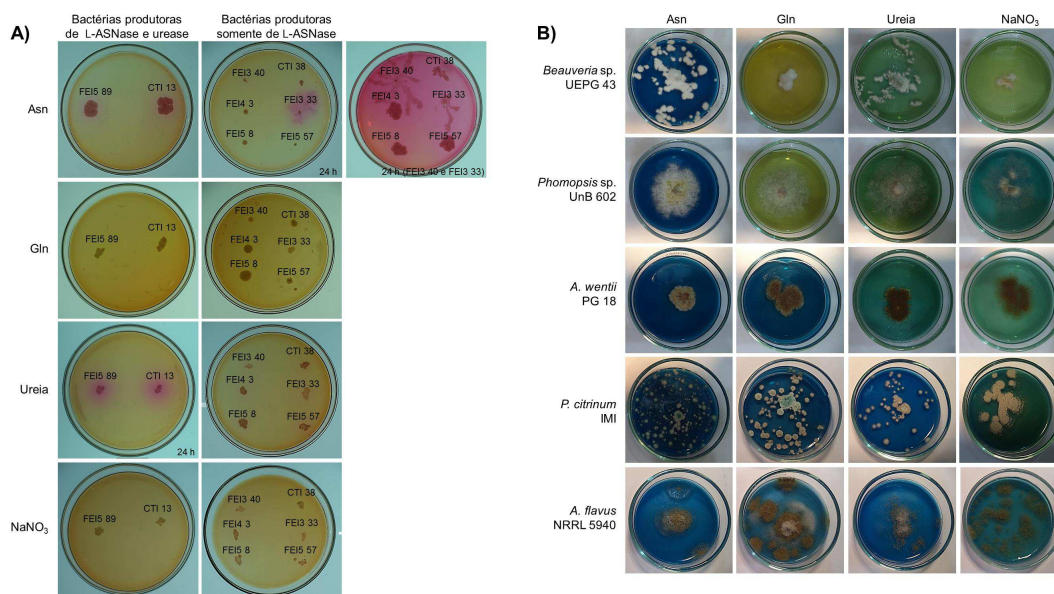


Figura 1 – Exemplos da produção das atividades enzimáticas em meio sólido. A) Bactérias em meio M9 cultivadas a 37 °C por um período de 72 h, a não ser que indicado diferente. B) Fungos em meio MCD cultivados por um período de 5 a 7 dias.

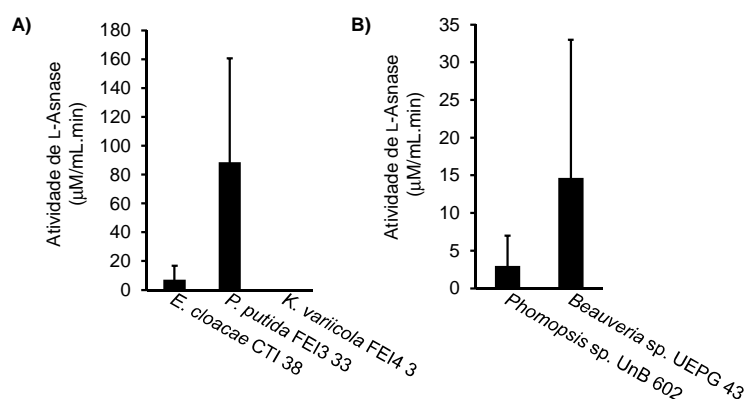


Figura 2 – Avaliação quantitativa da produção de L-ASNase. A) Bactérias. B) Fungos. Os dados são a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em 3 frascos de cultura.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, pela bolsa de iniciação científica concedida.

Referências

GULATI R., et al. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 23–26, 1997.

LOPES A. M., et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 37(1), p. 82–99, 2017.