



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA  
NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**AÇÃO ANTITUMORAL DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA ANTÁRTICA**

**GRECIA ANTONELLA NINA FLORES**

Foz do Iguaçu  
2024



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA  
NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**AÇÃO ANTITUMORAL DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA ANTÁRTICA**

**GRECIA ANTONELLA NINA FLORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz  
Coorientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Foz do Iguaçu  
2024

GRECIA ANTONELLA NINA FLORES

**AÇÃO ANTITUMORAL DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA ANTÁRTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz  
UNILA

---

Coorientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
UNILA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Nathália Corrêa Chagas de Souza  
UNILA

---

Ma. Rayssa de Mello Lopes  
Universidade Federal do ABC

Foz do Iguaçu, 14 de outubro de 2024

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Grecia Antonella Nina Flores

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento	
(.X.) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(.X.) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Ação antitumoral de extratos enzimáticos produzidos por fungos filamentosos isolados da Antártica

Nome do orientador(a): Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

Data da Defesa: 14/10/2024

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 14 de outubro de 2024.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável

**Dedico este trabalho à minha mãe,**

**Gladis e à minha avó, Teresa.**

## AGRADECIMENTOS

Quero, antes de tudo, agradecer a Deus por sempre cuidar de mim. Agradeço à minha querida família, especialmente à minha mãe, Gladis, que sempre me apoia em tudo o que faço, ela é minha heroína, minha força e inspiração. Um agradecimento especial à minha tia Karina, que cuida de mim com tanto carinho, sendo como uma segunda mãe. Às minhas irmãs, Sulay e Briset, por todo o apoio, companhia, e por me darem motivos para ser uma pessoa melhor a cada dia. Também agradeço aos meus primos Anjely e Teylor, com quem compartilhei tantas aventuras e sonhos. Não posso deixar de agradecer ao pilar da nossa família, minha avó Teresa, por nos ensinar a aproveitar a vida e a sempre seguir em frente, ela é nossa maior motivação.

Quero expressar meu carinho aos meus filhos caninos, Canela e Tyson, pela companhia, carinho, fofuras e amor.

Agradeço à família que formei em Foz do Iguaçu, que me acolheu com tanto carinho, especialmente a Jonathan, meu namorado, nakama e companheiro de vida, laboratório, estudo, viagens, lutas, sonhos, etc. Obrigada pelo apoio em todo momento e por me permitir ser eu mesma.

Às minhas amigas queridas que sempre estiveram ao meu lado, um agradecimento especial a Rochi Maria, por sempre estar ficando de olho, pelas noites de estudo, pizzas compartilhadas e por ser luz em momentos difíceis. Nati Maria, minha irmã de coração (embora você seja um pouquinho malvada, rsrs), obrigada por compartilhar tantas loucuras e alegrias comigo. Vivi Maria, minha amiga-tia, pelo carinho e pelas receitas compartilhadas. Embora algumas vezes eu fiquei distante, vocês sempre estiveram ali.

Aos meus queridos amigos Bernie, Lucas, Marcel, Susana, Andrea, Pechu e Eliezer, meu mais sincero agradecimento por todos os momentos incríveis e divertidos que compartilhamos ao longo da graduação, tanto dentro quanto fora da universidade.

Agradeço também a Bruno, Mateo e Julian, pelas vivências, pelas tardes de conversas cheias de risadas e todos os momentos memoráveis. Tenho um enorme carinho por todos vocês.

Quero agradecer aos meus colegas de laboratório, especialmente a Marahia, obrigada por me fornecer os fungos necessários para o desenvolvimento deste trabalho, sem isso, ele não teria sido possível. Karine, Anna Caroline, Santiago e Kiara, agradeço por me ensinarem com paciência a vida no lab e por todos os momentos no laboratório.

Agradeço de coração aos meus professores de graduação, especialmente a Jorge Luis María Ruiz e Michel Rodrigo Zambrano Passarini, por me orientarem na realização do meu TCC, e ao professor Cristian Rojas, pelo apoio em diversos projetos ao longo da minha graduação (quase todos os projetos rsrs). Agradeço aos técnicos, especialmente Carla e Fernando, por toda a ajuda durante os experimentos.

Também quero expressar minha gratidão ao time SynFronteras especialmente aos membros do projeto MHETYGUÁ, foi uma experiência maravilhosa trabalhar com todos vocês, Ghadir, Jams, Júlio e Isa e sou muito grata pelos aprendizados e o tempo compartilhado.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao Elenco Folclórico Latinoamericano, por me dar a oportunidade de me expressar do jeito que eu mais gosto, a dança, algo que amo tanto. Obrigada, Manu, Juli, Mari, Juan Pablo, pelos momentos divertidos, noites de sorvete, pelas risadas, e pelo seu carinho e companhia, eu sempre os levo no meu coração. Também abrigada a Karen, Wilson, Nicole, Maria, Rosa, Alejandro, Nikol, Arnulfo e Enuar, por fazerem parte dessa jornada tão especial.

Finalmente, quero expressar minha profunda gratidão à minha universidade, a UNILA, por ser um ambiente de crescimento, aprendizado e integração. Agradeço por todos os recursos, oportunidades e experiências que me proporcionaram, permitindo-me não só desenvolver minha trajetória acadêmica, mas também vivenciar a riqueza cultural e humana que essa universidade multicultural oferece. Obrigada, UNILA, por fazer parte da minha formação e por ser um espaço onde consegui crescer como pessoa e profissional.

Tupananchiskama

*A ciência tem grande beleza, e um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é também uma criança colocada perante fenômenos naturais que impressionam como um conto de fadas.*

**Marie Curie**

NINA FLORES, Grecia Antonella. **Ação antitumoral de extratos enzimáticos produzidos por fungos filamentosos isolados da Antártica**. 2024. 80 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024.

## RESUMO

A L-asparaginase é uma enzima amplamente utilizada no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e na indústria alimentícia. No contexto terapêutico, sua ação envolve a inibição do crescimento de células tumorais ao reduzir a disponibilidade de asparagina no organismo. Atualmente, as enzimas utilizadas na terapia de LLA são produzidas por *Dickeya chrysanthemi* e *Escherichia coli*, porém, apresentam diversos efeitos adversos, que podem estar relacionados às atividades de glutaminase e urease. A bioprospecção em ambientes frios, como o continente Antártico, surge como uma alternativa promissora para a busca de enzimas com propriedades diferenciadas. Este estudo avaliou a produção de L-asparaginase por 39 fungos isolados de solo e madeira da Ilha Rei George, na Antártica, focando na obtenção de L-asparaginase livre de glutaminase e urease por 39 fungos isolados de amostras de solo e madeira da Antártica. Além disso, foram investigados os efeitos dos extratos fúngicos em células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC), fibroblastos pulmonares humanos normais (MRC-5) e células de adenocarcinoma pancreático (MIA PaCa-2). Dos 39 fungos testados, três apresentaram produção apenas de L-asparaginase. Os fungos isolados de amostras de madeira, FM2.1 e FMR1.1, apresentaram os maiores índices enzimáticos. Os resultados do ensaio MTT mostraram que ambos os extratos fúngicos possuem um IC<sub>50</sub> menor que o do extrato puro, e essa diferença é mais notável na linhagem celular cancerígena MIA PaCa-2 em comparação às outras linhagens não cancerígenas. Na análise de microscopia de fluorescência das MIA PaCa-2, foram observadas deformações no citoesqueleto e no núcleo das células tratadas com os extratos fúngicos em uma concentração de 50%, além de uma redução na quantidade de células, diferente do controle e da concentração de 20%. Esses resultados sugerem que a L-asparaginase produzida pelos fungos antárticos têm potencial para aplicação no tratamento de câncer pancreático, incentivando futuras pesquisas para aprofundar o conhecimento sobre a composição dos extratos e a caracterização enzimática.

**Palavras-chave:** Bioprospecção, L-asparaginase, microrganismos antárticos, ação antitumoral, MIA PaCa-2

NINA FLORES, Grecia Antonella. **Acción antitumoral de extractos enzimáticos producidos por hongos filamentosos aislados de la Antártida**. 2024. 80 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-americana, Foz do Iguaçu, 2024.

## RESUMEN

La L-asparaginasa es una enzima ampliamente utilizada en el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y en la industria alimentaria. En el contexto terapéutico, su acción implica la inhibición del crecimiento de células tumorales al reducir la disponibilidad de asparagina en el organismo. Actualmente, las enzimas utilizadas en la terapia de LLA son producidas por *Dickeya chrysanthemi* y *Escherichia coli*, sin embargo, presentan diversos efectos adversos que pueden estar relacionados con las actividades de glutaminasa y ureasa. La bioprospección en ambientes fríos, como el continente Antártico, surge como una alternativa prometedora para la búsqueda de enzimas con propiedades diferenciadas. Este estudio evaluó la producción de L-asparaginasa por 39 hongos aislados de muestras de suelo y madera de la Isla Rey Jorge, en la Antártida, enfocándose en la obtención de L-asparaginasa libre de glutaminasa y ureasa. Además, se investigaron los efectos de los extractos fúngicos en células endoteliales microvasculares del cerebro humano (HBMEC), fibroblastos pulmonares humanos normales (MRC-5) y células de adenocarcinoma pancreático (MIA PaCa-2). De los 39 hongos probados, tres presentaron producción únicamente de L-asparaginasa. Los hongos aislados de muestras de madera, FM2.1 y FMR1.1, presentaron los mayores índices enzimáticos. Los resultados del ensayo MTT mostraron que ambos extractos fúngicos tienen un IC<sub>50</sub> menor que el extracto puro, y esta diferencia es más notable en la línea celular cancerosa MIA PaCa-2 en comparación con las otras líneas no cancerosas. En el análisis de microscopía de fluorescencia de las MIA PaCa-2, se observaron deformaciones en el citoesqueleto y en el núcleo de las células tratadas con los extractos fúngicos en una concentración del 50%, además de una reducción en la cantidad de células, diferente del control y de la concentración del 20%. Estos resultados sugieren que la L-asparaginasa producida por los hongos antárticos tiene potencial para su aplicación en el tratamiento del cáncer pancreático, incentivando futuras investigaciones para profundizar el conocimiento sobre la composición de los extractos y la caracterización enzimática.

**Palabras clave:** Bioprospección, L-asparaginasa, microorganismos antárticos; Acción antitumoral, MIA PaCa-2

NINA FLORES, Grecia Antonella. **Antitumoral action of enzymatic extracts produced by filamentous fungi isolated from Antarctica.** 2024. 80 pages. Undergraduate Thesis (Bachelor's in Biotechnology) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024.

### **ABSTRACT**

L-asparaginase is an enzyme widely used in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and in the food industry. In the therapeutic context, its action involves inhibiting the growth of tumor cells by reducing the availability of asparagine in the body. Currently, the enzymes used in ALL therapy are produced by *Dickeya chrysanthemi* and *Escherichia coli*, however, they present several adverse effects that may be related to glutaminase and urease activities. Bioprospecting in cold environments, such as the Antarctic continent, emerges as a promising alternative for the search for enzymes with differentiated properties. This study evaluated the production of L-asparaginase by 39 fungi isolated from soil and wood samples from King George Island, in Antarctica, focusing on obtaining L-asparaginase free of glutaminase and urease. Additionally, the effects of fungal extracts on human brain microvascular endothelial cells (HBMEC), normal human lung fibroblasts (MRC-5), and pancreatic adenocarcinoma cells (MIA PaCa-2) were investigated. Of the 39 fungi tested, three showed production of L-asparaginase only. The fungi isolated from wood samples, FM2.1 and FMR1.1, showed the highest enzymatic indices. MTT assay results showed that both fungal extracts have a lower IC<sub>50</sub> than the pure extract, and this difference is more noticeable in the MIA PaCa-2 cancer cell line compared to other non-cancerous lines. In the fluorescence microscopy analysis of MIA PaCa-2, deformations in the cytoskeleton and nucleus of cells treated with the fungal extracts at a 50% concentration were observed, in addition to a reduction in the number of cells, differing from the control and the 20% concentration. These results suggest that L-asparaginase produced by Antarctic fungi has potential for application in pancreatic cancer treatment, encouraging further research to deepen the understanding of the extract composition and enzymatic characterization.

**Keywords:** Bioprospecting, L-asparaginase, Antarctic microorganisms, antitumor activity, MIA PaCa-2

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Capacidades adquiridas e características facilitadoras do câncer .....	22
<b>Figura 2</b> - Números estimados de câncer de 2022 a 2050, de homens e mulheres, idade [0-85+] .....	28
<b>Figura 3</b> - Incidência (A) e mortalidade (B) do câncer em 2022 na América Latina..	28
<b>Figura 4</b> - Números absolutos, Incidência e Mortalidade de Leucemia no mundo (A) e na América Latina e Caribe (B) , Ambos os sexos, idade [0-14], em 2022 .....	29
<b>Figura 5</b> - (A) Localização do continente Antártico em relação à América do Sul. (B) Comparação da área territorial do Brasil com aquela do Continente Antártico .....	31
<b>Figura 6</b> - Mapa da Ilha Rei George e Estação de pesquisa Comandante Ferraz ...	32
<b>Figura 7</b> - Ação hidrolítica da L-asparaginase .....	35
<b>Figura 9</b> - Metodologia da triagem enzimática da L-asparaginase livre de glutaminase e urease e produção do extrato fúngico .....	43
<b>Figura 10</b> - Triagem enzimática da produção de L-asparaginase dos fungos isolados da amostra de madeira (FM) .....	47
<b>Figura 11</b> - Triagem enzimática da produção de L-asparaginase dos fungos isolados da amostra de madeira (FMR) .....	48
<b>Figura 12</b> - Triagem enzimática da produção de L-asparaginase dos fungos isolados da amostra de solo (FA) .....	49
<b>Figura 13</b> - Triagem enzimática da produção de L-asparaginase dos fungos FM2.1, FM2.2 e FMR1.1 em triplicata .....	50
<b>Figura 14</b> - Triplicata do cultivo em meio líquido dos fungos FM2.1 e FMR1.1, e o controle (extrato puro) a 15°C .....	52
<b>Figura 15</b> - Cultivo em meio líquido dos fungos FM2.1 e FMR1.1 a 30°C .....	53
<b>Figura 16</b> - Placas de 96 poços utilizadas no ensaio MTT com células HBMEC, MRC-5 e Mia PaCa-2 .....	54
<b>Figura 17</b> - Análise morfológica do núcleo e citoesqueleto das células Mia PaCa-2 tratadas com extrato FMR1.1 nas concentrações de 20% e 50%, extrato puro e o controle (CT) .....	63
<b>Figura 18</b> - Análise morfológica do núcleo e citoesqueleto das células Mia PaCa-2	

tratadas com extrato fúngico FM2.1 nas concentrações de 20% e 50%, o extrato  
puro e o controle (CT) .....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Origem e denominação das amostras coletadas .....	41
<b>Tabela 2</b> - Índices enzimáticos da triagem enzimática da produção de L-asparagina dos fungos FM2.1, FM 2.2 e FMR1 .....	51
<b>Tabela 3</b> - Pesos da biomassa dos fungos FM2.1 e FMR1.1, obtidos após o cultivo a 15 °C .....	53

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Comparação dos índices enzimáticos dos fungos FM2.1, FM2.2 e FMR1.1.....	52
<b>Gráfico 2</b> - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre FM2.1-1 e FM2.1-2 em células HBMEC .....	55
<b>Gráfico 3</b> - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre FMR1.1-1 e FMR1.1-2 em HBMEC.....	56
<b>Gráfico 4</b> - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre os diferentes tratamentos em células HBMEC .....	57
<b>Gráfico 6</b> - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre os diferentes tratamentos em células MRC-5 .....	58
<b>Gráfico 7</b> - Curvas de viabilidade celular e valores de IC50 dos tratamentos com extratos fúngicos e extrato puro em células MRC-5.....	59
<b>Gráfico 8</b> - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre os diferentes tratamentos em células MIA PaCa-2.....	60
<b>Gráfico 9</b> - Curvas de viabilidade celular e valores de IC50 dos tratamentos com extratos fúngicos e extrato puro em células MIA PaCa-2.....	60
<b>Gráfico 10</b> - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre o tratamento com o extrato do fungo FM2.1 e o extrato puro em células MIA PaCa-2 .....	61
<b>Gráfico 11</b> - Curvas de viabilidade celular e valores de IC50 dos tratamentos com o extrato fúngico de FM 2.1 e extrato puro em células MIA PaCa-2 .....	62
<b>Gráfico 12</b> - Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT em MIA PaCa-2 ao ser tratado com distintas concentrações dos controles .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASN	Asparagina
ASNS	Asparagina sintetase
CAMs	Moléculas de adesão célula-célula
CAF	Fibroblastos associados ao câncer
CE	Células Endoteliais
CT	Controle
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FGFs	Fatores de crescimento fibroblásticos
Gln	Glutamina
GOT2	Glutamato-oxaloacetato transaminase 2
HBMEC	Células endoteliais microvasculares do cérebro humano
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitoria 50 %
L-ASNase	L-asparaginase
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
MCD	Meio Czapek Dox modificado
MEC	Matriz Extracelular
MIA PaCa-2	Linhagem de células de câncer pancreático humano
MRC-5	Fibroblastos pulmonares humanos normais
MTT	Ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBT	Polibutileno Tereftalato
PDA	Ágar Batata dextrose
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreático
pRb	Proteína retinoblastoma

SASP	Fenótipo Secretor Associado à Senescência
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TME	Microambiente tumoral
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1. O CÂNCER .....	21
2.1.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	29
2.2. ECOSSISTEMA ANTÁRTICO E BIODIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA .....	30
2.3. ENZIMAS ADAPTADAS AO FRIO .....	33
2.4. L-ASPARAGINASE.....	34
2.4.1. L-ASPARAGINASE LIVRE DE UREASE E GLUTAMINASE NO TRATAMENTO DO CÂNCER .....	35
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
4.1. OBJETIVO GERAL .....	40
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
5.1. ORIGEM DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS.....	41
5.2. TRIAGEM QUALITATIVA DA L-ASPARAGINASE LIVRE DE GLUTAMINASE E UREASE .....	41
5.3. CULTIVO DE CÉLULAS .....	43
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL (ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR) .....	44
5.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CITOESQUELETO E NÚCLEO DAS CÉLULAS....	45
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
6.1. TRIAGEM QUALITATIVA DA L-ASPARAGINASE LIVRE DE GLUTAMINASE E UREASE .....	47
6.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	54
6.2.1. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS HBMEC.....	55
6.2.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MRC-5 .....	58
6.2.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS Mia PaCa-2.....	59
6.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CITOESQUELETO E NÚCLEO DAS CÉLULAS....	63
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças mais temidas pela humanidade, sendo o responsável por uma grande quantidade de mortes, há evidências de sua presença em espécimes paleontológicos, datado de 340 milhões de anos, e em múmias do Egito antigo, com relatos de casos cirúrgicos que datam de 1600 a.C. (Sudhakar, 2009; Galassi *et al.*, 2024). O termo "câncer", originado do grego "καρκίνοσ", foi utilizado por Hipócrates para descrever tumores. Atualmente o câncer abrange mais de 100 doenças distintas, cada uma com suas características de origem, diagnóstico e tratamento (Galassi *et al.*, 2024; Hanahan & Weinberg, 2011). No câncer as células cancerígenas em vez de sofrer apoptose, se proliferam descontroladamente devido a mutações no DNA (Hausman, 2019).

Hanahan (2022) agrupou 14 características do câncer, incluindo a evasão da morte celular e a capacidade de induzir angiogênese, fundamentais para a progressão da doença. Em 2022, foram registrados aproximadamente 20 milhões de novos casos de câncer, com a expectativa de que esse número alcance 35,3 milhões até 2050 (Ferlay *et al.*, 2024).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma das formas mais comuns de câncer infantil e é causada por mutações nas células precursoras do sistema linfóide impedindo seu desenvolvimento normal, o que resulta na produção excessiva de linfoblastos (Karunarathna *et al.*, 2024). O tratamento da LLA geralmente é dividido em quatro etapas, a etapa de terapia de indução, profilaxia do sistema nervoso central, intensificação e terapia de manutenção (Seth & Singh, 2015). Um dos medicamentos utilizados no tratamento é a L-asparaginase (L-ASNase), essa enzima desempenha um papel crucial, pois age na diminuição da concentração de asparagina, um aminoácido essencial para a proliferação de células leucêmicas (Huang *et al.*, 2022).

A L-ASNase é uma enzima amido-hidrolase que pertence ao grupo das enzimas amidase (EC 3.5.1.1), ela catalisa a hidrólise da L-asparagina em duas etapas: inicialmente, um resíduo nucleofílico ataca o átomo de carbono amida da L-asparagina, liberando amônia e formando um intermediário beta-acil-enzima, na segunda etapa, o nucleófilo ativado pela água ataca o carbono do éster, resultando na formação de L-aspartato (Tandon, 2021; Lefin *et al.*, 2023; Nunes *et al.*, 2020).

Apesar de sua eficácia, o uso de L-ASNase obtida de fontes bacterianas, como *Escherichia coli* e *Dickeya chrysanthemi*, pode provocar efeitos adversos

significativos, incluindo neurotoxicidade e pancreatite, atribuídos principalmente à atividade de glutaminase associada à L-ASNase. Além disso, a presença de urease nas preparações comerciais pode gerar amônia tóxica, reduzindo a eficácia da L-ASNase como agente terapêutico e exigindo etapas adicionais de purificação (Beckett & Gervais, 2019; Egler *et al.*, 2016). Em resposta a esses desafios, pesquisas recentes têm se concentrado na busca de microrganismos produtores de L-ASNase livre de glutaminase e urease (Arumugam & Thangavelu, 2022; Ashok *et al.*, 2019).

A biodiversidade microbiana da Antártica, notoriamente adaptada a condições extremas, oferece uma oportunidade promissora para a descoberta de novas fontes de L-ASNase. Os fungos isolados desse ecossistema têm demonstrado potencial para a produção de L-ASNase livre de glutaminase e urease (Ashok *et al.*, 2019; Da Cunha *et al.*, 2019; Doriya & Kumar, 2016). Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivos bioprospectar microrganismos isolados de amostras de solo e madeira com potencial para a produção da enzima L-asparaginase livre de glutaminase e urease, além de avaliar o efeito dos extratos fúngicos em três tipos de linhagens celulares, duas normais que incluem as células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC) e os fibroblastos pulmonares humanos normais (MRC-5) e uma linhagem cancerígena, as células de adenocarcinoma pancreático (MIA PaCa-2).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O CÂNCER

O câncer é uma das doenças mais temidas pela humanidade, pois é uma das principais causas da maior quantidade de mortes ao redor do mundo. Mas não é uma doença nova, muito pelo contrário existem evidências do câncer desde a antiguidade. Graças à paleontologia foi possível analisar amostras de seres como o *Dinichthys*, um vertebrado extinto que viveu antes dos dinossauros, há 340 milhões de anos. Nele, identificou-se uma cavitação na superfície interna da mandíbula, indicando um possível processo oncológico (Galassi *et al.*, 2024).

Além dessas descobertas, o câncer foi encontrado em múmias do antigo Egito e relatado em manuscritos antigos de aproximadamente 1600 a.C. (Sudhakar, 2009). Existe um papiro, descoberto por Edwin Smith, que descreve 45 casos cirúrgicos de câncer de mama. Em outra época, na Índia há 2.500 anos atrás o câncer já era corretamente diagnosticado, porém não existia cura, o tratamento era apenas paliativo, e para os tumores superficiais, eles eram removidos por cirurgia como se faz atualmente (Saito *et al.*, 2015). O termo câncer vem do grego *καρκίνοσ* que significa cangrejo, essa palavra foi usada pelo médico Hipócrates (460-370 a.C.) para descrever os tumores do carcinoma. Na atualidade, o câncer representa o conjunto de mais de 100 doenças que se diferem por sua origem, diagnóstico, tratamento, progressão, etc. (Galassi *et al.*, 2024; Hanahan & Weiberg, 2011; Saito *et al.*, 2015).

No câncer, as células do indivíduo sofreram mutações no DNA que o corpo não conseguiu reparar, afetando nos mecanismos que controlam o crescimento e a morte celular, levando as células a crescer e se dividir de maneira descontrolada, em vez de morrer como deveriam, esse processo pode ocorrer em qualquer parte do corpo e resultar na formação de tumores. Além disso, as células cancerígenas têm a capacidade de invadir tecidos adjacentes e se espalhar para outras partes do organismo, o que torna a doença mais grave e difícil de tratar. (Hausman, 2019; Saito *et al.*, 2015; Sudhakar, 2009).

Hanahan (2022), agrupou 14 características do câncer, entre elas: 9 capacidades marcantes adquiridas, 4 características facilitadoras e um componente genérico do microambiente tumoral (TME) representados na Figura 1.

**Figura 1** - Capacidades adquiridas e características facilitadoras do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

**A. Capacidades adquiridas:**

- a. Capacidade adquirida para manter a sinalização proliferativa, as células normais precisam de sinais de crescimento mitogênico para estar num estado proliferativo ativo, a transmissão desses sinais para as células se dá mediante os receptores transmembrana que são ligadas a diferentes moléculas de sinalização, como os fatores de crescimento difusíveis, componentes da matriz células e moléculas de adesão ao contrário das células tumorais, as quais reduziram sua dependência exógena, já que elas geram seus próprios sinais de crescimento.
- b. A evasão dos supressores de crescimento (insensibilidade a sinais de anti crescimento), num tecido normal, operam muitos sinais antiproliferativos para manter a homeostase tecidual e a quiescência celular, como os inibidores de crescimento solúveis e inibidores imobilizados na matriz extracelular e na superfície das células, no nível molecular, a maioria e provavelmente todos esses sinais são canalizados através da proteína retinoblastoma (pRb) e seus dois

parentes, p107 e p130, a interrupção da via pRb libera E2Fs (fatores de transcrição que controlam a expressão de genes essenciais para o passo da fase G1 a S), permitindo assim a proliferação celular, tornando as células insensíveis a os fatores de anti crescimento, além disso as células tumorais também evitam a diferenciação celular superexpressando a oncoproteína c-Myc.

- c. A resistência à morte celular (evitando a apoptose), a apoptose está presente em todos os tipos de células do corpo, este processo está dividida em duas classes de componentes, os sensores (responsáveis por monitorar o ambiente extra ou intracelular em busca de condições normais ou não para decidir o futuro da célula) e os efetores (sentinelas que incluem receptores de superfície celular que ligam fatores de sobrevivência ou morte) a resistência à apoptose das células cancerígenas pode ser devido a várias estratégias, como a perda dum regulador pró-apoptótico, a mutação do gene supressor de tumor p53, ativação da via PI3 quinase, por fatores extracelulares como IGF-1/2 ou IL-3, sinais intracelulares emanados por Ras ou perda do supressor tumoral pTEN.
- d. Permitir a imortalidade replicativa (potencial replicativo ilimitado), em algum momento durante o curso da progressão tumoral em múltiplas etapas, as populações de células pré-malignas em evolução rompem a barreira da mortalidade (mantendo os telômeros) e adquirem o potencial replicativo ilimitado.
- e. Indução/acesso a vasculatura (angiogênese Sustentada), a vasculatura é crucial para a função e sobrevivência celular, já que fornece oxigênio e nutrientes, depois da formação de um tecido, o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) é transitório e cuidadosamente regulado, as células tumorais parecem ativar o interruptor angiogênico, alterando o equilíbrio dos indutores da angiogênese e dos inibidores compensatórios, como a expressão aumentada de VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e/ou FGFs (fatores de crescimento fibroblásticos).
- f. Ativação da invasão tecidual e metástase, durante o desenvolvimento da maioria dos tipos de câncer, as massas tumorais primárias geram

células que se deslocam, invadindo tecidos adjacentes e daí viajam para locais distantes onde podem ter sucesso na fundação de novas colônias, tais assentamentos distantes de células tumorais (metástase) causa de 90% das mortes por câncer humano, nesse caso, várias proteínas envolvidas na ligação das células ao seu entorno em um tecido são alteradas em células que possuem capacidades invasivas ou metastáticas, as proteínas afetadas incluem moléculas de adesão célula-célula (CAMs).

- g. Desregular o metabolismo celular (reprogramação do metabolismo energético), às células normais processam a glicose, em condições anaeróbicas, primeiro em piruvato através da glicólise no citosol e depois em CO<sub>2</sub> nas mitocôndrias, e em condições anaeróbicas, a glicólise é favorecida, por outra parte, as células cancerígenas podem reprogramar seu metabolismo de glicose mesmo na presença de oxigênio, assim limitando seu metabolismo energético a glicólise (glicólise aeróbica), o abastecimento glicolítico está associado a oncogenes ativados como o RAS e MYC, e supressores de tumor mutantes como o TP53, o aumento da glicólise permite o desvio de intermediários glicolíticos para várias vias biossintéticas, incluindo aquelas que geram nucleosídeos e aminoácidos, facilitando a biossíntese de macromoléculas e organelas necessárias para geração de novas células.
- h. Evitar a destruição imunitária, o sistema imunitário está constantemente monitorando as células e tecidos e é capaz de reconhecer e eliminar a grande maioria de células cancerígenas incipientes, nesse sentido os tumores sólidos parecem ter conseguido de alguma forma evitar a detecção ou foram capazes de limitar a extensão da morte imunológica, por exemplo as células cancerosas podem paralisar Linfócitos T citotóxicos (CTLs) infiltrantes e células *Natural Killer*, secretando TGF- $\beta$  ou outros fatores imunossupressores, têm mecanismos mais sutis que operam através do recrutamento de células inflamatórias que são ativamente imunossupressoras, como as T reguladoras e células supressoras derivadas de mieloides, ambas podem suprimir as ações dos linfócitos citotóxicos.

- i. Desbloquear a plasticidade celular, a plasticidade fenotípica permite várias formas de interrupção na diferenciação celular, (1) como a desdiferenciação de estados maduros para progenitores, (2) diferenciação bloqueada de estados de células progenitoras e (3) a transdiferenciação em células de diferentes linhagens. Essas subclasses de plasticidade fenotípica atuam em vários tipos de câncer durante a formação do tumor primário, progressão maligna e/ou resposta à terapia.

**B. Capacidades adquiridas:**

- a. Inflamação promotora do tumor, as lesões neoplásicas contêm células do sistema imunitário, que variam desde infiltrações subtis até inflamações grosseiras, inflamação pode contribuir para múltiplas capacidades marcantes, fornecedor moléculas bioativas ao microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência, fatores pró-angiogênicos, enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogênese, invasão e metástase, etc. Além disso, as células inflamatórias podem liberar produtos químicos, que são ativamente mutagênicos para células cancerígenas próximas, acelerando a sua evolução genética a estados de malignidade elevada.
- b. Instabilidade e mutação do genoma, durante cada geração celular as taxas de mutação espontânea são geralmente muito baixas, pela capacidade dos sistemas de manutenção do genoma para detectar e resolver defeitos no DNA. Para que aconteça a tumorigênese, tem que ser adquiridos uma lista de genes mutantes, ali as células cancerosas aumentam as mutações, isso é conseguido por meio do aumento da sensibilidade aos agentes mutagênicos, através da quebra de um ou vários componentes da maquinaria de manutenção genômica, e o acúmulo de mutações pode ser acelerado comprometendo os sistemas que monitoram a integridade genômica e forçam as células danificadas a apoptose, como o TP53 é chamado guardião do genoma. As células neoplásicas, dependem em grande parte da sucessão de alterações nos seus genomas, a progressão tumoral é uma sucessão de expansões

clonais, e cada uma é desencadeada pela aquisição casual de um genótipo mutante. Os fenótipos hereditários, podem ser adquiridos através de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e modificações de histonas, o que resulta na inativação de genes supressores de tumor. A instabilidade do genoma é inerente a grande maioria das células cancerígenas e os defeitos na manutenção e reparação do genoma são vantajosos para progressão do tumor

- c. A reprogramação Epigenética não mutacional, envolve alterações na expressão gênica sem mutações genéticas e pode ser um fator importante na evolução do câncer. Este conceito sugere que o câncer pode se desenvolver através de mudanças epigenéticas semelhantes às que ocorrem no desenvolvimento embrionário e na homeostase dos tecidos. Alguns exemplos incluem o MET, como a hipóxia, pode causar mudanças no epigenética das células cancerígenas, como a hipermetilação do DNA, outro exemplo é a heterogeneidade dentro dos tumores, que é crucial para a diversidade fenotípica e também tem a regulação das células estromais no microambiente tumoral, essas células são modificadas para apoiar a progressão do câncer. Essa característica é fundamental para a plasticidade fenotípica, exclusivamente ao impulsionar a heterogeneidade transcriptômica dinâmica nas células cancerígenas.
- d. Microbiomas Polimórficos, a diversidade dos microrganismos que vivem em simbiose com os tecidos do corpo como a pele e as mucosas internas, têm um impacto profundo na saúde e nas doenças, os microrganismos poderiam ter efeitos protetores ou prejudiciais no desenvolvimento do câncer, na progressão maligna e na resposta a terapia, por exemplo o microbioma intestinal desempenha um papel crucial na homeostase metabólica e sua disbiose está associada ao câncer de cólon, mecanismos incluem a produção de toxinas bacterianas que danificam o DNA e estimulam a proliferação epitelial, além disso certas bactérias produzem butirato que pode induzir senescência celular e inflamação imunossupressora, promovendo a tumorigênese.

C. *Componente genérico do TME (microambiente tumoral):*

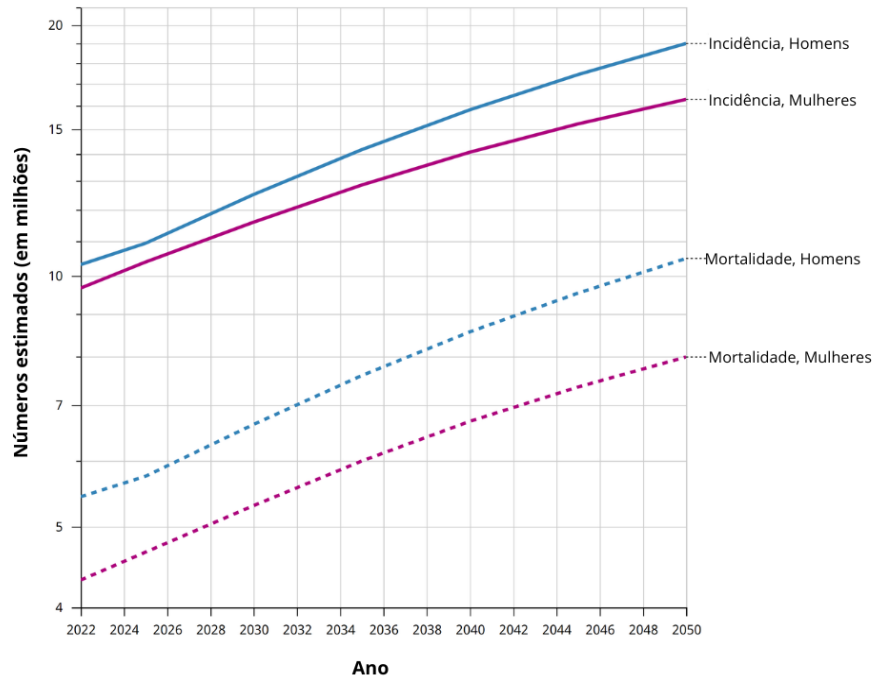
- a. Células Senescentes, a senescência celular é uma forma irreversível de parada proliferativa, evoluiu como um mecanismo protetor para manter a homeostase tecidual e evitar a neoplasia inativando as células doentes ou disfuncionais. Este processo inclui mudanças na morfologia e no metabolismo celular, assim como a ativação de um fenótipo secretor associado à senescência (SASP) a qual libera proteínas bioativas como quimiocinas e citocinas, mas paradoxalmente este processo pode promover o desenvolvimento tumoral em certos contextos, como ao liberar moléculas sinalizadoras que estimulam a proliferação celular, angiogênese, invasão e supressão imunológica, este efeito não só é observado em células cancerígenas senescentes, também em fibroblastos associados ao câncer (CAF) e outras células estromais no TME, e através do fenótipo secretor associado à senescência (SASP) modulam a resposta imune facilitando assim a progressão do tumor, além disso as células senescentes podem reverter a sua condição e retomar a proliferação contribuindo para a resistência terapêutica.

Com relação aos dados de mortalidade, em 2022, cerca de 9,7 milhões de óbitos por câncer foram registrados no mundo. Já para o número de casos novos, foram diagnosticados cerca de 20 milhões, sendo o mais frequente de câncer de mama, seguido por pulmão, colorretal, próstata e estômago. A estimativa é de que a carga global da doença seja de 35,3 milhões de casos até 2050, devido às mudanças demográficas e ao aumento dos fatores de risco relacionados à globalização (Figura 2).

No contexto da América Latina e do Caribe, a incidência dos diferentes tipos de câncer variam entre os países (Figura 3A). Em termos de mortalidade também varia de acordo com a região, como observado na Figura 3B o câncer de pulmão é a principal causa de morte no Brasil, Argentina, Venezuela, Uruguai, Chile, Cuba e Paraguai, por outro lado, no Panamá, Haiti e República Dominicana é o câncer de próstata, na Colômbia, Equador, Costa Rica, El Salvador e Peru, o câncer do colo do estômago se destaca, na Bolívia e Honduras, o câncer de colo de útero é o mais comum, enquanto na Guatemala e Nicarágua é o câncer de fígado e finalmente no

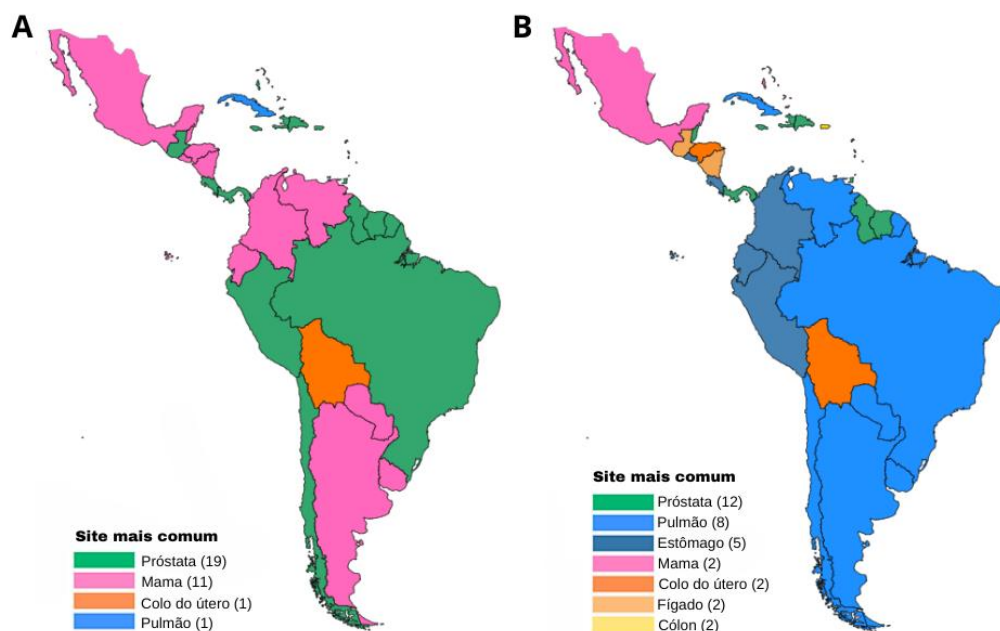
México, o câncer de mama. Porém, os tipos de câncer mencionados prevalecem em toda América Latina e o Caribe (Ferlay *et al.*, 2024).

**Figura 2** - Números estimados de câncer de 2022 a 2050, de homens e mulheres, idade [0-85+]



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN 2022.

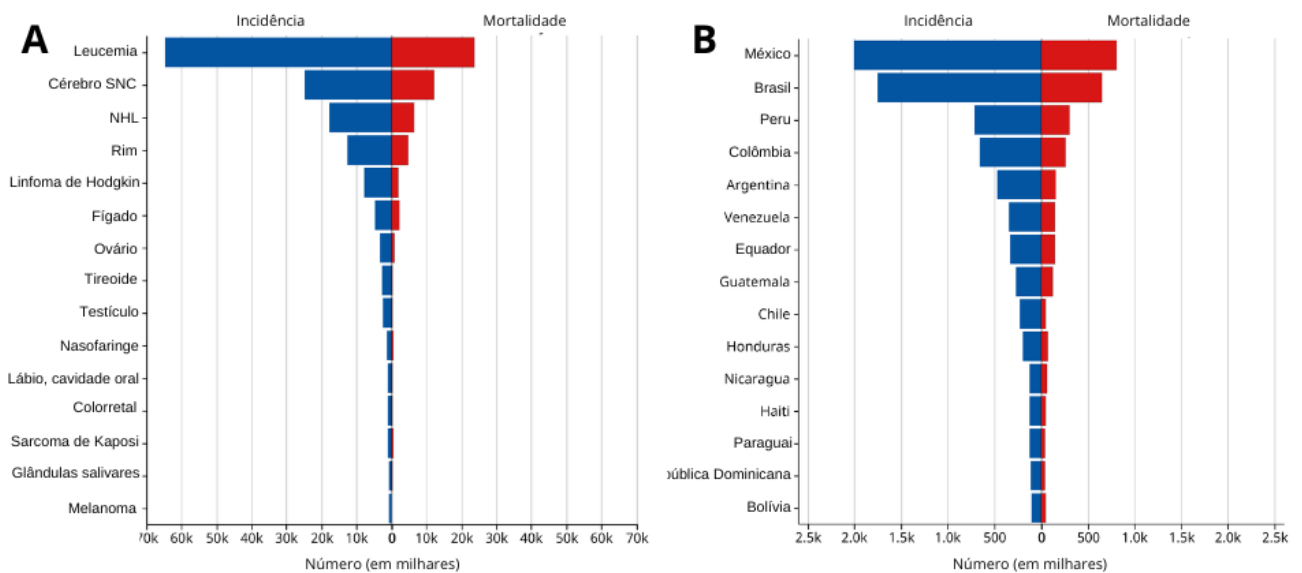
**Figura 3** - Incidência (A) e mortalidade (B) do câncer em 2022 na América Latina



O câncer geralmente se desenvolve como um tumor sólido, no entanto, cânceres hematológicos, como leucemias, linfomas e mielomas, são classificados como tumores líquidos (Sudhakar, 2009). Às leucemias estão relacionadas ao sangue e os tecidos produtores de células sanguíneas, é caracterizada pela produção anormal de células sanguíneas levando a interrupção da função normal da medulas e a insuficiência medular, interferindo na produção de células sanguíneas normais. Os principais tipos de leucemia incluem a leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC) (Huang *et al.*, 2022; Seth & Singh, 2015)

O câncer infantil, embora raro, também afeta crianças e adolescentes. De acordo com o GLOBOCAN (2022), a leucemia é o tipo de câncer que apresenta as maiores taxas de incidência e mortalidade em pacientes menores de 15 anos (Figura 4A). No contexto da América Latina e o Caribe, o México e o Brasil destacam-se como os países com maior incidência e mortalidade dessa doença (Figura 4B).

**Figura 4** - Números absolutos, Incidência e Mortalidade de Leucemia no mundo (A) e na América Latina e Caribe (B), Ambos os sexos, idade [0-14], em 2022



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN 2022.

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é um tipo de câncer hematológico caracterizado pela rápida proliferação de linfoblastos imaturos, que são células precursoras dos glóbulos brancos. Essas células anormais são originadas de mutações genéticas no DNA de uma única célula-tronco linfóide. Como resultado, os linfoblastos não se diferenciam em linfócitos maduros, que são essenciais para o

sistema imunológico, mas se transformam em células leucêmicas. Existem dois principais subtipos de LLA: a LLA de células B, que é a mais comum, especialmente em crianças, e a LLA de células T, mais rara e frequente em adultos (*Leukemia & Lymphoma Society, 2024*). Às causas da incidência da leucemia em crianças são desconhecidas, porém pode estar associado ao peso ao nascer, raios X, idade materna do parto, amigdalectomia, uso de inseticidas, tabagismo parental, taxa de natalidade, amamentação exclusiva e lactação por mais de 6 meses, poluentes antropogênicos (gases cancerígenos emitidos pelos carros quanto pelos incêndios), radiação especialmente em países situados em zonas com intensidade de campo geomagnético diminuída, dentro de zonas ovais aurorais, América do Sul, onde o terreno é elevado (Cui & Yan, 2024; Khabarova *et al.*, 2024; Namayandeh *et al.*, 2020). Segundo Seth & Singh (2015) o tratamento da LLA é dividido em 4 etapas:

1. Terapia de indução: Processo para erradicar a leucemia da medula óssea, normalmente consiste de 4-6 semanas de terapia, os regimes de indução incluem, vincristina, prednisona, L-asparaginase e uma antraciclina.
2. Profilaxia do SNC ou terapia preventiva do SNC: É essencial para erradicar as células leucêmicas que ultrapassaram a barreira hematoencefálica, o que aumenta as taxas de sobrevivência, para isso é administrado o metotrexato intratecal, desde o primeiro dia de indução e protege ao SNC.
3. Intensificação (consolidação): Período de tratamento intensificado, com administração de novos agentes quimioterápicos para contrarrestar a resistência aos medicamentos, é usado comumente o metotrexato em altas doses, L-asparaginase, epipodofilotoxina, ciclofosfamida e citarabina.
4. Terapia de manutenção (continuação): Dura aproximadamente 2 anos, e se usa 6-mercaptopurina e metotrexato para prevenir recaídas.

## 2.2. ECOSSISTEMA ANTÁRTICO E BIODIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA

A Antártica é um dos continentes mais inóspitos do planeta, localizado no Sul do Círculo Antártico (66°S), situada no hemisfério sul, conhecida como pólo Sul. este continente tem uma superfície aproximada de 14 milhões km<sup>2</sup>, estando entre os 5 maiores continentes do mundo depois de Ásia, África, América do Norte e América do

Sul, tendo 1,6 vezes a área total do Brasil observado na Figura 5 (Boger, 2011; De Mattos, 2016).

A maior parte do continente está coberto por gelo, mas cerca de 0,35% está livre de gelo durante parte ou durante todo o ano, como nos Vales Secos no lado leste das Montanhas Transantárticas na Dependência de Ross (Terra de Victoria), lagos, solos com poucos nutrientes, partes da linha costeira, em regiões vulcânicas aquecidas, nos picos de altas montanhas com aproximadamente de 4.000 m, bem como em ilhas subantárticas próximas ao nível do mar. (Hopkins *et al.*, 2006).

**Figura 5** - (A) Localização do continente Antártico em relação à América do Sul. (B) Comparação da área territorial do Brasil com aquela do Continente Antártico



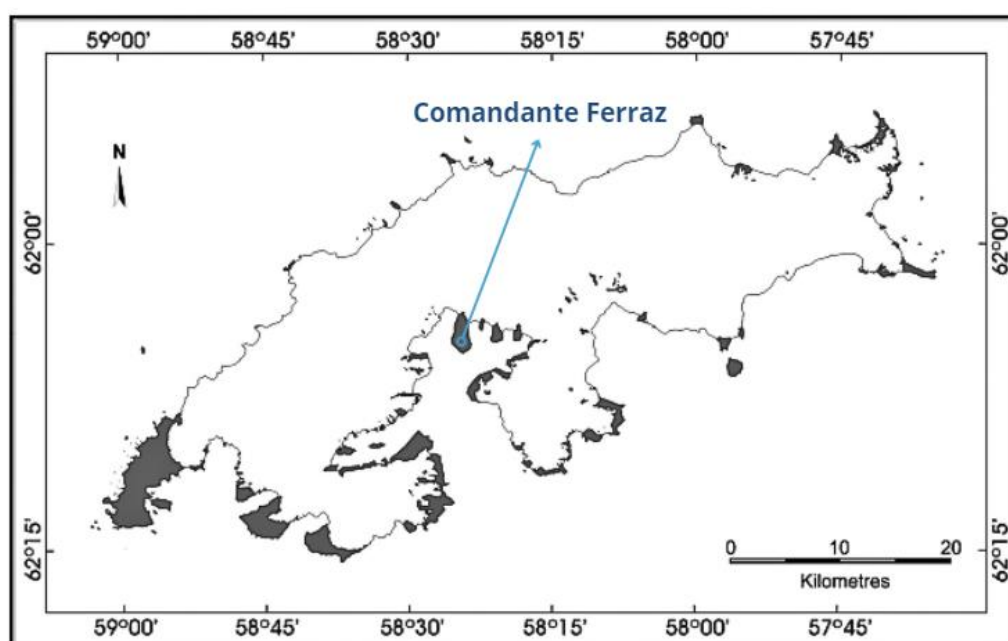
Fonte: Centro Polar e Climático, UFRGS.

Antártica é o continente de condições extremas, por apresentar uma temperatura média no verão de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , enquanto que no inverno é de  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , porém a menor temperatura já registrada foi de  $-93,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , também mais seco, com a precipitação média é de 150 mm por ano, tanto como o Deserto do Saara, e o mais ventoso da terra, com vento máximo registrado de 327 km/h, em 1972. Além disso, o continente apresenta alta radiação UV, ciclos de congelamento e descongelamento,

alto nível de salinidade, variações de pH e baixa disponibilidade de nutrientes (Arenz & Blanchette, 2011; Bottos *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2012).

Na zona do arquipélago das Shetland do Sul, na ponta norte da Península Antártica se encontra a Ilha Rei George. Local onde estão localizadas diversas estações de pesquisa, incluindo a Estação Antártica Comandante Ferraz do Brasil (Figura 6). Esta ilha tem aproximadamente 95 x 20 km, onde o gelo cobre cerca de 92% (Rückamp *et al.*, 2011; Setzer & Harter, 2004).

**Figura 6** - Mapa da Ilha Rei George e Estação de pesquisa Comandante Ferraz



Fonte: Adaptado de Simões; Arigony-Neto & Bremer, 2004.

Na Antártica, os habitats livres de gelo vão desde áreas costeiras com solos bem desenvolvidos e ricos em nutrientes, até desertos continentais e regiões de alta elevação com solos pouco desenvolvidos e oligotróficos. Embora a maioria dos ambientes terrestres na Antártica apresentem condições adversas, muitos solos abrigam comunidades de microrganismos (Bottos *et al.*, 2014). Os microrganismos antárticos, considerados extremófilos por meio de adaptações adotaram diversas características morfológicas e fisiológicas para resistir ao mesmo tempo aos diferentes estresses ambientais presentes na Antártica (Ruisi *et al.*, 2007; Singh; Dubey; Singh, 2011). Incluindo elevadas concentrações de lipídios insaturados da membrana, enzimas que são ativas em baixas temperaturas (Vaz *et al.*, 2011) e proteínas anticongelantes. (Yergeau & Kowalchuk, 2008). Essas comunidades adaptadas

localmente, variam segundo as diferentes regiões do continente, e refletem nas características físico-químicas e biológicas locais dos solos. (Bottos *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2020).

Diversos estudos realizados ao longo das últimas décadas, têm demonstrado a presença de uma variedade de organismos, como líquens, briófitas, hepáticas, plantas superiores, algas, fungos e bactérias (Chown *et al.*, 2015; Singh; Dubey; Singh, 2011). A microbiota Antártica continental é composta principalmente por fungos anamórficos, ou seja, fungos filamentosos e leveduras, pertencentes aos filos Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota (Garmendia *et al.*, 2021; Onofri *et al.*, 2006). Alguns gêneros de fungos encontrados na Antártica são *Aspergillus*, *Debaryomyces*, *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Um estudo demonstrou que extratos de *Aspergillus*, *Penicillium* apresentaram atividades antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, herbicida e antiprotozoaria. (Godinho *et al.*, 2015). Em relação às bactérias presentes neste continente, foram registradas a presença de Actinobactérias (Wentzel *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020), bem como os filos Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes e Deinococcus-Thermus. (Liu *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2013). Os gêneros predominantes de bactérias são *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*. Muitas dessas bactérias são capazes de secretar proteases, metaloproteases e têm atividade antimicrobiana (Leiva *et al.*, 2015).

O ecossistema Antártico é usado para o isolamento de microrganismos pela sua importância como produtores de enzimas, antibióticos e solventes, probióticos na indústria alimentícia, promotores de crescimento vegetal, agentes de controle biológico, e muitas outras características de importância industrial (Ramos *et al.*, 2019; Yarzabal, 2016).

### 2.3. ENZIMAS ADAPTADAS AO FRIO

Os microrganismos Antárticos possuem mecanismos de adaptação, como membranas celulares mais fluidas, produção de proteínas anticongelantes e enzimas com estruturas mais maleáveis, sítios catalíticos mais robustos, estáveis, seletivos para seus respectivos substratos e alta capacidade antioxidante (Lima *et al.*, 2022).

As enzimas são proteínas que cumprem uma função catalítica em diversos processos biológicos. No ecossistema antártico, essas moléculas desempenham um papel fundamental na sobrevivência de microrganismos que habitam esse ecossistema. (Shen *et al.*, 2021). A capacidade dos microrganismos de prosperar em baixas temperaturas está relacionada à sua habilidade de sintetizar enzimas adaptadas ao frio. As enzimas psicrófilas exibem uma eficiência catalítica elevada em baixas temperaturas e são altamente termossensíveis, devido a uma série de características estruturais que proporcionam um alto nível de flexibilidade em comparação com seus homólogos termoestáveis. Essa flexibilidade, especialmente no sítio ativo, permite que essas enzimas se adaptem ao frio, exigindo menor energia de ativação e mantendo-se estáveis em temperaturas mais altas. Além disso, as enzimas adaptadas ao frio exibem uma ampla faixa de pH ótimo (1,0-9,0) e temperatura (10,0-70,0 °C) (Duarte *et al.*, 2018; Gerday *et al.*, 2000; Georlette *et al.*, 2004; Siddiqui & Cavicchioli, 2006).

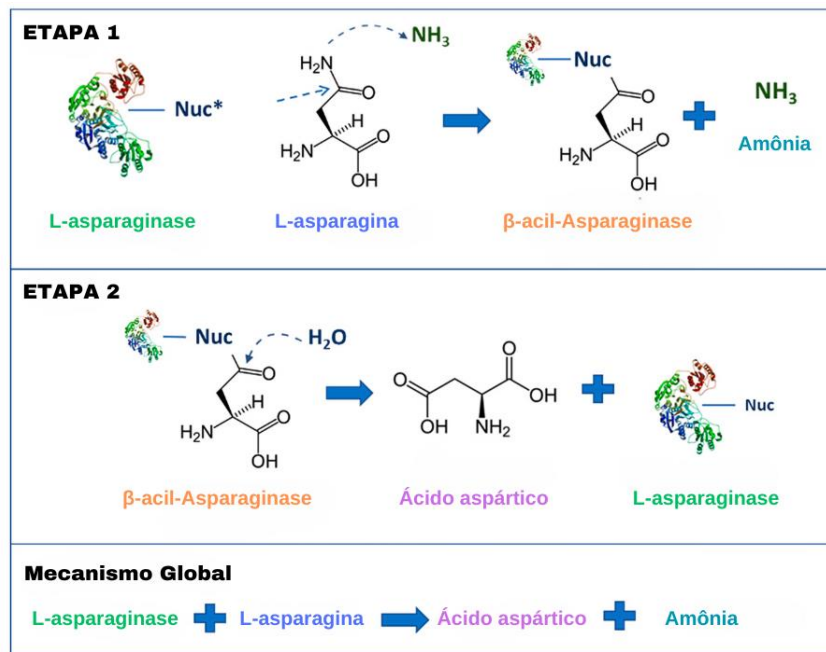
Diversas enzimas podem ser encontradas no ecossistema Antártico, incluindo as hidrolases, tais como  $\alpha$ -amilase, celulase, quitinase, glicosidase, invertase, lipase, pectinase, fitase, protease, subtilase, tanase, xilanas, esterases, e as desidrogenases e oxidoredutases como as lacases e superóxido dismutases. A maioria dessas enzimas são encontradas no meio extracelular (Duarte *et al.*, 2018; Dumorné *et al.*, 2017). Tais enzimas apresentam vantagens que são atraentes para os processos industriais, como a redução dos custos de energia e a prevenção da contaminação por outros microrganismos em condições de baixas temperaturas. Sua aplicação possui um potencial considerável na indústria de biotecnologia, por exemplo, nas indústrias de detergentes e alimentos, produtos químicos finos e biorremediação (Georlette *et al.*, 2004; Gerday *et al.*, 2000; Siddiqui & Cavicchioli, 2006). Além disso, bactérias e fungos da Antártica sintetizam outras enzimas com potencial farmacêutico, como L-asparaginase, colagenase e ribonucleases (Ashok *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2021; Freire *et al.*, 2021).

#### 2.4. L-ASPARAGINASE

A L-asparaginase (L-ASNase), é uma enzima amidohidrolase e pertence ao grupo de enzimas amidase (EC 3.5.1.1). A L-ASNase é conhecida por ser um principal

medicamento anticancer e um promissor mitigador de acrilamida na indústria de alimentos. Atua como catalisador da hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (Tandon, 2021). Seu papel na hidrólise da L-asparagina ocorre em duas etapas (Figura 7). Primeiro o resíduo nucleofílico ataca o átomo de carbono amida da L-asparagina, liberando amônia, gerando assim um intermediário da enzima beta-acil-enzima. Na segunda etapa o nucleófilo é ativado pela molécula de água, atacando o carbono do éster, formando a molécula de L-aspartato (Lefin *et al.*, 2023; Nunes *et al.*, 2020).

**Figura 7 - Ação hidrolítica da L-asparaginase**



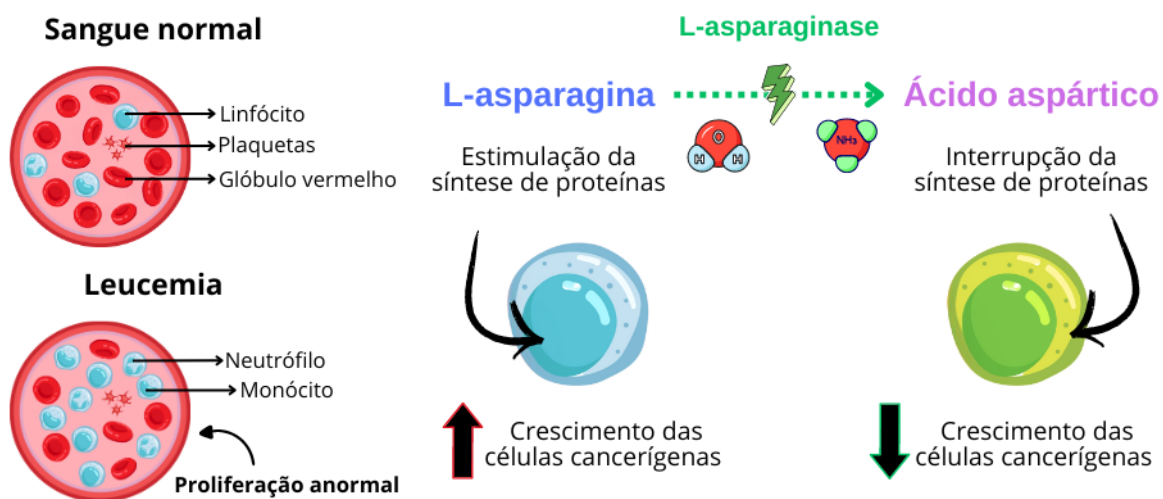
Fonte: Adaptado de Nunes *et al.*, 2020.

#### 2.4.1. L-ASPARAGINASE LIVRE DE UREASE E GLUTAMINASE NO TRATAMENTO DO CÂNCER

A asparagina (Asn) é um aminoácido não essencial que pode ser absorvido através da dieta, assim como sintetizado a partir do ácido aspártico e da glutamina (Gln), pela enzima asparagina sintetase. Porém, os linfoblastos de LLA e LMA não possuem atividade da asparagina sintase, pois têm silenciado o gene responsável pela codificação da enzima asparagina sintetase, sendo assim precisam da Asn extracelular para sua sobrevivência. (Chiu *et al.*, 2020; Van Trimpont *et al.*, 2022).

Devido à ação hidrolítica da L-asparaginase sobre a asparagina, a mesma é usada no tratamento da LLA. A L-asparaginase é administrada sistematicamente na corrente sanguínea de pacientes com blastos LLA circulantes. O mecanismo de ação do tratamento com L-asparaginase é reduzir ou remover a L-asparagina circulante endógena do sangue, removendo este nutriente essencial das células linfoblásticas (Figura 8). Como grandes quantidades de Asn são de fato necessárias para o crescimento de todas as células, a depleção de Asn circulante pela administração de L-ASNase resulta em fome e apoptose seletiva dos blastos leucêmicos (Tandon, 2021).

**Figura 8** - Composição do sangue e mecanismo de ação da L-asparaginase na redução de crescimento de células tumorais



Fonte: O autor, 2024.

Desde o trabalho de Broome et al, nas décadas de 1950 e 1960, o tratamento com L-asparaginase tornou-se um componente crítico do cuidado de pacientes, particularmente crianças com a LLA, hoje usada na rotina em conjunto com outros agentes quimioterápicos no tratamento. Atualmente a enzima está presente na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS) e é uma das enzimas terapêuticas com maior produção global (Lefin *et al.*, 2023).

A L-ASNase pode ser encontrada em diversos organismos, como animais, plantas e microrganismos como bactérias, fungos e leveduras. Porém o uso de microrganismos é mais útil para a indústria, pois facilita a produção em grande escala

(Tandon, 2021). Atualmente para fins terapêuticos, são usadas L-ASNases de duas espécies bacterianas, *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) nativa ou conjugada com polietilenoglicol e *Escherichia coli*. Apesar de serem eficientes, causam efeitos adversos, tais como neurotoxicidade, pancreatite, reações de hipersensibilidade, leucopenia, trombose e hepatotoxicidade. Alguns desses efeitos foram atribuídos à atividade da glutaminase associada à L-ASNases, uma vez que reduz a glutamina usada nos tecidos normais. Por tanto, existe um evidente conflito entre o efeito benéfico da citotoxicidade contra as células leucêmicas versus o prejuízo da depleção da glutamina sobre as células saudáveis do paciente (Beckett & Gervais, 2019; Van Trimpont *et al.*, 2022). Ademais, a presença de urease nas preparações comerciais induz a hidrólise da ureia em amônia tóxica no sangue, o que reduz a eficácia da L-ASNase como agente terapêutico. Isso conseqüentemente faz com que haja a necessidade de etapas adicionais de purificação para eliminar as atividades indesejáveis e melhorar a eficácia terapêutica (Egler; Ahuja; Matloub, 2016). Por esta razão, recentes estudos procuram microrganismos produtores de L-ASN livre de glutaminase e urease (Arumugam & Thangavelu, 2022; Ashok *et al.*, 2019; Doriya & Kumar, 2016; Ratuchne *et al.*, 2023).

Além disso, há interesse em incorporar L-asparaginases de fontes fúngicas em terapias antitumorais, pois essas enzimas podem ter maior eficácia no combate ao câncer. Como os fungos são organismos eucarióticos, seus processos pós-traducionais são mais semelhantes aos das células humanas, o que pode reduzir a imunogenicidade e diminuir a chance de efeitos colaterais. Isso as torna uma opção promissora para aplicações terapêuticas. (Da Cunha *et al.*, 2019; Doriya & Kumar, 2016).

A L-asparaginase tem sido amplamente investigada por sua eficácia antitumoral em diversos tipos de câncer. Além de seu uso consolidado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), pesquisas têm examinado seus efeitos sobre outras linhagens celulares tumorais. A enzima demonstrou atividade anticancerígena significativa contra células Jurkat clone E6-1 (linfoma de células T), K-562 (leucemia mieloide crônica) e MCF-7 (câncer de mama), sem apresentar toxicidade em células normais (Manahan *et al.*, 2014). Estudos adicionais também avaliaram a ação da L-asparaginase em células de câncer de ovário (Lorenzi *et al.*, 2006) e em células de adenocarcinoma ductal pancreático (Dufour *et al.*, 2012), sugerindo seu potencial para tratar tumores sólidos. Esses achados reforçam a versatilidade da enzima como

agente terapêutico, com eficácia demonstrada tanto em cânceres hematológicos quanto em tumores sólidos (Van Trimont et al., 2022).

### 3. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença complexa e desafiadora, e a busca por moléculas com propriedades terapêuticas aprimoradas torna-se fundamental para o desenvolvimento de tratamentos eficazes. Nesse contexto, as enzimas antitumorais, como a L-asparaginase, destacam-se por sua capacidade de inibir o crescimento tumoral em diversas linhagens celulares. No entanto, há uma escassez de registros sobre a atividade antitumoral da L-asparaginase produzida por fungos isolados de amostras da Antártica. Estudos anteriores têm enfatizado a necessidade de uma L-ASNase menos tóxica, uma vez que os efeitos adversos associados a fontes bacterianas têm gerado preocupações quanto à sua segurança. Diante disso, o presente trabalho propõe-se a investigar a produção de L-asparaginase livre de glutaminase e urease em meio líquido por microrganismos psicrófilos. Além disso, serão avaliados os efeitos do extrato fúngico em células da microvasculatura cerebral (HbMEC), células cancerígenas pancreáticas (MIA PaCa-2) e células derivadas de fibroblastos de pulmão (MRC-5). Essa abordagem poderá direcionar futuras investigações na busca por enzimas produzidas por microrganismos adaptados a ambientes extremos, como a Antártica, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais com menor toxicidade.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Bioprospectar fungos isolados de amostras de madeira e do solo da Antártica, com potencial de produzir a enzima L-asparaginase livre de glutaminase e urease.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma triagem qualitativa para verificar a capacidade dos fungos em produzir a enzima L-asparaginase sem atividade de glutaminase e urease.
- Produzir a enzima L-asparaginase em meio líquido utilizando os fungos que apresentarem os maiores índices enzimáticos na triagem qualitativa.
- Avaliar os efeitos dos extratos enzimáticos contendo L-asparaginase em células tumorais (MIA PaCa-2) e normais (HbMEC e MRC-5) para análise comparativa de toxicidade.
- Observar, por ensaio de fluorescência, as alterações morfológicas nas células tumorais MIA PaCa-2 expostas aos extratos enzimáticos para identificar efeitos antitumorais.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. ORIGEM DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados fungos isolados de três amostras de solos (P14, P15 e P18) e uma amostra de madeira. As amostras de solo foram coletadas em Punta Hanequim, na Ilha Rei George, no Arquipélago Shetland do Sul, essa coleta foi feita durante a OPERANTAR 40 (dezembro de 2021). E a amostra de madeira foi coletada em Whalers Bay na Ilha Deception, durante o verão polar austral do ano 2022 (OPERANTAR 41), no marco das atividades científicas realizadas pelo Programa Antártico Brasileiro. Na tabela 1 se detalha a origem e o tipo de amostras coletadas.

**Tabela 1** - Origem e denominação das amostras coletadas

Data de coleta	Origem	Lugar	Amostra	Código
2021	Antártica	Punta Hanequim	Solo	P14
2021	Antártica	Punta Hanequim	Solo	P15
2021	Antártica	Punta Hanequim	Solo	P18
2022	Antártica	Whalers Bay	Madeira	FMD 1

Fonte: O autor, 2024.

### 5.2. TRIAGEM QUALITATIVA DA L-ASPARAGINASE LIVRE DE GLUTAMINASE E UREASE

Os fungos isolados da Antártica foram cultivados em meio de cultura Ágar Batata dextrose (PDA) composto por Infusão de Batata (200,0 g/L), Glicose (20,0 g/L) Agar (17,0 g/L), a uma temperatura de 15 °C, durante o período de 7 dias. Após esse período, discos de 5 mm contendo ágar e micélio foram transferidos para placas de Petri contendo o meio Czapek Dox modificado (MCD) composto por: glicose (2,0 g/L), L-asparagina ou glutamina ou ureia, esta última esterilizada por filtração (10,0 g/L),

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,52 g/L),  $\text{KCl}$  (0,52 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,52 g/L),  $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L) e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L) e ágar (18,0 g/L), suplementado com vermelho de fenol (0,009% concentração final). O pH do meio foi ajustado para 6,2.

O vermelho de fenol foi utilizado como indicador da produção das enzimas L-asparaginase, L-glutaminase e urease pois sua faixa de viragem de cor ocorre entre o pH 6,8 e 8,2. O meio preparado foi autoclavado e colocado em placas estéreis. Todas as placas foram incubadas a uma temperatura de 15° C por um período de até 96 h.

Os microrganismos isolados que apresentaram resultados positivos, ou seja, apresentaram pigmentação avermelhada só nas placas que tinham asparagina, foram selecionados para fazer o teste em triplicata.

O diâmetro da colônia e o diâmetro do halo para todos os organismos de teste foram calculados medindo o diâmetro interno e externo do crescimento dos microrganismos e a produção de enzimas, respectivamente, após 96 h de incubação. O índice enzimático foi calculado como a razão entre o diâmetro externo e interno, conforme mostrado na Equação 1.

### **Equação 1 - Fórmula para calcular o índice enzimático**

$$\text{Índice enzimático} = \text{Diâmetro da zona externa (halo + colônia)} \div \text{Diâmetro da colônia}$$

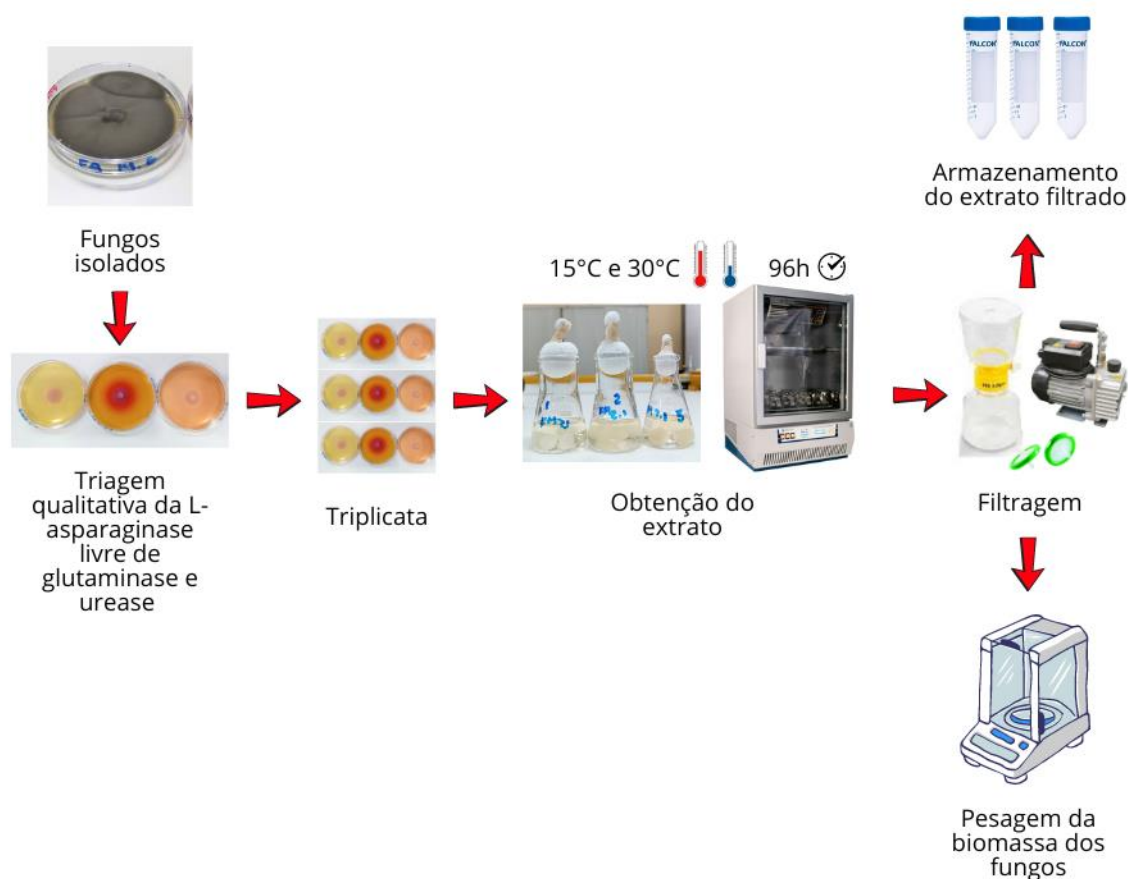
*Nota: Na equação 1 o diâmetro da zona externa é a medida em cm do diâmetro da colônia do fungo somada ao diâmetro do halo formado.*

Seguidamente os fungos que apresentaram maiores índices enzimáticos foram selecionados para realizar o crescimento em meio líquido, visando a preparação de extratos para posterior aplicação nos ensaios de atividade antitumoral.

Para os ensaios antitumorais foram preparados Erlenmeyer de 50 mL com 30 mL do meio MCD sem a presença do ágar, em cada Erlenmeyer foram inoculados 3 discos de 5mm contendo micélio e meio, nesse processo foram incluídos Erlenmeyer de controle (sem a inoculação do fungo). Os Erlenmeyer foram levados às incubadoras com agitação orbital (Shaker), em velocidade angular de 180 rpm por 96h, esse ensaio foi realizado em duas condições de temperatura distintas, uma a 15

°C e outra a 30 °C, para avaliar e identificar a temperatura ideal para o desenvolvimento dos fungos sob diferentes condições térmicas. Esses ensaios foram conduzidos conforme descrito por Ashok *et al.* (2019). As amostras foram sujeitas à filtragem, objetivando extrair a enzima bruta (Figura 9)

**Figura 9** - Metodologia da triagem enzimática da L-asparaginase livre de glutaminase e urease e produção do extrato fúngico



Fonte: O autor, 2024.

### 5.3. CULTIVO DE CÉLULAS

Os ensaios foram conduzidos com base nos estudos de Stacey e Hitomi (2008) e Carmichael *et al.* (1987). Neste estudo, foram utilizadas as linhagens de fibroblastos MRC-5 (ATCC CCL-171), células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC) e células do câncer pancreático (Mia PaCa-2). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100U/ml e estreptomicina 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$

(Sigma-Aldrich®, EUA). O cultivo foi realizado em uma incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Forma, EUA), com os cuidados necessários para manutenção das células, que foram realizadas de 2 a 3 vezes por semana, durante um período de 3 a 4 semanas antes dos testes serem realizados.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL (ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR)

Com o objetivo de determinar a diminuição da viabilidade celular, foi realizado o ensaio de proliferação celular utilizando o Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é um sal amarelo-ouro que, quando metabolizado pelas mitocôndrias, é reduzido a formazan, um composto de coloração púrpura. Essa reação do MTT é um indicador da função mitocondrial e, conseqüentemente, da viabilidade celular (Freshney, 2015).

Neste ensaio, as células Mia PaCa-2, HBMEC e MRC-5 foram semeadas em placas de 96 poços (Corning, EUA) contendo meio DMEM, com uma quantidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. As células foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Em seguida, os extratos enzimáticos previamente preparados foram adicionados em triplicata, em diferentes diluições: diluído a 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (para algumas amostras foram feitas 8 diluições: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%.) Como controles, foram utilizados seis poços contendo apenas meio de cultivo (controle de viabilidade) e seis poços contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (controle de morte). Logo em seguida a placa de cultivo retornou a incubadora por mais 24 horas para observação do efeito dos tratamentos aplicados.

Após esse período, 10 µL de MTT foram adicionados a cada poço. Após 4 h de incubação, o meio contendo MTT foi removido dos poços e adicionados 100 µL de DMSO para a diluição dos cristais formados. A viabilidade celular foi determinada mediante a diferença da quantificação da absorbância a 570 nm e 630 nm em espectrofotômetro (Spectramax Paradigm®, Molecular Devices, USA). Os dados de Absorbância foram transformados em porcentagem de viabilidade celular, utilizando como referência o controle sem tratamento, e foi realizada uma curva de viabilidade celular em função da concentração. Normalizando os dados e aplicando regressão não linear, foi determinada a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>).

## 5.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CITOESQUELETO E NÚCLEO DAS CÉLULAS

Para avaliar possíveis alterações morfológicas causadas pelos extratos dos fungos na linha celular Mia PaCa-2, foram analisadas as mudanças na morfologia celular nas concentrações de 20% e 50% dos extratos dos fungos FM2.1 e FMR1.1, assim como do extrato puro, que não contém a enzima L-asparaginase. Além disso, foi utilizado um controle com meio DMEM para comparação

As células foram cultivadas em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço em uma placa de 6 poços (*6-well Cell Culture Plate*, Biofil®) contendo lamínulas circulares. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Após esse tempo, o meio de cultura foi removido e 1,5 mL das concentrações pré-definidas dos tratamentos foram adicionadas em cada poço. Após outras 24 horas, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com 1,5 mL de formaldeído a 4% por 20 minutos. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 5 minutos. Este processo de permeabilização foi repetido três vezes no total.

Os passos seguintes foram realizados em local protegido de luz intensa. Posteriormente, as células foram marcadas com 1 mL por poço da solução de marcação 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e faloidina a 2%, e deixadas na geladeira a uma temperatura de 4°C durante toda a noite. No dia seguinte, o DAPI e a faloidina foram removidos e lavados com a solução de lavagem polibutileno tereftalato (PBT) três vezes por poço a cada 5 minutos. A solução foi removida e PBS foi adicionada para o enxágue dos poços. Finalmente, as células foram observadas na microscopia de fluorescência (NIKON ECLIPSE Ni H550L) usando lâminas e lamínulas com objetiva de 20x.

## 5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças nos índices enzimáticos dos fungos positivos na triagem foram analisadas utilizando o teste t. Para a viabilidade celular, foi realizada uma análise descritiva e regressão não linear para determinar o IC<sub>50</sub>. As variações entre os tratamentos no ensaio de MTT foram avaliadas com o teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando ANOVA no software GraphPad Prism 8®. Os resultados foram

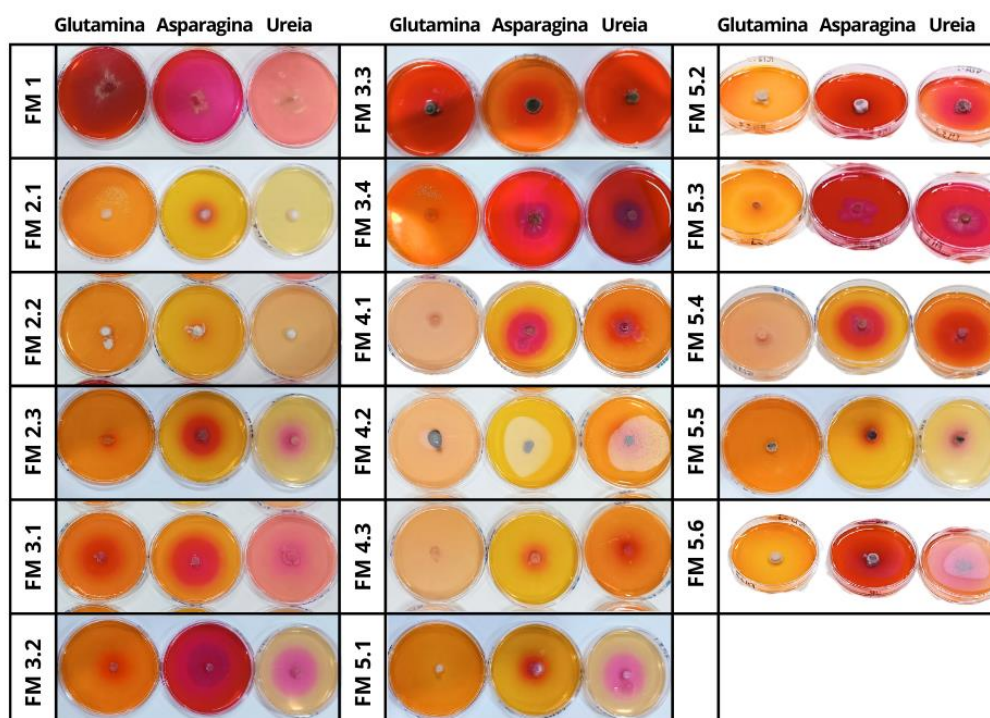
expressos como média  $\pm$  DP dos experimentos realizados, considerando  $P < 0,05$  como significativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. TRIAGEM QUALITATIVA DA L-ASPARAGINASE LIVRE DE GLUTAMINASE E UREASE

Dos 39 isolados da Antártica submetidos à avaliação em meio sólido suplementado com vermelho de fenol, 37 exibiram halo indicativo de atividade de L-asparaginase (Figura 10-12). Destes, 20 apresentaram também halo de hidrólise no meio com ureia e 14 fungos apresentaram halo nos meios de L-asparagina, glutamina e ureia, um dos fungos só apresentou halo no meio da ureia e um não apresentou halo em nenhum dos meios. A triagem resultou em 3 cepas produtoras de L-ASNase livre de glutaminase e urease, correspondendo a aproximadamente 7,5% de todas as linhagens testadas. Em relação a identificação dos fungos, o código FM representa fungos isolados da amostra de madeira em meio PDA, o código FMR representa os fungos isolados de amostra de madeira em meio R2A e o código FA representa fungos isolados de amostras de solo, todos identificados com códigos numéricos após o isolamento.

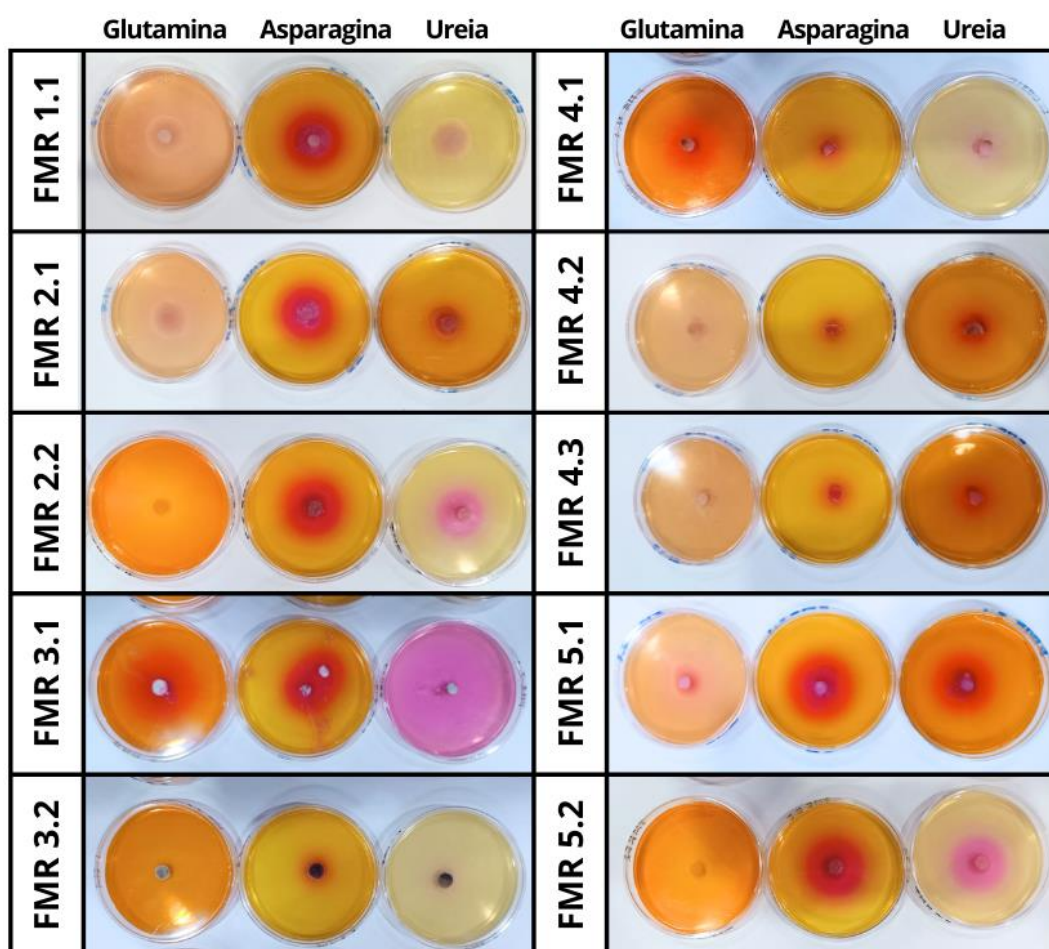
**Figura 10** - Triagem enzimática da produção de L-asparaginase dos fungos isolados da amostra de madeira (FM)



Fonte: O autor, 2024.

*Nota: Triagem de fungos isolados da amostra de madeira, cultivados em placas contendo meio Czapek Dox modificado suplementadas com corante vermelho de fenol, para identificação de produtores de L-asparaginase. Cada coluna de placa contém uma fonte específica de nitrogênio: L-glutamina, L-asparagina ou ureia. Todos os fungos apresentaram halo vermelho nas placas com L-asparagina, exceto o fungo FM4.2. Os fungos FM2.1 e FM2.2 foram os únicos do grupo em produzir L-asparaginase livre de glutaminase e urease.*

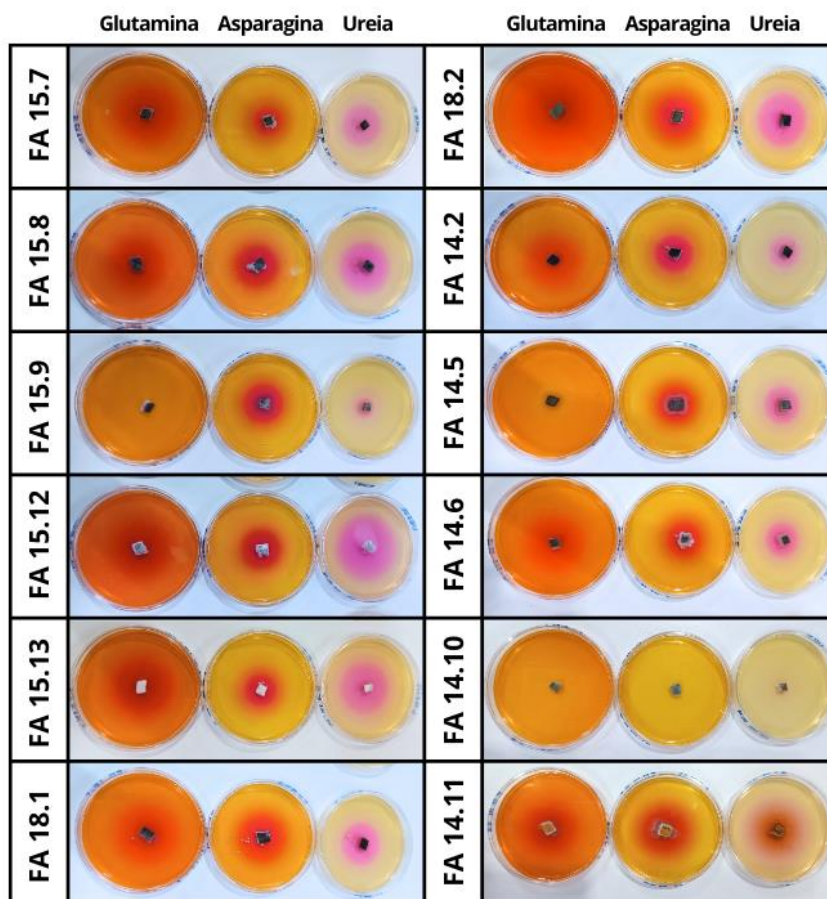
**Figura 11** - Triagem enzimática da produção de L-asparaginase dos fungos isolados da amostra de madeira (FMR)



Fonte: O autor, 2024.

*Nota: Triagem de fungos isolados da amostra de madeira, cultivados em placas contendo meio Czapek Dox modificado suplementadas com corante vermelho de fenol, para identificação de produtores de L-asparaginase. Cada coluna de placa contém uma fonte específica de nitrogênio: L-glutamina, L-asparagina ou ureia. Todos os fungos apresentaram halo vermelho nas placas com L-asparagina, porém só o fungo FMR1.1 foi o único do grupo em produzir L-asparaginase livre de glutaminase e urease.*

**Figura 12** - Triagem enzimática da produção de L-asparaginase dos fungos isolados da amostra de solo (FA)

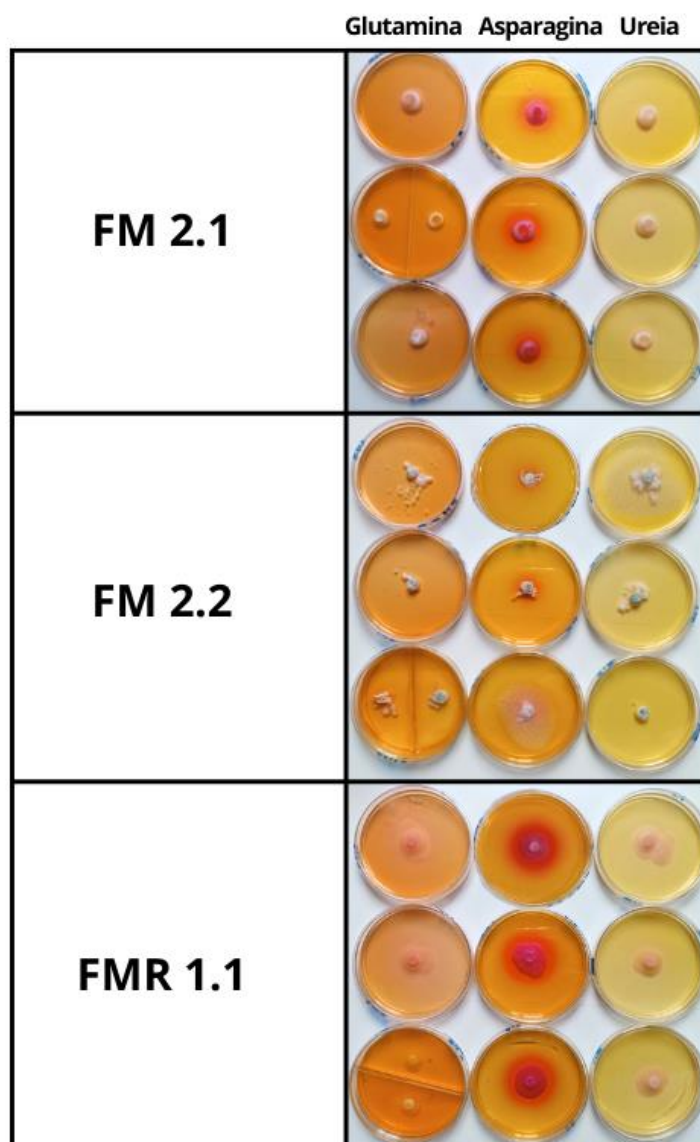


Fonte: O autor, 2024.

*Nota: Triagem de fungos isolados da amostra de madeira, cultivados em placas contendo meio Czapek Dox modificado suplementadas com corante vermelho de fenol, para identificação de produtores de L-asparaginase. Cada coluna de placa contém uma fonte específica de nitrogênio: L-glutamina, L-asparagina ou ureia. Todos os fungos apresentaram halo vermelho nas placas com L-asparagina, exceto o fungo FA14.10, que não apresentou halo em nenhuma das placas. Desse grupo nenhum dos fungos produz L-asparaginase livre de glutaminase e urease.*

Os resultados demonstram que a maioria dos fungos isolados apresentaram produção de L-asparaginase, com exceção de dois isolados que não formaram halo nas placas contendo L-asparagina. Esse achado ressalta o elevado potencial dos isolados para serem empregados em análises de produção enzimática. Como o objetivo do estudo é testar extratos com L-asparaginase, três fungos, FM2.1, FM2.2 e FMR1.1, que formaram halo exclusivamente nas placas com L-asparagina, foram selecionados para os ensaios de triagem enzimática, realizados em triplicata, para garantir os resultados obtidos na fase inicial (Figura 13)

**Figura 13** - Triagem enzimática da produção de L-asparaginase dos fungos FM2.1, FM2.2 e FMR1.1 em triplicata



Fonte: O autor, 2024.

*Nota: Triagem enzimática em triplicata para os fungos FM 2.1, FM 2.2 e FMR 1.1, cultivados em placas contendo meio Czapek Dox modificadas com corante vermelho de fenol, para identificação de produtores de L-asparaginase. Cada coluna de placa contém uma fonte específica de nitrogênio: L-glutamina, L-asparagina ou ureia. Todos os fungos apresentaram halo vermelho nas placas com L-asparagina, indicando a produção de L-asparaginase livre de atividades glutaminase e urease.*

A Tabela 2 apresenta os índices enzimáticos dos fungos produtores de L-asparaginase, evidenciando o potencial de produção da enzima. O fungo FMR1.1

apresentou o maior índice enzimático, com uma média de 2,83, seguido pelo fungo FM2.1, com índice de 2,64 e por último o fungo FM2.2, com 1,83.

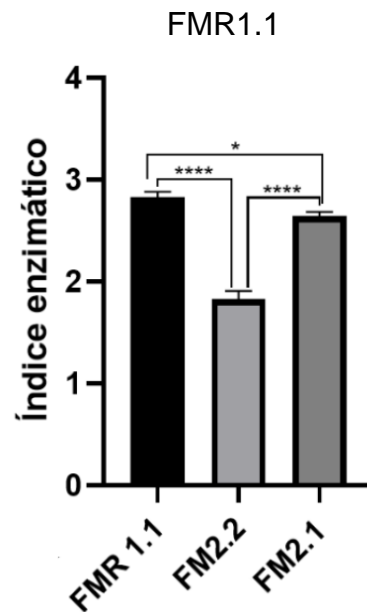
**Tabela 2** - Índices enzimáticos da triagem enzimática da produção de L-asparagina dos fungos FM2.1, FM 2.2 e FMR1

CÓDIGO	Medida (cm)	L-Glutaminase	L-asparaginase	Urease	Índice enzimático		
					L-Glutaminase	L-asparaginase	Urease
FM 2.1	Diâmetro interno	1,3	1,3	1,3	0	2,62	0,00
	Diâmetro externo	0	3,4	0			
FM 2.1	Diâmetro interno	1,1	1,3	1,3	0	2,69	0,00
	Diâmetro externo	0	3,5	0			
FM 2.1	Diâmetro interno	1,1	1,3	1,2	0	2,62	0,00
	Diâmetro externo	0	3,4	0			
					<b>Média:</b>	<b>2,64</b>	
					<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,040</b>	
					<b>Índice enzimático</b>		
CÓDIGO	Medida (cm)	L-Glutaminase	L-asparaginase	Urease	L-Glutaminase	L-asparaginase	Urease
FM 2.2	Diâmetro interno	1	1,1	1	0	1,91	0,00
	Diâmetro externo	0	2,1	0			
FM 2.2	Diâmetro interno	1	1,2	2	0	1,75	0,00
	Diâmetro externo	0	2,1	0			
FM 2.2	Diâmetro interno	1,2	1,1	1,2	0	1,82	0,00
	Diâmetro externo	0	2	0			
					<b>MÉDIA:</b>	<b>1,83</b>	
					<b>Desvio Padrão</b>	<b>0.080</b>	
					<b>Índice enzimático</b>		
CÓDIGO	Medida (cm)	L-Glutaminase	L-asparaginase	Urease	L-Glutaminase	L-asparaginase	Urease
FMR 1.1	Diâmetro interno	1,6	1,9	1,7	0	2,89	0,00
	Diâmetro externo	0	5,5	0			
FMR 1.1	Diâmetro interno	1,4	2	1,6	0	2,80	0,00
	Diâmetro externo	0	5,6	0			
FMR 1.1	Diâmetro interno	1,4	2	1,6	0	2,80	0,00
	Diâmetro externo	0	5,6	0			
					<b>MÉDIA:</b>	<b>2,83</b>	
					<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,052</b>	

Fonte: O autor, 2024.

O gráfico 1 revela que houve uma diferença significativa maior entre os fungos FM2.1 e FMR1.1, em comparação com FM2.2, sendo essa diferença mais pronunciada do que a observada entre os fungos FM2.2 e FMR1.1. Com base nesses resultados, os fungos FM2.1 e FMR1.1 foram selecionados para cultivo em meio líquido, visando a obtenção da enzima em extrato.

**Gráfico 1** - Comparação dos índices enzimáticos dos fungos FM2.1, FM2.2 e

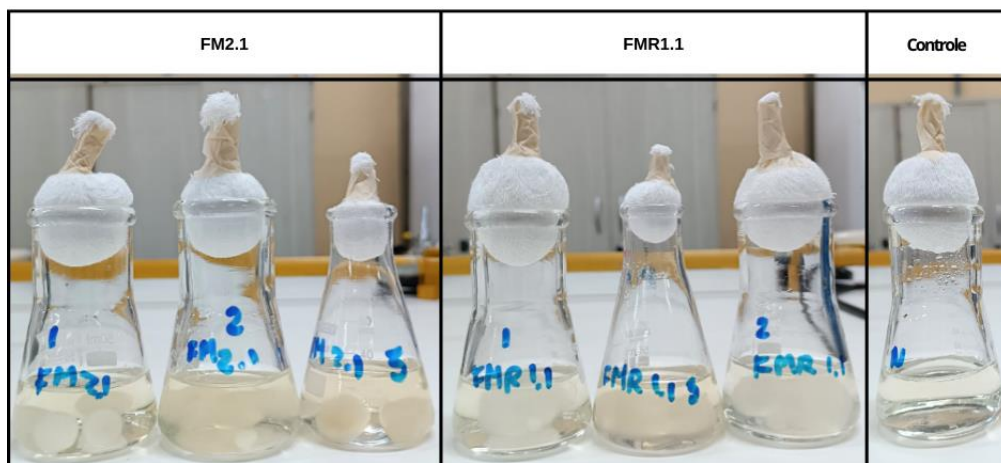


Fonte: O autor, 2024.

*Nota: O gráfico 1 ilustra as diferenças nos índices enzimáticos dos três fungos, destacando uma diferença significativa entre eles ( $p < 0,05$ ).*

Os fungos selecionados foram cultivados a duas temperaturas diferentes: 15°C e 30°C. Observou-se que o crescimento foi significativamente melhor a 15°C (Figura 14) em comparação com 30°C (Figura 15). Esse resultado sugere que a temperatura mais baixa proporciona condições mais favoráveis para o desenvolvimento dos fungos.

**Figura 14** - Triplicata do cultivo em meio líquido dos fungos FM2.1 e FMR1.1, e o controle (extrato puro) a 15°C



Fonte: O autor, 2024.

*Nota: Os Erlenmeyers na imagem contêm meio líquido Czapek Dox modificado (MCD), onde os fungos foram cultivados a 15 °C por 96 horas a 180 rpm.*

**Figura 15** - Cultivo em meio líquido dos fungos FM2.1 e FMR1.1 a 30°C



Fonte: O autor, 2024.

*Nota: Os Erlenmeyers na imagem contêm meio líquido Czapek Dox modificado (MCD), onde os fungos foram cultivados a 30 °C por 96 horas a 180 rpm. O erlenmeyer da esquerda corresponde ao fungo FM2.1, e o da direita ao fungo FMR1.1.*

Foram selecionados os extratos produzidos a 15 °C, pois essa temperatura demonstrou ser mais favorável para o crescimento dos fungos. Após o cultivo, foi realizada a pesagem da biomassa dos fungos, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Pesos da biomassa dos fungos FM2.1 e FMR1.1, obtidos após o cultivo a 15 °C

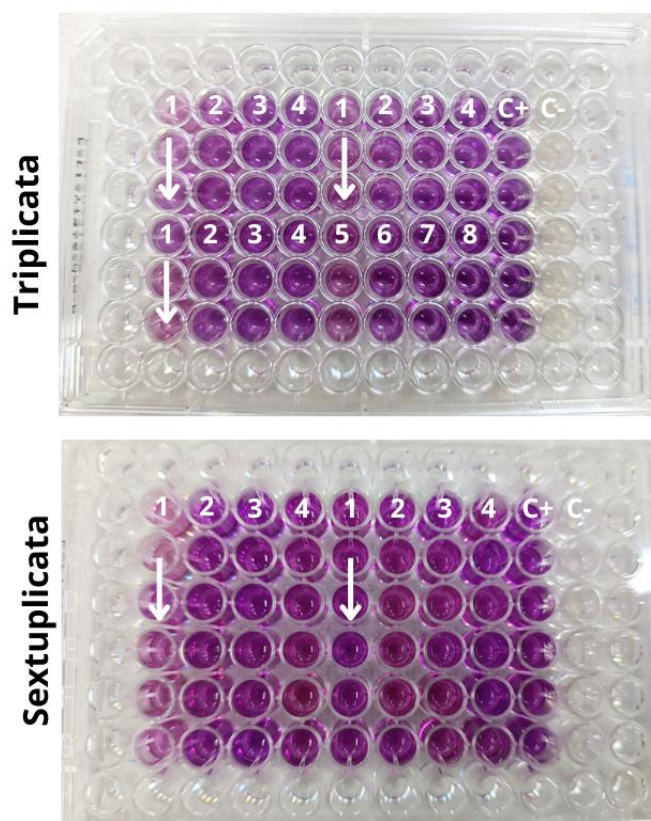
CÓDIGO	Peso do fungo	CÓDIGO	Peso do fungo
FM 2.1-1	0,0431	FMR 1.1-1	0,0452
FM 2.1-2	0,0494	FMR 1.1-2	0,0410
FM 2.1-3	0,0415	FMR 1.1-3	0,0408
MÉDIA	0,0447	MÉDIA	0,0423

*Nota: A tabela apresenta os pesos da biomassa dos fungos, onde o fungo FM2.1 apresenta uma média de 0,0447 g, enquanto o fungo FMR1.1 apresenta uma média de 0,0423 g.*

## 6.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade dos extratos fúngicos foi avaliada em linhagens celulares HBMEC, MRC-5 e Mia PaCa-2 por meio do ensaio MTT, com o objetivo de determinar o grau de mortalidade celular após a exposição aos extratos. Conforme ilustrado na Figura 16, o ensaio foi realizado em triplicata e sextuplicata, utilizando 4 e 8 concentrações, obtidas a partir de diluições seriadas. As concentrações foram as seguintes, respectivamente (da maior para a menor): 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%. Essas concentrações foram aplicadas de esquerda para a direita em ordem decrescente. Os controles positivo e negativo estão representados nas duas últimas colunas.

**Figura 16** - Placas de 96 poços utilizadas no ensaio MTT com células HBMEC, MRC-5 e MiaPaCa-2



Fonte: O autor, 2024.

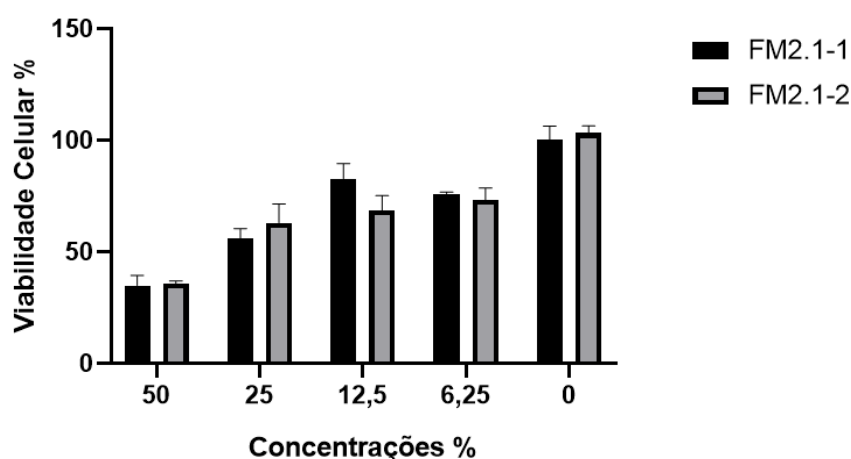
*Nota: Todas as concentrações dos extratos utilizados em ambos os experimentos foram incubadas em cada poço por 24 horas. As concentrações aplicadas em cada coluna foram: 1 (50%), 2 (25%), 3 (12,5%), 4 (6,25%), C+ (controle positivo, sem tratamento) e C- (controle negativo, 20% DMSO).*

Para determinar os valores de viabilidade celular de cada coluna, incluindo as tratadas com os extratos e os controles, foi realizada a leitura das placas no espectrofotômetro. A absorbância de cada poço foi medida, com base na intensidade de cor gerada pela reação do ensaio MTT, que reflete a atividade metabólica das células viáveis. Quanto maior a intensidade de cor, maior a quantidade de células metabolicamente ativas, o que permite calcular a viabilidade celular em resposta aos tratamentos aplicados.

### 6.2.1. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS HBMEC

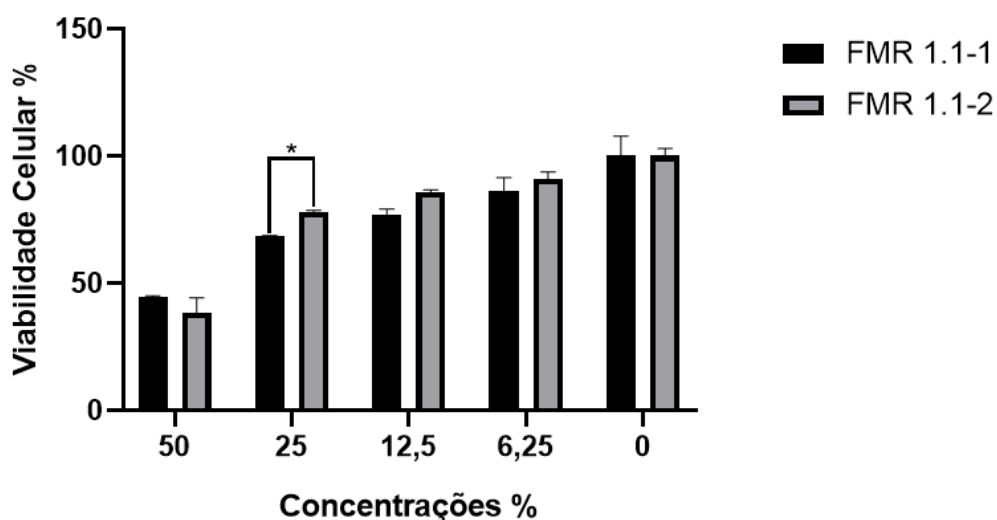
O primeiro teste foi realizado em células HBMEC, utilizando dois extratos do mesmo fungo para avaliar a similaridade ou variação entre eles. Para isso, foi aplicada uma análise estatística utilizando o teste t múltiplo, com o objetivo de identificar possíveis diferenças significativas entre as amostras. No caso dos extratos FM2.1-1 e FM2.1-2, conforme mostrado no Gráfico 2, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das concentrações testadas. Já para os extratos FMR1.1-1 e FMR1.1-2, apresentados no Gráfico 3, observou-se uma diferença significativa apenas na concentração de 25%. Esses resultados indicam que não há diferenças relevantes entre as amostras de dois erlenmeyers do mesmo fungo. Portanto, nas demais linhagens celulares, a análise foi realizada apenas com os extratos FM2.1-1 e FMR1.1-1

**Gráfico 2** - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre FM2.1-1 e FM2.1-2 em células HBMEC



Fonte: O autor, 2024.

**Gráfico 3** - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre FMR1.1-1 e FMR1.1-2 em HBMEC

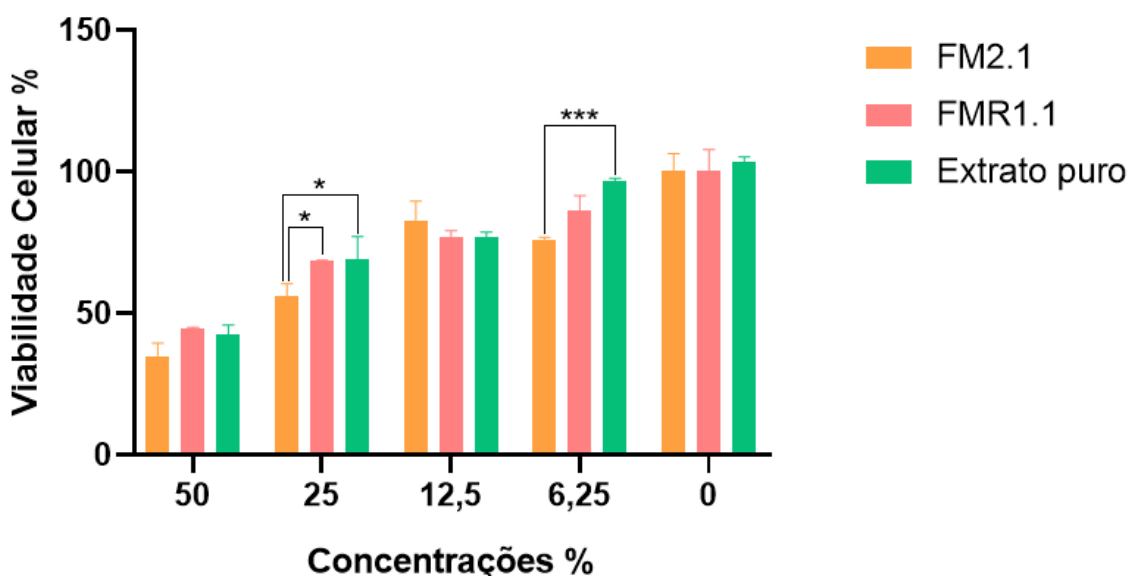


Fonte: O autor, 2024.

Além disso, o ensaio MTT foi realizado para o extrato puro (extrato sem a presença do fungo) nas três linhagens celulares. Esse controle foi essencial para diferenciar os efeitos causados pelos componentes do meio de cultivo e por outros fatores externos daqueles efeitos específicos atribuídos aos produtos metabólicos produzidos pelos fungos.

Foram elaborados gráficos para observar e analisar os efeitos dos extratos nas linhagens celulares. Esses gráficos permitem identificar as diferenças entre os tratamentos e o controle, além de possibilitar a determinação dos valores de IC<sub>50</sub>. No Gráfico 4, se observa a comparação da viabilidade celular após o tratamento com os extratos dos fungos e o extrato puro. Nas concentrações de 50% e 12,5%, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o extrato puro, sugerindo que os extratos fúngicos não apresentaram efeitos distintos em comparação ao extrato puro. No entanto, na concentração de 25%, observou-se uma diferença significativa entre o tratamento com FM2.1 e o extrato puro, além de diferenças entre os extratos dos dois fungos. Na concentração de 6,25%, essa diferença tornou-se ainda mais acentuada. O extrato de FM2.1 mostrou maior diminuição da viabilidade celular na concentração de 50%.

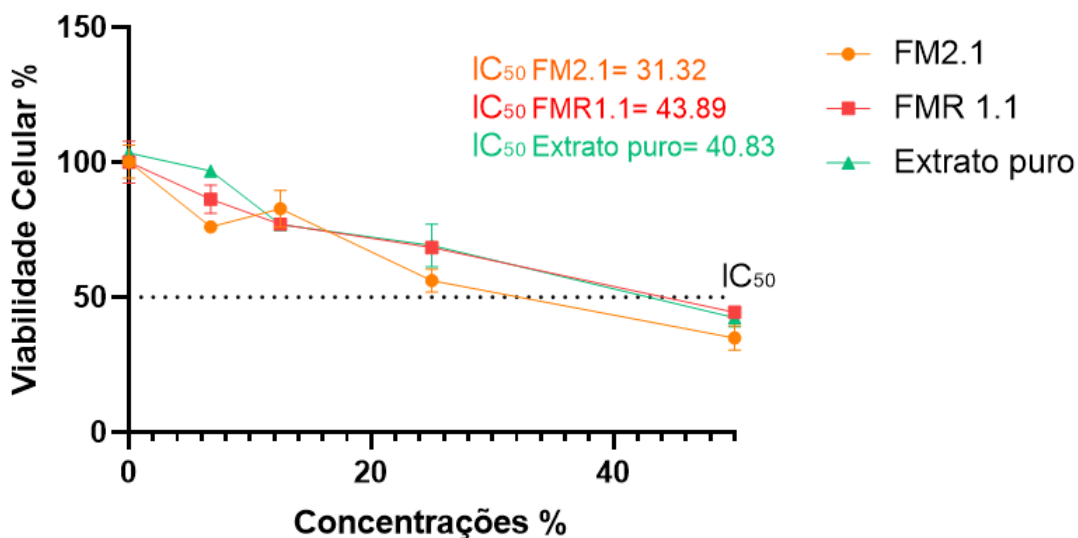
**Gráfico 4** - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre os diferentes tratamentos em células HBMEC



Fonte: O autor, 2024

No Gráfico 5, são apresentadas as curvas de viabilidade celular e os valores de  $IC_{50}$ . Os tratamentos demonstraram uma redução na viabilidade celular em ambos os casos: no extrato puro e nos extratos fúngicos. Os valores de  $IC_{50}$ , por sua vez, mostraram-se semelhantes entre os diferentes tratamentos. A maior inibição do crescimento celular ocorreu na concentração de 50%, indicando um efeito mais pronunciado nessa diluição.

**Gráfico 5** - Curvas de viabilidade celular e valores de  $IC_{50}$  dos tratamentos com extratos fúngicos e extrato puro em células HBMEC

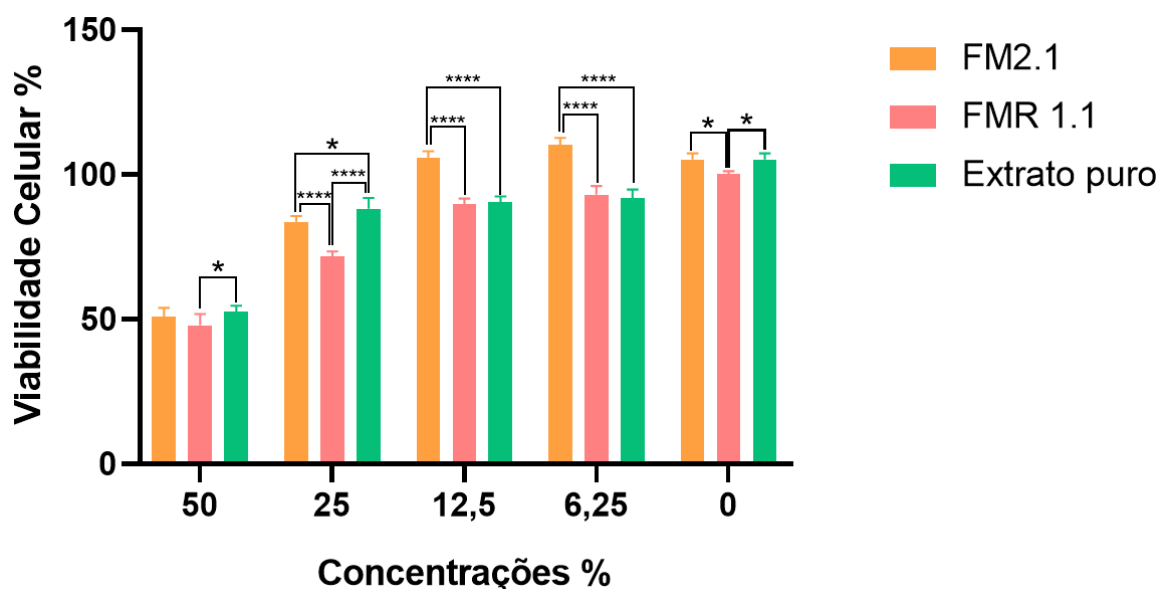


Fonte: O autor, 2024

### 6.2.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MRC-5

Foram realizados testes em células MRC-5 para avaliar os efeitos dos extratos fúngicos e do extrato puro na viabilidade celular. No Gráfico 6, são apresentadas as comparações entre os tratamentos. Os dados mostram diferenças significativas nas diferentes concentrações. Na concentração de 25% e 50% é observada diferença entre o extrato de FMR1.1 e o extrato puro. Além disso, na nas concentrações de 25%, 12,5% e 6,25% foram encontradas diferenças significativas entre FM2.1 e os demais tratamentos nas concentrações de 25%, 12,5% e 6,25%, com maior diminuição da viabilidade a 50%.

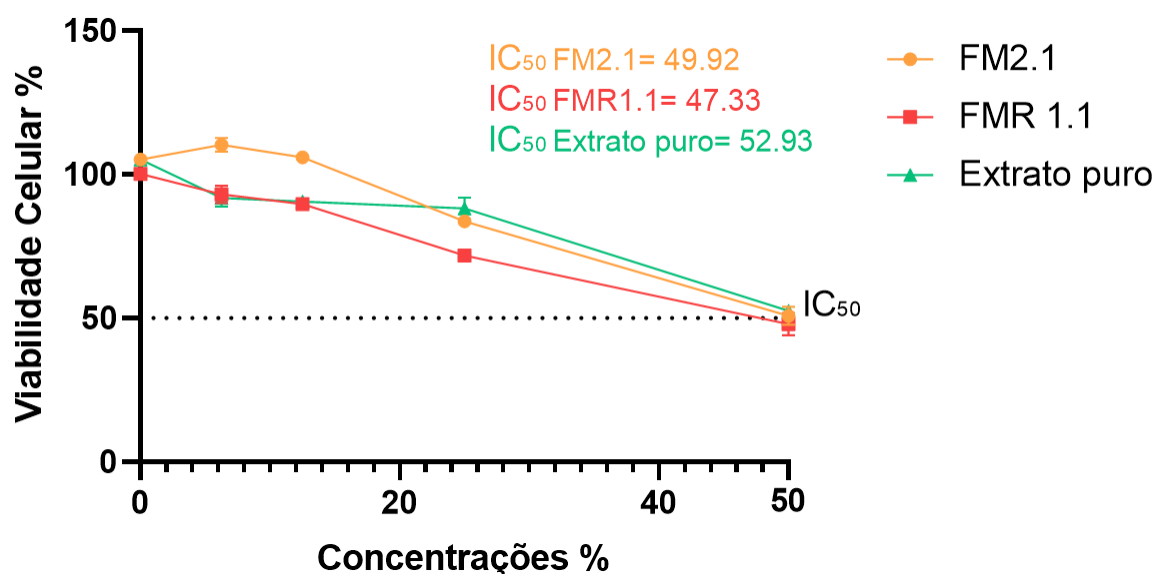
**Gráfico 6** - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre os diferentes tratamentos em células MRC-5



Fonte: O autor, 2024

No Gráfico 7, são apresentadas as curvas de viabilidade celular e os valores de IC<sub>50</sub>. A redução na viabilidade celular foi observada tanto no extrato puro quanto nos extratos fúngicos, em relação aos valores de IC<sub>50</sub>, eles mostraram-se semelhantes entre os tratamentos realizados. A concentração de 50% mostra maior inibição do crescimento celular em células MRC-5.

**Gráfico 7** - Curvas de viabilidade celular e valores de IC<sub>50</sub> dos tratamentos com extratos fúngicos e extrato puro em células MRC-5

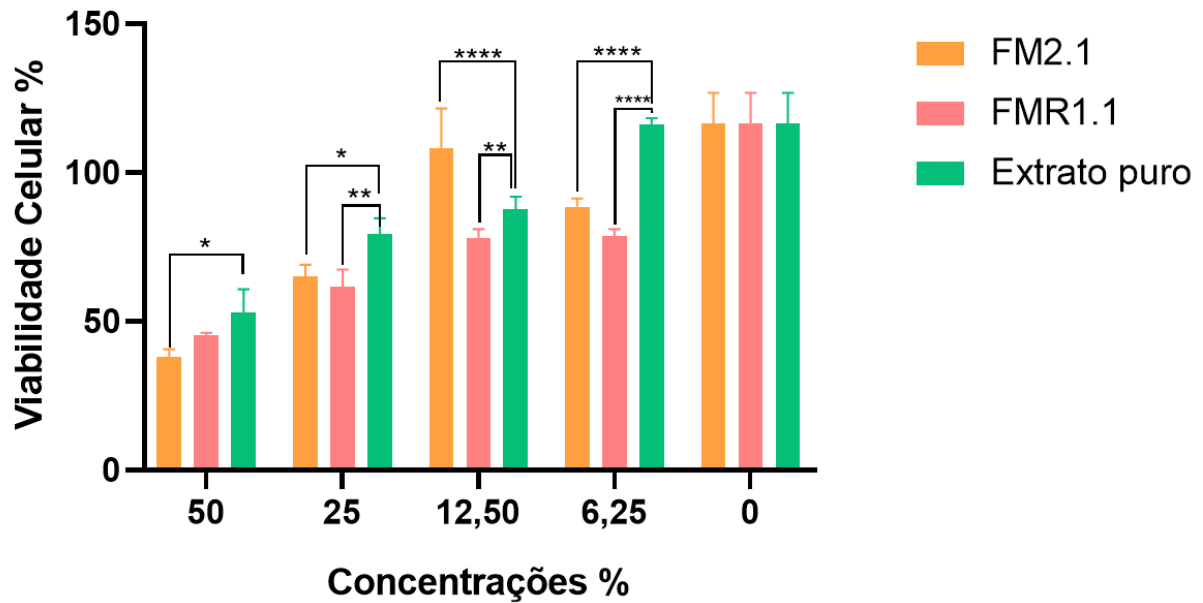


Fonte: O autor, 2024

### 6.2.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS Mia PaCa-2

Para avaliar o potencial antitumoral, é indispensável realizar testes em células tumorais, por isso neste estudo, foram realizadas análises na linhagem celular Mia PaCa-2, que são células de adenocarcinoma pancreático. No Gráfico 8, se observa a comparação da viabilidade celular após o tratamento com os extratos dos fungos e o extrato puro. Os dados mostram que houve diferenças significativas nas concentrações de 50%, 25% e 6,25% entre o extrato do fungo FM2.1 e o extrato puro. Nas concentrações de 25%, 12,50% e 6,25% houve diferenças significativas entre o extrato do fungo FMR1.1 e o extrato puro. Ao comparar os extratos fúngicos entre si, o fungo FM2.1 exibiu uma diminuição da viabilidade celular mais acentuada na concentração de 50%, enquanto nas concentrações de 25%, 12,50% e 6,25% o extrato de FMR1.1 apresentou maior diminuição na viabilidade celular.

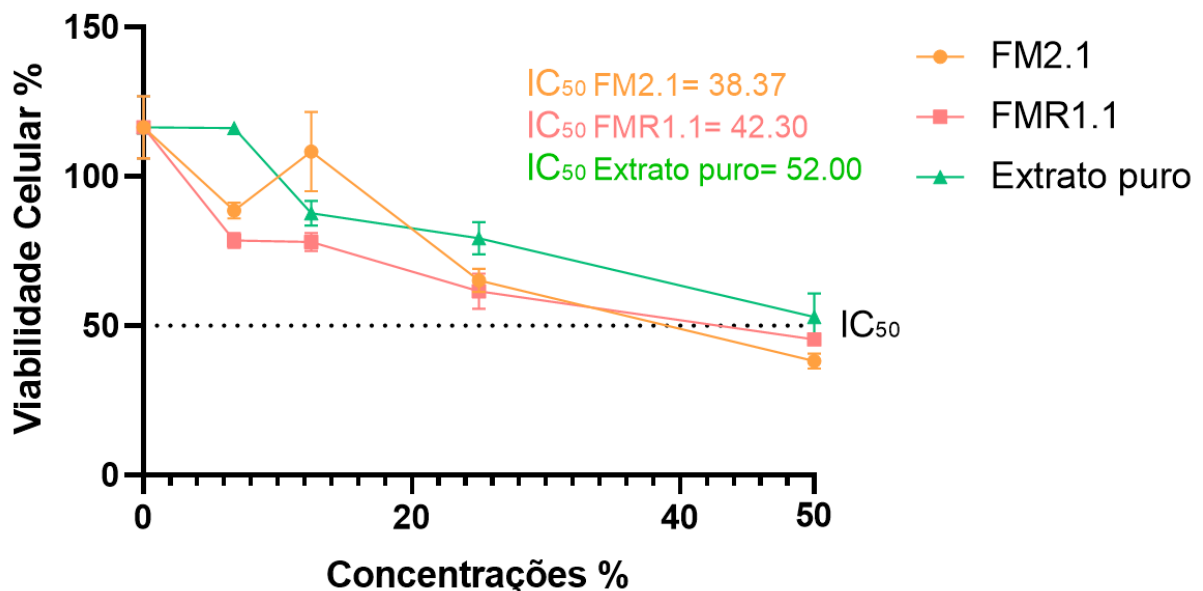
**Gráfico 8** - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre os diferentes tratamentos em células MIAPaCa-2



Fonte: O autor, 2024

No Gráfico 9, são apresentadas as curvas de viabilidade celular e os valores de  $IC_{50}$ , evidenciando uma diferença entre os extratos fúngicos e o extrato puro. O extrato do fungo FM2.1 foi o que apresentou maior inibição da viabilidade celular, destacando-se como o mais eficaz entre os tratamentos testados.

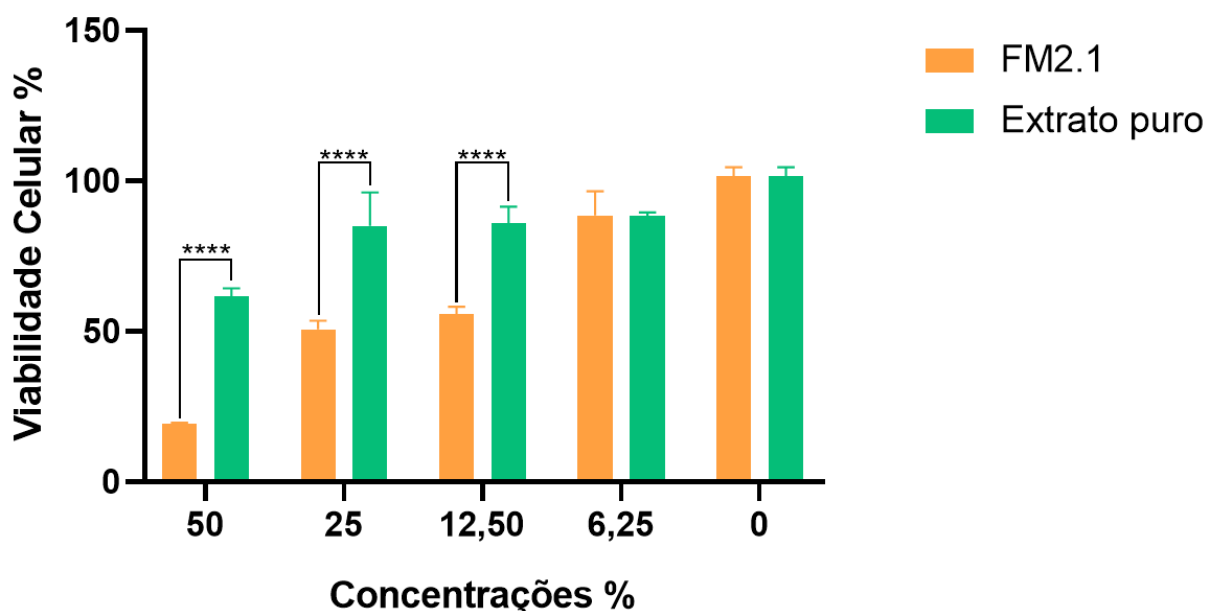
**Gráfico 9** - Curvas de viabilidade celular e valores de  $IC_{50}$  dos tratamentos com extratos fúngicos e extrato puro em células MIA PaCa-2



Fonte: O autor, 2024

Com base nesses resultados, e considerando que o IC<sub>50</sub> do extrato do fungo FM2.1 foi inferior, foi realizado um teste adicional, utilizando apenas o extrato do fungo FM2.1 e do extrato puro. No Gráfico 10 se observa a comparação da viabilidade celular após o tratamento com o extratos do fungo FM2.1 e o extrato puro, revelando que houve diferenças significativas entre eles nas concentrações de 50%, 25% e 12,5%. Em relação a concentração 6.25% não foi observada uma diferença significativa. Esses resultados sugerem que o extrato de FM2.1 possui um efeito mais acentuado na redução da viabilidade celular em comparação ao extrato puro nas concentrações mais altas.

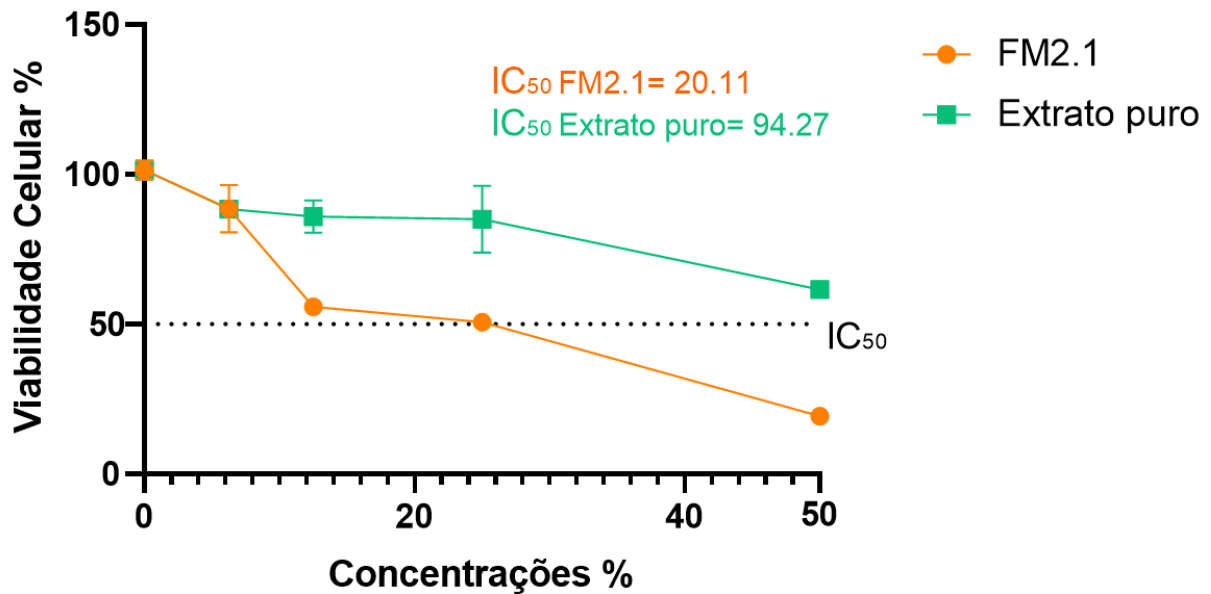
**Gráfico 10** - Comparação dos valores de viabilidade celular (%) entre o tratamento com o extrato do fungo FM2.1 e o extrato puro em células MIAPaCa-2



Fonte: O autor, 2024

No Gráfico 11, são apresentadas as curvas de viabilidade celular e os valores de IC<sub>50</sub>, evidenciando uma diferença acentuada entre o extrato do fungo FM2.1 e o extrato puro. Observa-se uma diferença significativa nas curvas entre os dois tratamentos, onde o extrato do fungo FM2.1 apresentou um IC<sub>50</sub> consideravelmente menor.

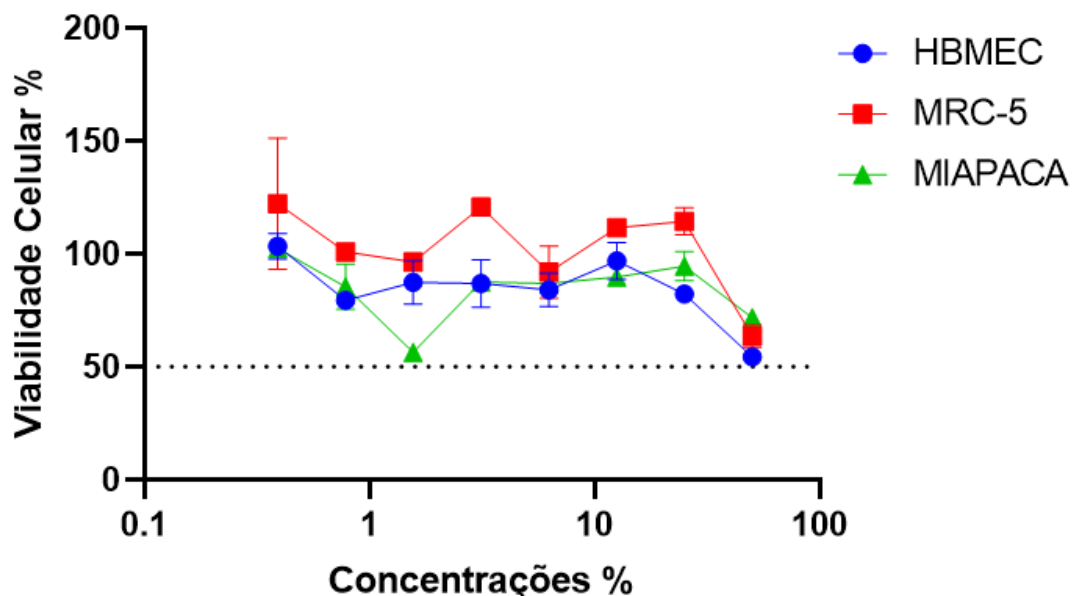
**Gráfico 11** - Curvas de viabilidade celular e valores de IC<sub>50</sub> dos tratamentos com o extrato fúngico de FM 2.1 e extrato puro em células MIA PaCa-2



Fonte: O autor, 2024

Para avaliar melhor o efeito do extrato puro na viabilidade celular das três linhagens celulares, foram realizados MTT com oito concentrações diferentes (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78% e 0,39%). No Gráfico 12, são apresentadas as curvas de viabilidade celular em resposta ao tratamento com o extrato puro. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos nessa análise foram de 460,9 para HBMEC, 50,77 para MRC-5 e 2,728e+023 para MIA PaCa-2

**Gráfico 12** - Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT em MIA PaCa-2 ao ser tratado com distintas concentrações dos controles

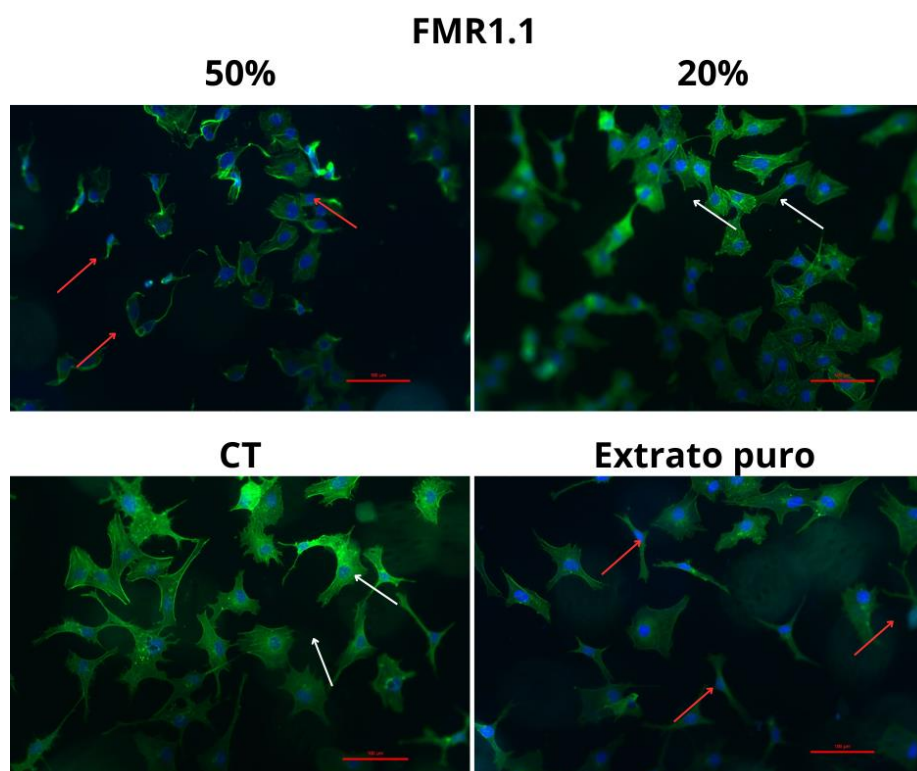


Fonte: O autor, 2024

### 6.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CITOESQUELETO E NÚCLEO DAS CÉLULAS

Foi realizado um ensaio de fluorescência com as células Mia PaCa-2, empregando DAPI para marcar os núcleos e faloidina para marcar as fibras de actina do citoesqueleto. Com base nos resultados dos ensaios de MTT, em que os extratos dos fungos FM2.1 e FMR1.1 apresentaram  $IC_{50}$  inferiores ao do extrato puro, decidiu-se avançar com este experimento. Foram utilizadas duas concentrações dos extratos fúngicos, 20% e 50%, o extrato puro a 50% e um controle adicional com DMEM. O objetivo foi observar as diferenças morfológicas nas células entre os diferentes tratamentos. Na Figura 17, são apresentadas imagens das células Mia PaCa-2 tratadas com o extrato fúngico FM2.1, por outro lado, a Figura 18 exibe as imagens das mesmas células, mas tratadas com o extrato do fungo FMR1.1, incluindo também os outros tratamentos.

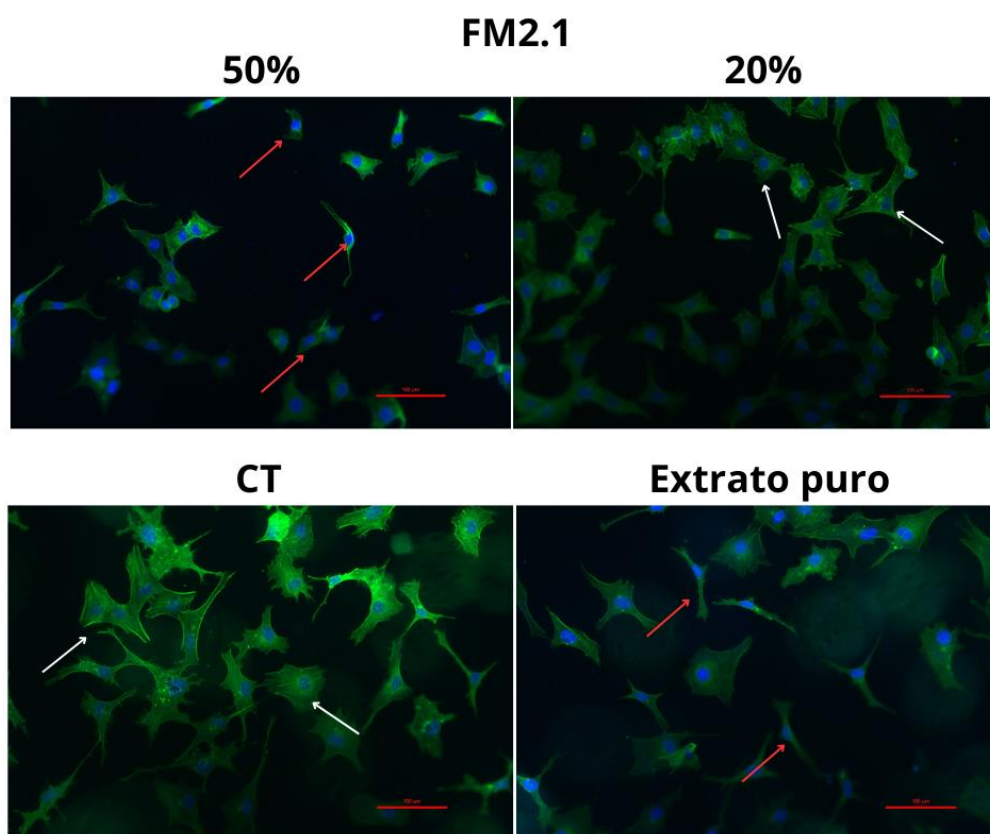
**Figura 17** - Análise morfológica do núcleo e citoesqueleto das células Mia PaCa-2 tratadas com extrato FMR1.1 nas concentrações de 20% e 50%, extrato puro e o controle (CT)



Fonte: O autor, 2024

*Nota: As imagens mostram células da linhagem Mia PaCa-2, marcadas com DAPI para o núcleo (azul) e faloidina para as fibras de actina (verde). Todas as imagens são sobreposições capturadas com uma objetiva de 20x. As setas vermelhas indicam deformações no citoesqueleto e no núcleo, enquanto as setas brancas apontam para estruturas mais normalizadas.*

**Figura 18-** Análise morfológica do núcleo e citoesqueleto das células Mia PaCa-2 tratadas com extrato fúngico FM2.1 nas concentrações de 20% e 50%, o extrato puro e o controle (CT)



Fonte: O autor, 2024

*Nota: As imagens mostram células da linha Mia PaCa-2, marcadas com DAPI para o núcleo (azul) e faloidina para as fibras de actina (verde). Todas as imagens são sobreposições capturadas com uma objetiva de 20x. As setas vermelhas indicam deformações no citoesqueleto e no núcleo, enquanto as setas brancas apontam para estruturas mais normalizadas.*

Nas imagens obtidas dos ensaios de fluorescência, foi possível observar que, na concentração de 50% dos extratos FM2.1 e FMR1.1, havia uma quantidade visivelmente menor de células na objetiva de 20x. Além disso, muitas dessas células apresentavam deformações no citoesqueleto ou no núcleo, em contraste com a

concentração de 20% e o controle. Na concentração de 20%, ambos os extratos não mostraram diferenças morfológicas significativas em relação ao controle, mantendo o citoesqueleto e o núcleo intactos. No extrato puro, algumas células também apresentaram deformações, com uma leve redução na quantidade celular comparada ao controle.

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a atividade antitumoral de extratos fúngicos contendo L-asparaginase livre de glutaminase e urease. Para isso, foi realizada uma triagem enzimática com fungos isolados de amostras de solo e madeira. Os resultados dessa triagem evidenciam o grande potencial dos microrganismos da Antártica na produção de enzimas de interesse biotecnológico. Dos 39 isolados antárticos avaliados em meio sólido suplementado com vermelho de fenol, três cepas se destacaram por produzirem L-asparaginase livre de glutaminase e urease, representando aproximadamente 7,5% das linhagens analisadas.

Ao comparar com outros estudos, Ashok *et al.* (2019) analisaram 55 isolados fúngicos obtidos de amostras de solo e musgo, e observaram que 30 isolados cresceram apenas em meios contendo asparagina e não em placas com glutamina nem ureia, os fungos estudados pertencem a espécies como *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Coprinopsis cinerea*, *Coprinopsis sp.* e *Trichosporon asahii*. Em outro estudo conduzido por De Andrade *et al.* (2023), 31 fungos foram testados em meio sólido para a produção de L-asparaginase, dos quais 13 apresentaram a enzima livre de glutaminase e urease, dentre esses, nove pertenciam aos gêneros *Aspergillus*, *Collariella*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Peroneutypa*, *Xylaria* e *Trametes*.

Freire *et al.* (2021) investigaram 134 cepas de leveduras isoladas de sedimentos marinhos na Ilha Rei George, identificando nove leveduras produtoras de L-asparaginase livre de glutaminase. Entre elas, *Leucosporidium muscorum* CRM 1648 demonstrou a maior atividade enzimática. De forma semelhante, Sánchez-Moguel *et al.* (2023) realizaram uma triagem inicial de 40 cepas de leveduras isoladas na Ilha Rei George, pertencentes a 13 espécies diferentes, e identificaram *Leucosporidium scottii* L115 como produtora de L-asparaginase sem atividade glutaminase. Esses resultados mostram o potencial dos fungos antárticos em produzirem a L-asparaginase livre de glutaminase e urease.

Ao comparar as metodologias utilizadas nos estudos mencionados, seria pertinente incorporar algumas análises adicionais ao presente estudo para confirmar a produção de L-asparaginase livre de glutaminase e urease. No estudo de Ashok *et al.* (2019), por exemplo, foram realizados testes com o indicador colorimétrico azul de bromotimol, que permitiram uma detecção mais precisa das mudanças de pH, algo

que pode não ser tão evidente com o uso de um único indicador, como o vermelho de fenol. A inclusão desse tipo de análise no presente estudo poderia melhorar a precisão na detecção da atividade enzimática. Além disso, seria interessante realizar testes utilizando placas com  $\text{NaNO}_3$  para avaliar a especificidade da enzima para a asparagina. Isso forneceria dados complementares importantes, ajudando a diferenciar se a atividade observada é realmente de L-asparaginase ou se a enzima atua também sobre outros substratos, como glutamina.

Neste estudo, foram avaliados os índices enzimáticos dos três fungos que apresentaram atividade positiva exclusivamente nas placas contendo asparagina. Os valores obtidos foram então comparados com os de outros estudos, como o de Ashok *et al.* (2019), onde o maior índice enzimático registrado foi de 5,83 e o menor de 1. Os índices enzimáticos determinados no presente trabalho estão dentro dessa faixa, indicando que os resultados aqui obtidos são consistentes com os valores relatados na literatura, o que reforça a validade dos resultados obtidos. O estudo de Sisay *et al.* (2024) sugere que a formação de halos mais amplos ao redor do micélio é um indicativo de maior capacidade de utilização de L-asparagina, resultante da produção de L-asparaginase.

Em relação à produção dos extratos fúngicos, foram realizados cultivos a duas temperaturas diferentes: 15 °C e 30 °C. Observou-se que, a 30 °C, não houve crescimento dos fungos. Ao comparar com outros estudos, Ashok *et al.* (2019) cultivaram fungos a 30 °C e não relataram problemas de desenvolvimento para fungos antárticos, porém considerando que este estudo envolveu outro tipo de amostra, esse resultado pode ser atribuído à temperatura. Ao comparar os resultados obtidos neste estudo com outros que também trabalharam com microrganismos psicrófilos, a temperatura de 15 °C pareceu ser a mais adequada entre as duas testadas para o bom desenvolvimento do fungo e para produção de ASNase. O estudo de Kostadinova *et al.* (2017) relatou que os microrganismos psicrófilos apresentam uma temperatura de crescimento ótima em torno de 15 °C, com um limite máximo de  $\leq 20$  °C. Além disso, Freire *et al.* (2021) indicaram que a melhor temperatura para a produção de ASNase foi entre 12 e 15 °C. E no estudo de Duarte *et al.* (2018) a temperatura ideal foi de 20 °C para produção de ASNase.

Assim, podem ser mencionados outros fatores que podem ter influenciado no crescimento dos fungos a 30 °C, por exemplo a diferença nos equipamentos utilizados. Os cultivos a 15 °C foram realizados no shaker localizado no laboratório DELABEN, enquanto os experimentos a 30 °C foram conduzidos no shaker do laboratório G009. Durante os experimentos, foi notado que o shaker do G009 apresentava uma agitação consideravelmente mais intensa, apesar de a velocidade ajustada ser a mesma em ambos os equipamentos (180 rpm). Além disso, depois de feito o experimento foi observado que outras pessoas que usam esse shaker do G009 para o cultivo de fungos usam uma agitação de 130 rpm, que é uma agitação menor, parecido com a agitação do shaker do DELABEN a 180 rpm. A agitação mais forte pode ter influenciado negativamente o crescimento dos fungos. Uma agitação excessiva pode alterar a oxigenação do meio, interferindo na troca gasosa necessária para o desenvolvimento adequado dos microrganismos. Além disso, a maior turbulência pode ter afetado a distribuição e disponibilidade de nutrientes no meio de cultura, prejudicando o acesso dos fungos aos compostos essenciais para o seu crescimento (Papagianni, 2004). Essas condições desfavoráveis podem ter afetado a diferença no desenvolvimento observado entre as duas temperaturas, o ideal seria fazer um novo teste, usando o mesmo shaker para ambas as temperaturas.

Devido à decisão de não realizar novos cultivos a 30 °C, utilizou-se apenas o extrato fúngico obtido a 15 °C. O extrato foi cuidadosamente filtrado e armazenado em tubos do tipo Falcon estéreis para preservar sua integridade.

Um ponto importante para discutir é saber se as enzimas produzidas pelos fungos em estudo são relevantes para serem usados no tratamento de LLA, para isso é relevante mencionar a estabilidade térmica, Beckett & Gervais (2019) no seu estudo discutiram sobre a importância da estabilidade térmica melhorada das enzimas, pois pode conferir estabilidade de armazenamento a longo prazo e, portanto, maior vida útil. Eles questionaram o uso de extremófilos como as bactérias *Thermus thermophilus* e *Pyrobaculum calidifontis*, que apresentam temperaturas ótimas para a atividade enzimática acima da faixa clinicamente relevante de 65 °C e 100 °C, respectivamente. Da mesma forma, analisam o estudo de Ashok, onde as asparaginases provenientes de fungos da Antártica com uma temperatura ótima baixa de 30 °C também podem ter valor terapêutico limitado, assim como aquelas com um pH ótimo bem fora da faixa humana normal. Assim, se faz necessária a realização de mais estudos para a caracterização das enzimas produzidas neste estudo.

Em relação aos resultados obtidos pelos dos ensaios de MTT realizados na linhagem celular HBMEC, eles indicaram que não houve diferença significativa entre os extratos obtidos de diferentes Erlenmeyers do mesmo fungo, sugerindo que as variações nos extratos não impactaram a viabilidade celular. No entanto, foi observada uma diminuição na viabilidade celular na concentração de 50%, tanto para o extrato fúngico quanto para o extrato puro (controle).

Essa redução na viabilidade celular pelo extrato puro pode estar relacionada à composição do meio Czapek Dox modificado (MCD), que, apesar de não conter compostos tradicionalmente considerados tóxicos em concentrações normais, pode ter se tornado prejudicial devido à elevada concentração de nutrientes como o zinco (Schoofs; Schmit; Rink, 2024.). Outro fator a ser considerado é o pH do meio, que não foi medido antes e após as 96 horas de incubação, nem antes das análises no cultivo celular. Variações no pH podem comprometer a viabilidade celular, especialmente se o pH se desviar do intervalo fisiológico ideal para as células. Além disso, depois que o extrato foi armazenado, foi observada precipitação no meio armazenado nos Falcons. Embora a precipitação tenha desaparecido após agitação, seria importante realizar análises mais detalhadas para determinar se essa precipitação ou outros fatores relacionados à composição do meio contribuíram para a toxicidade observada no extrato. É importante mencionar também que a diminuição da viabilidade celular pode estar relacionada à mudança na composição do meio onde são cultivadas as células, pois variações podem afetar no seu bom desenvolvimento e como no presente estudo foi adicionado um meio usado por fungos, diferente ao usado pelas células pode ter afetado. No entanto, investigações futuras poderiam esclarecer a causa exata dessa redução na viabilidade celular.

Os resultados dos ensaios de MTT realizados nas células HBMEC e MRC-5 indicam que não houve diferença acentuada na viabilidade celular entre os tratamentos com os extratos fúngicos e o extrato puro. No entanto, foi observada uma maior redução na viabilidade celular nas células de carcinoma pancreático Mia PaCa-2, especialmente em concentrações mais elevadas dos extratos. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que células cancerígenas, como as Mia PaCa-2, possuem maior sensibilidade à depleção de aminoácidos como a asparagina, o que pode ser explorado terapêuticamente com L-ASNase (Van Trimont *et al.*, 2022)

Estudos indicam que a mutação no gene KRAS, presente em muitos casos de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), está associada à dependência

metabólica dessas células de glutamina (Gln) e asparagina (Asn), criando uma vulnerabilidade que pode ser explorada terapeuticamente com a L-ASNase (Van Trimont *et al.*, 2022). Essa dependência metabólica ocorre porque o KRAS mutado altera o metabolismo celular, promovendo a regulação positiva da glutamato-oxaloacetato transaminase 2 (GOT2), crucial no metabolismo de Gln e Asn. Além do PDAC, outros tipos de câncer como glioblastoma, câncer de mama e carcinoma hepatocelular também apresentam baixa expressão da asparagina sintetase (ASNS), reforçando o potencial da L-ASNase como agente terapêutico nessas neoplasias agressivas (Vimal & Kumar, 2018).

Estudos *in vivo*, como o de Dufour *et al.* (2012), mostram que a privação de Asn induzida pela L-ASNase pode ser particularmente eficaz em tumores com baixa expressão de ASNS. Nesse contexto, a linhagem celular SW1990, derivada de carcinoma pancreático, demonstrou alta sensibilidade à privação de asparagina. Esse estudo verificou que aproximadamente 52% dos casos de PDAC esporádico não expressavam ou apresentavam baixa expressão de ASNS, resultando em uma maior sensibilidade das células tumorais à depleção de Asn e à ação da L-ASNase. Esses achados sugerem que a ausência ou baixa expressão de ASNS em células pancreáticas favorece a citotoxicidade induzida pela L-ASNase.

No entanto, o papel da glutaminase ainda é uma questão de debate em relação à atividade anticâncer da L-ASNase. Embora a coatividade da glutaminase possa contribuir para a depleção de Gln em alguns cânceres, como o PDAC, há relatos conflitantes na literatura. Em alguns casos, a depleção de Asn é suficiente para inibir o crescimento tumoral, enquanto em outros, a dependência de Gln se torna crítica após a privação de Asn, sugerindo que variantes de L-ASNase com baixa atividade glutaminase podem não ser eficazes para todos os tipos de câncer (Van Trimont *et al.*, 2022).

Em relação aos resultados obtidos para o ensaio de MTT com o extrato puro nas três linhagens celulares, observou-se uma diferença significativa em relação aos resultados iniciais, com um IC<sub>50</sub> muito maior nas células HBMEC e MIA PaCa-2. Em contrapartida, nas células MRC-5, o valor de IC<sub>50</sub> permaneceu semelhante ao observado anteriormente. Essa discrepância pode estar relacionada a diversos fatores, como erros de pipetagem, variações nas condições experimentais.

Os resultados do ensaio de fluorescência mostraram que os extratos contendo L-asparaginase, FMR1.1 e FM2.1, exerceram um efeito tóxico claro sobre as células

Mia PaCa-2, principalmente na concentração de 50%. Nessas condições, observou-se deformação e redução do citoesqueleto, sugerindo morte celular, possivelmente por apoptose ou necrose. Em contraste, as células tratadas com 20% dos extratos mantiveram uma estrutura semelhante ao controle, sem alterações visuais significativas. No extrato puro, algumas células também apresentaram deformações, com uma leve redução na quantidade celular em comparação ao controle e à concentração de 20%. Esses achados indicam que a L-asparaginase, presente nos extratos fúngicos, pode ser responsável pela toxicidade observada, especialmente em concentrações mais altas.

Esses resultados indicam que a L-asparaginase, presente nos extratos fúngicos, pode ser responsável pela toxicidade observada, especialmente em concentrações mais altas. Enquanto o ensaio de fluorescência sugere uma maior toxicidade em 50%, o ensaio MTT revelou um IC<sub>50</sub> de 20,11% para FM2.1. Para confirmar esses resultados, será fundamental realizar mais ensaios de fluorescência em concentrações intermediárias, como 38,37% para FM2.1 e 42,30% para FMR1.1, conforme apontado pelos IC<sub>50</sub> dos ensaios de MTT. Isso permitirá uma avaliação mais precisa do efeito tóxico da L-asparaginase nas células Mia PaCa-2.

É importante ressaltar que a análise foi limitada pela ausência de múltiplas imagens, uma vez que o experimento foi realizado apenas uma vez e não foram capturadas todas as fotografias necessárias. Assim, seria interessante repetir o experimento para confirmar esses resultados preliminares, isso permitirá uma avaliação mais precisa do efeito tóxico da L-asparaginase nas células Mia PaCa-2.

Uma observação importante a ser discutida é o efeito do extrato puro. Esse extrato não contém a enzima L-asparaginase e seus compostos não deveriam apresentar toxicidade, entretanto, os resultados indicaram deformações celulares, sugerindo algum grau de toxicidade, tal resultado pode estar relacionado a mudança na composição do meio onde as células são cultivadas normalmente, pois o extrato puro é um meio de cultivo para fungos.

Além disso, considerando que análises anteriores confirmaram que os fungos FMR1.1 e FM2.1 produzem L-asparaginase, reconhecida por suas propriedades anticancerígenas, especialmente em casos de leucemia infantil (Fonseca *et al.*, 2021), este estudo demonstrou uma maior suscetibilidade das células cancerígenas Mia PaCa-2 em comparação às outras linhagens de células normais. Isso sugere que a L-asparaginase exerce um efeito mais pronunciado em células tumorais, destacando

seu potencial como agente antitumoral. Os resultados deste estudo abrem caminho para futuras investigações mais aprofundadas, tanto em relação às propriedades bioquímicas e estruturais da enzima quanto ao seu potencial terapêutico no tratamento de diferentes tipos de câncer.

## 8. CONCLUSÃO

O presente estudo investigou a produção de L-asparaginase livre de glutaminase e urease por fungos isolados de amostras de solo e madeira da Antártica. Os fungos analisados mostraram uma notável capacidade de produção enzimática, com os isolados FM2.1, FM2.2 e FMR1.1 se destacando como produtores exclusivos da enzima L-asparaginase. Os resultados das análises de toxicidade indicaram que os extratos dos fungos FM2.1 e FMR1.1 provocaram uma diminuição significativa da viabilidade celular nas células MIA PaCa-2, em comparação com as linhagens não tumorais HBMEC e MRC-5, sugerindo uma potencial atividade antitumoral desses extratos. Particularmente, o extrato do fungo FM2.1 demonstrou uma redução mais acentuada da viabilidade celular nas células MIA PaCa-2 em relação ao extrato puro, com diferenças estatisticamente significativas observadas nas concentrações de 50%, 25% e 12,5%. Contudo, são necessários estudos adicionais para caracterizar de forma mais abrangente os compostos presentes nos extratos e confirmar sua atividade antitumoral, bem como avaliar a viabilidade de sua aplicação em tratamentos oncológicos.

## REFERÊNCIAS

- AMATTO, I. V. S. **Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* em Fermentação em Estado Sólido (FES)**. 2019. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.
- ARENZ, B. E.; BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 308-315, 2011.
- ARUMUGAM, N.; THANGAVELU, P. Purification and anticancer activity of glutaminase and urease free intracellular L-asparaginase from *Chaetomium* sp. **Protein Expression and Purification**, v. 190, p. 106006, 2022.
- ASHOK, A. *et al.* Microbes producing L-asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of Antarctic soil and moss. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1423, 2019.
- BECKETT, A.; GERVAIS, D.. What makes a good new therapeutic L-asparaginase?. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 152, 2019.
- BOTTOS, E. M., *et al.* Bacterial community structures of Antarctic soils. Antarctic terrestrial microbiology: **Physical and biological properties of Antarctic soils**, p. 9-33, 2014.
- BOGER, S. D. Antarctica before and after Gondwana. **Gondwana Research**, vol. 19, no 2, p. 335-371, 2011.
- CANCER TODAY. **Global Cancer Statistics**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 10 maio 2023.
- CARMICHAEL, J. *et al.* Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer research**, v. 47, n. 4, p. 936-942, 1987.
- CHIU, M. *et al.* Asparagine synthetase in cancer: beyond acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1480, 2020.
- CHOWN, S. L. *et al.* The changing form of Antarctic biodiversity. **Nature**, v. 522, n. 7557, p. 431-438, 2015. DOI: 10.1038/nature14505.
- COVINI, D. *et al.* Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 7, n. 1, p. 4-13, 2012.
- CUI, Y.; YAN, Y. The global burden of childhood and adolescent leukaemia and attributable risk factors: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. **Journal of Global Health**, v. 14, 2024.

DA CUNHA, M. C. *et al.* Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. **Food research international**, v. 126, p. 108658, 2019.

DE ANDRADE, G. A. K. *et al.* Screening of endophytic fungi from Antarctic mosses: Potential production for L-asparaginase free of glutaminase and urease activity. **Journal of Biotechnology**, v. 377, p. 1-12, 2023.

DE MATTOS, L. F. A inclusão da Antártica no conceito de Entorno Estratégico Brasileiro. **CAPA-REVISTA DAEGN**, v.20 (1), pp.165-191, 2016

DORIYA, K.; KUMAR, D. S.. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-10, 2016.

DUARTE, A. W. F. *et al.* Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 600–619, 2018. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1379468>.

DUFOUR, E. *et al.* Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation. **Pancreas**, v. 41, n. 6, p. 940-948, 2012.

EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62-71, 2016.

FERLAY, J. *et al.* **Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow (version 1.1)**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>. Acesso em: [11 march 2024].

FERREIRA, F. V. *et al.* Characteristics of a Cold-Adapted L-glutaminase with Potential Applications in the Food Industry. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 193, p. 3121–3138, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03596-8>.

FONSECA, M. H. G. *et al.* Circumventing the side effects of L-asparaginase. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111616, 2021.

FREIRE, R. K. B. *et al.* Glutaminase-free L-asparaginase production by *Leucosporidium muscorum* isolated from Antarctic marine-sediment. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 277-288, 2021.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. John Wiley & Sons, 2015.

GALASSI, F. M. *et al.* A historical and palaeopathological perspective on cancer. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 1, p. E93-E97, 2024.

GARMENDIA, G. *et al.* Fungal diversity in the coastal waters of King George Island (maritime Antarctica). **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 142, 2021. doi:10.1007/s11274-021-03112-4.

GEORLETTE, D. *et al.* Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 25-42, 2004.

GERDAY, C. *et al.* Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 103-107, 2000.

GODINHO, V. M. *et al.* Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles: life under extreme conditions**, v. 19, n. 3, p. 585-596, 2015.

GONÇALVES, V. N., *et al.* Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **FEMS microbiology ecology**, vol. 82, no 2, p. 459-471, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HAUSMAN, D. M. What Is Cancer? **Perspectives in biology and medicine**, v. 62, n. 4, p. 778-784, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1353/pbm.2019.0046>.

HUANG, J. *et al.* Disease burden, risk factors, and trends of leukaemia: A global analysis. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 904292, 2022.

HOPKINS, D. W., *et al.* Controls on the distribution of productivity and organic resources in Antarctic Dry Valley soils. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, vol. 273, no 1602, p. 2687-2695, 2006.

IMADA, A. *et al.* Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85-99, 1973.

KARUNARATHNA, I. *et al.* Leukemia: Classification, risk factors, and diagnostic challenges. 2024.

KHABAROVA, O. *et al.* Trends in childhood leukemia incidence in urban countries and their relation to environmental factors, including space weather. **Frontiers in Public Health**, v. 12, p. 1295643, 2024.

KOSTADINOVA, N. *et al.* Comparison of the oxidative stress response of two Antarctic fungi to different growth temperatures. **Polish Polar Research**, p. 393-408-393-408, 2017.

LEIVA, S. *et al.* Diversity of pigmented Gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica. **FEMS microbiology letters**, v. 362, n. 24, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv206>.

LEFIN, N. *et al.* Current state of molecular and metabolic strategies for the improvement of L-asparaginase expression in heterologous systems. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1208277, 2023.

LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY. **Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Teens**. Disponível em: <https://www.lls.org/booklet/acute-lymphoblastic-leukemia-all-children-and-teens>. Acesso em: 22 out. 2024.

LIU, J. *et al.* Diversity of protease-producing bacteria in the soils of the South Shetland Islands, Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 114, n. 4, p. 457–464, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01533-7>.

LIMA, I. G. O. *et al.* Antarctic environments as a source of bacterial and fungal therapeutic enzymes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, suppl 1, e20210452, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220210452>.

LORENZI, P. L. *et al.* Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 11, p. 2613-2623, 2006.

MAHAJAN, R. V. *et al.* Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99037, 2014.

NAMAYANDEH, S. M. *et al.* Global leukemia in children 0-14 statistics 2018, incidence and mortality and Human Development Index (HDI): GLOBOCAN sources and methods. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 21, n. 5, p. 1487, 2020.

NUNES, J. C. F. *et al.* Recent strategies and applications for L-asparaginase confinement. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5827, 2020.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

RAMOS, Larissa R., *et al.* Firmicutes in different soils of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, vol. 42, p. 2219-2226, 2019.

RABERT, C. *et al.* In Situ Rhizosphere Microbiome in Antarctic Vascular Plants, Modulated by Soil Condition. **Microbiology resource announcements**, v. 9, n. 50, p. e01125-20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MRA.01125-20>.

RATUCHNE, Aline *et al.* A new extracellular glutaminase and urease-free L-asparaginase from *Meyerozyma guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 715-723, 2023.

ROY, P. S.; SAIKIA, B. J. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian journal of cancer**, v. 53, n. 3, p. 441-442, 2016. DOI: 10.4103/0019-509X.200658.

RÜCKAMP, Martin *et al.* Observed glacial changes on the King George Island ice cap, Antarctica, in the last decade. **Global and Planetary Change**, v. 79, n. 1-2, p. 99-109, 2011.

RUISE, S. *et al.* Fungos na Antártica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, vol. 6, pág. 127-141, 2007.

SAITO, R. *et al.* Fundamentos de oncologia molecular. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2015.

SAMIE, N. *et al.* Psychrophilic  $\alpha$ -amylase from *Aeromonas veronii* NS07 isolated from farm soils. **Process Biochemistry**, vol. 47, no 9, p. 1381-1387, 2012.

SÁNCHEZ-MOGUEL, I. *et al.* Antarctic yeasts as a source of L-asparaginase: Characterization of a glutaminase-activity free L-asparaginase from psychrotolerant yeast *Leucosporidium scottii* L115. **Process Biochemistry**, v. 129, p. 121-132, 2023.

SETH, R.; SINGH, A. Leukemias in children. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 82, p. 817-824, 2015.

SETZER, A. W.; HARTE, F. Estudo das temperaturas mínimas de julho 1995 na Estação Antártica Comandante Ferraz, ilha Rei George. **Pesquisa Antártica Brasileira**, v. 4, p. 171-181, 2004.

SHEN, L., ZHANG, S.; CHEN, G. Regulated strategies of cold-adapted microorganisms in response to cold: a review. **Environmental science and pollution research international**, v. 28, n. 48, p. 68006-68024, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-16843-6.

SCHOOFS, H.; SCHMIT, J.; RINK, L. Zinc toxicity: Understanding the limits. **Molecules**, v. 29, n. 13, p. 3130, 2024.

SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-adapted enzymes. **Annual review of biochemistry**, v. 75, p. 403-433, 2006. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723.

SIMÕES, J. C.; ARIGONY NETO, J.; BREMER, U. F. O uso de mapas antárticos em publicações. 2004.

SIMÕES, J. C. O ambiente antártico: domínio de extremos. In: SIMÕES, J. C. *et al.* Antártica e as Mudanças Globais: um desafio para a humanidade. **Série Sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, p. 15–27, 2011.

SINGH, P.; BANIK, R. M. Biochemical characterization and antitumor study of L-glutaminase from *Bacillus cereus* MTCC 1305. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, p. 522-531, 2013.

SINGH, J.; DUBEY, A. K.; SINGH, R. P. Antarctic terrestrial ecosystem and role of pigments in enhanced UV-B radiations. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, vol. 10, p. 63-77, 2011.

SISAY, T. *et al.* Isolation and characterization of fungi producing L-asparaginase with reduced L-glutaminase activity from soil samples. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 71, p. 10-18, 2024.

SOUBA, W. W. Glutamine and cancer. **Annals of surgery**, v. 218, n. 6, p. 715, 1993.

STACEY, D. W.; HITOMI, M. Cell cycle studies based upon quantitative image analysis. Cytometry Part A: **The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 73, n. 4, p. 270-278, 2008.]

SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. **Journal of cancer science & therapy**, v. 1, n. 2, p. 1, 2009.

SUNG, H., *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TANDON, S. *et al.* Therapeutic enzymes: discoveries, production and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102455, 2021.

THE WORLD FACTBOOK 2021. Washington, DC: **Central Intelligence Agency**, 2021. Disponível em: <https://www.cia.gov/the-world-factbook/>. Acesso em: 20 de maio de 2023

VAN TRIMPONT, M. *et al.* Novel insights on the use of L-asparaginase as an efficient and safe anti-cancer therapy. **Cancers**, v. 14, n. 4, p. 902, 2022.

VAZ, A. B. M. *et al.* The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2011, vol. 42, p. 937-947.

VIMAL, A.; KUMAR, A. L-Asparaginase: a feasible therapeutic molecule for multiple diseases. **3 Biotech**, v. 8, n. 6, p. 278, 2018.

WADE, H. E.; ROBINSON, H. K.; PHILLIPS, B. W. Asparaginase and glutaminase activities of bacteria. **Microbiology**, 69(3), 299-312, 1971

Website citation Ferlay J, *et al.* (2024). **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed [01 march 2024]

WEINBERG, R. A. *et al.* The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

WENTZEL, L. C. P. *et al.* Fungi from admiralty bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. **Microbial ecology**, v. 77, p. 12-24, 2019.

YARZÁBAL, L. A. Antarctic psychrophilic microorganisms and biotechnology: history, current trends, applications, and challenges. **Microbial models: From environmental to industrial sustainability**, p. 83-118, 2016.

YERGEAU, E.; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze–thaw cycle frequency. **Environmental microbiology**, vol. 10, no 9, p. 2223-2235, 2008.

ZHANG, E. *et al.* Lifting the veil on arid-to-hyperarid Antarctic soil microbiomes: a tale of two oases. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2020.

ZHOU, M. Y. *et al.* Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of King George Island, Antarctica. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79668, 2013.