

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida**

---

**Expresión y caracterización de una L-asparaginasa sin actividad  
secundaria de glutaminasa de *Streptomyces scabrisporus*.**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Ricardo Rodríguez Vargas**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**Ricardo Rodríguez Vargas**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dr. Alejandro Huerta Saquero**  
Director de tesis

**Dr. Andrés Zárate Romero**

**Dr. Víctor Ruiz Cortés**

**Dra. Patricia Juárez Camacho**



**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Ricardo Rodríguez Vargas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida.

**Expresión y caracterización de una L-asparaginasa sin actividad secundaria de glutaminasa de *Streptomyces scabrissporus*.**

Resumen aprobado por:

Dr. Alejandro Huerta Saquero  
**Director de tesis**

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es parte de un grupo de cánceres hematológicos que se distinguen por la proliferación descontrolada de tipo monoclonal u oligoclonal de células precursoras de linfocitos B dentro de la médula ósea. Dentro de los síntomas asociados al padecimiento se encuentra el agrandamiento de órganos linfoides como el bazo y los ganglios linfáticos, además de fiebre. El uso de la L-asparaginasa se ha convertido en un tratamiento estándar en los casos infantiles con LLA, debido a que reduce los niveles de asparagina en el torrente sanguíneo del cual son dependientes las células leucémicas al no poder sintetizarlo por su cuenta. La reducción de asparagina lleva al arresto celular y muerte por apoptosis. No obstante, el uso de la L-asparaginasa presenta diversos obstáculos debido a reacciones inmunogénicas por su origen bacteriano (*Escherichia coli*), y la actividad cruzada de glutaminasa que presenta la enzima, que provoca la acumulación de amonio y por ende, toxicidad en diferentes órganos y tejidos. Es por ello que se buscan enzimas con menor perfil inmunogénico que preserven su afinidad por el sustrato (asparagina), y que no tengan actividad de glutaminasa, como la L-asparaginasa de *Streptomyces scabrissporus*. En este trabajo se purificó la L-asparaginasa de *S. scabrissporus*, se caracterizó y se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima en condiciones fisiológicas, para evaluar su viabilidad como un potencial tratamiento quimioterapéutico contra la LLA.

**Palabras clave:** *Streptomyces scabrissporus*, L-asparaginasa, leucemia linfocítica aguda.

Abstract of the thesis presented by **Ricardo Rodríguez Vargas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences.

***Expression and characterization of a L-asparaginase without secondary glutaminase activity from Streptomyces scabrisporus***

Abstract approved by:

Dr. Alejandro Huerta Saquero  
**Thesis Director**

Acute lymphocytic leukaemia (ALL) is a group of haematological cancers characterized by the uncontrolled monoclonal or oligoclonal proliferation of B lymphocyte precursor cells within the bone marrow. Among the symptoms of this condition are the enlargement of lymphoid organs, such as the spleen and lymph nodes, and fever. L-asparaginase has become a standard treatment in childhood cases with ALL because it reduces the levels of asparagine in the bloodstream on which leukemic cells are dependent, as they cannot synthesize it on their own. The reduction of asparagine leads to cell arrest and death by apoptosis. However, the use of L-asparaginase presents various obstacles due to immunogenic reactions ascribed to its bacterial origin (*Escherichia coli*) and the cross-glutaminase activity that the enzyme presents, which causes the accumulation of ammonium and, therefore, toxicity in different organs and tissues. Enzymes with a lower immunogenic profile that preserve their affinity for the substrate (asparagine) and that do not have glutaminase activity are needed, such as L-asparaginase from *Streptomyces scabrisporus*. In this work, the L-asparaginase from *S. scabrisporus* was purified and characterized, and the kinetic parameters of the enzyme were determined under physiological conditions to evaluate its viability as a potential chemotherapeutic treatment against ALL.

**Keywords:** *Streptomyces scabrisporus*, L-asparaginase, acute lymphoblastic leukemia.

## **Dedicatoria**

*A mis padres, Irma Antonia Vargas Pérez y Ricardo Rodríguez Aparicio por su apoyo incondicional durante la realización de mis estudios de posgrado*

*Y a mis hermanos, Bertha Alicia Rodríguez Vargas y Adrián Rodríguez Vargas.*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado con la beca para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por recibirme y apoyar mi formación académica, al igual que al departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN) por permitirme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de mis actividades experimentales. De la misma forma, al personal administrativo y académico del posgrado en Ciencias de la Vida, por brindarme su apoyo.

Al Dr. Alejandro Huerta Saquero, por recibirme nuevamente para trabajar en su grupo de investigación, por el apoyo para asistir a congresos que ayudaron a complementar mi formación académica y por brindar las herramientas, confianza y libertades para poder realizar este proyecto. De la misma forma quiero agradecer a mi sinodal el Dr. Andrés Zárate Romero, quien siempre estuvo apoyando en todo el proceso de estandarización de los protocolos experimentales y por apoyarme con las dudas técnicas que surgieron en la realización del proyecto.

A mis otros sinodales, la Dra. Patricia Juárez Camacho y el Dr. Víctor Ruiz Cortés, por sus preguntas puntuales que ayudaron a la profundización de los conocimientos básicos de técnicas de laboratorio que se realizaron durante este proyecto y por sus observaciones que fueron importantes en el desarrollo de este.

Finalmente, a todos mis amigos que siempre estaban dispuestos a escucharme hablar de las eventualidades que surgían en el día con día del laboratorio y brindarme su apoyo constante: Krissia, Sophia, Edgar, Germán, Juan Ángel, Tania, Pyma, Lalo, Amirr, Chava. Además, agradezco profundamente a mis compañeros de posgrado que se volvieron amigos y parte esencial durante la realización de la maestría: Fernanda, Mónica, Javier y Roberto quienes fueron proveedores de apoyo, ideas, café y margaritas.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos .....	v
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas.....	ix
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Leucemia linfocítica aguda .....	2
1.1.2 Uso de L-asparaginasa como tratamiento .....	3
1.1.3 Propiedades de la L-asparaginasa para uso terapéutico.....	4
1.1.4 Búsqueda de nuevas fuentes de L-asparaginasa .....	5
1.2 Justificación.....	6
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>8</b>
2.1 Clonación del gen que codifica para la L-asparaginasa y expresión de la proteína recombinante de <i>S. scabrisporus</i> en <i>E. coli</i> .....	8
2.2 Caracterización enzimática de la L-asparaginasa de <i>S. scabrisporus</i> .....	9
2.3 Comparación de actividad enzimática de las asparaginasas de <i>S. scabrisporus</i> y <i>R. etli</i> en condiciones fisiológicas .....	11
2.4 Caracterización cinética de las asparaginasas .....	11

<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>12</b>
3.1 Purificación de la L-asparaginasa de <i>S. scabrisporus</i> .....	12
3.2 Caracterización cinética de la enzima.....	13
3.3 Evaluación de la estabilidad de la enzima bajo distintas condiciones de almacenamiento .	15
3.4 Comparación cinética de las L-asparaginasa de <i>S. scabrisporus</i> y <i>Rhizobium etli</i> en condiciones fisiológicas.....	17
<b>Capítulo 4. Discusión .....</b>	<b>21</b>
4.1 El protocolo de purificación de la L-asparaginasa de <i>S. scabrisporus</i> es muy eficiente, pero requiere de optimización para mejorar su rendimiento.....	21
4.2 Caracterización de los parámetros cinéticos de la enzima.....	22
4.3 Los cambios en el pH del medio pueden alterar el perfil cinético. ....	24
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
5.1 Perspectivas .....	27
<b>Literatura citada .....</b>	<b>29</b>

## Lista de figuras

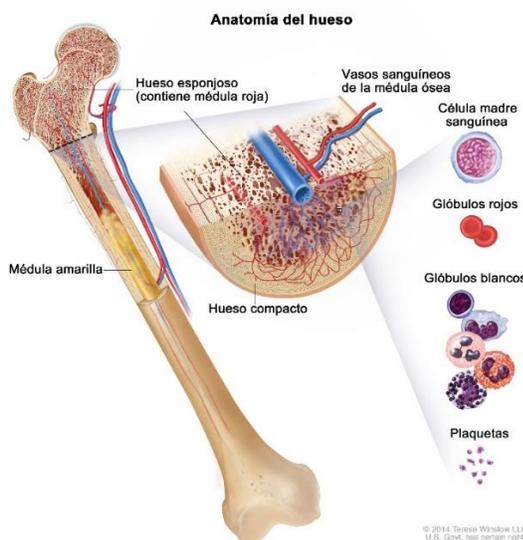
Figura	Página
1. Sitio de proliferación de células precursoras hematopoyéticas durante la LLA. ....	1
2. Árbol filogenético de las familias de proteínas PF00710.11 (A) y PF06089.11 (B).. ....	5
3. Cultivo de la L-asparaginasa recombinante de <i>S. scabrisporus</i> .....	8
4. Proceso de diálisis de las fracciones de proteína soluble. ....	9
5. Proceso de medición de actividad enzimática mediante espectrofotometría.. ....	10
6. Electroforesis de los pasos de producción y purificación de la L-asparaginasa.....	12
7. Electroforesis de las fracciones dializadas... ..	13
8. Evaluación de actividad enzimática de la L-asparaginasa de <i>S. scabrisporus</i> en un gradiente de pH. ....	14
9. Determinación de parámetros cinéticos de la L-asparaginasa de <i>S. scabrisporus</i> . ....	14
10. Evaluación de actividad secundaria de glutaminasa.....	15
11. Evaluación de la estabilidad enzimática.....	16
12. Electroforesis de los pasos de expresión y purificación de la L-asparaginasa de <i>R. etli</i> .. ....	17
13. Cinética enzimática de <i>S. scabrisporus</i> en condiciones fisiológicas.....	18
14. Cinética enzimática de <i>R. etli</i> en condiciones fisiológicas.....	19
15. Alineamiento de proteínas utilizando PyMOL.. ....	20
16. Alineamiento de los residuos del sitio activo de las asparinasas.....	26

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Estabilidad enzimática en distintas condiciones de almacenamiento.....	16
2. Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos entre asparaginasas .....	19
3. Reportes de pH y temperatura óptima para la expresión de L-asparaginasas en especies del género <i>Streptomyces</i> .....	23
4. Parámetros cinéticos de distintas L-asparaginasas (modificado de Beckett & Gervais, 2019)	24

## Capítulo 1. Introducción

La leucemia linfocítica aguda (LLA), es el tipo de cáncer con mayor prevalencia en niños de sociedades desarrolladas alrededor del mundo. El estudio de la LLA ha permitido la clasificación de este padecimiento de acuerdo con el linaje celular por el cual fue originada (células B o T), el estado de la diferenciación celular o por diferentes grupos de loci que son precursores de este cáncer (Greaves, 2018). Una de las principales características presentes en la LLA es la proliferación de tipo monoclonal u oligoclonal de células precursoras hematopoyéticas dentro de la médula ósea (Figura 1) (Mejia-Aranguré, 2011). La sintomatología clínica descrita incluye fiebre, agrandamiento del hígado, bazo y ganglios linfáticos (Stanulla & Schrappe, 2009). Entre los trastornos asociados al tejido linfoide se encuentra la anemia, trombocitopenia y granulocitopenia (Stanulla & Schrappe, 2009).



**Figura 1.** Sitio de proliferación de células precursoras hematopoyéticas durante la LLA (National Cancer Institute, 2011).

El uso de proteínas de origen bacteriano, como la L-asparaginasa, se ha convertido en un tratamiento estándar en los casos infantiles con LLA; no obstante, en el caso de los adultos con este padecimiento, el uso de L-asparaginasa tiene un incremento en la mortalidad por intoxicación debido a reacciones inmunogénicas por el origen bacteriano (*Escherichia coli*) de esta proteína (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Nuevas propuestas para el suministro de fármacos con potencial quimioterapéutico han sido desarrolladas. Un ejemplo son las partículas tipo virus para encapsidar proteínas. El objetivo es formar nanoreactores con actividad catalítica por sustratos específicos como la asparagina, como tratamiento de

la LLA (Díaz-Barriga, 2018). Por otro lado, actualmente se tiene conocimiento de numerosas actinobacterias que son productoras de diversos fármacos, antibióticos o compuestos de interés médico. Entre dichos compuestos se encuentra la L-asparaginasa, la cual es producida por diversas especies del género *Streptomyces*, además de la convencional de *E. coli* (Saxena et al., 2015; Velho-Pereira & Kamat, 2013). La búsqueda de secuencias homólogas a la asparaginasa tipo II de *E. coli* y *Streptomyces coelicolor* en diversas especies de actinobacterias dio como resultado el descubrimiento de una proteína con posibles sitios de unión a la asparagina, la cual teóricamente no utiliza glutamina como sustrato y presenta un bajo perfil inmunogénico. Esta enzima corresponde a la L-asparaginasa de *Streptomyces scabrissporus* (González-Torres, 2018). El uso de nuevas proteínas con perfiles de inmunogenicidad menores y con sitios de unión a asparagina (sustrato) similares a las actuales enzimas comerciales, sin actividad cruzada de glutaminasa, representan una alternativa para el tratamiento de la LLA. En el presente trabajo se plantea el uso de la enzima recombinante L-asparaginasa obtenida de *S. scabrissporus*, la cual será expresada en *E. coli* y se comparará su perfil cinético en condiciones fisiológicas. El uso de esta enzima se propone como un agente quimioterapéutico de baja reacción inmunogénica, para su uso potencial en el tratamiento de la LLA.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Leucemia linfocítica aguda

La LLA se caracteriza por la proliferación incontrolada de tipo monoclonal u oligoclonal de células precursoras hematopoyéticas dentro de la médula ósea. Este tipo de leucemia es el cáncer más común en niños alrededor del mundo. Se estima que cerca del 80% de los casos registrados corresponden a un subtipo de cáncer denominado leucemia linfocítica aguda (LLA). En México se tiene uno de los mayores niveles de incidencia del padecimiento a nivel mundial, además de una alta tasa de mortalidad asociada (Bekker-Méndez, et al., 2014). Estos descubrimientos en las poblaciones de niños de México han permitido analizar múltiples arreglos genéticos de pacientes con este cáncer. Los resultados arrojan una gran prevalencia del arreglo TCF3-PBX1, el cual está asociado a un bajo pronóstico de supervivencia (Bekker-Méndez, et al., 2014). La prevalencia de los arreglos genéticos es muy heterogénea, lo cual puede deberse a factores como la etnicidad o el ambiente (Bekker-Méndez, et al., 2014). El estudio de los arreglos genéticos y translocaciones de cromosomas permitirán analizar la aplicación de terapias dirigidas a padecimientos más agresivos o con pronósticos de supervivencia poco favorables (Bhojwani, 2015).

En el estudio elaborado por Dong, et al., (2020) se analizaron las tendencias de la incidencia de diferentes tipos de leucemia, en el cual se incluye la leucemia linfocítica aguda (LLA), se analizaron datos de 1990 a 2017 de 195 países. Entre los hallazgos realizados se puede destacar que la prevalencia de leucemia linfocítica aguda (LLA) presenta diferencias significativas entre niños y adultos a lo largo de los años. En términos globales, la LLA es más común en niños y jóvenes, especialmente en las regiones de países en desarrollo. En 1990, el número de casos de LLA en niños menores de 5 años era de 54.4 mil, con una tasa de incidencia ajustada por edad (ASIR) de 8.44 por 100,000 personas. Para 2017, el número de casos en este grupo de edad se redujo a 52.9 mil, con una ASIR de 7.78 por 100,000 personas. En el caso de los adultos se encontró que la incidencia de LLA es menor comparada con los niños.

En el grupo de edad de 15 a 49 años, la ASIR en 1990 era de 3.74 por 100,000 personas y en el 2017 se redujo a 3.15 por cada 100,000 personas. Además, se menciona que la incidencia de LLA ha aumentado en varias regiones de América Latina, incluyendo México. En 2017, México se encontraba entre los países con la mayor incidencia de LLA, justo después de Honduras y Dominica. La incidencia en América Latina Central era superior al 30% de los casos totales de leucemia tanto en 1990 como en 2017.

### 1.1.2 Uso de L-asparaginasa como tratamiento

El uso de la L-asparaginasa se ha convertido parte fundamental del tratamiento de la LLA, desde la mitad del siglo XX que se hicieron pruebas con el suero extraído de *Cavia porcellus*. A partir de esta investigación, se hipotetizó que la habilidad de suprimir el crecimiento de carcinomas se debía a algún compuesto enzimático el cual fue la L-asparaginasa obtenida en el suero (Kidd, 1953). Actualmente está ampliamente descrito el mecanismo de acción de la L-asparaginasa en el tratamiento de la LLA, la enzima realiza una hidrólisis del aminoácido asparagina convirtiéndolo en ácido aspártico y amonio (Chand, et al., 2020). Esto permite reducir los niveles de asparagina que se encuentran en el torrente sanguíneo y debido a que las células leucémicas no son capaces de sintetizar asparagina por su cuenta, estas entran en un estado de estrés nutricional prolongado que lleva al arresto proliferativo y posteriormente a la apoptosis de las células leucémicas (Chiu, et al., 2020).

Por lo cual, el uso de L-asparaginasa aislada de microorganismos se ha convertido en una enzima clave en los tratamientos de este cáncer. No obstante, desde que se logró aislar parcialmente la L-asparaginasa de *E. coli*, se ha continuado la búsqueda de enzimas con actividad catalítica de asparaginasa como fármacos quimioterapéuticos. La actividad anti-asparagina se ha observado en diversos microorganismos a través

de diversos grupos como los hongos, bacterias y levaduras. Sin embargo, se ha observado que la actividad de asparaginasa se encuentra asociada estrechamente a la actividad de glutaminasa en la mayoría de los organismos examinados (Imada, et al., 1973).

### 1.1.3 Propiedades de la L-asparaginasa para uso terapéutico

Existen diversas propiedades que se buscan en las asparinasas para ser consideradas como potenciales fármacos terapéuticos para poder sustituir a los que se distribuyen comercialmente (*Erwinia chrysanthemi* [ErA] y *Escherichia coli* [EcA]). Estas incluyen: (i) la afinidad de la enzima por el sustrato es un punto esencial, la cual puede ser determinada por la constante de Michaelis-Menten. El objetivo es buscar que la afinidad por el sustrato (asparagina) sea alta para que aun cuando las concentraciones en suero sean bajas, ésta pueda degradar el sustrato sin incrementar la dosis del fármaco; (ii) baja o nula actividad de glutaminasa, esto debido a que la glutamina es un componente esencial en el suero, ya que está involucrada en la síntesis de proteínas, en la respuesta inmune y en el transporte de nitrógeno (Beckett & Gervais, 2019).

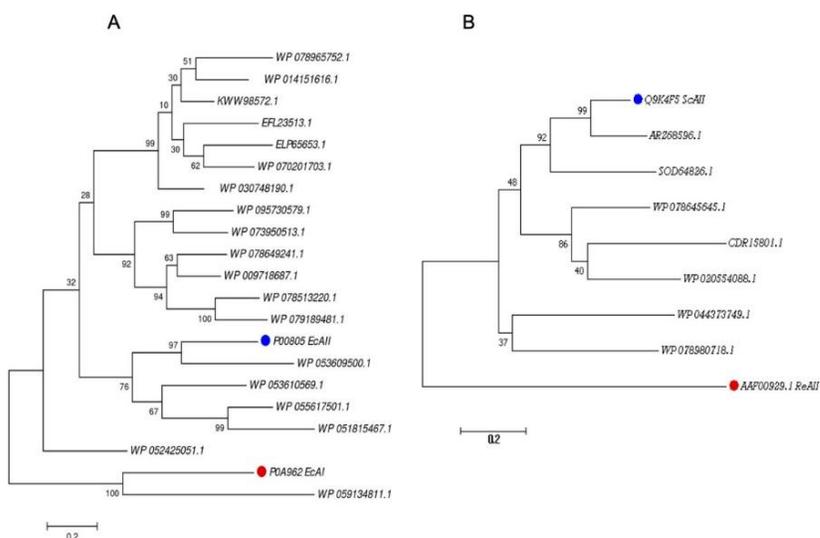
La mayoría de los padecimientos como pancreatitis, trombosis, cistitis hemorrágica, dolor abdominal e hiperglicemia han sido atribuidos en gran medida a una actividad alta de glutaminasa (Beckett & Gervais, 2019). Otro de los problemas que se ha asociado al uso de la L-asparaginasa es la respuesta inmune específica asociada a la hipersensibilidad (Walenciak, et al., 2019). Esta puede manifestarse desde reacciones puntuales, hasta casos más severos, en donde se produce una reacción sistémica (Walenciak, et al., 2019). Esta clase de afectaciones suelen presentarse principalmente en pacientes que son expuestos nuevamente a la asparaginasa durante los protocolos de tratamiento (Walenciak, et al., 2019). Los pacientes que muestran mayor nivel de reacciones alérgicas tienen mayor presencia de anticuerpos de tipo IgG (Walenciak, et al., 2019).

No obstante, los mecanismos bajo los cuales se relacionan los anticuerpos y la respuesta inmune anti-L-asparaginasa aún no están claros, por lo cual resulta importante monitorear la respuesta inmune en los tratamientos con asparaginasa y buscar formulaciones nuevas que tengan menor respuesta inmune (Walenciak, et al., 2019). Parte de las estrategias desarrolladas en la actualidad para atenuar la respuesta inmune anti-L-asparaginasa es la formulación conjugada con polietilenglicol (Heo, et al., 2019). Esta formulación PEGilada de la asparaginasa no presenta una disminución en el perfil farmacocinético de la enzima, pero si un decremento en la inmunogenicidad (Heo, et al., 2019). Además, se ha mostrado que el

uso de esta formulación aumenta el tiempo medio de actividad en suero respecto a la L-asparaginasa convencional de *E. coli* (Heo, et al., 2019).

#### 1.1.4 Búsqueda de nuevas fuentes de L-asparaginasa

La bacteria *Streptomyces scabrissporus* es una actinobacteria con un estilo de vida endófito. En la actualidad se han secuenciado y analizado numerosos genomas de otras especies de *Streptomyces*, sin embargo, en el caso específico de *S. scabrissporus* la secuenciación de su genoma ha sido un acontecimiento reciente. Esto se debe al crecimiento lento en el laboratorio, y a que su genoma está compuesto por 199 contigs. Dentro del análisis de su genoma se han encontrado numerosos compuestos con actividad antimicrobiana y antitumoral. En el análisis metabólico de *S. scabrissporus*, se encontró que no requiere de fuentes externas de aminoácidos para su crecimiento; sin embargo, en algunas cepas de la misma especie se reportan diversas fuentes de nitrógeno para su crecimiento como la peptona, extracto de levadura, nitrato de amonio, sulfato de amonio y L-asparagina (Ceapă, et al., 2018). Esta y otras especies del género *Streptomyces spp.* fueron analizadas en busca de L-asparaginasa, encontrando dos familias de proteínas (Figura 2; González-Torres, et al., 2020).



**Figura 2** Árbol filogenético de las familias de proteínas PF00710.11 (A) y PF06089.11 (B). En el análisis filogenético se tomaron como grupo control (indicado en rojo) la secuencia de la asparaginasa de tipo 1 de *E. coli* (EcAI) y la de tipo 2 *Rhizobium etli* (ReAI) además se incluyeron secuencias referencia de otras asparaginasa conocidas (indicado en azul) como la asparaginasa de tipo 2 de *E. coli* (EcAI) y la de tipo 2 de *Streptomyces coelicolor* (ScAI). González-Torres, et al., 2020.

En este estudio se realizaron predicciones de la antigenicidad de las enzimas al igual que el número de

“hits” o reacciones producidas por los epítomos de las enzimas. Esta selección de parámetros permitió la identificación de la enzima de *S. scabrisporus* la cual mostró tener un bajo número de epítomos de células T, bajo perfil de antigenicidad y baja cobertura de alelos en la población, valor que está estrechamente vinculado a la población que desarrolla una respuesta inmune a la enzima. La enzima de *S. scabrisporus* se encuentra en la familia de proteínas PF06089.11 (Figura 2B) en la cual también se puede encontrar a la L-asparaginasa de *R. etli* (González-Torres, et al., 2020) esta enzima ha sido reportada como una metaloproteína con afinidad por el zinc que tiene un papel fundamental en la organización de los residuos cercanos al sitio activo de la enzima (Loch, et al., 2021).

## 1.2 Justificación

Las formulaciones comerciales de L-asparaginasa aisladas de *E. coli* y *E. chrysanthemi* han demostrado generar reacciones inmunogénicas y presentan actividad cruzada de glutaminasa, lo que ocasiona efectos adversos asociados al tratamiento. La necesidad de buscar nuevas fuentes de L-asparaginasa que presenten menor perfil inmunogénico como la enzima de *S. scabrisporus* representan una alternativa potencial para la aplicación de la enzima en tratamiento contra la LLA. Además, la asparaginasa de *S. scabrisporus*, no presenta actividad secundaria de glutaminasa y cuenta con características cinéticas competitivas para su uso terapéutico.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad de la L-asparaginasa de *Streptomyces scabrisporus* en comparación con la L-asparaginasa de *Rhizobium etli*, para establecer su potencial aplicación en el tratamiento de la LLA.

### 1.3.2 Objetivos específicos

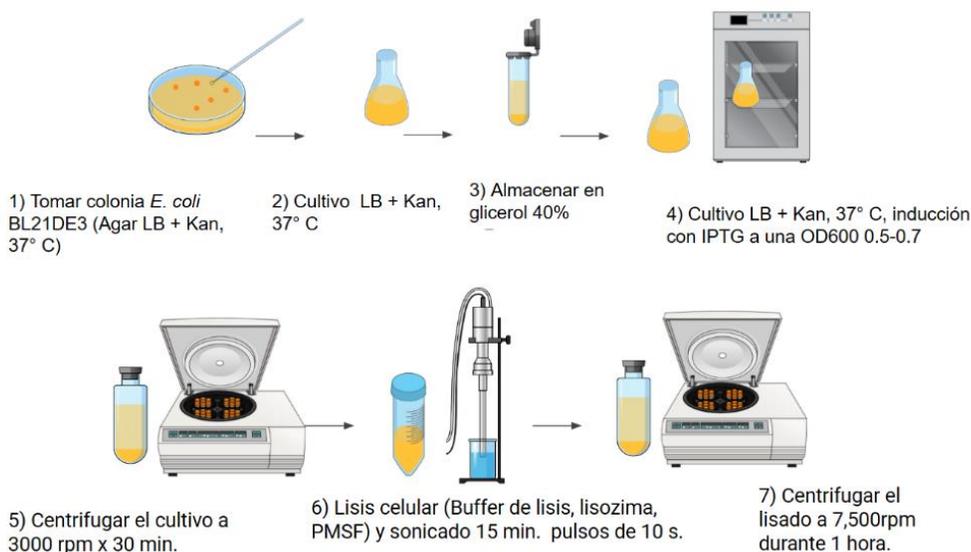
1. Establecer un protocolo de purificación para la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* expresada de forma recombinante en *E. coli*.

2. Caracterizar los parámetros cinéticos de la enzima.
3. Evaluar la estabilidad de la enzima bajo diferentes condiciones de almacenamiento.
4. Comparación cinética de la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* y *R. etli* en condiciones fisiológicas.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Clonación del gen que codifica para la L-asparaginasa y expresión de la proteína recombinante de *S. scabrisporus* en *E. coli*

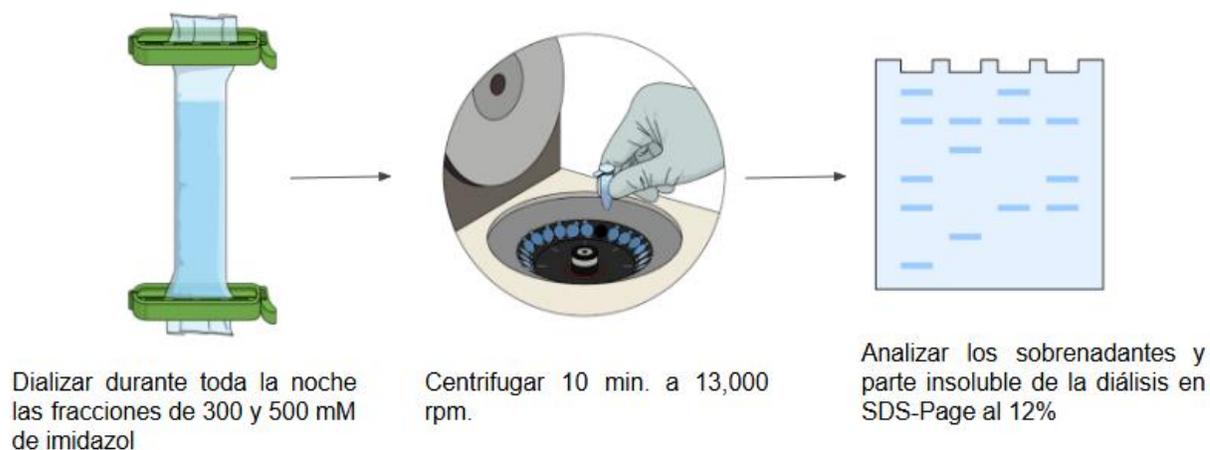
El gen que codifica la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* (ENA, OPC79493.1) fue sintetizado con optimización de uso de codones para su expresión en *E. coli*. La clonación del gen se realizó utilizando el vector pJET (Thermo Fisher) con extremos truncos y cortado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NdeI* para posteriormente ser subclonado en el plásmido pET28a (+) para obtener la construcción pET28a-AnsSs. El proceso de transformación fue realizado mediante la técnica de choque térmico utilizando células químicamente competentes BL21 (DE3) de *E. coli*. La cepa transformante BL21/pET28a-AnsSs fue sembrada en placa de agar LB suplementado con kanamicina (35 µg/mL) y se seleccionaron las colonias positivas (Figura 3). Para el pre-inoculo del cultivo se utilizaron 200 ml de medio LB suplementado con kanamicina 35 µg/mL y se incubaron por 20 h a 37°C en agitación constante a 180 rpm. A partir de este cultivo se inocularon 2 L de medio LB + kanamicina 35 µg/mL, cloruro de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) 1 mM y se incubó a 37°C en agitación constante a 180 rpm. La densidad óptica fue monitoreada a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer y una vez alcanzada una densidad óptica de 0.5-0.7 se indujeron los cultivos con 200 µM IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiránósido). El cultivo se incubó a 30°C y 180 rpm durante 20 h.



**Figura 3. Cultivo bacteriano para obtener la L-asparaginasa recombinante de *S. scabrisporus***

Los cultivos inducidos se cosecharon por centrifugación en la centrifuga Avanti Jxn-26 con el rotor JA-14 de ángulo fijo a 3,000 rpm por 30 minutos; las pastillas celulares fueron resuspendidas en 60 ml de buffer de lisis-uni3n (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM B-mercaptoetanol y 10% glicerol) con 100  $\mu$ l de lisozima (20  $\mu$ g/ $\mu$ l) y 300  $\mu$ l de PMSF (200 mM), se incubaron por 1 hora a 37°C y se lisaron por sonicaci3n durante 15 min en pulsos de 10 segundos con 5 de reposo. La suspensi3n sonicada se centrifug3 con el rotor JA2550 a 7,500 rpm por 1 hora. El sobrenadante fue inyectado en una columna HisTrap (Cytiva) previamente equilibrada con buffer de lisis-uni3n. Posteriormente la columna fue sometida a un paso de lavado con 50 ml de imidazol 20 mM. Las prote3nas unidas fueron eluidas con buffer de eluci3n (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM B-mercaptoetanol y 10% glicerol) utilizando un gradiente de concentraciones de imidazol de 100, 300 y 500 mM. La presencia de la enzima fue analizada en todas las fracciones mediante electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%.

Posteriormente se realiz3 una di3lisis de las fracciones de 300 y 500 mM de imidazol utilizando una membrana de di3lisis de 12-14 kDa en 1L de buffer de di3lisis (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 50 mM NaCl y 5% glicerol), la di3lisis fue realizada a 4°C en mezcla constante utilizando un agitador magn3tico. Las fracciones dializadas fueron evaluadas en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% (Figura 4).



**Figura 4** Proceso de di3lisis de las fracciones de prote3na soluble.

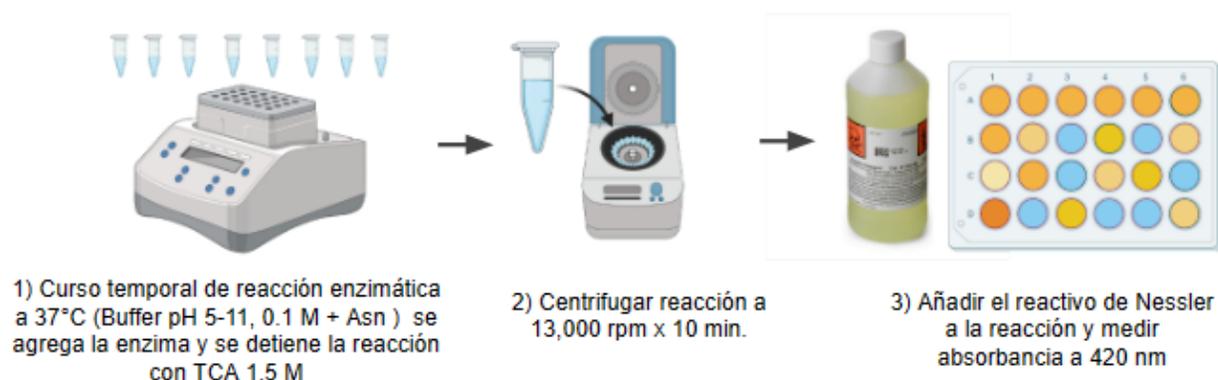
## 2.2 Caracterizaci3n enzim3tica de la L-asparaginasa de *S. scabrisporus*

Para caracterizar la enzima purificada de *S. scabrisporus* se realiz3 un ensayo con el extracto celular donde la actividad asparaginasa se evalu3 espectrofotom3tricamente con un ensayo colorim3trico utilizando el

reactivo de Nessler. El reactivo de Nessler es una mezcla de químicos que incluye Yoduro de potasio (KI), Yoduro de mercurio (II) ( $\text{HgI}_2$ ), Hidróxido de potasio (KOH). En presencia de amonio y medio alcalino por el KOH, el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se convierte en amoniaco ( $\text{NH}_3$ ). Posteriormente, el amoniaco reacciona con el complejo de yoduro de mercurio (II) formando un complejo coloreado de amido yodo mercurioso ( $[\text{Hg}_2\text{N}]\text{I}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ), el cual proporciona el color amarillo a marrón de la solución (Nichols & Willits, 1934). Este complejo formado presenta una longitud de onda de máxima absorbanza en el intervalo de 400-450 nm, lo cual nos permite determinar mediante espectrofotometría la cantidad de amonio presente en la reacción enzimática.

Para el ensayo estándar se estableció un curso temporal de 0, 1, 3, 5, 7 y 10 minutos en el cual se cuantificará la cantidad de amonio producido por la asparaginasa en 500  $\mu\text{l}$  de reacción.

Las condiciones para realizar la reacción enzimática de la L-asparaginasa (500  $\mu\text{l}$ ) son: Buffer de fosfatos (0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) con 10 mM de sustrato (L-asparagina) y 0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de la enzima purificada. La reacción se llevó a cabo a 37°C. La reacción se detuvo en los tiempos especificados añadiendo 25  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético 1.5 M. La cuantificación del amonio liberado se realizó midiendo la absorbanza a 420 nm en microplacas de 96 pocillos utilizando 25  $\mu\text{l}$  de los productos de la reacción enzimática en 175  $\mu\text{l}$  de agua. A la mezcla se le agregaron 25  $\mu\text{l}$  de reactivo de Nessler, y se dejaron incubar 10 minutos antes de medir la absorbanza a 420 nm (Figura 5).



**Figura 5 Proceso de medición de actividad enzimática mediante espectrofotometría.**

Adicionalmente se realizaron ensayos para determinar el pH óptimo y estabilidad de la enzima a temperatura de 37°C y 4°C. Para determinar el pH óptimo de la enzima se realizaron ensayos de actividad enzimática en los siguientes buffers: Acetatos (pH 3-5), Fosfatos de sodio (pH 6-8) y carbonato de sodio (pH 9-11), todos a una concentración de 0.1 M. Para evaluar la estabilidad de la enzima, se incubó durante

17, 24 y 48 horas a 37°C y se evaluó la actividad enzimática. También se almacenó la enzima a 4°C durante 6 semanas y posteriormente se midió la actividad enzimática.

### **2.3 Comparación de actividad enzimática de las asparaginidas de *S. scabrisporus* y *R. etli* en condiciones fisiológicas**

Para realizar la comparación entre las actividades enzimáticas de las asparaginidas, se realizó la clonación del gen que codifica para la L-asparaginida tipo II de *Rhizobium etli* (Q2K0Z2) al cual se le agregó los sitios de restricción *NdeI-NcoI* en el extremo 5' y *PstI-stop-EcoRI* en el extremo 3', respectivamente. Posteriormente, se obtuvo el plásmido pET28a-AnsRe, con el que se transformaron células BL21 (DE3), para obtener las clonas BL21/pET28a-AnsRe. Se llevó a cabo la inducción para la expresión de la asparaginida de *R. etli* y se utilizó el mismo protocolo de purificación descrito para la L-asparaginida de *S. scabrisporus*. Una vez obtenidas ambas enzimas purificadas, se realizaron las cinéticas enzimáticas de manera simultánea, acorde a lo descrito en la sección 2.2 utilizando 10 mM de L-asparagina como sustrato en buffer de fosfatos (0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4).

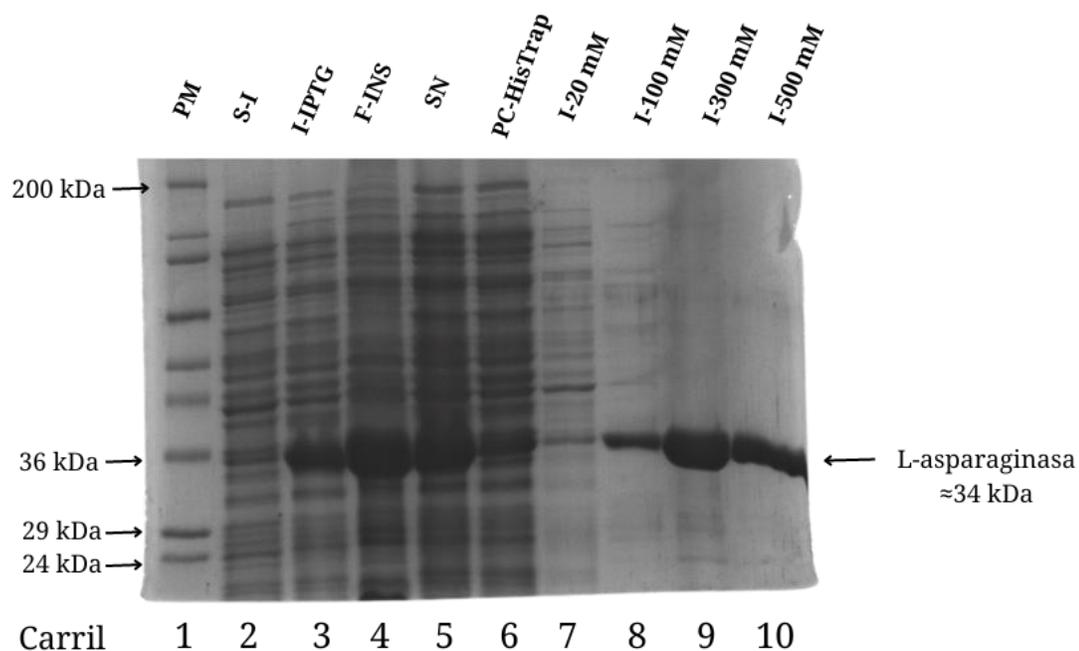
### **2.4 Caracterización cinética de las asparaginidas**

Para determinar los parámetros cinéticos de las enzimas, se llevaron a cabo reacciones en cursos temporales de 0, 1, 3, 5, 7 y 10 minutos por triplicado; las concentraciones de sustrato evaluadas fueron de 0.5 mM a 20 mM. Para el análisis de los datos se emplearon el modelo no lineal de Michaelis-Menten y los programas Origin y Graphpad.

## Capítulo 3. Resultados

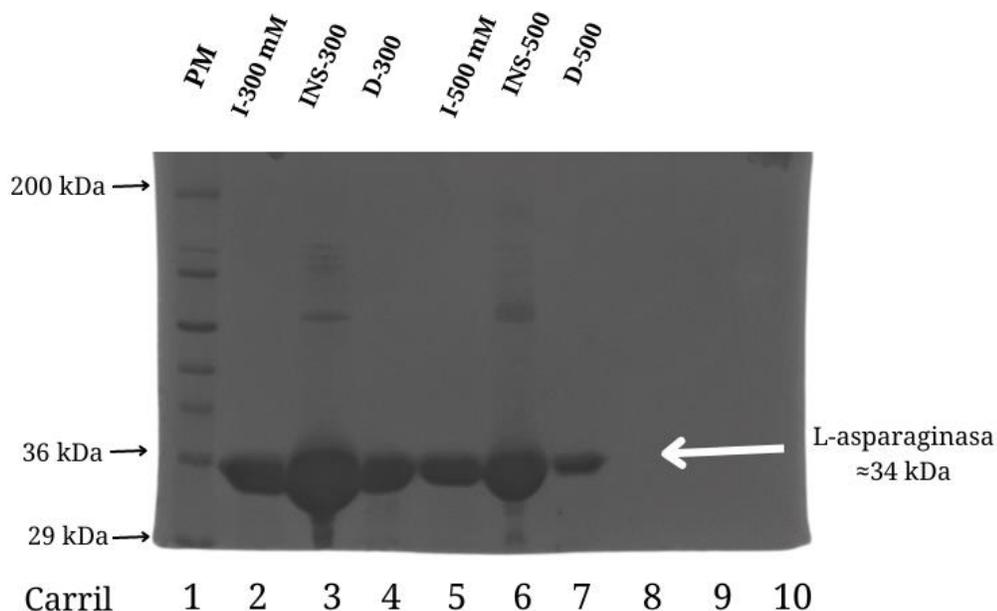
### 3.1 Purificación de la L-asparaginasa de *S. scabrisporus*

Mediante el análisis electroforético de las fracciones purificadas en la columna HisTrap (Cytiva) se logró identificar la banda correspondiente a la L-asparaginasa recombinante de *S. scabrisporus* (Figura 6) la cual tiene un peso molecular estimado de 34 kDa. En el gel de electroforesis se logró apreciar en los carriles 9 y 10 las fracciones solubles recuperadas obteniendo un rendimiento de aproximadamente 2 mg/L de proteína.



**Figura 6 Electroforesis de los pasos de producción y purificación de la L-asparaginasa.** Gel desnaturizante de poliacrilamida al 12%. Carril PM: marcador de peso molecular, S-I: cultivo sin inducir, I-IPTG: cultivo inducido con IPTG, F-INS: fracción insoluble del lisado celular, SN: sobrenadante del lisado celular, PC-HisTrap: paso por columna HisTrap, I-20: lavado con imidazol 20 mM, I-100, 300 y 500 mM: elución de la L-asparaginasa con concentraciones ascendentes de imidazol.

Posteriormente se realizó la diálisis de las fracciones eluidas con 300 y 500 mM de imidazol, con la cual se logró obtener L-asparaginasa con alto grado de pureza (Figura 7) y se removieron componentes de bajo peso molecular como el imidazol el cual intervenía con los ensayos de cinética enzimática.



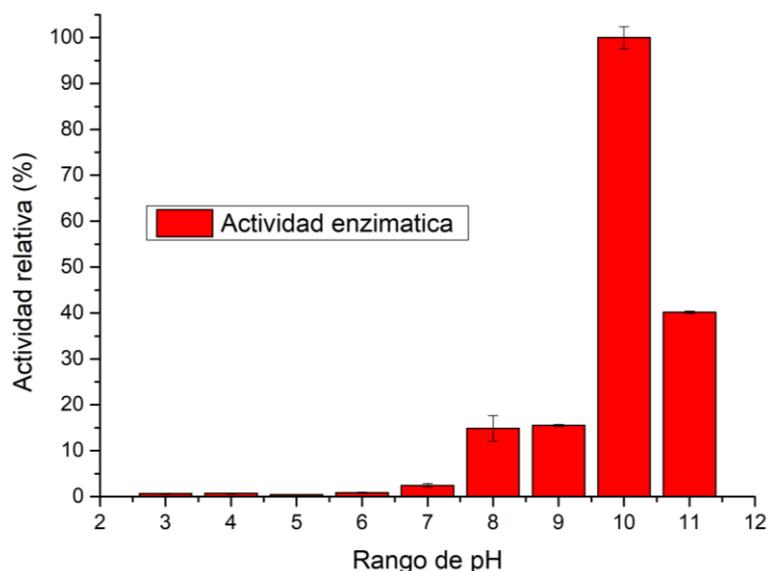
**Figura 7 Electroforesis de las fracciones dializadas.** Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%. Carril PM: marcador de peso molecular, I-300, 500 mM: elución de la L-asparaginasa sin dializar, INS-300, 500: fracción insoluble de la L-asparaginasa precipitada en la diálisis, D-300,500: sobrenadante recuperado de la L-asparaginasa tras ser dializada.

### 3.2 Caracterización cinética de la enzima

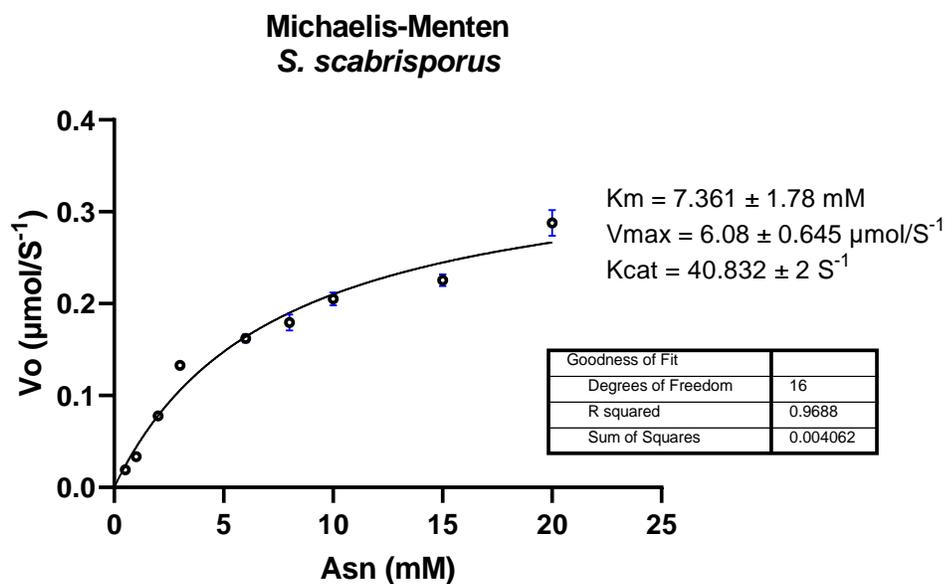
La caracterización cinética y enzimática de la L-asparaginasa consistió en determinar su pH óptimo de actividad, la determinación de los parámetros cinéticos, la determinación de la posible actividad cruzada de glutaminasa y de su estabilidad bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Para la determinación del pH óptimo de actividad enzimática (Figura 8), se realizaron cinéticas de 30 minutos utilizando distintos buffers (acetatos pH 3-5, Fosfato de sodio pH 6-8, carbonatos 9-11). En un pH de 10 se presentó mayor actividad enzimática respecto a las otras condiciones evaluadas. No se observaron diferencias significativas en el resto de las condiciones evaluadas. Los valores del pH óptimo son similares a los reportados para otras asparaginasas de la misma familia como la de *R. etli* (Loch, et al., 2021).

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima, se realizaron cinéticas enzimáticas con tiempos de reacción de 0-10 minutos para determinar la velocidad inicial de reacción y realizar una aproximación de la constante de Michaelis-Menten (Figura 9).



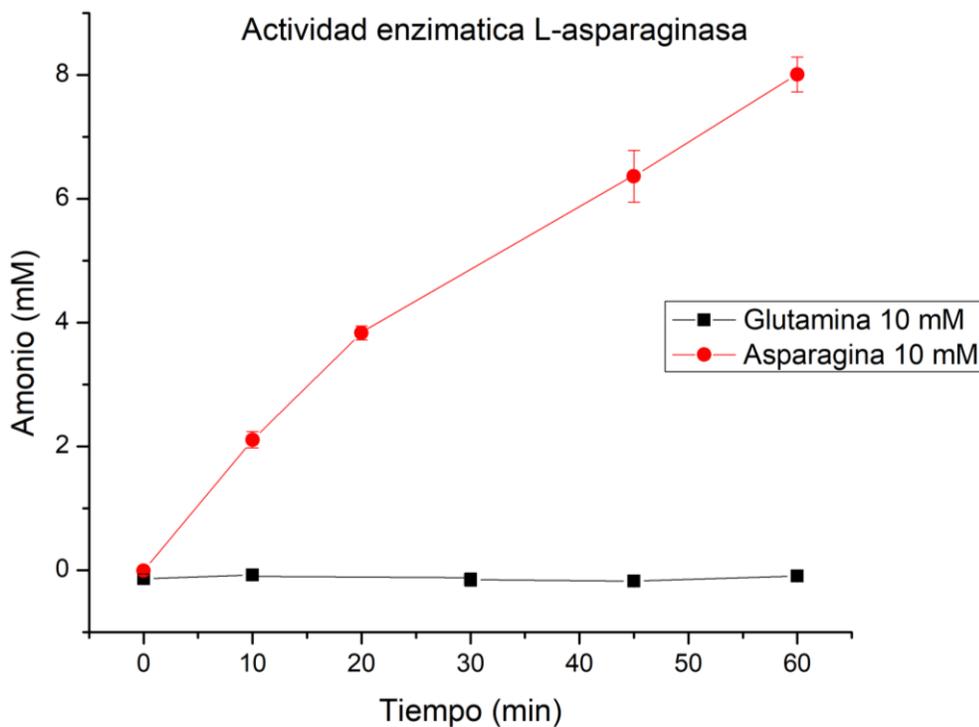
**Figura 8** Evaluación de actividad enzimática de la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* en un gradiente de pH. Se determinó que el pH con mayor actividad enzimática corresponde al valor de 10.



**Figura 9** Determinación de parámetros cinéticos de la L-asparaginasa de *S. scabrisporus*. La cinética enzimática se ajusta al modelo de Michaelis-Menten. Se determinó una  $V_{max}$  ( $\mu\text{mol/s}$ ) de  $6.08 \pm 0.645$ ,  $K_m$  (mM) de  $7.361 \pm 1.78$  y una  $k_{cat}$  ( $\text{S}^{-1}$ ) de  $40.832 \pm 2$  con una  $R^2$  de 0.968

Para ello se evaluaron distintas concentraciones de sustrato desde 0.5 a 20 mM de asparagina. Se determinó una constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de 7.361 mM la cual presentó una velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ) de  $6.08 \mu\text{mol/s}^{-1}$  mientras que la constante de catálisis ( $k_{cat}$ ) fue de  $40.832 \text{ s}^{-1}$

Posteriormente se evaluó la actividad de glutaminasa de la enzima. La evaluación de la actividad secundaria de glutaminasa (Figura 10) se realizó mediante una cinética enzimática de 0 a 60 minutos de reacción, en reacciones individuales conteniendo 10 mM de asparagina como sustrato o 10 mM de glutamina. Los resultados mostraron que la asparaginasa de *S. scabrissporus* no presenta actividad secundaria de glutaminasa.

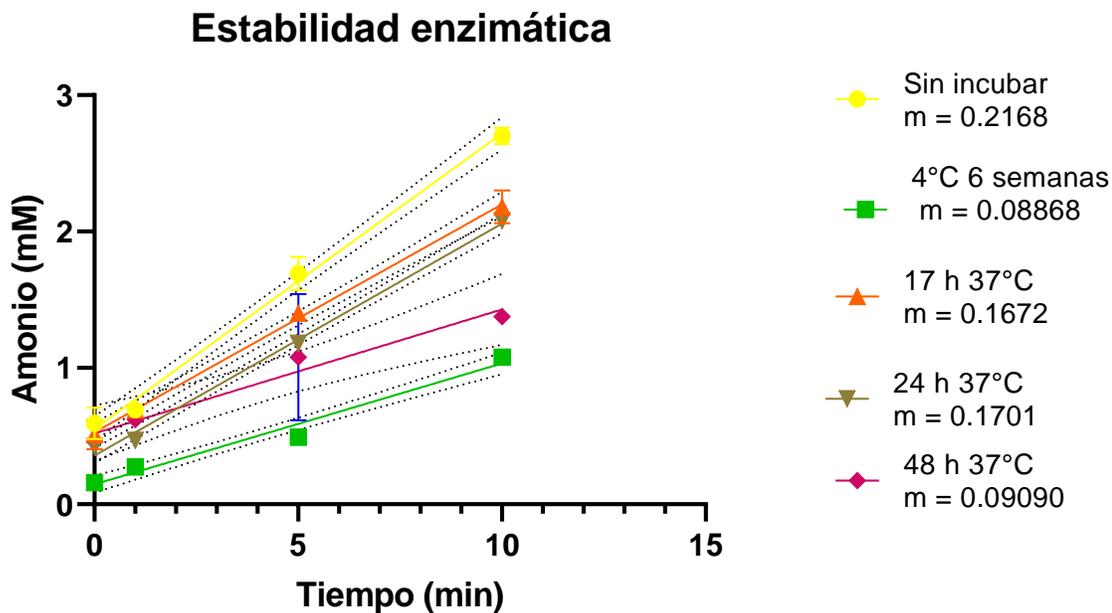


**Figura 10 Evaluación de actividad secundaria de glutaminasa.** Curso temporal de 1 hora utilizando L-glutamina y L-asparagina como fuente de sustrato para la L-asparaginasa de *S. scabrissporus*. No se detectó amonio, producto de la hidrólisis en las reacciones que se utilizó glutamina.

### 3.3 Evaluación de la estabilidad de la enzima bajo distintas condiciones de almacenamiento

Para la evaluación de la estabilidad de la enzima se realizaron cinéticas de actividad enzimática tras incubar la enzima a 37 °C durante 17, 24 y 48 horas, al igual que tras almacenar la enzima por 6 semanas a 4°C (Figura 11). Mediante un análisis de la regresión lineal de las pendientes de actividad enzimática de las diferentes condiciones evaluadas se logró determinar que las pendientes difieren entre sí. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:  $F = 36.27$ .  $DFn = 4$ ,  $DFd = 10$   $P < 0.0001$  ( $F$  = estadística  $F$  del análisis de la varianza ó ANOVA,  $DFn$  = grados de libertad del numerador el cual está representado por el número de

variables independientes, Df= grados de libertad del denominador el cual está representado por el total de observaciones menos el número de parámetros estimados) esto nos indicó que si hay un efecto en el cambio de actividad enzimática respecto a las condiciones bajo las cuales fue almacenada la enzima.



**Figura 11 Evaluación de la estabilidad enzimática.** El gráfico de muestra la diferencia entre las pendientes bajo las diferentes condiciones evaluadas.

**Tabla 1 Estabilidad enzimática en distintas condiciones de almacenamiento.**

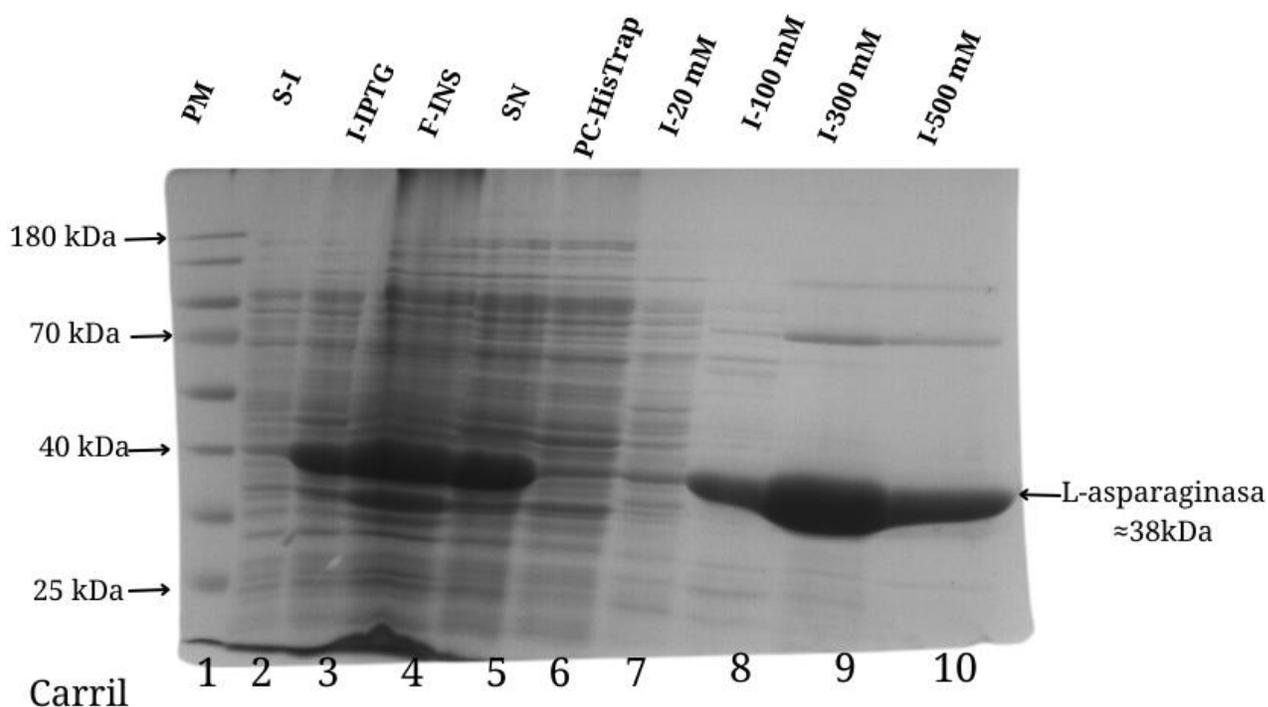
	Sin incubar	4°C (6 semanas)	37°C (17 h)	37°C (24 h)	37°C (48 h)
Pendiente	0.2168	0.08868	0.1672	0.1701	0.0909
Error std.	0.001804	0.002016	0.0007868	0.001667	0.002296
Porcentaje de actividad relativa	100%	40%	77%	78%	41%

La información obtenida de la comparación de las pendientes (Tabla 1) mostró que el almacenar la enzima por un periodo de 6 semanas a 4°C presenta una reducción del 60% de la actividad relativa de la enzima

respecto a la enzima sin incubar, por otra parte, la enzima incubada a 37°C durante las primeras 24 horas presenta una reducción del 22% en la actividad, mientras que a las 48 h se reduce su actividad en 59%.

### 3.4 Comparación cinética de las L-asparinasas de *S. scabrisporus* y *Rhizobium etli* en condiciones fisiológicas.

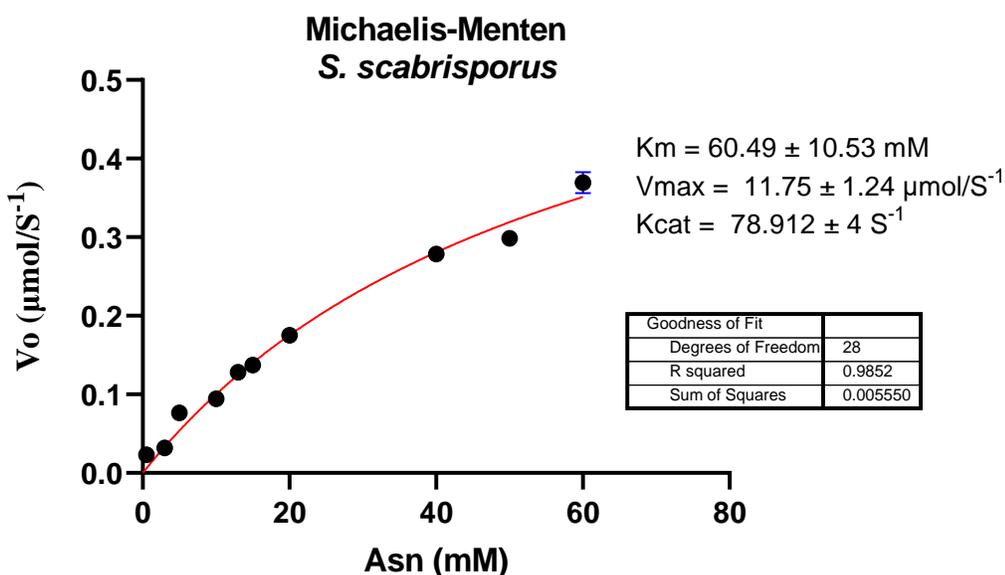
Durante el desarrollo de este proyecto, se logró clonar el gen que codifica para la L-asparinasa de *R. etli* en el vector de expresión pET28a (+), mismo vector utilizado para la sobre-expresión de la L-asparinasa de *S. scabrisporus*. Tomando ventaja de la experiencia de la purificación de la enzima de *S. scabrisporus*, aunado a la importancia de la asparinasa de *R. etli*, por sus cualidades y su potencial como alternativa para el tratamiento de la LLA, llevamos a cabo la purificación y caracterización parcial de esta enzima, a fin de comparar sus parámetros cinéticos a los obtenidos para la L-asparinasa de *S. scabrisporus*. Se llevó a cabo la purificación de la L-asparinasa de *R. etli* siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la purificación de la enzima de *S. scabrisporus*.



**Figura 12 Electroforesis de los pasos de expresión y purificación de la L-asparinasa de *R. etli*.** Gel desnaturizante de poliacrilamida al 12%. Carril PM: marcador de peso molecular, S-I: cultivo sin inducir, I-IPTG: cultivo inducido con IPTG, F-INS: fracción insoluble del lisado celular, SN: sobrenadante del lisado celular, PC-HisTrap: paso por columna HisTrap, I-20: lavado con imidazol 20 mM, I-100, 300 y 500 mM: elución de la L-asparinasa con concentraciones ascendentes de imidazol.

Se realizó un análisis electroforético (Figura 12) de los pasos de expresión y purificación como se realizó con la asparaginasa de *S. scabrisporus*. Esta enzima presenta un peso molecular de estimado de 38 kDa. en el gel de electroforesis se logró apreciar en los carriles 9 y 10 las fracciones solubles recuperadas obteniendo un rendimiento de aproximadamente 3 mg/L de proteína. Para la comparación de los parámetros cinéticos de ambas enzimas, se llevaron a cabo cinéticas enzimáticas con tiempos de incubación de 0-10 minutos y se ajustaron los resultados con el modelo de Michaelis-Menten. Se utilizaron condiciones de pH y temperatura fisiológica para emular las condiciones presentes en el cuerpo humano.

Se probaron distintas concentraciones de sustrato desde 0.5 a 20 y 0.5 a 60 mM de asparagina. En el caso de la enzima purificada de *S. scabrisporus* (Figura 13) se encontró que se redujo la actividad de la enzima al cambiar el pH, lo que se puede ver reflejado en el cambio de los parámetros cinéticos como la  $K_m$  la cual en condiciones de pH óptimo era de  $7.361 \pm 1.78$  mM y en condiciones fisiológicas aumentó aproximadamente 8 veces dando como resultado una  $K_m$  de  $60.49 \pm 10.53$  mM indicando pérdida de afinidad por el sustrato.



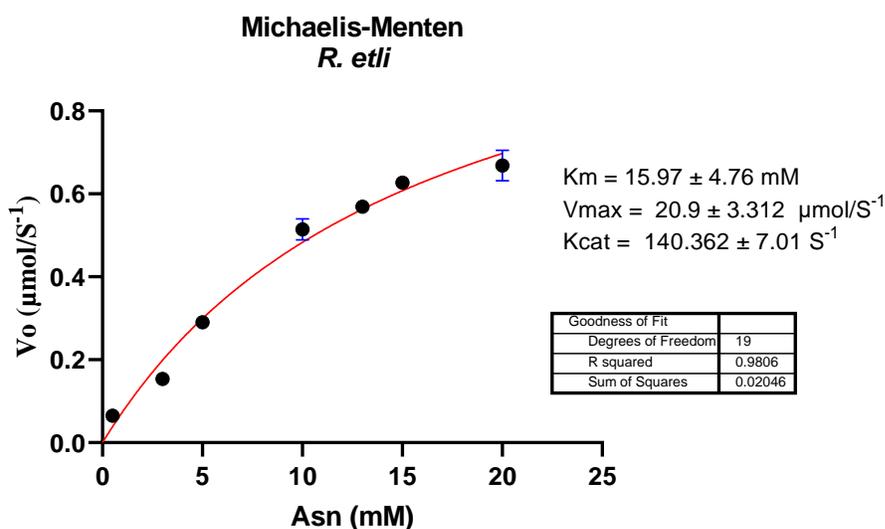
**Figura 13** Cinética enzimática de *S. scabrisporus* en condiciones fisiológicas. Se determinó una  $V_{max}$  ( $\mu\text{mol/s}$ ) de  $11.75 \pm 1.24$ ,  $K_m$  (mM) de  $60.49 \pm 10.53$  y una  $k_{cat}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) de  $78.912 \pm 4$  con una  $R^2$  de 0.956.

Por otra parte, las cinéticas realizadas con la enzima de *R. etli* en condiciones fisiológicas (Figura 14) mostraron que ocurre un incremento en la  $K_m$  de 3 veces en condiciones fisiológicas respecto a su pH de actividad óptimo, lo cual ya había sido anteriormente reportada. (Loch, et al., 2021).

**Tabla 2 Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos entre asparaginasa**

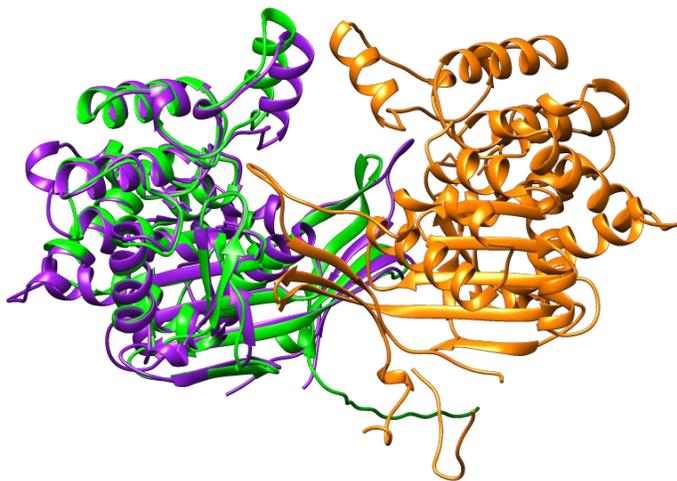
L-asparaginasa	Cinética en pH óptimo	Cinética en pH fisiológico
<i>S. scabrisporus</i>	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/s}$ ) $6.08 \pm 0.645$ $K_m$ (mM) $7.361 \pm 1.78$ $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) de $40.832 \pm 2$	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/s}$ ) $11.75 \pm 1.24$ $K_m$ (mM) $60.49 \pm 10.53$ $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) $78.912 \pm 4$
<i>R. etli</i>	$*K_m$ (mM) $4.2 \pm 0.3$ $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) $438 \pm 32$	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/s}$ ) $20.9 \pm 3.312$ $K_m$ (mM) $15.97 \pm 4.76$ $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) $140.362 \pm 7.01$

\*Valores obtenidos del trabajo de Loch, et al., (2021)



**Figura 14 Cinética enzimática de *R. etli* en condiciones fisiológicas.** Se determinó una  $V_{max}$  ( $\mu\text{mol/s}$ ) de  $20.9 \pm 3.312$ ,  $K_m$  (mM) de  $15.97 \pm 4.76$  y una  $k_{cat}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) de  $140.362 \pm 7.01$  con una  $R^2$  de 0.980.

Para poder hacer una aproximación de los residuos que componen el sitio activo de la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* se realizó un alineamiento del modelo obtenido de AlphaFold A0A1T3NRE8 (Jumper, et al., 2021; Varadi, et al., 2022) con el modelo obtenido a partir de la estructura cristalográfica de la asparaginasa de *R. etli* (Loch, et al., 2021). El alineamiento fue realizado utilizando el servidor DALI (Holm, et al., 2023) y se visualizó la superposición de ambos modelos de la proteína utilizando PyMOL (Figura 15). Los parámetros obtenidos por el servidor indican significancia estructural (Z-score de 40.2) junto con un RMSD aceptable (2.1 Å) y una longitud de alineamiento extensa (318 residuos de 369) lo cual nos indica que las dos proteínas tienen una estructura tridimensional muy similar.



**Figura 15 Alineamiento de proteínas utilizando PyMOL.** El alineamiento de ambos modelos mostró que existe similitud estructural entre ambas enzimas. L-asparaginasa de *S. scabrisporus* (verde) y *R. etli* (morado).

## Capítulo 4.      Discusión

---

Como se mencionó previamente al inicio de este trabajo, la búsqueda de nuevas fuentes de L-asparaginasa resulta ser una labor imperativa para hacerle frente a los efectos adversos ocasionados por la actividad secundaria de glutaminasa, la cual puede llegar a causar hiperamonemia debido a la acumulación excesiva de amonio en el cuerpo producto de la hidrólisis de la glutamina (van Trimont, et al., 2022). Este tipo de problemas ha sido reportado en asparaginasas como la de *E. coli* y *E. chrysanthemi*. Otra problemática observada asociada a las asparaginasas empleadas actualmente como tratamiento, incluyen los efectos ocasionados por reacciones inmunogénicas que pueden ir desde una reacción alérgica leve hasta un choque anafiláctico (Fonseca, et al., 2021). Por lo cual, encontrar variantes de L-asparaginasa con alta especificidad hacia el sustrato y nula actividad secundaria de glutaminasa es un objetivo fundamental. Estas variantes no solo mejorarían la seguridad del tratamiento, sino que también podrían incrementar su eficacia al reducir las dosis necesarias y los efectos adversos asociados (Fonseca, et al., 2021). Investigaciones recientes han identificado posibles nuevas fuentes con estas características como la L-asparaginasa de *R. etli* (Moreno-Enríquez, et al., 2012) y la descrita en este trabajo obtenida de *S. scabrisporus*.

### **4.1 El protocolo de purificación de la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* es muy eficiente, pero requiere de optimización para mejorar su rendimiento.**

El protocolo de purificación realizado dio como resultado la obtención de la L-asparaginasa con alta pureza de *S. scabrisporus*. Como se puede observar en el gel de electroforesis (Figura 1) la banda en el cuarto carril que corresponde a una fracción insoluble de la lisis indica que un porcentaje de la proteína se encuentra en cuerpos de inclusión. Sin embargo, el rendimiento de proteína soluble obtenido fue de 2 mg/L el cual fue una cantidad suficiente para realizar los ensayos de cinética enzimática y caracterización de la enzima. En los carriles 7-10 se observa la elución de la proteína con las concentraciones ascendentes de imidazol (20-500 mM), en las fracciones no se observa presencia de una cantidad considerable de proteínas inespecíficas al tamaño de la L-asparaginasa (34~kDa) por lo cual se considera que la proteína tiene un alto porcentaje de pureza. Para las consideraciones futuras de la optimización del proceso de purificación es necesario intentar reducir la formación de los cuerpos de inclusión. Para ello en la actualidad se han explorado distintos enfoques que ayudan a la reducción de la formación de cuerpos de inclusión entre los cuales hay métodos asociados a las condiciones de cultivo (Bhatwa, et al., 2021), entre

los cuales destacan el realizar la inducción de la proteína a una temperatura menor, el promover la formación de proteínas chaperonas mediante la realización de un periodo breve de choque térmico (47°C por 20 a 30 minutos). Otro de los enfoques que se ha estudiado es el uso de promotores de expresión que sean termo lábiles como el sistema  $\lambda$ pL/pR-cl857, este sistema es ampliamente utilizado para la expresión de proteínas recombinantes de uso terapéutico y permite la purificación de los cuerpos de inclusión formados (Valdez-Cruz, et al., 2023).

Durante el proceso de dializado de la enzima (Figura 2) se observó la precipitación de proteína no soluble en las membranas de diálisis (Figura 2, carriles 3 y 6) este fenómeno típicamente puede estar asociado a la concentración de sales que alteran la fuerza iónica de la solución y cambian las propiedades hidrofóbicas de la proteína, esto puede solucionarse cambiando el buffer de almacenamiento para la proteína a uno con menor concentración de sales, además es importante considerar la cantidad de surfactante como glicerol ya que altas concentraciones de esta sustancia propician la precipitación de las proteínas (Pesarradona, et al., 2015).

## 4.2 Caracterización de los parámetros cinéticos de la enzima.

El proceso de caracterización de la enzima incluyó la evaluación de la actividad residual a 37°C tomando como referencia la temperatura del cuerpo humano, ya que la enzima tiene la finalidad de utilizarse como un potencial agente quimioterapéutico.

En el proceso de determinación del pH óptimo en el cual la enzima realizaba la hidrólisis del aminoácido asparagina, se encontró que el pH ideal para la enzima se encuentra en un rango alcalino siendo el pH óptimo de 10. Esto es contrastante con el pH del suelo del cual la bacteria *Streptomyces scabrisporus* fue aislada, ya que se reporta que esta especie es una bacteria endófito del suelo de la planta *Amphipterygium adstringens* (Ceapă, et al., 2018) la cual crece en suelos ácidos a ligeramente alcalinos que oscilan entre 6.30-7.67 en la escala de pH (Ortega-Baranda, et al., 2023).

En la actualidad se han reportado distintos intervalos de pH y temperatura óptima en la cual las especies del género *Streptomyces* producen sus asparaginasas, por lo cual se realizó una búsqueda bibliográfica de especies que comparten un porcentaje de identidad superior al 60% con la secuencia de *S. scabrisporus* (González-Torres, et al., 2020) (Tabla 3) lo cual permite hacer inferencia en el pH de actividad óptimo que pudiera tener otras enzimas dentro de este grupo.

**Tabla 3 Reportes de pH y temperatura óptima para la expresión de L-asparaginasa en especies del género *Streptomyces***

Especie	pH	Temperatura (°C)	Referencia
<i>S. albidoflavus</i>	7.5	35°C	Narayana, et al., (2008).
<i>S. griseus</i>	8	35°C	Meena, B., et al., (2015).
<i>S. phaeochromogenes</i>	8.5	35°C	M. K., et al., (1998).
<i>S. fradiae</i>	8.5	40°C	El-Naggar, et al., (2016).

Por otra parte, el resultado obtenido del pH óptimo para esta L-asparaginasa presenta una limitante para su potencial uso terapéutico, ya que el pH fisiológico en el cual se requiere utilizar esta enzima se encuentra en un intervalo de 7.35-7.45.

No obstante, en la actualidad se han reportado distintos enfoques que permiten solucionar esta problemática mediante la inmovilización de la L-asparaginasa libre en nanopartículas magnéticas de óxido férrico ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) puede mejorar la estabilidad de la enzima en un rango más amplio de pH. Sin embargo, es importante destacar que otros parámetros cinéticos como la  $K_m$  y  $V_{max}$  pueden resultar alterados respecto a los valores obtenidos en condiciones óptimas (Dik, et al., 2023; Ates, et al., 2018; Orhan, et al., 2020). Los parámetros cinéticos observados para la L-asparaginasa de *Streptomyces scabrisporus* mostraron que la enzima en condiciones de pH óptimo presenta una  $K_m$  de 7.361 mM,  $V_{max}$  de 6.08  $\mu\text{mol/s}$  y una  $k_{cat}$  de 40.832  $\text{s}^{-1}$ . La comparación de los parámetros cinéticos con otras asparaginasas caracterizadas actualmente se presenta en la Tabla 4.

Una característica importante que destacar de la caracterización cinética de la enzima, es que en este trabajo se logró corroborar de manera experimental lo planteado en el análisis bioinformático realizado por González-Torres, et al., (2020) respecto a la nula actividad secundaria de glutaminasa en la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* (Figura 10) lo cual representa una ventaja respecto a las asparaginasas utilizadas como tratamiento en la actualidad.

Otro de los parámetros evaluados fue la estabilidad enzimática, este parámetro resulta particularmente importante en el ámbito de aplicación clínica, debido a que en la actualidad algunas de las formulaciones de L-asparaginasa requieren de la pegilación con polietilenglicol (PEG) para mejorar la estabilidad de la enzima y prolongar su vida media (Tripathy, et al., 2024).

**Tabla 4 Parámetros cinéticos de distintas L-asparaginidas (modificado de Beckett & Gervais, 2019)**

Especie	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	Actividad secundaria de glutaminasa	Referencia
<i>E. coli</i>	$0.02 \pm 0.03$	440	Presente	(Beckett & Gervais, 2019)
<i>E. chrysanthemi</i>	0.05	$207 \pm 358$	Presente	(Beckett & Gervais, 2019)
<i>R. etli</i>	$4.2 \pm 0.03$	$438 \pm 32$	Ausente	(Loch, et al., 2021)
<i>S. scabrisporus</i>	$7.361 \pm 1.78$	$40.832 \pm 2$	Ausente	(este trabajo)

En el caso de la L-asparaginasa de *E. chrysanthemi* una vez reconstituida de su forma liofilizada, esta presenta un tiempo de utilidad de 8 horas, mientras que, al almacenarse en temperaturas de 4°C, se puede prolongar su tiempo de utilidad por hasta 120 horas reteniendo el 98% de su actividad inicial (Viña-Romero, et al., 2020). En el caso de *E. coli*, se ha reportado que en condiciones no optimizadas para su almacenamiento a una temperatura de entre 4-8°C puede retener su actividad en un 92% cuando es almacenada durante 168 horas (Mihooliya, et al., 2023). Estos resultados son contrastantes con lo observado para la asparaginasa de *S. scabrisporus*, la cual preserva cerca del 40% de su actividad al almacenarse por 1008 horas a 4°C. Esto es un elemento importante para tener en consideración, ya que el régimen de uso de estas enzimas requiere de múltiples aplicaciones en los pacientes para poder disminuir los niveles de asparagina en sangre. En la actualidad no hay reportes de la estabilidad de la asparaginasa de *R. etli* en condiciones de almacenamiento a 4°C ni después de incubarse en periodos prolongados a 37°C.

### 4.3 Los cambios en el pH del medio pueden alterar el perfil cinético.

Una vez que se purificaron las asparaginidas de *R. etli* y *S. scabrisporus* se procedió a evaluar la cinética de ambas enzimas en condiciones de pH y temperatura fisiológica. En el caso de *R. etli* se obtuvo una  $V_{max}$  de  $20.9 \pm 3.312$   $\mu\text{mol/s}$ ,  $K_m$  de  $15.97 \pm 4.76$  mM y una  $k_{cat}$  de  $140.362 \pm 7.01$   $s^{-1}$ , estos parámetros son coincidentes con lo descrito por Loch, et al., (2021) y se explica que los cambios en el incremento de la  $K_m$  y reducción de la  $k_{cat}$  están asociados con el estado de protonación de los aminoácidos del sitio catalítico. Particularmente se hace mención que los residuos Lys51 y Lys263 (Figura 16) se encuentran protonados a

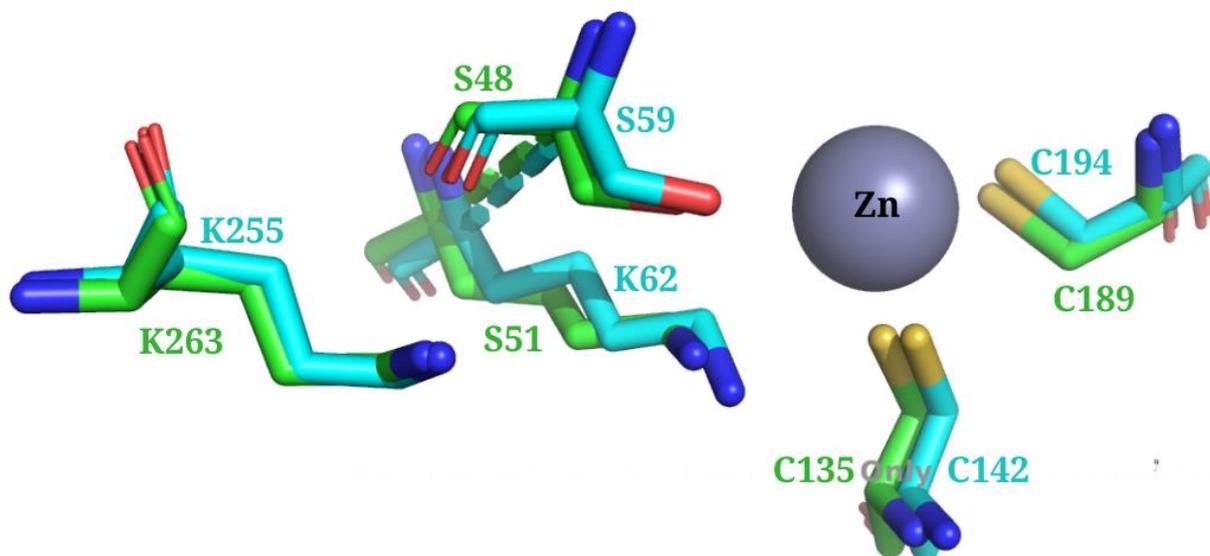
pH inferior a 9 y para que se lleve de forma adecuada la activación del sitio activo se requiere la deprotonación del residuo Lys51, para ello es necesario que la enzima se encuentre en un pH alcalino, esto es coincidente con las observaciones realizadas en estudios previos como el de Moreno-Enríquez, et al., (2012) en el cual se determinaron las condiciones de pH óptimo de la enzima en valores de pH 9-9.5.

En el caso de la asparaginasa de *S. scabrisporus* se observaron cambios en los parámetros cinéticos entre los cuales se puede destacar el incremento en la  $K_m$  el cual fue de cerca de 8 veces dando como resultado una  $K_m$  de  $60.49 \pm 10.53$  mM, este resultado era algo de esperarse debido a que el pH óptimo de la enzima se encuentra en un intervalo alcalino. No obstante, uno de los cambios interesantes observados fue un incremento en la  $k_{cat}$  la cual se duplica dando un valor de  $78.912 \pm 4$  s<sup>-1</sup>. Este tipo de cambios en la cinética de una enzima son poco habituales y han sido descritos anteriormente como un fenómeno poco común que puede deberse a una mutación en la secuencia de la enzima (Bauer, et al., 2001).

Como se mencionó previamente en el artículo elaborado por González-Torres, et al., (2020) tanto la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* como la de *R. etli* se encuentran dentro de la misma familia de proteínas PF06089.11. Los resultados obtenidos en el análisis *In silico* mostraron que a pesar de que la identidad de secuencia es del 30%, la alta similitud estructural observada en el alineamiento de dos monómeros de la enzima (Figura 15) y que ambas pertenecen a la misma familia de proteínas nos permite realizar algunas inferencias sobre la ubicación del sitio activo y los posibles residuos que lo conforman en la asparaginasa de *S. scabrisporus*.

En el trabajo elaborado por González-Torres, et al., (2020) los posibles sitios de unión para el sustrato difieren tanto en posición como en el tipo de residuo presente respecto a la estructura de *R. etli*. No obstante, en el momento que fue realizada dicha comparación aún no se contaba con la estructura realizada por cristalografía con la descripción precisa del sitio activo, por lo cual es de esperarse que haya algunas inconsistencias entre lo esperado y lo observado de forma experimental.

En el alineamiento realizado se puede apreciar que los residuos del sitio activo de *R. etli* se encuentran conservados en la estructura de la asparaginasa de *S. scabrisporus* al igual que los residuos que se coordinan con el ion de zinc para mantener la conformación tridimensional de la enzima (Figura 16).



**Figura 16 Alineamiento de los residuos del sitio activo de las asparaginases.** L-asparaginasa de *S. scabrisporus* (color cian) y de *R. etli* (verde), ion de Zinc (esfera gris).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

La L-asparaginasa de *S. scabrisporus* pudo expresarse de forma recombinante en *E. coli* y purificarse, obteniendo un rendimiento suficiente para realizar la caracterización cinética de la enzima. Aunque esta nueva fuente de L-asparaginasa presenta baja afinidad por el sustrato ( $K_m$ ) y esta pudiera ser insuficiente para emplearse como un tratamiento de primera línea contra la LLA, presenta otras ventajas respecto a las formulaciones actualmente empleadas como tratamiento, entre estas propiedades se encuentra su nula actividad secundaria de glutaminasa y la estabilidad de la enzima en condiciones de almacenamiento por periodos prolongados de tiempo.

Por otra parte, se logró purificar de forma exitosa la asparaginasa de *R. etli* y evaluar sus parámetros cinéticos en pH fisiológico. Esta asparaginasa se ha mostrado como una potencial alternativa para el tratamiento de la LLA, debido a que presenta propiedades cinéticas competitivas respecto a otras asparaginasas que se estudian en la actualidad, esta enzima al igual que la de *S. scabrisporus*, carece de actividad secundaria de glutaminasa lo cual le confiere una ventaja respecto a las formulaciones derivadas de *E. coli* y *E. chrysanthemi* las cuales pueden presentar efectos adversos derivado de la hidrólisis de la glutamina.

El presente trabajo permitió caracterizar dos L-asparaginasas perteneciente a una familia de proteínas poco explorada (PF06089.11), las cuales presentan propiedades prometedoras para utilizarse como un potencial tratamiento contra la LLA. Aunque los resultados obtenidos en el desempeño de la enzima en condiciones fisiológicas no son del todo favorables, este trabajo da un antecedente para poder explorar alternativas que permitan mejorar las propiedades cinéticas de la enzima.

### 5.1 Perspectivas

- 1.- Realizar la caracterización estructural de la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* por cristalografía y determinar los residuos que conforman el sitio activo.
- 2.- Evaluar el efecto citotóxico de la enzima en líneas celulares leucémicas sensibles a asparaginasa (Molt-4) y en líneas celulares tolerantes a asparaginasa (Reh).
- 3.- Funcionalización de la enzima de *S. scabrisporus* con nanopartículas u otros nanomateriales que puedan

mejorar el perfil cinético de la enzima en condiciones de pH fisiológico.

4.- Realizar estudios de inmunogenicidad de la enzima en modelos *in vitro* e *in vivo* para validar los análisis inmunoinformáticos que se realizaron en trabajos previos y corroborar si la L-asparaginasa de *S. scabrisporus* induce una respuesta inmune menor a la de *E. coli*.

## Literatura citada

- Abdel Fatah, M. K., Abdel Mageed, A. R., Abdel All, S. M., & Mohamed, N. G. (1998). Purification and characterization of L-asparaginase produced by *Streptomyces phaeochromogenes* FS-39. *Journal of Drug Research of Egypt*, 22(2-Jan), 195-212
- Ates, B., Ulu, A., Köytepe, S., Noma, S. A. A., Kolat, V. S., & Izgi, T. (2018). Magnetic-propelled Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan carriers enhance L-asparaginase catalytic activity: A promising strategy for enzyme immobilization. *RSC Advances*, 8(63), 36063–36075. <https://doi.org/10.1039/C8RA06346J>
- Bauer, C., Osman, A. M., Cercignani, G., Gialluca, N., & Paolini, M. (2001a). A unified theory of enzyme kinetics based upon the systematic analysis of the variations of *k*<sub>cat</sub>, *K*<sub>M</sub>, and *k*<sub>cat</sub>/*K*<sub>M</sub> and the relevant  $\Delta G_0^\ddagger$  values—Possible implications in chemotherapy and biotechnology. *Biochemical Pharmacology*, 61(9), 1049–1055. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00579-2)
- Bauer, C., Osman, A. M., Cercignani, G., Gialluca, N., & Paolini, M. (2001b). A unified theory of enzyme kinetics based upon the systematic analysis of the variations of *k*<sub>cat</sub>, *K*<sub>M</sub>, and *k*<sub>cat</sub>/*K*<sub>M</sub> and the relevant  $\Delta G_0^\ddagger$  values—Possible implications in chemotherapy and biotechnology. *Biochemical Pharmacology*, 61(9), 1049–1055. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00579-2)
- Beckett, A., & Gervais, D. (2019). What makes a good new therapeutic L-asparaginase? *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35(10), 152. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2731-9>
- Bekker-Méndez, V. C., Miranda-Peralta, E., Núñez-Enríquez, J. C., Olarte-Carrillo, I., Guerra-Castillo, F. X., Pompa-Mera, E. N., Ocaña-Mondragón, A., Rangel-López, A., Bernáldez-Ríos, R., Medina-Sanson, A., Jiménez-Hernández, E., Amador-Sánchez, R., Peñaloza-González, J. G., de Diego Flores-Chapa, J., Fajardo-Gutiérrez, A., Flores-Lujano, J., Rodríguez-Zepeda, M. del C., Dorantes-Acosta, E. M., Bolea-Murga, V., ... Mejía-Aranguré, J. M. (2014). Prevalence of Gene Rearrangements in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Population Study—Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. *BioMed Research International*, 2014, e210560. <https://doi.org/10.1155/2014/210560>
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X.-Z., & Zhou, T. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>
- Bhojwani, D., Yang, J. J., & Pui, C.-H. (2015). Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), 47–60. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.004>
- Ceapă, C. D., Vázquez-Hernández, M., Rodríguez-Luna, S. D., Cruz Vázquez, A. P., Jiménez Suárez, V., Rodríguez-Sanoja, R., Alvarez-Buylla, E. R., & Sánchez, S. (2018). Genome mining of *Streptomyces scabrisporus* NF3 reveals symbiotic features including genes related to plant interactions. *PLoS One*, 13(2), e0192618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192618>
- Chand, S., Mahajan, R. V., Prasad, J. P., Sahoo, D. K., Mihooliya, K. N., Dhar, M. S., & Sharma, G. (2020). A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(4), 619–647. <https://doi.org/10.1002/bab.1888>

- Chiu, M., Taurino, G., Bianchi, M. G., Kilberg, M. S., & Bussolati, O. (2020). Asparagine Synthetase in Cancer: Beyond Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01480>
- Díaz-Barriga, C. (2018). *Encapsidación de la enzima quimioterapéutica asparaginasa en la partícula tipo virus del bacteriófago P22*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Tesis en resguardo.
- Díaz-Barriga, C., Villanueva-Flores, F., Quester, K., Zárate-Romero, A., Cadena-Nava, R. D., & Huerta-Saquero, A. (2021). Asparaginase-Phage P22 Nanoreactors: Toward a Biobetter Development for Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. *Pharmaceutics*, 13(5), 604. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050604>
- Dik, G., Ulu, A., Inan, O., Atalay, S., & Ates, B. (2022). A Positive Effect of Magnetic Field on the Catalytic Activity of Immobilized L-Asparaginase: Evaluation of its Feasibility. *Catalysis Letters*, 153. <https://doi.org/10.1007/s10562-022-04075-3>
- Dong, Y., Shi, O., Zeng, Q., Lu, X., Wang, W., Li, Y., & Wang, Q. (2020). Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Experimental Hematology & Oncology*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00170-6>
- El-Naggar, N. E.-A., Deraz, S. F., Soliman, H. M., El-Deeb, N. M., & El-Ewasy, S. M. (2016). Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic *Streptomyces fradiae* NEAE-82. *Scientific Reports*, 6, 32926. <https://doi.org/10.1038/srep32926>
- Fonseca, M. H. G., Fiúza, T. da S., Morais, S. B. de, Souza, T. de A. C. B. de, & Trevizani, R. (2021). Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111616. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111616>
- González-Torres, I. (2018). Estudio in silico de L-asparaginasas de *Streptomyces* para la identificación de potenciales candidatas para el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Aguda. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2518>
- González-Torres, I., Perez-Rueda, E., Evangelista-Martínez, Z., Zárate-Romero, A., Moreno-Enríquez, A., & Huerta-Saquero, A. (2020). Identification of L-asparaginasas from *Streptomyces* strains with competitive activity and immunogenic profiles: A bioinformatic approach. *PeerJ*, 8, e10276. <https://doi.org/10.7717/peerj.10276>
- Greaves, M. (2018). A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews. Cancer*, 18(8), 471–484. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
- Heo, Y.-A., Syed, Y. Y., & Keam, S. J. (2019). Pegaspargase: A Review in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs*, 79(7), 767–777. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01120-1>
- Holm, L., Laiho, A., Törönen, P., & Salgado, M. (2023). DALI shines a light on remote homologs: One hundred discoveries. *Protein Science*, 32(1), e4519. <https://doi.org/10.1002/pro.4519>

- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K., & Isono, M. (1973). Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *Journal of General Microbiology*, 76(1), 85–99. <https://doi.org/10.1099/00221287-76-1-85>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kidd, J. G. (1953). Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *The Journal of Experimental Medicine*, 98(6), 565–582. <https://doi.org/10.1084/jem.98.6.565>
- Loch, J. I., Imiolczyk, B., Sliwiak, J., Wantuch, A., Bejger, M., Gilski, M., & Jaskolski, M. (2021). Crystal structures of the elusive *Rhizobium etli* L-asparaginase reveal a peculiar active site. *Nature Communications*, 12(1), 6717. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27105-x>
- Meena, B., Anburajan, L., Sathish, T., Vijaya Raghavan, R., Dharani, G., Valsalan Vinithkumar, N., & Kirubakaran, R. (2015). L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: Optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of L-asparaginase gene. *Scientific Reports*, 5(1), 12404. <https://doi.org/10.1038/srep12404>
- Mejía-Aranguré, J., Perez-Saldivar, M., Pelayo-Camacho, R., Fuentes-Pananá, E., Bekker-Méndez, V., Morales, A., Duarte-Rodríguez, D., & Fajardo-Gutiérrez, A. (2011). Childhood Acute Leukemias in Hispanic Population: Differences by Age Peak and Immunophenotype. *Novel aspects in acute lymphoblastic leukemia*, 1. <https://doi.org/10.5772/26546>
- Mihooliya, K. N., Nitika, N., Bhambure, R., & Rathore, A. S. (2023a). Post-refolding stability considerations for optimization of in-vitro refolding: L-asparaginase as a case study. *Biotechnology Journal*, 18(4), 2200505. <https://doi.org/10.1002/biot.202200505>
- Mihooliya, K. N., Nitika, N., Bhambure, R., & Rathore, A. S. (2023b). Post-refolding stability considerations for optimization of in-vitro refolding: L-asparaginase as a case study. *Biotechnology Journal*, 18(4), 2200505. <https://doi.org/10.1002/biot.202200505>
- Moreno-Enriquez, A., Evangelista-Martinez, Z., Gonzalez-Mondragon, E. G., Calderon-Flores, A., Arreguin, R., Perez-Rueda, E., & Huerta-Saquero, A. (2012). *Biochemical Characterization of Recombinant L-Asparaginase (AnsA) from Rhizobium etli, a Member of an Increasing Rhizobial-Type Family of L-Asparaginases*. 22(3), 292–300. <https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07047>
- Narayana, K. J. P., Kumar, K. G., & Vijayalakshmi, M. (2008). L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 331–336. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0018-1>
- National Cancer Institute. (2011). Médula ósea [Imagen]. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/medula-osea>

- Nichols, M. L., & Willits, C. O. (1934). Reactions of Nessler's Solution <sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society*, 56(4), 769–774. <https://doi.org/10.1021/ja01319a003>
- Orhan, H., & Aktaş Uygun, D. (2020). Immobilization of L-Asparaginase on Magnetic Nanoparticles for Cancer Treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(4), 1432–1443. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03276-z>
- Ortega-Baranda, V., Cruz-Salinas, D. L. de la, Romero-Manzanares, A., & Sánchez-Bernal, E. I. (2023). Estructura poblacional y fenología de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) desarrollado sobre litosol degradado en la costa de Oaxaca. *Terra Latinoamericana*, 41. <https://doi.org/10.28940/terra.v41i0.1595>
- Pesarrodona, M., Unzueta, U., & Vázquez, E. (2015). Dialysis: A characterization method of aggregation tendency. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1258, 321–330. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_18)
- Reimer, L. C., Vetcinina, A., Carbasse, J. S., Söhngen, C., Gleim, D., Ebeling, C., & Overmann, J. (2019). BacDive in 2019: Bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D631–D636. <https://doi.org/10.1093/nar/gky879>
- Saxena, A., Upadhyay, R., & Kango, N. (2015). Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(12), 786–793.
- Stanulla, M., & Schrappe, M. (2009). Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology*, 46(1), 52–63. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2008.09.007>
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6), e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
- Tripathy, R. K., Anakha, J., & Pande, A. H. (2024). Towards development of biobetter: L-asparaginase a case study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1868(1), 130499. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130499>
- Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2023). Thermoinducible *E. coli* for Recombinant Protein Production in Inclusion Bodies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2617, 17–30. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2930-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2930-7_2)
- Van Trimpont, M., Peeters, E., De Visser, Y., Schalk, A. M., Mondelaers, V., De Moerloose, B., Lavie, A., Lammens, T., Goossens, S., & Van Vlierberghe, P. (2022). Novel Insights on the Use of L-Asparaginase as an Efficient and Safe Anti-Cancer Therapy. *Cancers*, 14(4), 902. <https://doi.org/10.3390/cancers14040902>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Velho-Pereira, S., & Kamat, N. M. (2013). Actinobacteriological research in India. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(8), 573–596.

- Villanueva-Flores, F., Zárate-Romero, A., Torres, A. G., & Huerta-Saquero, A. (2021). Encapsulation of Asparaginase as a Promising Strategy to Improve In Vivo Drug Performance. *Pharmaceutics*, 13(11), 1965. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111965>
- Viña-Romero, M. M., Ramos-Díaz, R., Mourani-Padron, I., Gonzalez-Mendez, H., Gonzalez-Cruz, M., Nazco-Casariago, G., Merino-Alonso, J. J. F., Diaz-Vera, J., & Gutiérrez-Nicolás, F. (2020). Extended Stability of Reconstituted Lyophilized Erwinia L-asparaginase in Vials. *In Vivo*, 34(5), 2419–2421. <https://doi.org/10.21873/invivo.12055>
- Walenciak, J., Wyka, K., Janczar, S., Młynarski, W., & Zalewska-Szewczyk, B. (2019). Dynamic changes in specific anti-L-asparaginase antibodies generation during acute lymphoblastic leukemia treatment. *Pharmacological Reports: PR*, 71(2), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.11.002>