

B17 - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ASPARAGINASE II DE *Saccharomyces cerevisiae* CLONADA EM *Pichia pastoris*: ESTUDO DE UM POSSÍVEL FÁRMACO ANTILEUCÊMICO

Luciana Facchinetti de Castro Girão ^{1,2,*}, Surza Lucia Gonçalves da Rocha ², Ricardo Sobral Teixeira¹, Maria Antonieta Ferrara ³, Jonas Perales ², Elba Pinto da Silva Bon ^{1,*}

¹Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

²Laboratório de Toxinologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

³Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introdução: Asparaginases bacterianas oriundas de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são utilizadas como medicamentos para tratamento de leucemia linfocítica aguda e linfomas não Hodgkin. Apesar das propriedades terapêuticas destas enzimas, reações adversas têm sido relatadas: por vezes tão severas que impossibilitam a utilização destes medicamentos por alguns pacientes. Além disso, o único medicamento que o Brasil importava parou de ser produzido. Tendo em vista esses dois aspectos, propôs-se a produção de asparaginase de fonte não bacteriana.

Objetivo: Purificar e caracterizar a asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* clonada e expressa em *Pichia pastoris* visando à produção de um fármaco antileucêmico.

Metodologia: A metodologia estabelecida para a purificação da asparaginase recombinante envolveu três etapas: ultrafiltração em membrana Amicon de 50 kDa, cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex200 e cromatografia de troca aniônica em coluna Mono-Q. A homogeneidade foi confirmada através de SDS-PAGE em condições redutoras e por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF; a atividade enzimática foi determinada pela reação de hidroxilaminólise. O ponto isoelétrico foi estimado por eletroforese bidimensional e a massa molecular foi determinada utilizando SDS-PAGE 12% e cromatografia de exclusão molecular. A porção glicídica da asparaginase recombinante em sua forma homogênea foi analisada através de SDS-PAGE 12% em condições redutoras, seguido de coloração pela técnica de ácido periódico/reagente de Schiff. Além disso, realizamos a clivagem enzimática dos glicídios N-ligados com PNGase F à 37 °C por 3 horas, seguido de análise por SDS-

PAGE. Caracterizou-se o pH e a temperatura ótima da enzima por reação de hidroxiaminólise em diferentes valores de pH e temperatura.

Resultados: A fração homogênea oriunda da troca aniônica apresentou atividade específica de 204 UI mg⁻¹, representando um grau de purificação de 10,9 vezes e uma recuperação de atividade de 51,3 % em relação ao extrato bruto. Após eletroforese, observamos a presença de duas bandas, com massa molecular estimada em 48 e 46 kDa respectivamente. Após análise por espectrometria de massas, verificamos que estas bandas correspondem à enzima asparaginase II de *S. cerevisiae*. As duas bandas apresentaram coloração positiva para glicosilação. A massa molecular da enzima nativa foi estimada em 136 kDa, sugerindo que a enzima é um oligômero. No entanto, foram observados dois valores de pH ótimo em 7,2 e 9,0. Após clivagem enzimática dos glicídios por PNGase F, as duas bandas migraram como uma única banda em SDS-PAGE, indicando que a principal diferença entre elas é o grau de glicosilação. O ponto isoelétrico foi estimado em aproximadamente 4,55 utilizando o programa de análise de imagens ImageMaster (GE Healthcare).

Conclusão: Os resultados obtidos dão suporte à continuação da pesquisa visando o uso da asparaginase de levedura recombinante como medicamento antileucêmico, já tendo sido iniciados os estudos pré-clínicos *in vitro*.