

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

Natália Plínio de Souza

Otimização da extração da enzima asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris*

Rio de Janeiro

2019

Natália Plinio de Souza

Otimização da extração da enzima asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris*

Dissertação submetida ao corpo docente do Curso de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Antônio Carlos Siani

2º Orientadora: Dra. Maria Antonieta Ferrara

Rio de Janeiro

2019

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

S719o Souza, Natália Plínio de

Otimização da extração da enzima asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris*. / Natália Plínio de Souza. – Rio de Janeiro, 2019.

xix, 87 f. : il. ; 30 cm.

Orientadores: Antônio Carlos Siani e Maria Antonieta Ferrara.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2019.

Bibliografia: f. 78-87

1. Asparaginase. 2. Extração. 3. *P. pastoris*. 4. Enzima Periplásmica.
I. Título.

CDD 615.1

Natália Plínio de Souza

Otimização da extração da enzima asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris*

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz

Aprovada em 15 de fevereiro de 2019.

Banca Examinadora:

Dr. Antonio Carlos Siani
Instituto de Tecnologia em Fármacos -FIOCRUZ (orientador)

Dr^a. Maria Antonieta Ferrara
Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ (2^o orientador)

Prof. Dr. Raquel Elisa da Silva Lopez
Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Dr^a. Karen Medeiros Gonçalves
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Dr^a. Edna Maria Moraes de Oliveira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu marido Jorge Felipe e aos
meus filhos: Guilherme e Heloisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força de vontade de concluir este trabalho.

À minha família pela compreensão da minha ausência e incentivo da minha vida acadêmica.

Ao meu irmão Jadir Plínio pelo incentivo e carinho.

À minha orientadora Dra. Maria Antonieta Ferrara por toda ajuda e aprendizado, principalmente pela confiança.

Ao meu orientador Dr. Antonio Carlos Siani por sempre estar disposto a ajudar e a dar continuidade neste trabalho.

À Dra. Elba Bon por disponibilizar os equipamentos e insumos.

Ao Laboratório Enzitec do Instituto de Química / UFRJ por disponibilizar o espaço e infraestrutura para realizar todos os ensaios deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica: Camila Silva de Oliveira e Eduardo Moraes pela ajuda nos ensaios de otimização.

Ao Dr. Wagner Lopes do Laboratório de Bioprodutos/ Farmanguinhos, principalmente pelo treinamento nas técnicas de atividade enzimática que foram fundamentais para elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Felipe Knopp pelo aprendizado de cultivo de leveduras e fermentação em biorreator.

À Msc. Cristiana Passinato pela ajuda nas esterilizações do meio e estar sempre disposta a ajudar.

Ao Dr. Marcelo Tappin pela ajuda na elaboração dos ensaios de otimização e discussão dos resultados.

A todos colaboradores do laboratório LATIM/ Biomanguinhos, principalmente Dra. Denise Matos e Dra. Andrea Marques, por todo apoio, incentivo e na ajuda na elaboração dos gráficos.

À Dra. Elezer Lemes, Dr. José Senna, Msc. Anna Erika Vieira e Msc. Carlos Viana, pela amizade e por sempre incentivarem minha vida acadêmica.

Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele o fará.
(Salmos 37:5)

De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.

(Fernando Sabino)

RESUMO

SOUZA, Natália Plínio de Souza. Otimização da extração da enzima asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris*. 2019. 109f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

A enzima L-asparaginase é o principal medicamento biológico para tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA). As formulações de L-asparaginase existentes no mercado atualmente são oriundas de sistema procariótico, *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*; que são eficazes no tratamento de LLA, porém provocam toxicidade e reações de imunogenicidade que dificultam ou até inviabilizam o tratamento. Neste contexto, foi estabelecido um projeto desenvolvido em parceria entre Farmanguinhos / Fiocruz e o Instituto de Química / UFRJ, que visa o desenvolvimento de um fármaco antileucêmico a partir de asparaginase de levedura, a qual possui menor potencial imunogênico devido à maior proximidade filogenética com as células humanas. Em trabalhos anteriores, o gene *ASP3* que codifica a asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* foi clonado e expresso na levedura *Pichia pastoris*. A extração da asparaginase periplasmática recombinante foi estudada por choque osmótico e pH alcalino usando solução de fosfato de potássio 500 mM em pH 11,5 na presença de cisteína 10 mM, na proporção de 70 mL por grama de massa celular seca, resultando em 90% de recuperação da atividade enzimática em 2 horas de tratamento. Apesar do alto rendimento e da seletividade para a extração da asparaginase, o elevado consumo de reagentes e o pH extremamente alcalino são fatores problemáticos, especialmente quando se considera o aumento de escala do processo. O presente trabalho consistiu na otimização deste processo de extração, buscando minimizar a quantidade de insumos e o tempo reacional. Os parâmetros significativos, selecionados por planejamento fatorial fracionário entre a concentração de fosfato de potássio, concentração de cisteína e pH do meio reacional, foram otimizados por delineamento composto central. Posteriormente, o tempo de reação, temperatura e proporção de solução extratora : massa celular foram avaliados separadamente. Os extratos enzimáticos foram analisados quanto à atividade enzimática, concentração de proteína total e perfil proteico por SDS-PAGE. O planejamento experimental mostrou que as três variáveis avaliadas (concentrações de fosfato e de cisteína e pH) foram significativas para a extração da asparaginase. A otimização da solução extratora indicou como composição ótima: fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2, significando uma redução de 0,3 unidades de pH em relação ao processo anteriormente desenvolvido. O tempo de extração da asparaginase foi reduzido de 120 min para 60 min. A extração pode ser realizada à temperatura ambiente, entre 25 e 28° C. A proporção de volume de solução extratora : massa celular pode ser reduzida para 17,5 mL por grama de célula seca, representando uma redução de quatro vezes em relação ao processo anterior. O processo de extração otimizado foi transposto da escala de 0,1 g de célula para 0,5 g de célula sem alterações significativas no rendimento de extração e na atividade específica do extrato bruto, indicando a reprodutibilidade do processo de extração para a faixa estudada.

Palavras-chave: Asparaginase 1. Extração 2. *P. pastoris* 3. Enzima periplásmica 4.

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase is the main biological drug for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). The currently available formulations of L-asparaginase are from the prokaryotic, *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*; which are effective in the treatment of ALL, but cause toxic and immunogenic reactions that hinder or even render the treatment unfeasible. In this context, a project has been developed in partnership between Farmanguinhos / Fiocruz and the Institute of Chemistry / UFRJ, aiming at developing an antileukemic drug from yeast asparaginase, which has a lower immunogenic potential due to the higher phylogenetic proximity with human cells. In previous work, the *ASP3* gene encoding *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II was cloned and expressed in the yeast *Pichia pastoris*. The extraction of the recombinant periplasmic asparaginase was studied by osmotic shock and alkaline pH using a 500 mM potassium phosphate solution at pH 11.5 in the presence of 10 mM cysteine, at the ratio of 70 ml per gram of dry cell mass, resulting in 90% enzymatic activity recovery in 2 hours of treatment. Despite the high yield and selectivity for extracting asparaginase, the high reagent consumption and extremely alkaline pH are problematic factors, especially when considering the process scale up. The present work consists in the optimization of this extraction process, aiming at minimizing the amount of reagents and the reaction time. The significant parameters, selected by fractional factorial design among phosphate and cysteine concentrations and medium pH were optimized by central composite design. Subsequently, reaction time, temperature and extractive solution : cell mass ratio were separately evaluated. The enzymatic extracts were analyzed for enzymatic activity, total protein concentration and protein profile by SDS-PAGE analysis. The experimental design showed that the three variables evaluated were significant for asparaginase extraction. Optimization of the extractive solution indicated as optimal composition: 500 mM potassium phosphate, 10 mM cysteine, pH 11.2, meaning a reduction of 0.3 pH units over the previously developed process. The extraction time was reduced from 120 min to 60 min. Extraction may be performed at room temperature, between 25 and 28 °C. The ratio of extractive solution volume: cell mass may be reduced at least to 17.5 ml per gram of dry cell mass, representing a four-fold reduction over the previous process. The optimized extraction process was transposed from 0.1 g cell to 0.5 g cell without significant changes in the extraction yield and the specific activity of the crude extract, indicating the reproducibility of the extraction process for the studied range.

Key-words: Asparaginase 1. Extraction 2. *Pichia pastoris* 3. Periplasmic enzyme 4.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Estimativa das taxas de incidência mundial em 2018 de leucemia em ambos os sexos, todas as idades	4
FIGURA 2 -Mecanismo geral da reação de catalise da enzima asparaginase	8
FIGURA 3 - Ação antineoplasica da enzima asparaginase	9
FIGURA 4 - Características estruturais das L-asparaginases do tipo bacteriano	12
FIGURA 5 - Sequência de aminoácidos da enzima asparaginase II de <i>E. coli</i> cuja estrutura quaternária está representada na figura 5.	14
FIGURA 6 - Sequência de aminoácidos da enzima asparaginase II de <i>Erwinia chrysanthemi</i> cuja estrutura quaternária está representada na figura 8	14
FIGURA 7 - Estrutura quaternária da L-asparaginase II de <i>E. coli</i> determinada por cristalografia de raios-X.	15
FIGURA 8 - Estrutura quaternária da L-asparaginase II de <i>E. chrysanthemi</i> determinada por cristalografia de raios-X	15
Figura 9 - Representação esquemática da de uma proteína peguilada e as vantagens da peguilação	16
FIGURA 10 - Sequência de aminoácidos da enzima asparaginase II de <i>S. cerevisiae</i>	24
FIGURA 11 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das asparaginases utilizando o programa <i>multialin</i>	25
FIGURA 12 - Estrutura e composição das camadas externas de levedura	31
FIGURA 13 - Sequência de aminoácidos de enzima asparaginase II de <i>S. cerevisiae</i> expressa em <i>P. pastoris</i>	38
FIGURA 14 - Esquema geral da metodologia	49
FIGURA 15 - Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE das amostras que apresentaram rendimento superior a 50% nos ensaios da triagem dos fatores relevantes da composição da solução extratora	56
FIGURA 16 - Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE das amostras que apresentaram rendimento superior a 50% nos ensaios da triagem dos fatores	

relevantes da composição da solução extratora	57
FIGURA 17 - Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE das amostras que apresentaram rendimento superior a 60% nos ensaios de composto central para otimização da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e ph) por planejamento experimental	61
FIGURA 18 - Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE dos extratos enzimáticos em função do tempo de extração	66
FIGURA 19 - Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE dos extratos enzimáticos obtidos com diferentes proporções de peso seco de célula (g) : volume de solução extratora (mL)	70

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - Recuperação enzimática obtida para a extração da enzima asparaginase nos ensaios de triagem dos fatores relevantes da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) por planejamento experimental55
- GRÁFICO 2 - Atividade específica das amostras que apresentaram rendimento superior a 50% nos ensaios de triagem dos fatores relevantes da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH).....55
- GRÁFICO 3 - Efeito das variáveis da solução extratora (concentração de fosfato de potássio dibásico, concentração de cisteína e pH) na extração da enzima asparaginase no planejamento fatorial completo 58
- GRÁFICO 4 - Rendimentos obtidos para a extração da enzima asparaginase nos ensaios de composto central para otimização da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) por planejamento experimental..... 60
- GRÁFICO 5 - Atividade específica das amostras que apresentaram rendimento superior a 60% nos ensaios de composto central para otimização da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) por planejamento experimental.....60
- GRÁFICO 6 - Efeitos dos fatores avaliados para composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) no desenho de composto central 62
- GRÁFICO 7 - Perfis das respostas das variáveis relevantes (concentração de fosfato de potássio dibásico, concentração de cisteína e pH) na extração da enzima asparaginase e composição da solução extratora otimizada 63
- GRÁFICO 8 - Superfície de resposta da extração da enzima asparaginase em função das concentrações de fosfato de potássio e cisteína em pH 11,2. Dados obtidos a partir do planejamento experimental realizado conforme a tabela 7.....64
- GRÁFICO 9 - Cinética de extração da enzima asparaginase com frações de 10 mL de cultura empregando a solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM,

cisteína 10 mM em pH 11,2) em 28°C a 200 rpm65

GRÁFICO 10 - Recuperação enzimática e atividade específica dos extratos em função da temperatura de extração da enzima asparaginase. condições de extração: 0,085 g de massa celular (base seca); 6,4 mL de solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2); 60 min; 200 rpm 67

GRÁFICO 11 - Recuperação enzimática e atividade específica dos extratos em função da proporção de peso seco de célula (g) : volume de solução extratora (mL) empregada para a extração da asparaginase. condições de extração: 0,085 g de massa celular (base seca); solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2); 60 min; 28 °C; 200 rpm..... 69

GRÁFICO 12 - Avaliação do pH inicial e final dos ensaios de extração da enzima asparaginase empregando diferentes proporções em peso seco de célula (g) : volume de solução extratora (mL) na solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM em pH 11,2) em 60 min, 28 °C e 200 rpm 71

GRÁFICO 13 - Cinética de extração da enzima asparaginase. Condições de extração: 0,45 g de massa celular (base seca); 30 mL de solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2) (proporção 1:70); 28 °C; 200 rpm..... 73

GRÁFICO 14 - Recuperação e atividade específica dos extratos em função da proporção de peso seco de célula (g): volume de solução extratora (ml). Condições de extração: 0,45 g de massa celular (base seca); solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2); 60 min; 28 °C; 200 rpm 74

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Espécies que produzem endogenamente a enzima asparaginase	10
QUADRO 2 - Características da enzima asparaginase II de <i>E. coli</i> e de <i>E. chrisanthemi</i>	13
QUADRO 3 - Produtos farmacêuticos derivados da enzima asparaginase	18
QUADRO 4 - Formulações de asparaginase e suas características	19
QUADRO 5 - Características da enzima asparaginase do tipo I e II de <i>S. cerevisiae</i>	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grau de identidade e similaridade entre as asparaginases: <i>E. coli</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> e <i>S. cerevisiae</i> clonada e expressa em <i>P. pastoris</i>	25
TABELA 2 - Triagem das variáveis relevantes e seus níveis (concentração de fosfato de potássio, concentração de cisteína e pH) para otimização da solução extratora por planejamento fatorial completo.....	44
TABELA 3 - Valores das variáveis dependentes (concentração de fosfato, concentração de cisteína e pH) e seus níveis para otimização da solução extratora para otimização por deliniamento composto central	44
TABELA 4 - Dados da produção da enzima asparaginase expressa em <i>P. pastoris</i> INCQS 50002 a partir de 1,5 L de cultura em frascos agitados	51
TABELA 5 - Dados das alíquotas de <i>pellet</i> celular utilizadas nos experimentos de otimização do processo de extração da asparaginase periplásmica. As alíquotas correspondem a 10 mL da cultura descrita na tabela 4.....	52
TABELA 6 - Triagem das variáveis relevantes e seus níveis (concentração de fosfato de potássio, concentração de cisteína e pH) para otimização da solução extratora por planejamento fatorial completo	54
TABELA 7 - Valores das variáveis dependentes (concentração de fosfato, concentração de cisteína e pH) e seus níveis para otimização da solução extratora para otimização por deliniamento composto central	59
TABELA 8 - Dados da produção da enzima asparaginase expressa em <i>P. pastoris</i> INCQS 50002 para ensaio de extração em 0,4g de <i>pellet</i> (peso seco)	72
TABELA 9 - Características dos extratos enzimáticos resultantes do processo desenvolvido por Ferrara e col. (2010) e do processo otimizado no presente trabalho	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	- Ácido desoxirribonucléico
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOX	- Álcool oxidado
ARN	- Ácido Ribonucleico
BSA	- Albumina de soro bovino
BMG	- <i>Buffered glycerol complex médium</i>
BMM	- <i>Buffered metanol complexmedium</i>
Da	- Daltons
DO	- Densidade ótica
EXT.	- Extrato bruto enzimático
G	- Gravidade
LLA	- Leucemia linfoblásica aguda
pH	- Potencial hidrogeniônico
rec.	- Recuperação
RPM	- Rotação por minuto
SDS-PAGE	- <i>Sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TCA	- Ácido tricloroacético
trad.	- Tradutor
U	- Unidades internacionais de atividade enzimática
VISA	- Vigilância Sanitária
YNB	- <i>Yest nitrogen base</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

- © - copyright
- @ - arroba
- ® - marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA).....	3
2.2 ASPARAGINASE.....	6
2.2.1 ASPARAGINASES DE USO TERAPÊUTICO	16
2.2.2 OS PRINCIPAIS EFEITOS ADVERSOS QUE A ASPARAGINASE PROMOVE	20
2.3 ASPARAGINASE II DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	23
2.4 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM <i>PICHIA PASTORIS</i> (<i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i>).....	26
2.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM LEVEDURAS	29
2.5.1 EXTRAÇÃO SELETIVA DE ENZIMAS PERIPLASMÁTICAS.....	32
2.6 OTIMIZAÇÃO DE BIOPROCESSOS.....	35
2.7 PROJETO ASPARAGINASE	36
3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 OBJETIVO GERAL.....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
5 MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1 CULTIVO CELULAR.....	41
5.1.1 Micro-organismo	41
5.1.2 Manutenção e reativação de cultura	41
5.1.3 Crescimento celular e produção de asparaginase em agitador orbital	41
5.2 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATORA.....	42
5.2.1 Triagem de variáveis relevantes por planejamento fatorial completo	42
5.2.2 Delineamento composto central (DCCR) para otimização e estudo dos efeitos dos componentes na extração da enzima asparaginase II.....	43
5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE EXTRAÇÃO.....	43
5.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO.....	44
5.5 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DA SOLUÇÃO EXTRATORA	44

5.6 TRANSPOSIÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO PARA 0,5 G DE PELLET CELULAR	45
5.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	45
5.7.1 Quantificação de massa celular	45
5.7.2 Atividade asparaginásica	45
5.7.3 Dosagem de proteínas totais pelo método Bradford.....	47
5.7.4 Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE (sodium dodecil sulfato poliacrilamida gel electrophoresis).....	47
5.8 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	50
6.2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA ASPARAGINASE PERIPLASMÁTICA.....	51
6.2.1. Cultivo celular e produção da asparaginase II de <i>S. cerevisiae</i> expressa em <i>P. pastoris</i>	51
6.2.2. Otimização da composição da solução extratora por planejamento experimental	52
6.2.3. Avaliação do tempo de extração da enzima asparaginase.....	64
6.2.4. Avaliação da temperatura de extração	66
6.2.5 Avaliação de diferentes proporções de massa celular : solução extratora	68
6.2.5 Transposição das condições ótimas de extração para 0,5 g de pellet celular	71
7 CONCLUSÕES.....	76
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	77
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

A enzima L-asparaginase é o principal medicamento biológico para tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (AVRAMIS, 2012). Esta enzima hidrolisa o aminoácido L-asparagina em L-aspartato e amônio, promovendo o bloqueio da síntese protéica das células neoplásicas que são incapazes de sintetizar esse aminoácido por serem deficientes da enzima L-asparagina sintetase, levando à morte seletiva dessas células por apoptose (SHIRIVASTA *et al.*, 2016).

A LLA é uma neoplasia caracterizada pela proliferação clonal desordenada de células linfóides nos estágios precoces de maturação (AVRAMIS, 2012). Os protocolos de tratamento com a enzima têm resultado em taxas de remissão de 90%, bem como maior sobrevida global dos pacientes do que os protocolos de tratamento sem asparaginase, que proporcionam remissão entre 40-60% (KAMINSK, 2017).

As formulações de L-asparaginase existentes no mercado atualmente são oriundas de sistema procariótico, *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*; são eficazes no tratamento de LLA, porém provocam toxicidade e reações de imunogenicidade que dificultam ou até inviabilizam o tratamento (HIJIYA, SLUIS, 2016). Uma forma de prevenir os efeitos colaterais e, assim, garantir um melhor bem-estar do paciente e menor custo terapêutico, seria tratar os pacientes com asparaginase com baixa imunogenicidade (BRINKS *et al.*, 2011).

Neste contexto, foi estabelecido um projeto desenvolvido em parceria entre Farmanguinhos / Fiocruz e o Instituto de Química / UFRJ, que visa o desenvolvimento de um fármaco antileucêmico a partir de asparaginase de levedura, tendo sido já concluídas as seguintes etapas: clonagem e expressão do gene *ASP3* que codifica a asparaginase II de *S. cerevisiae* na levedura *Pichia pastoris* sob o controle do promotor *AOX1*; processo para produção da enzima em biorreator de 2 L compreendendo cultivo multiestágio em batelada alimentada com altas densidades celulares; processo para extração, com elevados rendimentos, da enzima periplasmática em escala de bancada; protocolo para purificação da enzima em escala analítica e preparativa; caracterização bioquímica, físico-química e estrutural da proteína pelas técnicas de espectrometria de massas, dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência, entre outras. Ensaio anti-proliferativos *in-vitro* indicaram que a asparaginase recombinante apresenta atividade antitumoral contra

células K562 de leucemia mielóide crônica, corroborando para a viabilidade de seu uso como medicamento.

Este trabalho consiste na otimização do processo de extração da enzima asparaginase periplasmática por choque osmótico em pH alcalino, que é um procedimento escalonável com baixo consumo de energia e, principalmente, dentro dos padrões de produção de medicamentos biológicos.

O estudo visa minimizar a quantidade de reagentes e o tempo de reação, levando à redução de custos e dos impactos ambientais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)

A palavra câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo. Atualmente, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células que se caracteriza pela perda do controle da divisão celular e pela capacidade de invadir outras estruturas orgânicas. Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2018).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes é relacionada à doença. As maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia). Taxas intermediárias são vistas na América do Sul e Central, no Leste Europeu e em grande parte do Sudeste Asiático (incluindo a China). As menores taxas são vistas em grande parte da África e no Sul e Oeste da Ásia (incluindo a Índia) (FERLAY *et al.*, 2015). No Brasil, para os anos 2018/2019, a estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer em cada um desses anos.

A leucemia é um tipo de câncer que ocorre na medula óssea, que é o tecido responsável pela formação da maioria das células sanguíneas. O prognóstico da leucemia depende do tipo de célula sanguínea afetada e se a leucemia é aguda ou crônica. Para cada tipo de célula do sangue que é afetada, existem diferentes tipos de leucemia. Os tipos de células do sangue são: os glóbulos brancos ou linfócitos (células do sistema imunológico responsáveis pela defesa do organismo) que são o tipo mais comum de células do sangue que se tornam câncer; os glóbulos vermelhos (células que transportam oxigênio dos pulmões para o resto do corpo); e as plaquetas (células que fazem parte da coagulação sanguínea) (INCA, 2018). A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica heterogênea, caracterizada por uma disfunção das células tronco da medula óssea (MO) que leva à proliferação clonal desordenada de células que exibem marcadores celulares

associados aos estágios precoces de maturação linfóide (GRIGOROPOULOS *et al.*, 2013). As células leucêmicas imaturas ou blastos se acumulam na medula óssea e dificultam a produção normal de glóbulos brancos (leucócitos), glóbulos vermelhos (hemácias) e plaquetas, promovendo a substituição dos elementos normais da medula óssea pelas células leucêmicas imaturas (ALI *et al.*, 2016). Esse fenômeno promove ao paciente anemia e aumento do risco de infecções devido à deficiência de glóbulos vermelhos e brancos, respectivamente (AVRAMIS, 2012). Na Figura 1 está representada a estimativa das taxas de incidência mundial em 2018 de leucemia em ambos os sexos e todas as idades.

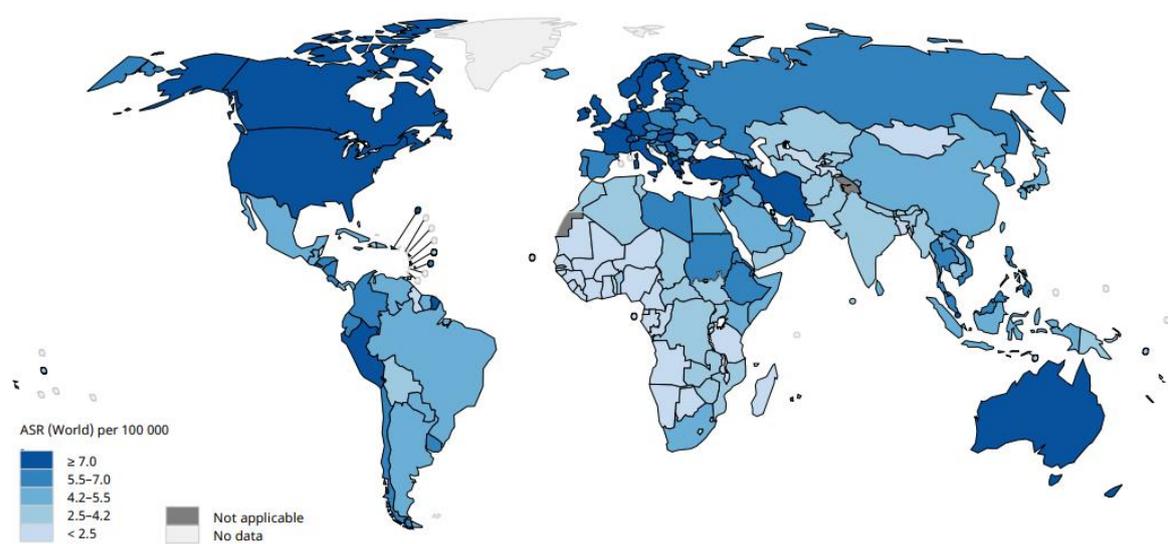


Figura 1: Estimativa das taxas de incidência mundial em 2018 de leucemia em ambos os sexos, todas as idades

Fonte: GLOBOCAN, Produção de gráficos: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>) Organização Mundial da Saúde (2018).

O risco de uma pessoa desenvolver LLA é inferior a 0,1%. Esse risco é ligeiramente maior no sexo masculino do que no sexo feminino e maior em pessoas caucasianas do que negras. Estima-se que para cada ano do biênio 2018/2019, sejam diagnosticados 5.940 casos novos no sexo masculino e 4.860 no sexo feminino. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,75 casos novos a cada 100 mil do sexo masculino e 4,56 casos novos para cada 100 mil do sexo feminino (INCA, 2018).

O risco de desenvolver LLA é maior em crianças de até 5 anos. Após essa idade, o risco declina lentamente até a faixa dos 20 anos, começando a aumentar gradativamente após os 50 anos. Cerca de 40% dos casos de LLA acontecem em adultos, sendo o período em que mais ocorrem mortes pela doença. Isso acontece devido às diferenças da própria doença nas distintas faixas etárias, assim como do tipo de tratamento, uma vez que o organismo das crianças, muitas vezes, pode lidar melhor do que o dos adultos com um tratamento mais agressivo, ou mesmo devido a alguma combinação terapêutica diferente (INCA, 2018).

A etiologia da LLA ainda é desconhecida, mas há indícios de que a transformação leucêmica seja multifatorial sendo o resultado de um processo que envolve interações complexas entre a susceptibilidade do hospedeiro e danos cromossômicos secundários. Em geral, pode estar relacionada a fatores de risco ocupacionais, agentes infecciosos específicos, desordens genéticas, exposição à radiação ionizante e a agentes químicos como os solventes (entre eles, o benzeno) comumente encontrados no vapor da gasolina, e a possível incorporação de informações genéticas de vírus oncogênicos transmitidas às células progenitoras susceptíveis (LEITE *et al.*, 2007; INCA, 2017). Os fatores que já foram aceitos incluem a exposição pré-natal a raios X; a exposição pós-natal a altas doses de radiação; e condições genéticas bem específicas, como a Síndrome de Down, entre outras síndromes (ONCIU, 2009).

O tratamento da LLA tem o objetivo de destruir as células leucêmicas para que a medula óssea volte a produzir células normais. O tratamento é composto de três fases: indução ou remissão da indução, consolidação ou intensificação e manutenção. Durante todo o tratamento, pode ser necessária a internação do paciente por infecção decorrente da queda dos glóbulos brancos normais e por outras complicações do próprio tratamento (JAIN *et al.*, 2010; CAZÉ *et al.*, 2010).

O objetivo da quimioterapia de indução, também chamada de remissão da indução, é obter a remissão completa da leucemia. Essa fase dura aproximadamente um mês ou mais, empregando diferentes combinações de quimioterápicos que incluem: vincristina, dexametasona ou prednisona, doxorubicina (adriamicina) ou daunorrubicina. Com base nos fatores prognósticos do paciente, alguns protocolos também podem incluir ciclofosfamida, L-asparaginase

(ou pegaspargase) e/ou altas doses de metotrexato ou citarabina (ara-C) como parte desta fase.

A próxima fase de consolidação geralmente consiste em outro ciclo de quimioterapia de período curto, aproximadamente alguns meses, usando os mesmos medicamentos da fase de indução, mas em altas doses. Os pacientes em remissão que possuem certos subtipos de LLA ou outros fatores de mau prognóstico, possuem alto risco de recaída da leucemia. Em vez de quimioterapia padrão, os médicos podem sugerir um transplante de células-tronco alogênico ou autólogo.

A fase de manutenção geralmente dura cerca de dois anos, normalmente o paciente é submetido a um programa de quimioterapia com metotrexato e 6-mercaptopurina (6-MP). Em alguns casos, isso pode ser combinado com outras drogas, como vincristina e prednisona.

A L-asparaginase está presente na maioria dos protocolos de quimioterapia na fase de indução e a sua administração aumentou o número de pacientes que entraram em remissão obtendo uma maior sobrevivência dos portadores de LLA para mais de 90% nos últimos anos, demonstrando a relevância deste medicamento (SHIRIVASTA *et al.*, 2016; ABDI *et al.*, 2014).

2.2 ASPARAGINASE

A enzima L-asparaginase (L-asparagina aminohidrolase E.C.3.5.1.1) é utilizada há mais de 40 anos com sucesso como agente terapêutico auxiliar no tratamento da LLA (LANVERS-KAMINSKY, 2017). Também está presente nos protocolos de tratamento de outros tipos de câncer, incluindo a doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (ROTH *et al.*, 2013).

No início da década de 50, Kidd (1953) identificou que o soro de porquinho da índia tinha a capacidade de controlar a progressão do linfoma murino, através de ensaios nos quais cobaias transplantadas com células de linfoma foram tratadas com injeções intraperitoneais repetidas deste soro. O tratamento conduziu a uma

regressão do linfoma e sobrevivência das cobaias tratadas, enquanto que para o grupo controle observou-se um aumento progressivo do linfoma e morte dentro de 20 a 30 dias. Mas antes da descoberta da atividade anti-linfoma do soro de cobaias, Clementi (1922) observou que o soro de porquinho da Índia era uma fonte rica de L-asparaginase. No início dos anos 70, células do linfoma suscetível ao soro de porquinho da Índia foram cultivadas em meio de cultura desprovido do aminoácido L-asparagina. Esta inadequação diminuiu a população de células rapidamente, mas algumas células sobreviveram e começaram a proliferar. Verificou-se que estas células perderam a susceptibilidade ao soro de porquinho da Índia após as mesmas serem transplantadas em cobaias, enquanto as células originais do linfoma mantiveram a susceptibilidade mesmo após o transplante. A susceptibilidade perdida ao soro de porquinho da Índia foi restrita à limitação da L-asparagina, enquanto outros aminoácidos, purinas e pirimidinas foram incapazes de complementar este efeito. Portanto, concluiu-se que a L-asparaginase presente no soro do porquinho-da-Índia era a responsável pela sua atividade anti-linfoma (BROOME, 1961). Posteriormente, outros estudos demonstraram que a ausência da asparagina fazia com que células leucêmicas parassem de proliferar, além de entrar em processo de morte celular, indicando que a asparagina era importante para a via metabólica destas células e que estas não eram capazes de sintetizá-la (HALEY *et al.*, 1961). A afinidade da L-asparaginase purificada de porquinho da Índia com o aminoácido L-asparagina e sua propriedade inibitória do tumor foram estabelecidas por vários outros pesquisadores posteriormente (BOYSE *et al.*, 1963). Estas descobertas levaram ao desenvolvimento da enzima L-asparaginase como um medicamento anti-câncer.

O mecanismo de ação da enzima asparaginase tem como base a hidrólise do grupo amino na cadeia lateral do aminoácido L-asparagina formando um intermediário acil-enzima que posteriormente forma amônia. Esse intermediário é atacado por um segundo nucleófilo, que normalmente é água, formando ácido aspártico e a enzima livre regenerada (Figura 2) (VERMA *et al.*, 2007).

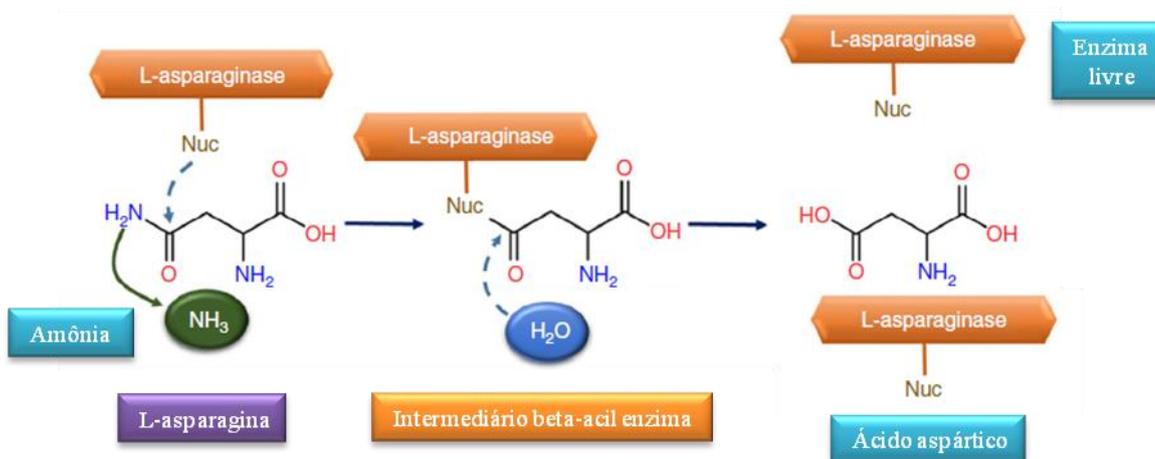


Figura 2: Mecanismo geral da reação decatálise da enzima asparaginase

Fonte: Verma (2007).

A atividade antitumoral da asparaginase tem como base o fato de alguns tipos de células tumorais carecerem da atividade da L-asparagina sintetase, o que impossibilita a síntese de novo da L-asparagina a partir do ácido aspártico (LANVERS-KAMINSKY, 2017). Quando a L-asparaginase é administrada, a concentração de L-asparagina na corrente sanguínea diminui causando inibição do crescimento na fase G1 do ciclo celular devido ao bloqueio da síntese de proteínas e conseqüentemente a inibição da síntese de ácido desoxirribonucléico (ADN) e ácido ribonucléico (ARN) (LOPES *et al.*, 2015), provocando assim a apoptose das células leucêmicas suscetíveis (KEATING *et al.*, 1993). Os íons amônio (um dos subprodutos da atividade da L-asparaginase) modificam o pH por difusão para o citosol, que ativa a via de transdução do sinal associada à fosforilação de substratos e à apoptose (UENO *et al.*, 1997). As células normais não são afetadas, pois sintetizam L-asparagina, através da L-asparagina sintetase, em quantidades suficientes para suas necessidades metabólicas (Figura 3) (ASSELIN, RIZZARI, 2015; CACHUMBA *et al.*, 2016).

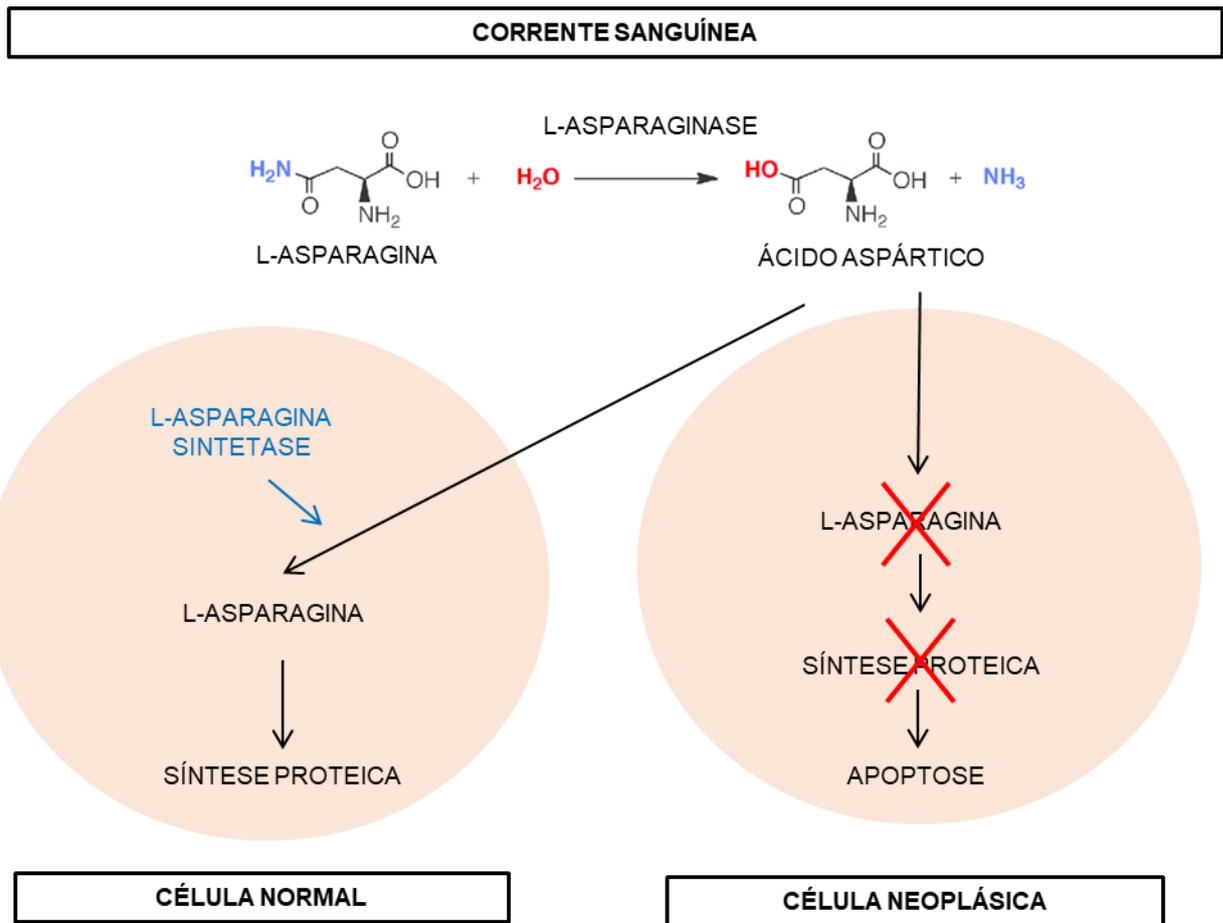


Figura 3: Ação antineoplásica da enzima asparaginase

Fonte: Adaptado por Cachumba (2016)

O aminoácido L-asparagina é um aminoácido não-essencial produzido endogenamente pelas células humanas sendo necessário para o crescimento das células, pois é requerido para a síntese de proteínas, além de ser um iniciador chave para a síntese de pirimidina e atuar como doador de nitrogênio para síntese de purina por meio de adenilsuccinatosintetase I (OUTSCHOORN *et al.*, 2016).

A partir da década de 60, diversos estudos prospectivos foram realizados a fim de se encontrar novas fontes produtoras de asparaginase principalmente em micro-organismos que são fontes ilimitadas de metabólitos. Estes estudos verificaram que mamíferos, pássaros, plantas, bactérias e fungos também possuem a capacidade de produzir endogenamente a L-asparaginase. Alguns exemplos estão

no Quadro 1 (VIMAL, KUMAR, 2017).

Organismos	Espécies
Bactéria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 50071, <i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>E. chrysanthemi</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> MB-405, <i>Thermus thermophilus</i> , <i>Tetrahymena pyriformis</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Nocardia levis</i> MK-VL_113, <i>Lactobacillus crispatus</i> strain CLS01, <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus amylovorus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> sub sp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus pasteurii</i> , <i>Bacillus amylolique facciens</i> , <i>Cellulomonas fimi</i> , <i>Cellulomonas uda</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> A-1, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i>
Fungo	<i>Fusarium equiseti</i> , <i>Aspergillus flavus</i> (KUFS 20), <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>A. tamari</i> , <i>Emericella nidulans</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus albus</i> , <i>Aspergillus sclerotiorum</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium frequentans</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium purpurogenum</i> , <i>Penicillium lilacinum</i> , <i>Serpula lacrymans</i> , <i>Volvariella volvacea</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Aureobasidium bisporous</i>
Actinomiceto	<i>Streptomyces</i> , <i>Karnatakensis</i> , <i>S. venezuelae</i> , <i>Thermo actinomyces vulgaris</i> , <i>Streptomyces gulbargensis</i> , <i>Streptomyces tendae</i> TK-VL-333
Planta	<i>Tamarindus indica</i> , <i>Capsicum annum</i> L., <i>Withania omnifera</i> , <i>Lupinus angustifolius</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Pisum arvense</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Phaseolus multiflorus</i> , <i>Lupinus polyphyllus</i> , <i>L. albus</i> var. <i>Buttercup</i> , <i>L. mutabilis</i> var. <i>Tabor</i> , <i>Zeamays</i> var. <i>Fronica</i> , <i>Hordeum vulgare</i> var. <i>Julia</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Pinus radiata</i> , <i>Lupinus albus</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Lupinus luteus</i> , <i>Amaranthus polygonoides</i>
Levedura	<i>Candida utilis</i> , <i>Pichia polymorpha</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida dublinensis</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida kefyr</i>
Alga	<i>Algae Chlamydomonas</i> sp., <i>Chlorella vulgaris</i>
Animal	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Homo sapiens</i>

Quadro 1: Algumas espécies que produzem endogenamente a enzima asparaginase

Fonte: Vimal, Kumar (2017).

Com base na sequência, estrutura e homologia funcional, três grandes famílias de enzimas com atividade L-asparaginásica foram identificadas, as asparaginases de origem vegetal, também chamadas de tipo III, as enzimas

semelhantes à asparaginase de *Rhizobium elti*, e as bacterianas, também denominadas tipo I e tipo II (BOREK, JASKÓLSKI, 2001).

As sequências de aminoácidos das L-asparaginases vegetais não têm qualquer homologia significativa com as L-asparaginases bacterianas. A afinidade ao seu substrato é baixa, com Km da ordem de 10^{-2} M, e hidrolisam também a glutamina. A maioria das L-asparaginases vegetais são hidrolases nucleófilas N-terminais envolvidas em vias metabólicas relacionadas com a assimilação do nitrogênio atmosférico. As L-asparaginases vegetais são de dois tipos: dependentes e independentes de potássio, ambas com níveis significativos de similaridade de sequência entre si. A enzima dependente de K^+ está mais amplamente distribuída em vegetais superiores e metaboliza L-asparagina mais eficientemente sob condições de alta demanda metabólica por nitrogênio (BRUNEAU *et al.*, 2006).

A segunda classe de L-asparaginase é a asparaginase termolábil de *Rhizobium etli*, que não tem homologia com as outras L-asparaginases. Esta enzima é utilizada pelo organismo no metabolismo de carbono e nitrogênio (BOREK, JASKÓLSKI, 2001).

As L-asparaginases bacterianas pertencem a uma família de amido-hidrolases em que a treonina é o nucleófilo primário durante a catálise. As enzimas são classificadas em dois tipos, asparaginase I (ASP I) e II (ASP II), que são expressas pelos genes *ansA* e *ansB*, respectivamente. A ASP I está localizada no citoplasma e é expressa constitutivamente, enquanto a ASP II é periplasmática sendo secretada apenas como resposta à exposição a baixas concentrações de nitrogênio (BROOME, 1966).

Diversas pesquisas demonstraram um potencial na utilização de ASP II de *E. coli* devido à sua equivalência com relação à atividade da asparaginase de porquinho da Índia (BOYSE *et al.*, 1967). Desde então, diversos grupos de pesquisa investiram em caracterizá-la quimicamente e bioquimicamente, assim como em estudar suas propriedades terapêuticas passando para estudos em fase clínica (BATOOL *et al.*, 2016; KRISHNAPURA *et al.*, 2016).

As enzimas produzidas por *E. coli*, possuem as mesmas sequências de aminoácidos conservados mas apesar da alta homologia diferem em sua estrutura quaternária. A ASP I é caracterizada por uma baixa afinidade a L-asparagina (Km =

10^{-3}M). A ASPII possui maior afinidade a L-asparagina ($K_m=18 \pm 3 \mu\text{M}$), apresentando assim maior atividade antitumoral, e também catalisa a conversão de L-glutamina ($K_m= 3.7 \pm 0.2 \text{ mM}$) que é responsável por grande parte dos efeitos adversos associados ao medicamento no tratamento da LLA (LANVERS-KAMINSKY, 2017). A figura 4 demonstra as características estruturais de cada tipo.

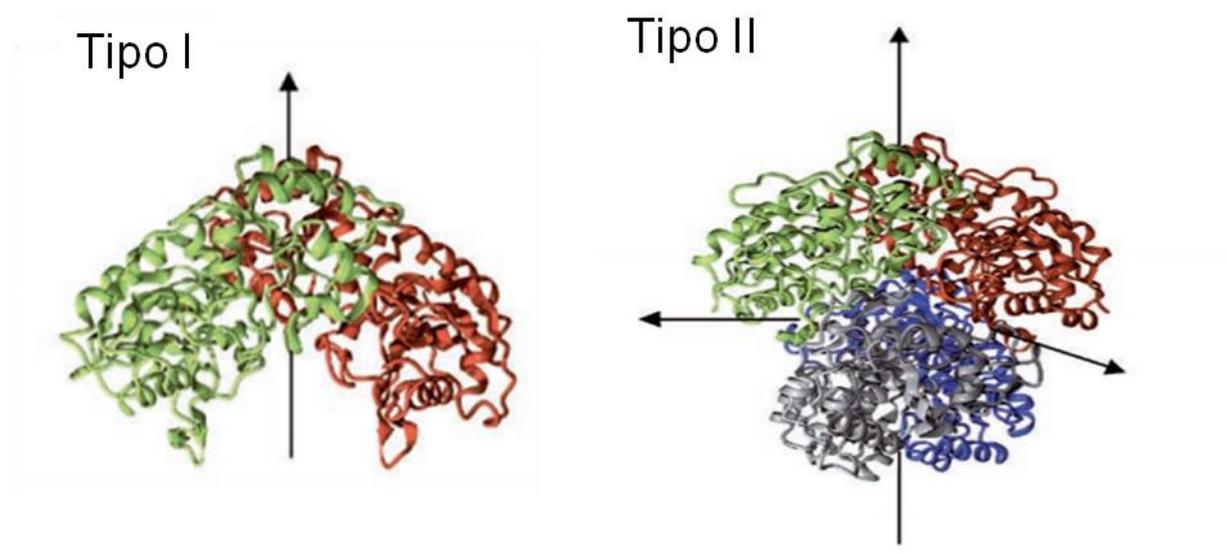


Figura 4: Características estruturais das L-asparaginases do tipo bacteriano.

Fonte: Michalska (2006)

As asparaginases produzidas por certas estirpes de leveduras, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* têm seqüências de aminoácidos muito semelhantes às da família bacteriana tipo II (BOREK, JASKÓLSKI, 2001).

Até agora, o genoma humano é conhecido por codificar pelo menos três enzimas que podem hidrolisar a L-asparagina. A primeira, chamado lisofosfolipase, pode hidrolisar a lisofosfatidil colina e na sua porção N-terminal, a asparagina. Esta enzima tem alta homologia com a família da L-asparaginase bacteriana. A segunda é a aspartilglucosaminidase lisossômica, que possui 60% de similaridade de seqüência com asparaginases do tipo III de planta. Tem baixa afinidade pela L-asparagina ($K_m=10^{-3}\text{M}$), e funciona na degradação da glicoproteína pela clivagem

de grupos carboidratos ligados à L-asparagina. A terceira L-asparaginase humana é referida como hASNase3. É semelhante às asparaginases vegetais, mas também tem homologia estrutural com a L-asparaginase de *E. coli* com treonina desempenhando um papel crucial para sua atividade de L-asparaginase (BELVISO, *et al.*, 2017).

Nem todas asparaginases possuem atividade antineoplásica, e atualmente, as únicas formulações disponíveis para uso médico são as aspararinases II de *E. coli* e de *Erwinia chrysanthemi*. As características dessas asparaginases estão apresentadas no Quadro 2, enquanto que as suas sequências e estruturas quaternárias estão apresentadas nas Figuras 5 e 7 (L-asparaginase de *E. coli*) e Figuras 6 e 8 (L-asparaginase de *E. chrysanthemi*).

Características	<i>E. coli</i>	<i>E. chrysanthemi</i>
Estrutura quaternária	Homotetrâmero	Homotetrâmero
Localização	Periplasmática	Periplasmática
Massa molecular	35 kDa (monômero) 140 kDa (tetrâmero)	37,575 kDa (monômero) 144 Kda (tetrâmero)
PI	5,96	7,84
Aminoácido	348	348
Km L-asparagina	18 ± 3 µM	33 ± 6 µM
Km L-glutamina	3,7 ± 0,2 mM	10,3 ± 0,4 mM

Quadro 2: Características da enzima asparaginase II de *E. coli* e de *E. chrysanthemi*

Fonte: Broome (1966)

```

10      20      30      40      50      60
MEFFKKTALA ALVMGFSGAA LALPNITILA TGGTIAGGGD SATKSNYTVG KVGVENLVNA

      70      80      90      100     110     120
VPQLKDIANV KGEQVVNIGS QDMNDNVWLT LAKKINTDCD KTDG FVITHG TDTMEETAYF

      130     140     150     160     170     180
LDLTVKCDKP VVMVGAMRPS TSMSADGPFN LYNAVVTAAAD KASANRGVLV VMNDTVLDGR

      190     200     210     220     230     240
DVTKTNTDĀV ATFKSVNYGP LGYIHNGKID YQRT PARKHT SDTPFDVSKL NELPKVGIVY

      250     260     270     280     290     300
NYANASDLPA KALVDAGYDG IVSAGVGNĀN LYKSVFDTLĀ TAAKTGTAVV RSSRVPTGAT

      310     320     330     340
TQDAEVDDAK YGFVASGTLN PQKARVLLQL ALTQTKDPQQ IQQIFNQY

```

Figura 5: Sequência de aminoácidos da enzima asparaginase II de *E. coli* cuja estrutura quaternária está representada na Figura 7.

```

      10      20      30      40      50      60
MERWFKSLFV LVLFFVFTAS AADKLPNIVI LATGGTIAGS AATGTQTTGY KAGALGVDTL

      70      80      90      100     110     120
INAVPEVKKL ANVKGEQFSN MASENMTGDV VLKLSQRVNE LLARDDVDGV VITHGTDTVĒ

      130     140     150     160     170     180
ESAYFLHLTV KSDKPVVĒVA AMRPATAISA DGPMNLLEAV RVAGDKQSRG RGVMVVLNDR

      190     200     210     220     230     240
IGSARYITKT NASTLDTFKA NEEGYLGVII GNRIYYQNRI DKLHTTRSVĒ DVRGLTSLPK

      250     260     270     280     290     300
VDILYGYQDD PEYLYDAAIQ HGVKGIVYAG MGAGSVSVRG IAGMRKAMEK GVVVIRSTRT

      310     320     330     340
GNGIVPPDEĒ LPGLVSDSLN PAHARILLML ALTRTSDPKV IQEYFHTY

```

Figura 6: Sequência de aminoácidos da enzima asparaginase II de *E. chrisanthemi* cuja estrutura quaternária está representada na Figura 8.

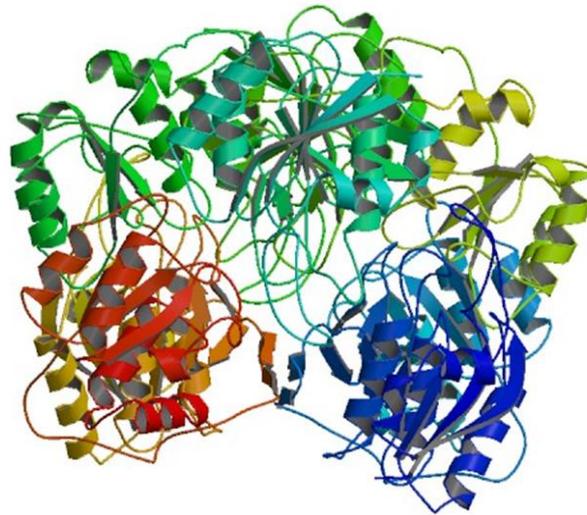


Figura 7: Estrutura quaternária da L-asparaginase II de *E. coli* determinada por cristalografia de raios-X. As hélices representam os elementos de estrutura secundária α -hélice e as setas, os elementos de estrutura secundária folhas- β (Fonte: PDB (DOI: 10.2210/pdb3eca/pdb)).

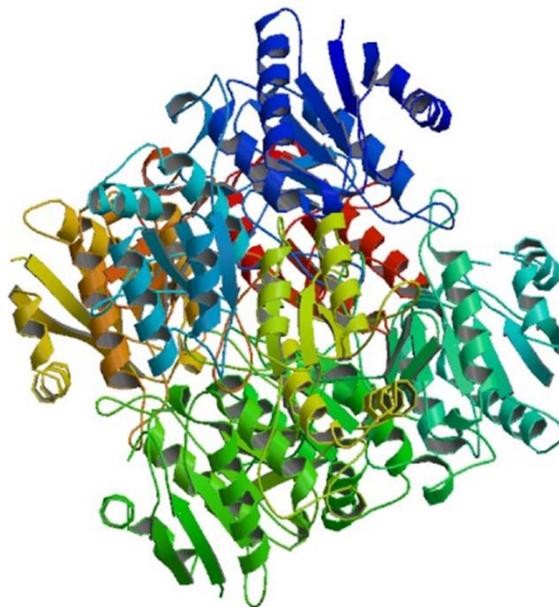


Figura 8: Estrutura quaternária da L-asparaginase II de *E. chrisanthemi* determinada por cristalografia de raios-X: As hélices representam os elementos de estrutura secundária α -hélice e as setas, os elementos de estrutura secundária folhas- β (Fonte: PDB (DOI: 10.2210/pdb1hfw/pdb)).

2.2.1 ASPARAGINASES DE USO TERAPÊUTICO

Atualmente várias apresentações de asparaginase para tratamento de LLA estão disponíveis no mercado. Essas apresentações são de origem procariótica: duas são derivados da bactéria *E. coli* na sua forma nativa ou conjugada com polietilenoglicol (PEG) e a terceira é derivada da bactéria *Erwinia chrysanthemi*. Estas enzimas são licenciadas para administração intravenosa e intramuscular e são empregadas em esquemas quimioterápicos combinados com alguns outros agentes, como metotrexato, vincristina e prednisona (LANVERS-KAMINSK, 2017).

A peguilação é um processo de modificação química de moléculas bioativas com PEG, que proporciona melhorias nas propriedades terapêuticas das proteínas e enzimas, aumentam a meia-vida, reduzem a imunogenicidade e melhoram a solubilidade e a estabilidade. O PEG forma uma proteção nos sítios antigênicos e proteolíticos impedindo o reconhecimento de anticorpos e proteases, aumentando a meia-vida através da resistência ao pH, à temperatura, ação de outras enzimas e diminuindo a secreção renal (Figura 9) (VERONESE, PASUT, 2005).

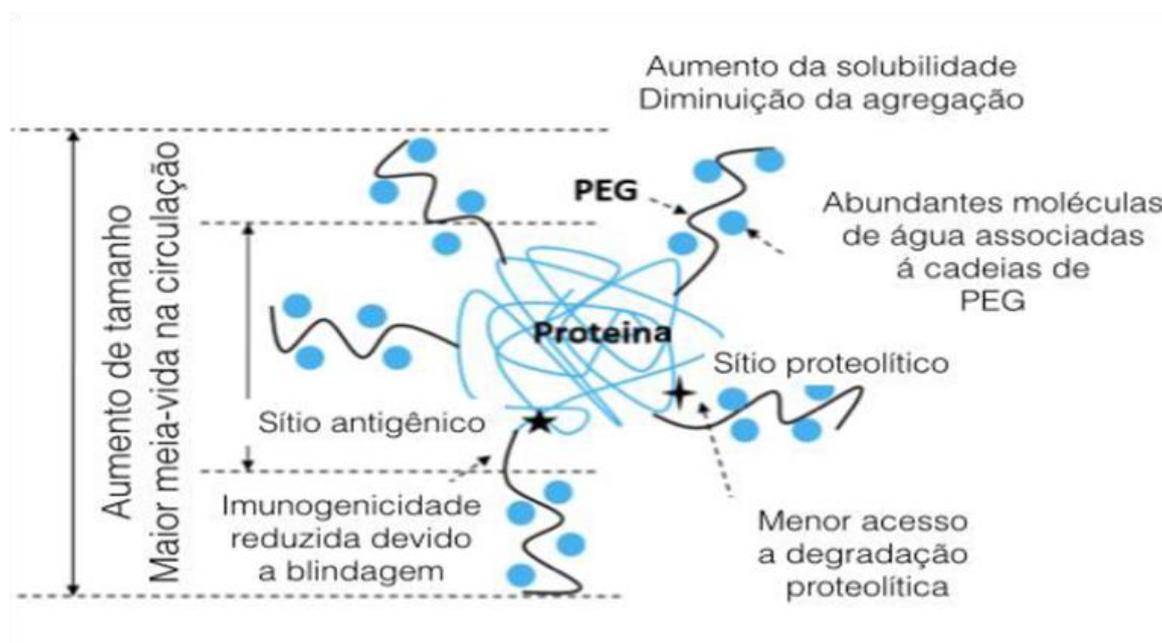


Figura 9: Representação esquemática da de uma proteína peguilada e as vantagens da peguilação

Fonte: Meneguetti (2017)

Uma nova formulação constituída de glóbulos vermelhos carregados com L-asparaginase de *E. coli* (RBCs) está em fase de pré registro. Esta preparação consiste em eritrócitos homólogos carregados com L-asparaginase em uma concentração de 50% e depois suspensa em solução salina, adenina, glicose e manitol. A L-asparaginase permanece no interior do eritrócito, que é transportado por toda a circulação. A asparagina permeia para o interior do eritrócito, resultando em clivagem e depleção da asparagina plasmática. Como a asparaginase permanece encapsulada no eritrócito, os anticorpos são incapazes de reconhecer a enzima, impedindo a depuração rápida da asparaginase e diminuindo o risco de reações alérgicas (KOPRIVINICAR *et al.*, 2017). Além destes, uma forma recombinante de L-asparaginase II derivada de *E. coli* conjugada com carbonato succinimidil mono metoxipolietilenoglicol (SC-PEG) e uma forma peguilada derivada de *Erwinia* estão atualmente sob estudos pré-clínicos fase II/III (PIETERS *et al.*, 2011). Exemplos de produtos farmacêuticos derivados de L-asparaginase são apresentados no Quadro 3.

Embora a depleção de asparagina seja considerada o objetivo farmacológico da terapia com asparaginase, não existe uma dose universalmente aceita nem um cronograma de tratamento para todos os pacientes. Os níveis de asparagina variam muito entre os indivíduos, com vários fatores influenciando a relação entre a dose de asparaginase e as concentrações séricas de asparagina (ASSELIN, RIZZARI, 2015).

Todas as formulações mostram atividade anti-leucêmica equivalente *in vitro*. No entanto, as propriedades farmacocinéticas de cada asparaginase diferem (Quadro 4). A meia-vida da PEG-asparaginase é aproximadamente cinco vezes mais longa do que a da asparaginase de *E. coli* nativa e nove vezes maior do que a da asparaginase de *Erwinia*. Essa meia-vida mais longa significa que a droga pode ser administrada em doses mais baixas e com menos frequência, resultando em menores reações antigênicas. Essas diferenças trazem implicações práticas para a construção de esquemas de dose ideais, pois formulações com meia-vida mais longa são eliminadas de forma mais lenta e, portanto, proporcionam uma exposição relativamente mais longa à enzima e subsequente duração da depleção de asparagina. Por esse motivo, diferentes preparações não são facilmente intercambiáveis (ASSELIN, RIZZARI, 2015).

Organismo	Princípio ativo	Nome comercial	Fabricante
<i>E. coli</i>	L-asparaginase	Kidrolase/Kidrolaze	EUSA Pharama
		Crasnitin/Crasnitine	Bayer
		Aginasa	Medac
		Colaspase; Leunase	Sanfer
		Asginase	Sun Pharma
		Aspanase	Intas
		Celginase	Celon Laboratories
		Celnase	Curacell
		Hoilasp	United Biotech
		Oncoginase	Chandra
		L-ASPase	Miracalus
		Asparget	GLS Pharma
		Leucoginase	VHB Life Science
	Peronal	Takeda	
	Elspar	Merck	
L-asparaginase recombinante	Spectrila	Medac	
PEG L-asparaginase	Pegasparaginase; Oncospar	Shire	
L-asparaginase II conjugada com carbonato succinimidil mono metoxipolietilenoglicol (SC-PEG)*	Calaspargasepegol ; Oncospar-IV	Shire	
L-asparaginase encapsulada em glóbulos vermelhos*	Eryaspase, Eryasp, Graspa	Erytec	
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	L-asparaginase	Crisantaspase; Erwinase/Ervinaze	Proton Biofarma
	L-asparaginase recombinante peguilada*	MPEG-r crisantaspase; Pegcrisantaspase; Asparec	Jazz Pharmaceuticals

*Em estudos clínicos

Quadro 3: Produtos farmacêuticos derivados da enzima asparaginase

Fonte: FIOCRUZ (2017)

Produto	Nome comercial	Fabricante	Tempo de meia vida	Dosagem
Asparaginase nativa de <i>E. coli</i>	Elspar	Merck & Co, inc.	26–30 horas	6.000 UI/m ² (3 x / semana)
Asparaginase nativa de <i>E. chrisanthemi</i>	Erwinase	Spey wood Pharmaceuticals, inc.	5,5 – 7 dias	6.000 UI/m ² (1-10 / dia), ou 30,000 UI/m ² (10 /dia na fase de indução)
PEG-Asparaginase de <i>E. coli</i>	Oncospar	Enzon Pharmaceuticals	16 horas	2.000–2.500 UI/m ² (a cada 2 - 4 semanas)
RBCs-Asparaginase	GRASPA	Erytech Pharma	40 dias	100 UI/kg (a cada 4 semanas)

Quadro 4: Formulações de enzima asparaginase e suas características

Fonte: Koprivnacar (2017)

Atualmente no mercado há predominância de comercialização de L-asparaginase derivada de *E. coli* na sua forma livre. A enzima derivada de *Erwinia* e a de *E. coli* na forma peguiladasão consideradas medicamentos de alto custo. A enzima de *Erwinia* é considerada uma opção para tratamento de segunda escolha aos pacientes com hipersensibilidade à enzima de *E. coli*.

Nos Estados Unidos, três formulações de asparaginase são amplamente utilizadas no tratamento da LLA: asparaginase de *E. coli* nativa (Elspar®; Merck &Co.,Inc., West Point, PA, EUA)(descontinuada no mercado), sua forma peguilada (Oncaspar®; Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc. Gaithersburg, MD, EUA) e a asparaginase de *Erwinia*, Erwinaze® (Jazz Pharmaceuticals,Palo Alto, CA, EUA). A formulação de *Erwinia* é aprovada no Reino Unido como tratamento de segunda linha para pacientes com hipersensibilidade às duas primeiras formas.

No Brasil, a asparaginase é importada e apenas o medicamento contendo enzima obtida de *E. coli* na sua forma livre (não peguilada) tem sido utilizado no tratamento de leucemia. Sendo que até o ano de 2012, foi comercializado apenas o medicamento Elspar® (Lundbeck, Deerfield, IL, EUA). Com a descontinuidade de sua produção, entre janeiro de 2013 e março de 2017, o medicamento Aginasa® (Medac, AL), de origem alemã, passou a ser utilizado no País. No entanto, a partir

de abril de 2017, o Ministério da Saúde importou uma asparaginase de origem chinesa, sob o nome comercial Leuginase® (Beijing, China). Houve desde então diversas discussões sobre a eficiência terapêutica e a qualidade deste medicamento, já que este último não tem comprovação de eficácia e não foram feitos testes suficientes em humanos para que pudesse ser utilizado em pacientes (Fonte:<http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/apos-troca-demedicacao-criancas-tem-tratamento-de-leucemia-afetado-no-boldrini.ghtml>). Outro dado importante é a pureza deste medicamento, pois segundo testes realizados pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), esta asparaginase possui 398 impurezas, enquanto a asparaginase fabricada na Alemanha possui três contaminantes (Fonte:<http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/apos-impasse-com-troca-de-medicacao-pelo-ministerio-da-saude-boldrini-fica-sem-remedio-e-inicia-importacao-por-conta.ghtml>). Após quase quatro anos sem nenhuma formulação de asparaginase registrada no Brasil, os medicamentos Oncaspar (asparaginase peguilada) e Spectrila (asparaginase livre) obtiveram registro na ANVISA em junho de 2017 e janeiro de 2019, respectivamente.

Diante do quadro apresentado, é imprescindível o desenvolvimento e produção de uma asparaginase alternativa e inovadora pelo Brasil que possibilitaria a diminuição do custo do tratamento de leucemia, evitando o desabastecimento nacional e possibilitando uma oportunidade de tratamento aos pacientes que desenvolvessem resposta imunológica à enzima de *E. coli*.

2.2.2 OS PRINCIPAIS EFEITOS ADVERSOS QUE A ASPARAGINASE PROMOVE

O tratamento da LLA com a L-asparaginase apesar de ser eficaz pode apresentar efeitos colaterais associados à terapia como vários tipos de reações alérgicas devido à sua alta imunogenicidade, bem como toxicidades clinicamente importantes, como pancreatite, eventos trombóticos, mucosite, náuseas, diarreia, vômitos, disfunção hepática, hiperglicemia, dislipidemia, neutropenia, coagulopatia, cefaléia, dor abdominal e disfunções do sistema nervoso central (DORIYA, KUMAR, 2016). Estes efeitos são devido não somente à imunogenicidade do medicamento por este ser de origem procariótica, levando à inativação da enzima pelo sistema imune com produção de anticorpos anti-asparaginase, mas também pela interferência com o metabolismo da glutamina (SHIRIVASTA *et al.*, 2016;

CACHUMBA *et al.*, 2016).

A imunogenicidade é a capacidade do medicamento biológico desencadear a resposta imune. Este processo pode ser provocado pela presença de impurezas na formulação, como endotoxinas ou proteínas desnaturadas. Mas também se o biofármaco estiver de forma agregada o que faz com que o sistema imunológico reconheça esses agregados com vírus (KESSLER *et al.*, 2006).

As reações de hipersensibilidade estão associadas ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, que inativam a asparaginase, consequentemente levando ao aumento dos níveis de asparagina extracelular (HAK, 2004). Os anticorpos anti-asparaginase podem não causar sintomas clínicos, sendo chamado de inativação silenciosa (PANOSYAN *et al.*, 2004; ASSELIN, 1999). Cerca de 30% dos pacientes apresentam inativação silenciosa, que reduz a eficácia terapêutica (WENNER *et al.*, 2005; WOO *et al.*, 2000).

A incidência da hipersensibilidade é menor em preparações com produtos peguilados, pois produtos biológicos ligados covalentemente com PEG têm seu tempo de meia-vida plasmática aumentado, com menor degradação por enzimas metabólicas e imunogenicidade menor (KOPRINIKAR *et al.*, 2017). Conforme já mencionado, o tempo de meia-vida da PEG-asparaginase de *E. coli* é aproximadamente cinco vezes maior do que o da asparaginase nativa de *E. coli* e nove vezes maior do que o da asparaginase de *Erwinia*. Esta meia-vida prolongada significa que o fármaco pode ser administrado em doses mais baixas e com menos frequência, resultando na diminuição da reação antigênica (AVRAMIS *et al.*, 1999). Devido à redução dos efeitos adversos e à menor frequência de administração, o uso da PEG asparaginase implica a redução de diárias hospitalares, atenuando o custo do tratamento e trazendo mais conforto ao paciente.

Devido à capacidade das asparaginases de *E. coli* e de *Erwinia* realizarem também a hidrólise da L-glutamina em glutamato e amônio, vários efeitos colaterais como reações alérgicas, supressão da imunidade, hiperglicemia, trombose, disfunção hepática, renal, pancreática, entre outras, são observados (CHAN *et al.*, 2014). O declínio prolongado no nível deste aminoácido interrompe muitos processos bioquímicos, especialmente os que ocorrem no fígado (ZEIDAM *et al.*,

2009), uma vez que a L-glutamina é a principal forma de transporte de nitrogênio no corpo para muitas reações biossintéticas (AVRAMIS *et al.*, 2015). A hiperamonemia causada pelo excesso de amônia na corrente sanguínea é responsável pela neurotoxicidade do medicamento presente em até 25% dos pacientes (HÄBERLE *et al.*, 2012).

As reações imunológicas às enzimas de origem bacteriana e a sua administração concomitante com outros fármacos quimioterapêuticos, como os corticóides, influenciam o desenvolvimento de alergias que são frequentes durante o tratamento. As reações de hipersensibilidade à asparaginase alcançam taxas entre 3 e 70%, dependendo do grau de sensibilidade do paciente, do modo de administração e do protocolo de tratamento (HIJIYA, SLUIS, 2017).

Os inconvenientes acima mencionados das asparaginases de *E. coli* e de *Erwinia* levam a uma demanda por novas L-asparaginases com propriedades antigênicas diferenciadas e que poderiam ser usadas para a terapia de indução. MULLER, BOSS (1998), com base na experiência clínica, afirmaram que apenas 20 a 25% dos pacientes provavelmente voltariam a apresentar reações de hipersensibilidade relevantes em relação a outra preparação de L-asparaginase que não tenha reação cruzada; isso permitiria a conclusão do tratamento em 90% dos pacientes. A taxa de reações imunológicas deve ser alta se a mesma preparação de L-asparaginase for usada para terapia de indução e reindução. Isso sugere que as L-asparaginases, além daquelas já disponíveis no mercado, também poderiam ser usadas em terapia de reindução. Além disso, a baixa estabilidade e a pequena meia-vida da L-asparaginase no plasma são uma preocupação crítica na indústria farmacêutica (ASSELIN, 1999).

Para superar as limitações das asparaginases hoje comercializadas para o tratamento da LLA é aconselhável ter um conjunto de L-asparaginases com alta atividade enzimática, mas diferindo em propriedades antigênicas e com baixa atividade L-glutaminásica. Essas circunstâncias explicam o grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos L-asparaginase com melhorias nas propriedades terapêuticas e com baixa imunogenicidade (PIETERS *et al.*, 2011; BRINKS *et al.*, 2011). Como os fungos são micro-organismos eucarióticos e estão evolutivamente mais próximos dos seres humanos (em comparação com as

bactérias), estima-se que a enzima isolada deles poderia causar menor imunogenicidade (SHIRIVASTA *et al*, 2012).

2.3 ASPARAGINASE II DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um organismo biotecnológico tradicional devido ao seu uso milenar em panificação, fabricação de cerveja e vinificação, sendo reconhecido como estirpe segura (GRAS) para uso em humanos. Foi o primeiro eucarioto cujo genoma foi totalmente sequenciado (GOFFEAU *et al.*, 1996). O sistema de expressão de proteínas heterólogas em *S.cerevisiae*, o primeiro a ser desenvolvido e o melhor caracterizado em leveduras, é o segundo sistema microbiano mais utilizado para produção de fármacos biológicos, vindo logo após a bactéria *E. coli* (CELIK, ÇALIK 2012).

A levedura *S. cerevisiae* produz dois tipos de asparaginase que são classificadas pela similaridade com a sequência de aminoácidos da L-asparaginase pertencente à família bacteriana de tipo II (ASPII): uma intracelular (asparaginase I) e outra periplásmica (asparaginase II). Todas hidrolisam a L-asparagina, mas são bioquímica e geneticamente distintas. A asparaginase I é codificada pelo gene *ASP1* e tem expressão constitutiva enquanto que a asparaginase II é codificada pelo gene *ASP3* e é secretada para o periplasma, sendo expressa em condições de limitação de nitrogênio. Ao contrário da asparaginase I, que tem ação somente sobre a L-asparagina, a asparaginase II é capaz de desaminar tanto a L quanto a D-asparagina (DUNLOP *et al.*, 1978; SINCLAIR *et al.*, 1994). As principais características físico-químicas das duas enzimas estão descritas no Quadro 5.

Características	Asparaginase I	Asparaginase II
Localização	Intracelular	Periplasmática
Massa molecular do monômero	45 KDa*	38,687 kDa
Km (asparagina)	7,5 x 10 ⁻⁴ M	2,5 – 3 x 10 ⁻⁴ M
pH ótimo	8,5	6,8
Estabilidade ao pH	5 a 11*	3,5 a 10,5
Temperatura ótima	40°C	37°C

Quadro 5: Características da asparaginase do tipo I e II de *S. cerevisiae*

Fonte: Dunlop (1978); Costa (2016)*

Considerando algumas propriedades bioquímicas e físico-químicas das duas proteínas, a asparaginase II apresenta maior viabilidade para ser utilizada como medicamento, pois sua afinidade pelo substrato L-asparagina e sua estabilidade em condições fisiológicas (37 °C; pH 7,4) são maiores (DUNLOP *et al.*, 1978). Sua sequência de aminoácidos encontra-se na Figura 10.

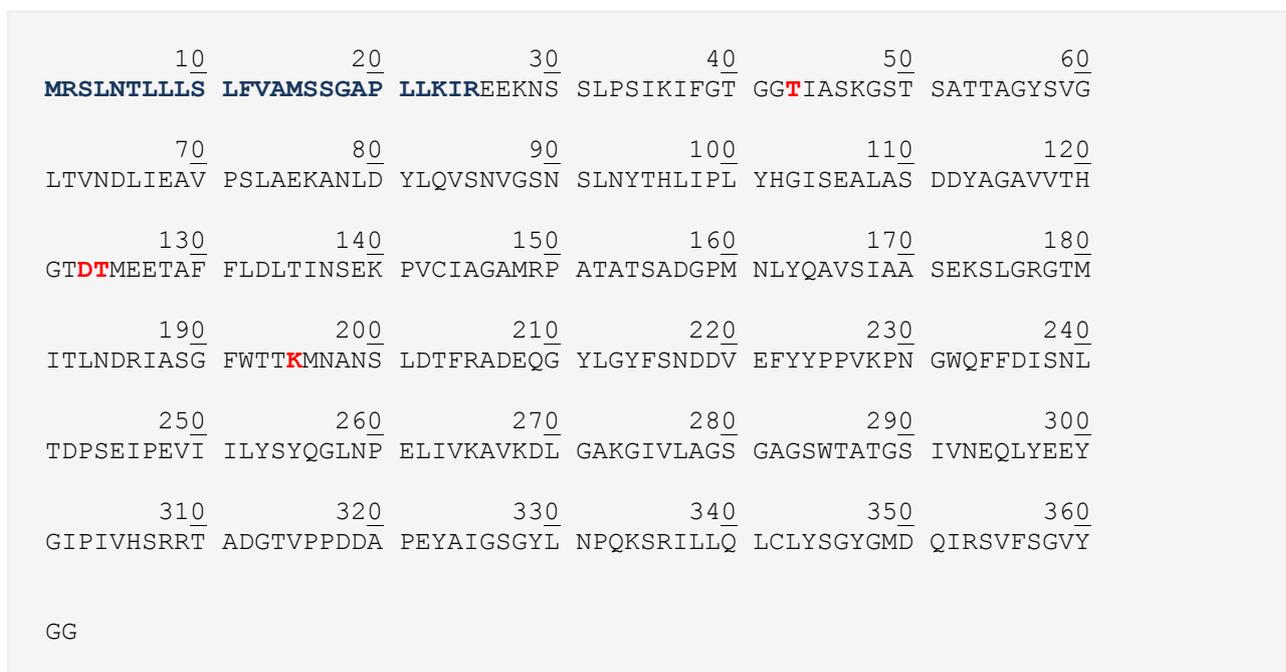


Figura 10: Sequência de aminoácidos da enzima asparaginase II de *S. cerevisiae*

Fonte: Girão (2016)

A asparaginase II de *S. cerevisiae* apresenta uma sequência sinal de 25 resíduos de aminoácidos em seu N-terminal, representada em azul na Figura 10, que encaminha a enzima ao espaço periplásmico, onde é clivada. Assim como todas as proteínas secretadas, a asparaginase II apresenta glicosilação. O sítio ativo da enzima possui os mesmos aminoácidos, treonina, aspartato e lisina, representados em vermelho na Figura 10, que as asparaginases de *E. coli* e de *E. Chrysanthemi* (DUNLOP *et al.*, 1978).

A sequência da asparaginase II de *S. cerevisiae* apresenta maior identidade e similaridade com a enzima de *E. chrisanthemi*, conforme pode ser observado no alinhamento das sequências das asparaginases II de *S. cerevisiae*, *E. coli* e *E. chrysanthemi*, utilizando o programa Multialin (disponível em

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Figura 11). Os graus de identidade e similaridade, calculados através do programa Kalin (disponível em <http://msa.sbc.su.se/cgi-bin/msa.cgie>), estão apresentados na Tabela 1 (GIRÃO *et al.*, 2016).

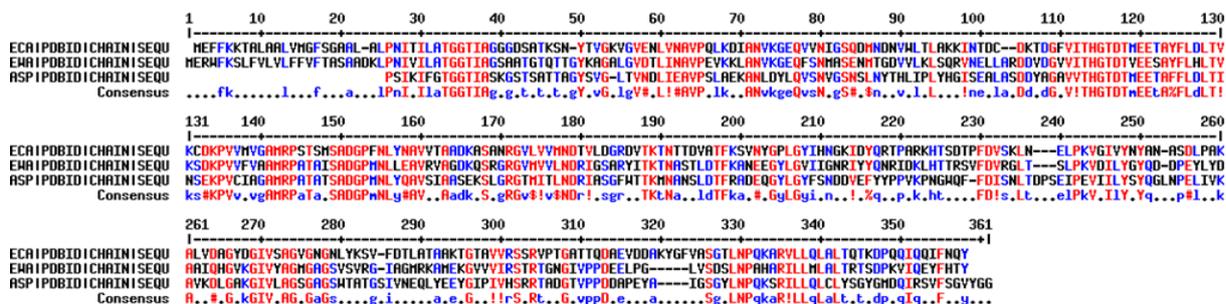


Figura 11: Alinhamento da sequência de aminoácidos das asparaginases utilizando o programa Multialin: ECA – Asparaginase de *E. coli*, EWA – Asparaginase de *E. chrisanthemi* e ASP – Asparaginase de *S. cerevisiae* clonada e expressa em *P. pastoris*.

Fonte: Girão (2016)

Tabela 1- Grau de identidade e similaridade entre as asparaginases: ECA – Asparaginase de *E. coli*, EWA – Asparaginase de *E. chrisanthemi* e ASP – Asparaginase de *S. cerevisiae* clonada e expressa em *P. pastoris*.

Asparaginase	Identidade (%)	Similaridade (%)
ECA/EWA	47	73,7
ECA/ASP	37,9	64,3
EWA/ASP	43,7	71,4

Fonte: Girão (2016).

A asparaginase II de *S. cerevisiae* poderia representar uma terapia alternativa para LLA, especialmente para pacientes que desenvolveram hipersensibilidade à enzima bacteriana. Contudo, os níveis de expressão desta enzima de forma nativa não são satisfatórios para produção em escala industrial (FERRARA *et al.*, 2006). A clonagem do gene *ASP3* em outros sistemas de expressão é uma forma de aumentar a quantidade de produto (CACHUMBA *et al.*, 2015).

2.4 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM *PICHIA PASTORIS* (*KOMAGATAELLA PHAFFII*)

Desde a década de 1970, o estabelecimento e desenvolvimento da indústria de biotecnologia têm melhorado exponencialmente, permitindo a produção comercial de enzimas e proteínas biofarmacêuticas. Como muitas proteínas são de imenso valor comercial, numerosos estudos se concentraram em encontrar maneiras de produzi-las eficientemente e de forma funcional (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

Sistemas de expressão em leveduras têm sido utilizados com sucesso há mais de 30 anos para a produção e secreção de proteínas recombinantes de origem humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana e viral (DAMASCENO, 2012). A levedura *Pichia pastoris*, atualmente reclassificada como *Komagataella phaffii*, pertence ao Reino Fungi, divisão *Eumycota* subdivisão *Ascomycotina*, Classe *Hemoascomycetes*, Ordem *Endomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* e Subfamília *Saccharomycetoideae*. Foi inicialmente escolhida para a produção de proteínas de unicelulares (SCP, da sigla em inglês para *single cell protein*) para ração animal devido ao seu crescimento eficiente em meios contendo metanol, uma vez que a síntese de metanol a partir de metano natural era barata no final dos anos 1960. No entanto, como os custos do metano aumentaram durante a crise do petróleo na década de 1970, e os da soja, a principal fonte de proteínas, diminuiu, a produção de SCP nessa levedura nunca se tornou economicamente viável (CREGG *et al.*, 2000).

Nos anos 80, a *Phillips Petroleum Company*, juntamente com o Instituto Salk Biotecnologia / Industrial Associates, Inc. (SIBIA, La Jolla, CA, EUA), iniciaram o desenvolvimento de um sistema para a expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris*. A SIBIA construiu vetores e linhagens e gerou protocolos correspondentes para a manipulação genética de *P. pastoris* com base no uso de metanol como fonte de carbono e energia desse organismo. Mais de 1.000 proteínas foram clonadas e expressas usando este sistema, e ele foi selecionado por várias plataformas de produção de proteínas para programas de genômica estrutural (CREGG, CEREHINO, 2000; BUCKHOLZ, GLEESON, 1991; ROMANOS, 1995).

O sistema de expressão *P. pastoris* foi patenteado através da Research Corporation Technologies (Tucson, AZ, EUA), e o kit de expressão da Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EUA) está disponível para uso em pesquisa. O primeiro polipeptídeo terapêutico expresso por *P. pastoris*, com 60 aminoácidos, recebeu aprovação do FDA em 2009 e é produzido pela Dyax Corporation (Cambridge, MA) para o tratamento de angioedema hereditário. Atualmente, diversos produtos biológicos produzidos por *P. pastoris* encontram-se no mercado ou em fase de teste, incluindo albumina sérica humana, antígeno da hepatite B, fator de crescimento epidermal (EGF), inibidor da calicreína plasmática, anticoagulante hirudina, insulina, interferon-alfa e fragmentos de anticorpos.

O sucesso de *P. pastoris* como sistema de expressão de proteínas recombinantes está diretamente ligado ao fato desta levedura ser metilotrófica, ou seja, utilizar o metanol como única fonte de carbono e energia na ausência de uma fonte de carbono mais facilmente metabolizável, como glicose ou glicerol. Derivado do gene da álcool oxidase 1 (*AOX1*) da via de metabolização do metanol, o promotor P_{AOX1} é conhecido por ser um dos mais fortes promotores eucarióticos regulados. Uma ampla variedade de proteínas tem sido expressa usando este promotor, com rendimentos que podem chegar a mais de 10 g L^{-1} de proteína recombinante (WERTEN *et al.*, 2000). Como a levedura não é fermentativa, produtos de fermentação como o etanol e o ácido acético não se acumulam rapidamente (CEREGHINO, CREGG, 2000), permitindo que as culturas atinjam altas densidades celulares, na faixa de 100 g L^{-1} (HEYLAND *et al.*, 2010).

As leveduras, ao contrário das bactérias, são capazes de realizar glicosilação e outras modificações pós-traducionais complexas, de forma semelhante aos eucariotos superiores (HAMILTON *et al.*, 2003). Isto é de especial importância, uma vez que muitas proteínas requerem processamento adicional para adquirir sua conformação correta e, conseqüentemente, a atividade biológica esperada. As modificações pós-traducionais, em especial a glicosilação, influenciam também a carga, solubilidade, interações com proteínas plasmáticas e imunogenicidade da proteína de interesse, entre outras propriedades (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

A levedura *P. pastoris*, assim como outras leveduras, adiciona O-glicossacarídeos no grupo hidroxila de serina e treonina nas proteínas secretadas. As cadeias glicosiladas são compostas de resíduos de manose, diferente das proteínas secretadas por células humanas, que possuem glicosilação mais variada. Porém, a glicosilação realizada por *P. pastoris* é mais semelhante à de proteínas humanas, pelo menos em tamanho, quando se compara com os outros sistemas de expressão eucariotos, como *S. cerevisiae*, o que sugere para a proteína expressa em *Pichia* menor imunogenicidade em humanos (DALY, HEARN, 2005). As principais vantagens do sistema de expressão em *Pichia* em relação a outros sistemas procariotos e eucariotos estão citadas a seguir (CEREGHINO, CREGG, 2000; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005):

- Simplicidade das técnicas de manipulação genética e similaridade com aquelas empregadas em *S. cerevisiae*;
- Micro-organismo GRAS (*generally recognized as safe*)
- Capacidade de integrar múltiplas cópias de ADN heterólogo via recombinação em seu genoma em regiões de homologia
- Capacidade de realizar modificações pós-traducionais eucarióticas (glicosilação, proteólise e formação de pontes de enxofre);
- Glicosilação mais homogênea que a de *S. cerevisiae*;
- Capacidade de produzir proteínas heterólogas em elevadas concentrações, intracelular ou extracelularmente;
- Elevados níveis de secreção (maiores que $1,0 \text{ gL}^{-1}$).
- Rápido crescimento em meio definido de baixo custo
- Obtenção de elevada densidade celular ($100 \text{ g peso seco/L}$);
- Fácil *scale up*.

A expressão de um gene heterólogo em *P. pastoris* requer três etapas básicas: a inserção do gene em um vetor de expressão; integração do vetor de

expressão no genoma de *P. pastoris*; e a seleção dos clones recombinantes que expressam potencialmente a proteína de interesse (LI *et al.*, 2007). Grande parte dos vetores de expressão em *P. pastoris* disponíveis comercialmente apresenta o promotor fortemente regulado e induzível P_{AOX1} . Quando esses vetores são utilizados, o bioprocessamento de produção da proteína heteróloga é dividido em duas fases: a primeira consiste no cultivo da linhagem recombinante com uma fonte de carbono pouco repressora, em geral o glicerol, até obter densidade celular elevada; após o esgotamento da fonte de carbono, a segunda fase é iniciada pela adição de metanol, que induz a expressão da proteína de interesse (CEREGHINO, CREGG, 2000).

Dependendo da estratégia de clonagem, as proteínas heterólogas expressas pela levedura *P. pastoris* podem estar localizadas na região citoplasmática ou serem secretadas para o periplasma ou meio extracelular; sendo que as duas últimas requererem a presença de uma sequência sinal na proteína expressa para direcioná-la à via de secreção. Dependendo da localização do produto bioativo, diferentes formas de isolamento podem ser empregadas (DALY, HEARN, 2005).

2.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM LEVEDURAS

A ruptura celular é a primeira etapa no processo de isolamento de materiais intracelulares e constitui uma etapa essencial no processo de “*downstream*”, possuindo considerável influência não somente na quantidade total da proteína de interesse a ser recuperada, mas também na sua atividade biológica, sua associação com outros componentes celulares, a possível ocorrência de degradação proteolítica e a presença de contaminantes que podem influenciar nas etapas subsequentes (JOSALA *et al.*, 2016).

O processo de extração de proteínas heterólogas requer o conhecimento da estrutura celular da levedura e a localização em que esses compostos se encontram para seleção de um método de rompimento e condição de ruptura apropriada que permita uma liberação eficiente e econômica (GECIOVA, BURY, 2002).

A membrana plasmática, o espaço periplásmico e a parede celular formam o envelope da célula de levedura que compõe aproximadamente 15% do volume total da célula e serve como uma cápsula protetora no controle da permeabilidade celular. A parede celular é rígida e confere proteção osmótica e física à célula; possui

espessura de aproximadamente entre 100 a 200 nm, representando cerca de 20 - 25% do peso seco da célula (LIPKE, OVALLE, 1999).

Os principais constituintes estruturais da parede celular são polissacarídeos (80-90%), principalmente glucanas e mananas, e uma pequena porcentagem de quitinas e proteínas (KOLLAR *et al.*, 1997). As glucanas conferem resistência mecânica à parede celular, principalmente à camada interna. São moléculas moderadamente ramificadas, compostas por resíduos de glicose, principalmente com ligações β -(1-3) e β -(1-6). As mananas são caracterizadas como uma espinha dorsal de resíduos de manose com ligação α -(1-6), com cadeias laterais de oligossacarídeos curtas (GECIOVA, BURY, 2002). As cadeias laterais de carboidratos das proteínas da superfície celular contêm múltiplas pontes fosfodiéster, resultando em numerosas cargas negativas na superfície da célula em valores fisiológicos de pH. As proteínas da parede celular são covalentemente ligadas à rede α 1,3-glucano-quitina, seja indiretamente através de uma porção α 1,6-glucana ou diretamente. Além disso, algumas proteínas são dissociadas de outras proteínas da parede celular (DE NOBEL *et al.*, 1990).

O periplasma é uma região fina entre a membrana plasmática e a parede celular e contém principalmente proteínas segregadas que são incapazes de permear entre parede celular e a membrana plasmática (LIU *et al.*, 2016). Seu ambiente oxidativo facilita a formação de pontes dissulfeto e o enovelamento de proteínas devido à porosidade da parede celular, as enzimas periplasmáticas podem ter sua atividade determinada sem rompimento da membrana plasmática ou mesmo com a célula intacta (DE NOBEL *et al.*, 1989). A estruturada levedura e composição das camadas externas estão apresentados na Figura 12.

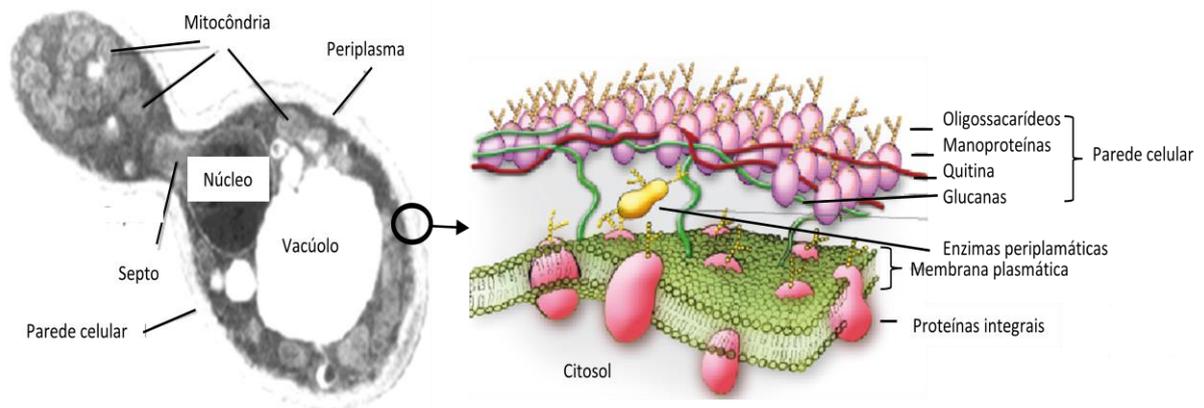


Figura 12: Estrutura e composição das camadas externas de levedura

Fonte: Adaptado por Gaensly (2010)

A extração de proteínas intracelulares ou periplasmáticas requer energia para o rompimento da parede celular. Os processos aplicados podem ser mecânicos (sonicação, homogeneização de alta pressão, moagem, prensagem) e não-mecânicos. Estes últimos subdividem-se, por sua vez, em métodos químicos (ação de agentes complexantes, alcalinos, enzimáticos, detergentes ou solventes) e físicos (choque osmótico, congelamento e descongelamento, secagem) (BALASSUNDARAM *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2016).

Os processos mecânicos têm sido amplamente utilizados para liberação eficiente de bioprodutos intracelulares, porém concomitantemente com a proteína-alvo, liberam outros produtos intracelulares como: ácidos nucleicos, proteínas celulares, polissacarídeos, lipídios, compostos fenólicos e restos celulares. Conseqüentemente um grande número de impurezas com propriedades físicas e químicas semelhantes é uma grande desvantagem dos processos mecânicos, exigindo estratégias de purificação complexas e dispendiosas (FONSECA, CABRAL 2002). Além disso, o calor gerado pela dissipação de energia mecânica precisa ser removido por um sistema de resfriamento eficiente para manter a atividade biológica de produtos termossensíveis, aumentando assim o custo do processo (COSTA, 2018).

Os métodos não mecânicos agem fundamentalmente na parede celular, alterando a sua estrutura de forma a torná-la permeável mantendo a integridade da membrana celular e do citoplasma. São utilizados normalmente para a extração

seletiva de biomoléculas situada no espaço periplasmático ou associadas à membrana externa, conseguindo-se deste modo a extração sem extravasamento de componentes intracelulares (BALASSUNDARAM, HARRISON, 2008). Segundo Balansudaran e col. (2009), as principais vantagens de extração de bioprodutos no espaço periplasmático de forma seletiva são:

- Redução da liberação de proteínas intracelulares contaminantes, aumentando assim a capacidade de adsorção durante a cromatografia.
- Ausência de detritos celulares micronizados, o que facilita as etapas de filtração ou centrifugação subsequentes (a micronização é um fenômeno que ocorre tipicamente com métodos mecânicos de ruptura celular, nos quais os restos celulares gerados nos estágios iniciais de ruptura são divididos em partículas mais finas).
- Não liberação do ADN celular, proporcionando a diminuição da viscosidade do extrato bruto e facilitando assim a etapa de purificação subsequente.

2.5.1 EXTRAÇÃO SELETIVA DE ENZIMAS PERIPLASMÁTICAS

Conforme mencionado anteriormente, as proteínas associadas à parede celular externa podem ser liberadas seletivamente através do enfraquecimento da estrutura da parede celular por métodos físicos ou químicos de severidade moderada. Diversos métodos são citados na literatura com este objetivo, incluindo o uso de soluções salinas com elevada concentração, solventes (etanol, metanol, Isopropanol), compostos tensoativos e compostos sulfidrílicos (ditiotreitól, β -mercaptoetanol, cisteína) (FONSECA, CABRAL 2002).

Vários trabalhos relatam o uso de compostos sulfidrílicos, especialmente ditiotreitól, β -mercaptoetanol e cisteína, para extração seletiva de proteínas periplasmáticas ou associadas à parede celular. Estes compostos aumentam a permeabilidade da parede celular através da ruptura de pontes dissulfeto das proteínas associadas, pelo o ataque nucleofílico realizado pelo íon sulfeto (BANSAL-MUTALIK, GAIKAR, 2006). A associação de agentes redutores ao pH alcalino ($\text{pH} \geq 8$) é reportada por favorecer a liberação de proteínas não ligadas

covalentemente à parede celular uma vez que a afinidade dessas proteínas pelos polissacarídeos da parede celular seria dependente do pH; e de proteínas associadas de forma iônica, devido ao fato da maioria dessas proteínas apresentar $pK_a < 8$, tornando-se carregadas negativamente em solução alcalina e assim perdendo a capacidade de se ligar às cargas negativas das glicoproteínas da parede celular (KLIS *et al.*, 2007).

Soluções salinas de elevada concentração, por sua vez promovem um choque osmótico na célula. Em combinação com agentes redutores, presumivelmente, expandem a parede celular, aumentando assim a sua porosidade e permitindo que moléculas presentes na matriz da parede ou no espaço periplasmático se difundam (MIDDLEBERG *et al.*, 1995).

A escolha do método e das condições a serem empregadas depende do micro-organismo e da proteína de interesse. Diversos processos são relatados na literatura para a extração seletiva de proteínas associadas à parede celular através do uso de soluções salinas de elevada concentração e/ou agentes redutores e/ou pH alcalino. Lam e GrootWassink (1985) alcançaram liberação completa de uma exo-inulinase periplásmica de *Kluyveromyces fragilis* através do tratamento das células, durante 30 minutos, com fosfato 0,3M a pH 7-8 em presença de cisteína 8 mM. Workman e Day (1983) relataram 60% de liberação de uma beta-frutofuranosidase de *K. fragilis*, em 45 min, pelo uso de fosfato potássio 20 mM pH 8,0 na presença de 2-mercaptoetanol 10 mM. Kidby e Davies (1970) reportaram o uso de tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 8,0 em presença de β -mercaptoetanol 10 mM ou ditioneitol 1,0 mM para a liberação de invertase da parede celular de *Saccharomyces fragilis*. Weinberg e Orton (1966) alcançaram a liberação de invertase e de fosfatase ácida de *S. cerevisiae* e *S. fragilis* pelo emprego de tampão acetato 50 mM, pH 6,5 na presença de cloreto de potássio 1M ou de 2-mercaptoetanol 40 mM; as células de *S. cerevisiae*, no entanto, exigiram um tratamento prévio com enzimas de digestão da parede celular. O tratamento de células de levedura de panificação com solução de fosfato 0,5 M, pH 10,0, na presença de cisteína 10 mM resultou na recuperação completa, em 1 h, da invertase periplásmica (BANSAL-MUTALIK, GAIKAR, 2006). Fenton (1982) alcançou recuperação de 80–90% na extração de beta-d-galactosidase de *K. fragilis* através do tratamento com etanol ou isopropanol 80% por 5 minutos, seguido de extração

com tampão fosfato 0,1 M pH 6,6. Fonseca e Cabral (2002) utilizaram choque osmótico para extração da enzima penicilina acilase de *E. coli*, obtendo atividade específica dez vezes maior do que a alcançada com o uso de sonicação. Já o trabalho realizado por Klis (2007) demonstra a extração de proteínas associadas à parede celular de *S. cerevisiae* com agentes redutores β -mercaptoetanol e ditioneitol em baixas concentrações (2 mM), na temperatura de 4°C, mantendo a integridade da membrana plasmática.

A extração seletiva de proteínas periplásmicas foi demonstrada também através do uso de diferentes produtos químicos, como por exemplo: tensoativos aniônicos para a liberação de penicilina acilase de *E. coli* (BANSAL-MUTALIK, 2003); glicina 1% para a liberação de α -amilase de *E. coli* recombinante (ARIGA *et al.*, 1989); glicol éter para a liberação de um bioproduto da região periplasmática de *Pseudomonas fluorescens* (ALLEN *et al.*, 2007). Zhao e Yu (2001) descreveram uma estratégia combinada para extrair a enzima periplasmática L-asparaginase de *E. coli* em sistemas bifásicos aquosos. As células foram tratadas com solução de K_2HPO_4 9,4% e Triton X-100 15%, a 25 °C por 15-20 h, obtendo um rendimento de 80%. A maior parte da enzima foi recuperada na fase inferior, rica em fosfato, enquanto a fase superior era rica em micelas. O uso de meio básico (pH 11) favoreceu liberação da enzima asparaginase, sendo em pH 9,0 que se obteve a maior quantidade de proteínas extraídas do espaço periplasmático com menor quantidade de proteínas celulares, ou seja, com uma maior pureza da enzima na solução extratora.

Os métodos de liberação periplasmática descritos na literatura, embora funcionem com eficácia em escala laboratorial, envolvem muitos passos para um processo de recuperação eficiente em grande escala. Além disso, muitos produtos químicos não são inertes e podem ter efeitos prejudiciais para o bioproduto e/ou para os procedimentos subsequentes de purificação (FRENCH *et al.*, 1996). A combinação de processos de extração que permitam liberar seletivamente os produtos de acordo com sua localização celular é necessária para atender às necessidades futuras da indústria de bioprocessos (BALASSUNDARAM *et al.*, 2009).

2.6 OTIMIZAÇÃO DE BIOPROCESSOS

Para o desenvolvimento de processos microbianos de produção de proteínas recombinantes, diversos aspectos devem ser otimizados visando à obtenção de elevados rendimentos e produtividades: linhagem produtora, matéria-prima empregada, formulação do meio de cultivo e parâmetros operacionais das etapas de *upstream* (preparo e esterilização de meio de cultivo, preparo de inóculo, etc.), produção da molécula de interesse e *downstream* (isolamento e purificação do produto biológico) (JOSALA, 2016).

O processo de extração em pequena escala deve ser reprodutível e comparável ao método em escala industrial em eficiência de rompimento, concentração de produto bioativo, perfil de impurezas (proteínas da célula hospedeira e ADN) e parâmetros cruciais do processo, como viscosidade e tamanho dos debrís celulares. Somente considerando estes parâmetros será possível a transferência bem-sucedida à escala industrial. A economia no consumo de insumos também é um critério importante (WALTHER, DARAUER, 2017).

O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para avaliar, e mesmo quantificar, a influência de variáveis sobre as respostas desejadas é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas (BARROS *et al.*, 2001).

O desenho experimental (DoE) é uma técnica para planejar experimentos e analisar a informação obtida. A técnica permite usar um número mínimo de experimentos, em que sistematicamente são variados diversos parâmetros experimentais simultaneamente para obter informação suficiente. Com base nos dados obtidos, um modelo matemático do processo em estudo (por exemplo, um protocolo de purificação de proteína ou um passo de cromatografia) é criado. O modelo pode ser usado para entender a influência dos parâmetros experimentais no resultado e encontrar uma condição ótima para o processo. O *software* moderno é usado para criar o planejamento experimental do projeto, para obter um modelo e visualizar as informações geradas. Diferente da abordagem empírica tradicional para otimizar experimentos, na qual um parâmetro é variado enquanto todos os outros são fixos, na abordagem do DoE os parâmetros do processo podem variar

simultaneamente, o que permite que os efeitos de cada parâmetro, individualmente e/ou combinados, sejam avaliados. Adicionalmente, o número de experimentos e a demanda de tempo é muito menor para o DoE (MONTGOMERY, 1991).

O planejamento estatístico de experimentos por planejamento fatorial completo com ponto central é empregado para se obter as melhores condições operacionais de um sistema sob estudo, realizando-se um número menor de experimentos. O planejamento fatorial determina quais fatores têm efeitos relevantes na resposta e, também, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores. Essas interações são os principais componentes de muitos processos de otimização (BRASIL *et al.*, 2007).

Alterações nos níveis das variáveis de bioprocessos, como pH, temperatura e concentrações dos reagentes, pode afetar o resultado experimental através de seus efeitos individuais e de interação com outras variáveis de processo, mas seus níveis podem ser variados de forma independente uns dos outros durante o modelamento, como acontece nos planejamentos fatoriais (SILVA *et al.*, 2008).

2.7 PROJETO ASPARAGINASE

Visando uma alternativa de produção nacional da enzima asparaginase com melhores propriedades terapêuticas, foi estabelecida uma parceria entre Farmanginhos/Fiocruz e o Instituto de Química da UFRJ com o objetivo de desenvolver um fármaco antileucêmico a partir da asparaginase de origem eucariótica.

Assim, o gene *ASP3* que codifica a asparaginase II da levedura *S. cerevisiae* foi clonado e expresso na levedura metilotrófica *P. pastoris*. Como estratégia de clonagem foi utilizada a linhagem de *P. pastoris* GS115 eo vetor de expressão pPIC9, obtendo-se uma linhagem recombinante classificada como Mut^S. O rendimento enzimático por massa celular seca obtido para a cepa recombinante foi de 800 U/g, sete vezes superior ao obtido para *S. cerevisiae*. Posteriormente, cultivos em biorreator de alta densidade celular em escala de 2 L resultaram em rendimento volumétrico de 85.600 U/L e produtividade volumétrica global de 1083 U/L.h (FERRARA *et al.*, 2006).

Apesar da presença do sinal de secreção no vetor pPIC9, a asparaginase II de *S. cerevisiae* produzida pela linhagem de *P. pastoris* recombinante não é excretada para o meio de cultura, permanecendo no espaço periplásmico (FERRARA *et al.*, 2006). Para a extração periplasmática da enzima, no trabalho realizado por Ferrara *et al.* (2010) foram empregados dois métodos não-mecânicos com bons rendimentos. O método de congelamento e descongelamento do *pellet* celular apresentou rendimento de 85%, após 6 ciclos, porém é um procedimento utilizado somente em escala laboratorial. O outro procedimento, realizado em micro escala (2 g de célula úmida, correspondendo a cerca de 0,28 g em base seca), envolveu extração por choque osmótico em pH alcalino na presença de cisteína, no qual o *pellet* celular foi tratado com solução de fosfato de potássio com concentração de 50 ou 500 mM em pH 7,0, 10,0 ou 11,5 na presença ou ausência de cisteína 10 mM (1 g de célula úmida : 10 mL de solução extratora). A extração utilizando fosfato de potássio 500 mM em pH 11,5 na presença de cisteína 10 mM resultou em mais de 90% de recuperação da atividade enzimática em 2 horas de tratamento a 28-30° C; sendo este um método escalonável e com constituintes compatíveis com o sistema biológico.

A etapa de purificação foi desenvolvida partindo-se do extrato bruto enzimático obtido através do tratamento das células com fosfato/cisteína em pH alcalino. O processo desenvolvido, escalonável, envolveu cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de troca iônica. A recuperação da atividade enzimática foi de 66,1%, o grau de purificação de 4,1 vezes e a atividade específica de 336,9 UI/mg (GIRÃO, 2017), ressaltando-se que a atividade específica do medicamento Elspar (asparaginase livre de *E. coli*) é de 225 UI/mg.

A enzima apresentou atividade em condições fisiológicas (pH 7,2 e 37° C), estabilidade entre pH 6 e 10 e até 45 °C (GIRÃO *et al.*, 2016), ponto isoelétrico de 4,5 e Km de $2,461 \pm 0,17$ mM (PINHEIRO, 2015). De forma semelhante à asparaginase nativa de *S. cerevisiae*, a enzima expressa em *Pichia* apresentou atividade contra D e L-asparagina. A atividade contra L-glutamina correspondeu a apenas 0,7% da atividade medida para a L-asparagina (PINHEIRO, 2015), valor este muito menor do que o exibido pelas asparaginases comerciais (entre 2 e 10%), resultado bastante interessante, pois a degradação da glutamina tem sido associada a efeitos adversos do medicamento. Além disso, em testes *in vitro* a asparaginase

recombinante de levedura demonstrou atividade antitumoral contra células leucêmicas K562. Esses resultados corroboram para o desenvolvimento de um produto biológico antileucêmico inovador tendo a asparaginase de levedura recombinante como princípio ativo.

A asparaginase produzida pela linhagem recombinante de *P. pastoris* apresenta as seguintes características físico-químicas principais (GIRÃO *et al.*, 2016):

- Massa molecular estimada: 35,184 kDa (monômero)
- Massa molecular (glicosilada): 46,6 e 48,6 kDa (monômero) e 136 kDa (homotretâmero)
- pI: 4,5
- pH ótimo: 7,2
- Temperatura ótima: 46°C
- Glicosilação: presente
- Sequência descrita na Figura 13

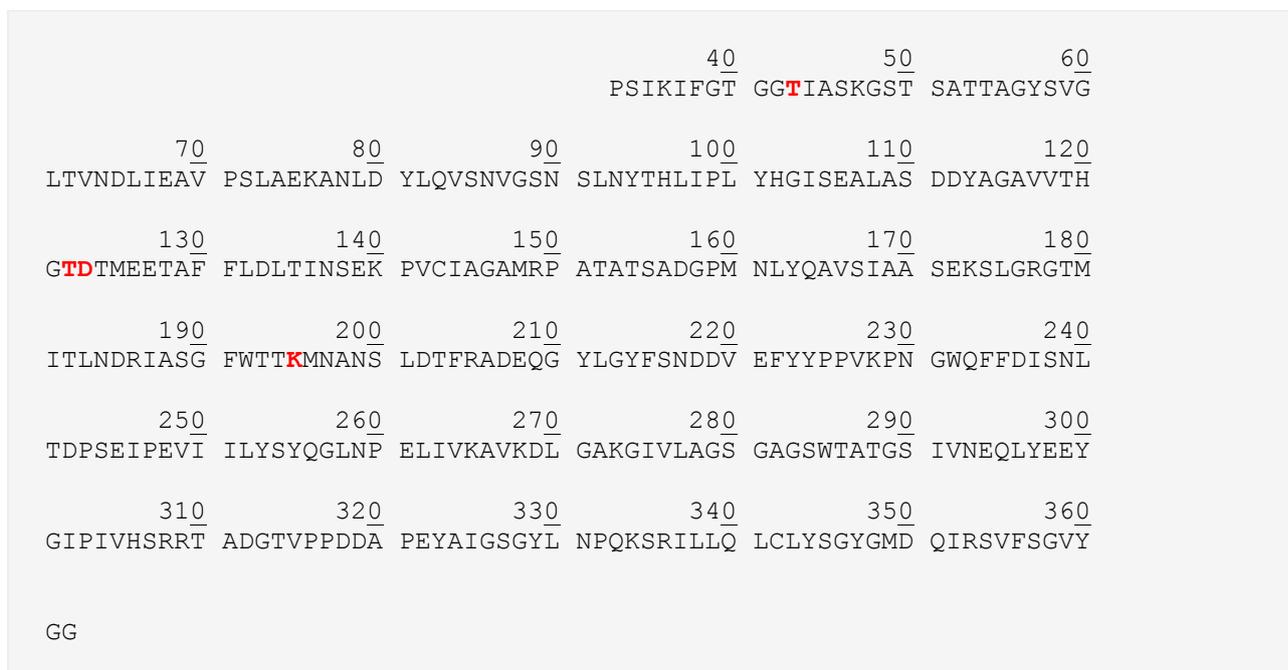


Figura 13: Sequência de aminoácidos de enzima asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *P. pastoris*. Os aminoácidos marcados em vermelho representam a tríade catalítica.

3 JUSTIFICATIVA

A asparaginase é um medicamento essencial na quimioterapia combinada principalmente para LLA. Todas as asparaginases hoje existentes no mercado são de origem bacteriana: *E. coli* e alternativamente *Erwinia chrysanthemi*. Apesar de possuírem efeito terapêutico, provocam efeitos colaterais anafiláticos e imunológicos, assim como a inativação enzimática, que dificultam ou até inviabilizam o tratamento. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma enzima de origem eucariótica pode levar a um medicamento de menor potencial imunogênico devido a maior proximidade filogenética das leveduras com as células humanas.

A asparaginase consta na lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) elegível para produção nacional através do estabelecimento de parcerias para o desenvolvimento produtivo (PDPs) que consta na portaria nº 704, de 8 de março de 2017. Como até o momento não existe uma produção nacional desta enzima, a dependência tecnológica do mercado externo e o recorrente desabastecimento do produto são os principais motivadores para a produção no Brasil.

Neste contexto, Farmanguinhos/Fiocruz e o Instituto de Química/UFRJ estabeleceram uma parceria para desenvolvimento de um fármaco antileucêmico a partir de asparaginase de levedura. Espera-se chegar, ao final do projeto, a um biofármaco inovador para o tratamento de leucemia, a partir de asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *P. pastoris*.

No presente trabalho, as atividades estão voltadas para a otimização da etapa de extração, por choque osmótico em pH alcalino em presença de cisteína, da enzima, visando minimizar a quantidade de insumos, o tempo reacional e o volume de solução extratora por unidade de massa celular. Apesar do alto rendimento alcançado na extração, o consumo elevado de reagentes e o pH extremamente alcalino são fatores críticos, especialmente quando se considera o aumento de escala do processo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de extração da asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa por *P. pastoris* por choque osmótico em pH alcalino na presença de cisteína visando minimizar a quantidade de insumos e o tempo reacional.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Otimizar a composição da solução extratora por planejamento experimental, utilizando como variáveis a concentração de fosfato de potássio, a concentração de cisteína e o pH, em escala de 100 mg de massa celular seca;
- b) Avaliar a influência do tempo de extração;
- c) Avaliar a extração em diferentes temperaturas
- d) Avaliar a extração em diferentes proporções de solução extratora : massa celular;
- e) Avaliar a reprodutibilidade do processo de extração otimizado para quantidade cinco vezes maior de massa celular.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CULTIVO CELULAR

5.1.1 Micro-organismo

Foi utilizada uma linhagem recombinante da levedura *P. pastoris* Mut^S que expressa o gene *ASP3* de *S. cerevisiae*, depositada na Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)/FIOCRUZ(INCQS 50002). A clonagem e expressão em *P. pastoris* foram realizadas por Ferrara e col. (2006). O ADN que sintetiza o gene *ASP3* foi extraído da levedura *S. cerevisiae ure2dal80* YAE3R-D12, que foi construída por Oliveira e col. (2003). O gene foi inserido para o plasmídio pGEM-T Easy (Promega) e amplificado em *E. coli* DH5 (Toyobo). A expressão foi realizada em *P. pastoris* GS115 (*his4*) – (*Invitrogen Corporation*), utilizando o vetor pPIC9 – (*Invitrogen Corporation*).

5.1.2 Manutenção e reativação de cultura

A partir do estoque de cultura em meio sólido YPDA (glicose 20 g/L; extrato de levedura 10 g/L; peptona 20 g/L e ágar 20 g/L) foi realizado um repique para o mesmo meio, em placa de petri, a qual foi incubada a 28 °C por 48 horas.

5.1.3 Crescimento celular e produção de asparaginase em agitador orbital

A cultura expandida em placa foi ressuspensa em solução salina (cloreto de sódio 0,85%) de forma a se obter densidade óptica (DO_{600nm}) de aproximadamente 30. Um mL da suspensão celular foi inoculado em 100 mL de meio BMG (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0; *yeast nitrogen base*[®] (YNB) sem sulfato de amônio e aminoácidos (Difco) 3,4 g/L; sulfato de amônio 10 g/L; glicerol 10 mL/L e biotina 0,4 mg/L) em frascos de *Erlenmeyer* de 1 L de capacidade. A cultura foi incubada em agitador orbital a 28 °C a 200 rpm durante 28 h. As células foram separadas por centrifugação a 3000 x g a 15 °C por 20 minutos e o *pellet* celular ressuspensa em 100 mL de meio BMM (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, YNB[®] sem sulfato de amônio e aminoácidos 3,4 g/L; sulfato de amônio 10 g/L, metanol 5 mL/L e biotina 0,4 mg/L), sendo incubadas em frascos de *Erlenmeyer* de

1 L de capacidade, a 200 rpm a 28 °C. Após 24h, foi adicionado metanol 100% na proporção de 5 mL/L. Ao completar 48h de indução da cultura, a massa celular foi quantificada e, em seguida foi separada por centrifugação a 3000 g a 15 °C por 20 minutos. O *pellet* celular foi lavado com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e posteriormente separado por centrifugação a 3000 g a 15 °C por 20 minutos. Após repetir esse último processo por duas vezes, a massa celular foi separada em alíquotas, pesada e armazenada a -4°C.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATORA

Com a finalidade de determinar a melhor composição da solução extratora para extração da enzima asparaginase, foi realizado um planejamento experimental tendo como variáveis a concentração de fosfato de potássio dibásico, a concentração de cisteína e o pH do meio de extração. O *software* utilizado para montagem e análise dos experimentos foi JMP 8.7.2.

Para este estudo foi realizado o crescimento celular e produção da enzima conforme descrito no item 5.1.2, partindo-se de 1,5 L de meio de cultura. Ao final do processo, a suspensão celular foi distribuída em alíquotas de 10 mL de cultura para que todos os ensaios fossem conduzidos como mesmo lote de células.

Os *pellets* celulares foram ressuspendidos em 6,4 mL de solução extratora (proporção massa celular úmida em g : volume de solução extratora em mL de 1:10) com diferentes composições e incubados em agitador orbital a 28 °C a 200 rpm durante 2 h. A suspensão celular foi separada por centrifugação a 3000 g a 15 °C por 20 minutos. A atividade asparaginásica medida no sobrenadante (extrato bruto enzimático) foi utilizada como variável de resposta. Os ensaios que apresentaram resultados mais promissores também tiveram os extratos correspondentes avaliados quanto à concentração de proteínas e perfil proteico.

5.2.1 Triagem de variáveis relevantes por planejamento fatorial completo

Para seleção dos parâmetros significativos de extração da asparaginase periplásmica, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com um ponto central e quatro replicatas totalizando 36 ensaios. Neste estudo foram avaliados: concentração de fosfato de potássio dibásico, concentração de cisteína e pH. Os

valores das variáveis, bem como seus níveis codificados estão expressos na Tabela 2. Os ensaios foram realizados de forma aleatória em 16 blocos.

Tabela 2: Valores das variáveis e seus níveis na triagem do planejamento fatorial completo para otimização da composição da solução extratora.

Variáveis	-1	0	+1
K ₂ HPO ₄ (mM)	100	300	500
Cisteína (mM)	2	6	10
pH	10,5	11	11,5

5.2.2 Delineamento composto central (DCCR) para otimização e estudo dos efeitos dos componentes na extração da enzima asparaginase II

Após a triagem das variáveis relevantes (concentração de fosfato, concentração de cisteína e pH) descrita no item 5.2.1, foi realizado um planejamento de composto central com dois pontos centrais e duas replicatas totalizando 32 ensaios. A Tabela 3 apresenta os valores das variáveis independentes e seus níveis codificados utilizados nesta etapa. Os ensaios foram realizados de forma aleatória em 4 blocos com 4 pontos centrais.

Os valores ótimos das variáveis selecionadas foram obtidos através da resolução da equação de regressão e também pela análise dos gráficos de superfície resposta de contorno.

Tabela 3: Valores das variáveis independentes utilizado no delineamento composto central (DCCR) para otimização da solução extratora.

Variáveis	a	-1	0	+1	A
K ₂ HPO ₄ (mM)	42,56	100	300	500	557,44
Cisteína (mM)	0,852	2	6	10	11,15
pH	10,36	10,5	11	11,5	11,64

5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE EXTRAÇÃO

Para avaliar o rendimento da extração em diferentes tempos reacionais, foi realizada a extração a partir de alíquotas de *pellets* correspondentes a 10 mL de

cultura, como descrito no item 5.1.3, empregando-se a solução extratora otimizada (item 5.2). As condições de extração foram as mesmas utilizadas no item anterior, isto é, proporção massa celular seca (g) : volume de solução extratora (mL) de 1: 70 e incubação em 200 rpm a 28 °C, empregando-se diversos tempos (0, 30, 60, 120, 150, 180 e 210 minutos). Após cada período de incubação, a suspensão foi submetida a centrifugação a 3000 g a 15 °C por 20 minutos. Posteriormente o extrato bruto enzimático foi analisado quanto à atividade enzimática, concentração de proteínas totais e perfil proteico em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO

Para avaliar o rendimento da extração em diferentes temperaturas reacionais, foram realizados experimentos de extração nas temperaturas de 15, 25 e 28 °C. Alíquotas de *pellet* correspondentes a 10 mL de cultura, como descrito no item 5.1.3, foram tratadas com solução extratora otimizada (item 5.2). As condições de extração foram as mesmas utilizadas no item anterior, isto é, proporção massa celular seca (g) : volume de solução extratora (6,4 mL) de 1: 70 e incubação em 200 rpm, pelo tempo de uma hora. Após a incubação a suspensão foi submetida à centrifugação a 3000 g a 15 °C por 20 minutos. Posteriormente o extrato bruto enzimático foi analisado quanto à atividade enzimática e concentração de proteínas totais. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.5 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DA SOLUÇÃO EXTRATORA

Para avaliar a influência de diferentes proporções de massa celular : solução extratora, a massa celular foi fixada e variou-se o volume de solução extratora. A partir de alíquotas de *pellet* correspondentes a 10 mL de cultura, obtidas como descrito no item 5.1.3, foi realizada a extração com a solução extratora otimizada (item 5.2), no tempo otimizado (item 5.3), a 28 °C em 200 rpm. As proporções de massa celular peso úmido em (g): volume de solução extratora (mL) testadas foram 1:10; 1:5; 1:2,5 e 1:1, que correspondem em peso seco respectivamente a 1:70; 1:35; 1:17,5 e 1:7. Após o período de incubação, a suspensão foi submetida a centrifugação a 3000 g a 15 °C por 20 minutos. Posteriormente o extrato bruto

enzimático foi analisado pelos ensaios de atividade enzimática e dosagem de proteínas totais. Foi também medido o pH inicial e final das reações.

5.6 TRANSPOSIÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO PARA 0,5 G DE PELLET CELULAR

Para este estudo foi realizado o crescimento celular e produção da enzima conforme descrito no item 5.1.2, partindo-se de 1,0 L de meio de cultura. Ao final do processo, a suspensão celular foi distribuída em alíquotas de 50 mL de cultura.

Inicialmente, foi realizado um experimento cinético, empregando-se as condições otimizadas de extração (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2, temperatura de 28 °C) e proporção de massa celular seca (g) para solução extratora (mL) de 1:70, retirando-se alíquotas a cada hora.

Em seguida, foram realizados ensaios de extração com 0,5 g de massa celular nas condições otimizadas (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2, tempo de 1 h, temperatura de 28 °C, empregando-se as proporções de massa celular seca (g) para solução extratora (mL) de 1:70, 1:35 e 1:17,5.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os extratos celulares foram analisados quanto à atividade asparaginásica, concentração de proteínas e perfil protéico em gel de eletroforese SDS-PAGE.

5.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

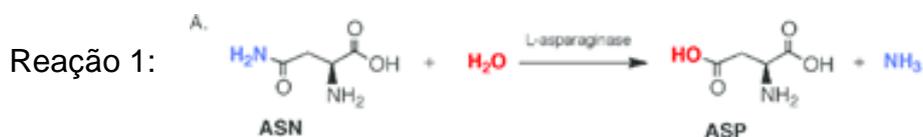
5.7.1 Quantificação de massa celular

A concentração de massa celular da levedura foi avaliada através de medidas de densidade ótica (D.O.) em $\lambda = 600$ nm. Uma unidade de D.O. corresponde a 0,26 g de peso seco de células/L.

5.7.2 Atividade asparaginásica

A atividade asparaginásica da enzima foi determinada pela dosagem de amônio formado a partir da reação de hidrólise da asparagina conforme a Reação 1. Uma unidade de atividade asparaginásica é definida como a quantidade de enzima envolvida na reação suficiente para liberar 1 μ mol de amônio a 37 °C por 1 minuto.

O método de dosagem de amônio foi adaptado do kit enzimático de análise de ureia (Urea 500) do fabricante Doles.



5.7.2.1 Atividade extracelular

A atividade extracelular corresponde à atividade asparaginásica presente no extrato bruto enzimático (sobrenadante obtido após extração da enzima).

A partir de 50 µL de extrato bruto enzimático (diluído 1:8 em fosfato de potássio 200 mM pH 7,0) foram adicionados 50 µL de L-asparagina 5 g/L, sendo a reação incubada a 37 °C durante 30 minutos. Em alíquotas de 40 µL da reação correspondentes aos tempos 0 e 30 minutos foram adicionados 40 µL de solução de TCA 1,5 M. Posteriormente foram adicionados 2 mL do reagente 1 (salicilato de sódio 9,61 g/L; nitroprussiato de sódio 1,01 g/L; EDTA 0,50 g/L) e 2 mL do reagente 2 (hipoclorito de sódio 4-6% 8,9 mL/L; hidróxido de sódio 6,01 g/L) e a mistura foi incubada a 37 °C durante 5 minutos. O produto da reação foi quantificado em espectrofotômetro ($\lambda = 600$ nm). O branco utilizado no ensaio foi 40 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,0 + 40 µL de TCA 1,5 M + 2 mL do reagente 1 + 2 mL do reagente 2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os controles utilizados foram: misturas reacionais nas quais a enzima foi substituída por tampão; e misturas reacionais nas quais a asparagina foi substituída por tampão.

A atividade enzimática foi calculada a partir do coeficiente angular (α) da reta obtida na curva de calibração de concentrações de amônio X absorvância ($\lambda = 600$ nm). As concentrações de amônio utilizadas para a curva de calibração foram: 30,2; 22,7; 15,1; 11,4; 7,6; 3,8 e 1,9 µmol/mL (Anexo A). O cálculo da atividade enzimática está descrito na Equação 1.

$$Atividade (U/mL) = \frac{(\Delta Abs_{600nm} \times 2 \times \text{diluição amostra})}{\alpha \text{ curva padrão} \times \text{tempo}} \quad (\text{Equação 1})$$

5.7.2.2 Atividade periplasmática

A atividade da asparaginase periplasmática foi determinada na célula íntegra. Para isto, o *pellet* correspondente a 10 mL de cultura foi ressuspensionado em 6,4 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 (proporção massa celular em peso seco (g):volume de tampão (mL) de 1:70 e a suspensão foi diluída 40 vezes no mesmo tampão. A partir deste ponto, a metodologia utilizada foi semelhante à realizada para o extrato bruto enzimático (item 5.7.2.1), com a diferença que, após a incubação com a asparagina, a reação foi centrifugada a 3000 g a 15 °C por 20 minutos.

5.7.3 Dosagem de proteínas totais pelo método Bradford

A dosagem de proteínas totais do extrato enzimático foi realizada pelo método colorimétrico Bradford, que consiste na interação das proteínas com o corante Azul de comassie R-250. Em microplaca de 96 orifícios, alíquota de 10 µL de sobrenadante da extração foi incubada com 200 µL de reagente (BIO-RAD proteinassay) diluído quatro vezes, à temperatura ambiente durante 15 minutos e em seguida foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA ($\lambda = 595\text{nm}$), utilizando como branco, água, no lugar da amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (BRADFORD, 1976).

A concentração de proteínas totais foi determinada a partir da equação da reta obtida pela curva padrão feita em diferentes concentrações de albumina x absorbância. As concentrações de albumina utilizadas foram: 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL (Anexo B).

5.7.4 Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE (*sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Para avaliar o perfil proteico e a proporção da enzima asparaginase no extrato bruto enzimático, foi realizada a análise em gel de eletroforese SDS-PAGE. Em 15 µL de sobrenadante de extração, foram adicionados 5µL de tampão de amostra 5X (SDS 10% m/v, 2-mercaptoetanol 2,5% v/v, glicerol 25% v/v, Tris-HCl 0,5M pH 6.8 e azul de bromofenol 0,5% m/v). Após aquecimento a 100 °C durante 5 minutos, a solução foi aplicada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (*Stacking gel* 4% e *Resolving gel* 15%) e submetida à eletroforese utilizando corrente de 100

volts no sistema BIO-RAD® em tampão de corrida (Tris 25 mM, Glicina 0,25 mM pH 8,3 e SDS 0,1%). Após a eletroforese os géis foram corados com azul de comassie R-250 e descorados com ácido acético/metanol/água (1:4:5). Para avaliação da massa molecular das proteínas presentes no sobrenadante da extração, foram utilizados os padrões de massa molecular PAGERULER Plus Prestained Protein Ladder (Invitrogen) e SeeBlue® Plus 2 Pre-Stained Protein Standard Protocol (Life Technologies) (Anexo C).

5.7.5 Cálculo da recuperação da atividade enzimática

A recuperação da atividade enzimática após a extração foi avaliada pela comparação da atividade total do extrato bruto enzimático com a atividade da enzima asparaginase na célula (atividade periplasmática) conforme a Equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Atividade Extrato bruto} \times 100}{\text{Atividade periplasmática}} \quad (\text{Equação 2})$$

5.7.6 Cálculo da atividade específica

A atividade específica (unidades enzimáticas por mg de proteínas totais) foi calculada a partir da Equação 3.

$$\text{Atividade específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Atividade enzimática (U/mL)}}{\text{Concentração de proteínas (mg/mL)}} \quad (\text{Equação 3})$$

5.8 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA

O esquema geral das etapas realizadas neste trabalho é apresentado na Figura 14.

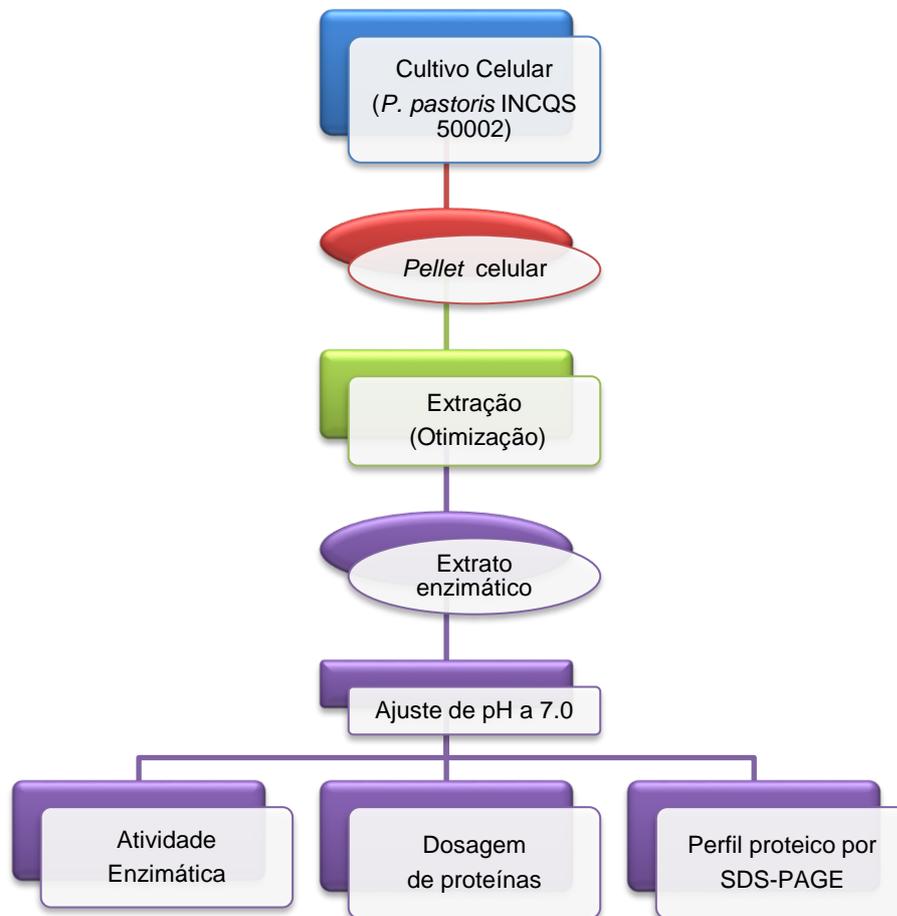


Figura 14: Esquema geral da metodologia.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O presente estudo foi planejado a partir dos resultados do trabalho realizado por Ferrara e col.(2010). Nesse trabalho foi estudada a extração da asparaginase periplásmica empregando soluções de fosfato de potássio dibásico 500 mM em pH 7,0, 10,0 ou 11,5 na presença ou ausência de cisteína 10 mM; foi avaliado também o uso de solução extratora contendo fosfato de potássio dibásico 20 mM e cisteína 10 mM em pH 11,5. A proporção de solução extratora foi de 10 mL por g de *pellet* celular úmido, correspondendo a cerca de 70 mL/g de célula seca, considerando o peso seco médio do *pellet* celular na faixa de 14%. Os estudos foram conduzidos com 2 g de *pellet* celular úmido (cerca de 0,28 g em base seca) na temperatura de 28-30 °C.

O uso de fosfato de potássio 500 mM em pH 11,5 na presença de cisteína 10 mM resultou em mais de 90% de recuperação da atividade enzimática em 2 horas de tratamento e na manutenção da atividade por aproximadamente 18h. Em contrapartida, a extração nas mesmas condições, porém em ausência de cisteína resultou em uma cinética de extração muito mais lenta e recuperação de apenas 10% da atividade enzimática, mostrando o papel relevante deste aminoácido na extração da enzima do espaço periplasmático de *P. pastoris* e na manutenção da estabilidade enzimática. O pH também se mostrou um fator relevante, uma vez que o uso de fosfato 500 mM em pH 10,0 ou 7,0, mesmo em presença de cisteína, resultou em recuperações de atividade enzimática menores do que 60%. O mesmo ocorreu quando do uso de fosfato de potássio dibásico 20 mM + cisteína em pH 11,5.

Adicionalmente, os dados de variação do pH durante a extração indicaram que o uso da concentração mais elevada de fosfato é de importância não somente para promover um choque osmótico nas células, facilitando a extração da enzima da parede celular de levedura, mas também para manter o pH na faixa desejada. Os autores ressaltaram que, como o pK do grupo SH da cisteína é 8,33, este grupo funcional estaria totalmente ionizado em pH 11,5. Assim, o equilíbrio entre a cisteína carregada negativamente e seu produto de oxidação, a cistina, proporcionaria um ambiente redutor favorável, provavelmente benéfico também para a preservação

da estrutura da enzima e conseqüentemente da atividade asparaginase nessa condição de extração. Considerando isso, a cisteína desempenharia um duplo papel na extração de asparaginase, ajudando a liberação da enzima da parede celular da levedura e prevenindo a inativação enzimática.

6.2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA ASPARAGINASE PERIPLASMÁTICA

6.2.1. Cultivo celular e produção da asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *P. pastoris*

Com a finalidade de realizar todos os ensaios de otimização do processo de extração com um lote único de células, a levedura foi cultivada conforme descrito no item 5.1.3, partindo-se de 1,5 L de cultura. Os dados da cultura, resumidos na Tabela 4, situaram-se dentro da faixa esperada do cultivo realizado por Ferrara (2004), em que foram obtidos 770 U/g de célula seca no cultivo em frascos agitados.

Tabela 4: Dados da produção da enzima asparaginase expressa em *P. Pastoris* INCQS 50002 a partir de 1,5L de cultura em frascos agitados.

Dados da produção	Valor
Volume de cultura	1,5L
D.O. (600 nm)	32,7
Concentração de massa celular (peso seco)	8,50 g/L
Atividade enzimática por g de célula (peso seco)	665,9 U/g

No final do cultivo, a cultura foi fracionada em alíquotas de 10 mL em tubos tipo falcon de 15 mL. Após a lavagem com tampão e centrifugação, os *pellets* foram pesados e congelados para utilização posterior. As alíquotas de *pellet* celular correspondentes a 10 mL de cultura apresentaram um valor médio de massa celular de 0,640 g \pm 0,034 em peso úmido e de 0,085 g de célula em peso seco, correspondendo a um peso seco de 13,28%. A atividade asparaginásica total presente em cada alíquota foi calculada em 52,48 U. Esses dados estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5: Dados das alíquotas de *pellet* celular utilizadas nos experimentos de otimização do processo de extração da asparaginase periplásmica. As alíquotas correspondem a 10 mL da cultura descrita na Tabela 4.

Dados das alíquotas	Valor
Volume de cultura	10 mL
Massa celular (peso úmido)	0,640 g ± 0,034
Massa celular (peso seco)	0,085 g
Atividade enzimática total	52,48 U

6.2.2. Otimização da composição da solução extratora por planejamento experimental

6.2.2.1. Triagem das variáveis relevantes

A extração da enzima asparaginase por choque osmótico em pH alcalino na presença de cisteína realizada em Ferrara e col. (2010) apresentou recuperação enzimática de 90% quando da utilização da seguinte solução extratora: fosfato de potássio dibásico 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,5. A otimização da composição da solução extratora tem como finalidade buscar diminuir as concentrações de reagentes e o pH reacional, de forma a reduzir o custo do processo. Para o estudo de otimização, considerou-se como fatores relevantes a concentração de fosfato de potássio dibásico, a concentração de cisteína e o pH do meio reacional. Os ensaios foram realizados fixando-se a proporção peso úmido de células : volume de solução extratora em 1:10, o tempo de processo em 2 h e a temperatura em 28 °C, condições utilizadas no trabalho de Ferrara e col. (2010).

No presente trabalho optou-se por normalizar a proporção massa celular : solução extratora considerando-se a massa celular seca, de forma a se trabalhar com um parâmetro de maior reprodutibilidade, visto que a umidade do *pellet* celular pode variar conforme a forma de centrifugação da amostra. Assim, para reproduzir as condições empregadas por Ferrara e col. (2010) (proporção peso úmido de células : volume de solução extratora de 1:10), o volume de solução extratora empregado em cada ensaio, que continha em média 0,64 g de célula em peso úmido, foi de 6,4 mL, correspondendo à proporção peso seco de células : volume de solução extratora de 1:70.

Os resultados de recuperação da enzima para cada ensaio, realizados como descrito na Tabela 6, estão dispostos no Gráfico 1. Os extratos enzimáticos correspondentes aos ensaios que obtiveram rendimentos superiores a 50% (8,10, 14, 15, 18, 26, 28, 32, 33 e 36) foram analisados quanto à atividade específica (Gráfico 2). Observa-se que a atividade específica situou-se na faixa de 20 U/mg para todos os ensaios, com exceção dos ensaios 18 e 26, para os quais este parâmetro situou-se abaixo de 13 U/mg. O perfil protéico das amostras (Figuras 15 e 16) mostra que todas elas apresentaram uma banda semelhante, próxima a 45 kDa, correspondente à enzima asparaginase. De forma coerente com os resultados de atividade específica, os extratos correspondentes aos ensaios 18 e 26 mostram uma maior quantidade de impurezas quando comparados aos demais.

Tabela 6: Triagem das variáveis relevantes e seus níveis (concentração de fosfato de potássio, concentração de cisteína e pH) para otimização da solução extratora por planejamento fatorial completo.

Ensaio	Blocos	K₂HPO₄ (mM)	Cisteína (mM)	pH
1	1	(-1) 100	(-1) 2	(+1) 11.5
2	1	(1) 500	(1) 10	(-1) 10.5
3	1	(0) 300	(0) 6	(0) 11
4	2	(1) 500	(-1) 2	(-1) 10.5
5	2	(-1) 100	(1) 10	(+1) 11.5
6	3	(-1) 100	(1) 10	(-1) 10.5
7	3	(1) 500	(-1) 2	(+1) 11.5
8	4	(1) 500	(1) 10	(+1) 11.5
9	4	(-1) 100	(-1) 2	(-1) 10.5
10	5	(0) 300	(0) 6	(0) 11
11	5	(-1) 100	(-1) 2	(+1) 11.5
12	5	(1) 500	(1) 10	(-1) 10.5
13	6	(1) 500	(-1) 2	(-1) 10.5
14	6	(-1) 100	(1) 10	(+1) 11.5
15	7	(1) 500	(-1) 2	(+1) 11.5
16	7	(-1) 100	(1) 10	(-1) 10.5
17	8	(-1) 100	(-1) 2	(-1) 10.5
18	8	(1) 500	(1) 10	(+1) 11.5
19	9	(-1) 100	(-1) 2	(+1) 11.5
20	9	(1) 500	(1) 10	(-1) 10.5
21	9	(0) 300	(0) 6	(0) 11
22	10	(1) 500	(-1) 2	(-1) 10.5
23	10	(-1) 100	(1) 10	(+1) 11.5
24	11	(-1) 100	(1) 10	(-1) 10.5
25	11	(1) 500	(-1) 2	(+1) 11.5
26	12	(1) 500	(1) 10	(+1) 11.5
27	12	(-1) 100	(-1) 2	(-1) 10.5
28	13	(0) 300	(0) 6	(0) 11
29	13	(-1) 100	(-1) 2	(+1) 11.5
30	13	(1) 500	(1) 10	(-1) 10.5
31	14	(1) 500	(-1) 2	(-1) 10.5
32	14	(-1) 100	(1) 10	(+1) 11.5
33	15	(1) 500	(-1) 2	(+1) 11.5
34	15	(-1) 100	(1) 10	(-1) 10.5
35	16	(-1) 100	(-1) 2	(-1) 10.5
36	16	(1) 500	(1) 10	(+1) 11.5

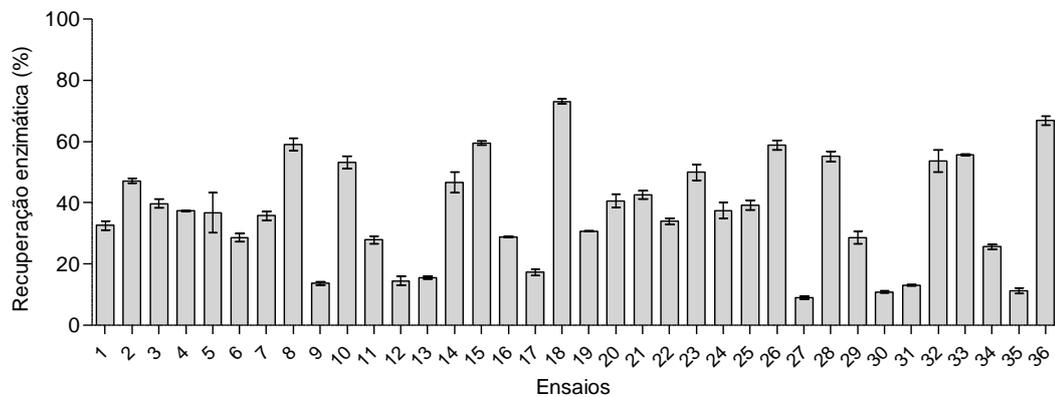


Gráfico 1: Recuperação enzimática obtida para a extração da enzima asparaginase nos ensaios de triagem dos fatores relevantes da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) por planejamento experimental.

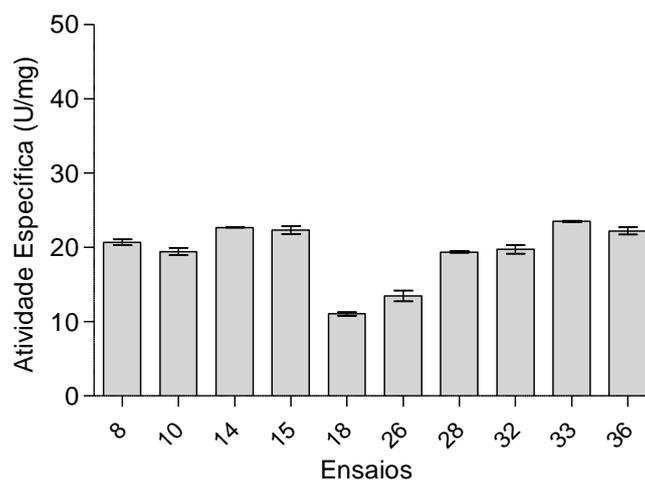


Gráfico 2: Atividade específica das amostras que apresentaram rendimento superior a 50% nos ensaios da triagem dos fatores relevantes da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH).

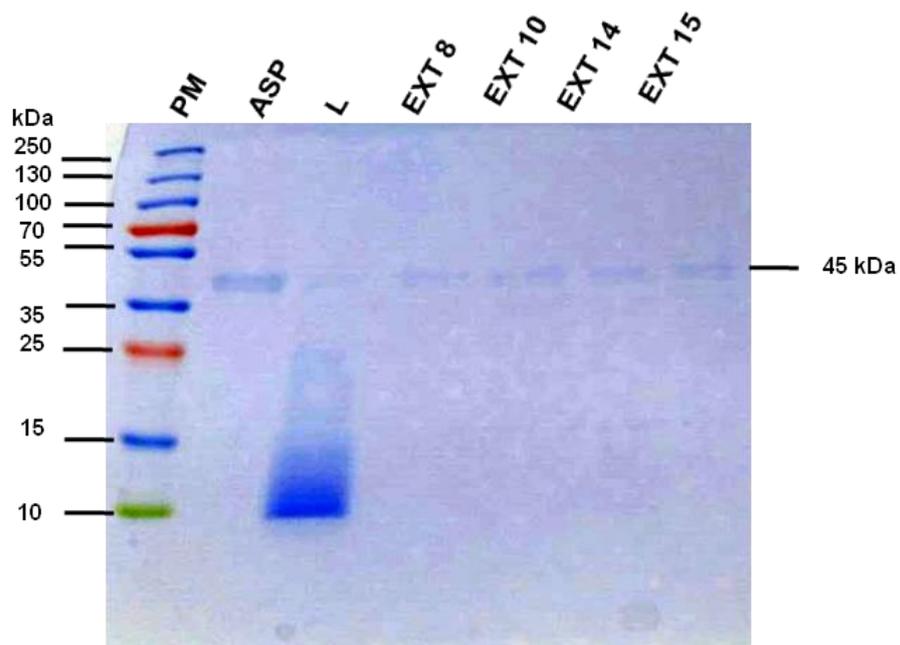


Figura 15: Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE de 10 μ L amostras que apresentaram rendimento superior a 50% nos ensaios da triagem dos fatores relevantes da composição da solução extratora. PM- Pageruler Plus Prestained Protein Lader (Invitrogen); ASP- Asparaginase purificada; L-lisado celular; EXT- Extrato bruto enzimático.

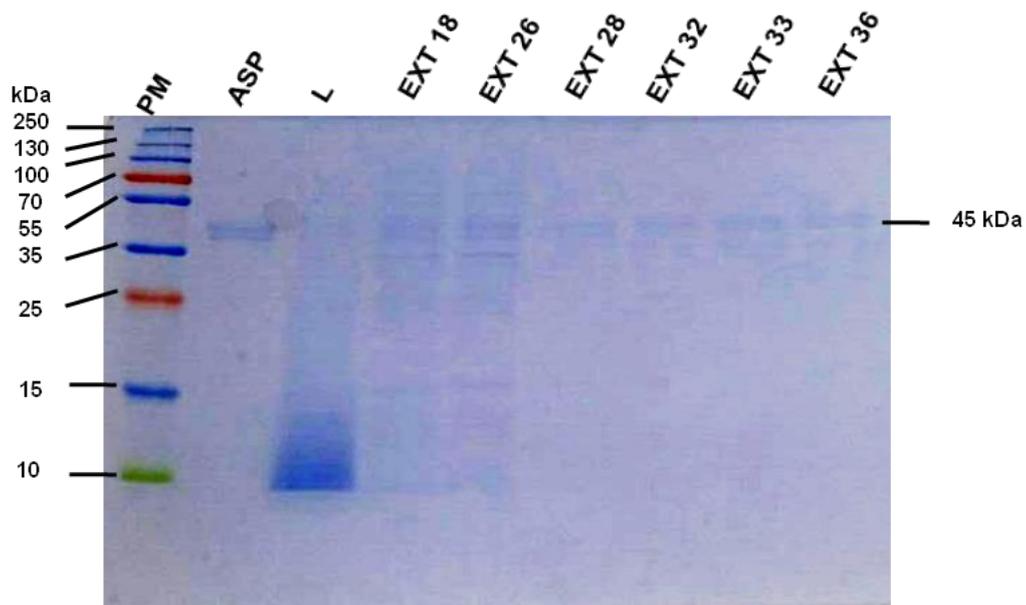


Figura 16: Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE de 10 μ L das amostras que apresentaram rendimento superior a 50% nos ensaios da triagem dos fatores relevantes da composição da solução extratora. PM- Pageruler Plus Prestained Protein Lader (Invitrogen); ASP- Asparaginase purificada; L- lisado celular; EXT- Extrato bruto enzimático.

A análise estatística (Gráfico 3) mostra que os fatores: concentração de fosfato de potássio, concentração de cisteína e pH influenciaram de forma independente no rendimento da extração da asparaginase, sendo o pH com maior intensidade, seguido da concentração de cisteína e concentração de fosfato de potássio. Pois são fatores que se estendem para além da linha de referência, demonstrando sua relevância para a extração. Os coeficientes foram calculados com intervalo de confiança de 95% ($p= 0,05$).

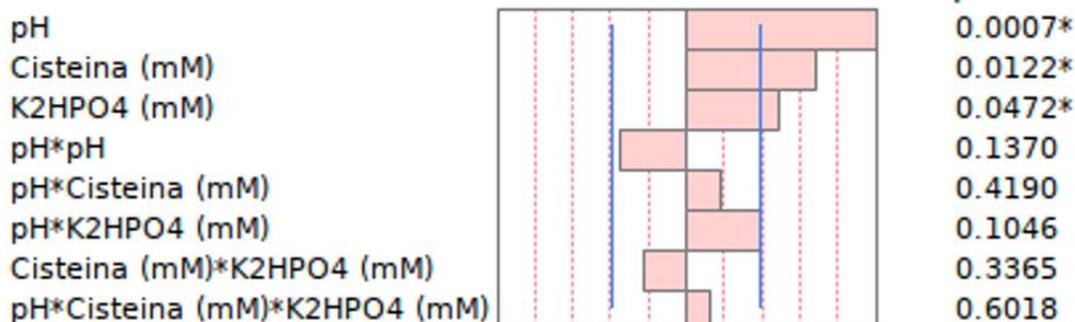


Gráfico 3: Efeito das variáveis da solução extratora (concentração de fosfato de potássio dibásico, concentração de cisteína e pH) na extração da enzima asparaginase no planejamento fatorial completo.

6.2.2.2. Análise de superfície de resposta empregando planejamento de composto central

Métodos de superfícies de respostas são utilizados para examinar as relações entre uma ou mais variáveis e um conjunto quantitativo de fatores experimentais. Esses métodos estatísticos são empregados após uma triagem dos fatores importantes, que geralmente é realizada previamente por um planejamento fatorial. Após isso, é preciso encontrar os níveis de fatores que otimizam a resposta (BRASIL *et al.*, 2007).

Após a triagem das variáveis relevantes (concentração de fosfato de potássio dibásico, concentração cisteína e pH), a otimização da composição da solução extratora foi realizada pelo planejamento de composto central de acordo com a Tabela 7. Os efeitos dos fatores sobre a extração da enzima foram avaliados pela recuperação da atividade asparaginásica no extrato bruto, apresentada no Gráfico 4. Os ensaios que apresentaram rendimento de atividade enzimática superior a 60% foram avaliados quanto à atividade específica (Gráfico 5), apresentando valores entre 24,5 e 31,8 U/mg. O perfil proteico destas amostras é bastante semelhante, com uma proteína majoritária correspondente à enzima asparaginase próxima a 45 kDa, conforme mostra a figura 17.

Tabela 7: Valores das variáveis dependentes (concentração de fosfato, concentração de cisteína e pH) e seus níveis para otimização da solução extratora para otimização por delimitação composto central.

Ensaio	Blocos	K ₂ HPO ₄ (mM)	Cisteína (mM)	pH
1	1	(-1) 100	(1) 10	(+1) 11,50
2	1	(0) 300	(a) 0,85	(0) 11
3	1	(0) 300	(A) 11,15	(0) 11
4	1	(-1) 100	(1) 10	(-1) 10,5
5	1	(0) 300	(A) 11,15	(0) 11
6	1	(1) 500	(-1) 2	(-1) 10,5
7	1	(0) 300	(0) 6	(0) 11
8	1	(0) 300	(0) 6	(a) 10,36
9	2	(0) 300	(0) 6	(0) 11
10	2	(-1) 100	(1) 10	(+1) 11,50
11	2	(-1) 100	(-1) 2	(-1) 10,5
12	2	(0) 300	(0) 6	(0) 11
13	2	(1) 500	(1) 10	(+1) 11,50
14	2	(1) 500	(-1) 2	(-1) 10,5
15	2	(-1) 100	(-1) 2	(+1) 11,50
16	2	(1) 500	(1) 10	(-1) 10,5
17	3	(A) 557,44	(0) 6	(0) 11
18	3	(-1) 100	(-1) 2	(-1) 10,5
19	3	(-1) 100	(-1) 2	(+1) 11,50
20	3	(0) 300	(0) 6	(a) 10,36
21	3	(-1) 100	(1) 10	(-1) 10,5
22	3	(a) 42,56	(0) 6	(0) 11
23	3	(0) 300	(0) 6	(A) 11,64
24	3	(0) 300	(0) 6	(A) 11,64
25	4	(1) 500	(-1) 2	(+1) 11,50
26	4	(0) 300	(0) 6	(0) 11
27	4	(0) 300	(a) 0,85	(0) 11
28	4	(1) 500	(1) 10	(+1) 11,50
29	4	(1) 500	(-1) 2	(+1) 11,50
30	4	(A) 557,44	(0) 6	(0) 11
31	4	(1) 500	(1) 10	(-1) 10,5
32	4	(a) 42,56	(0) 6	(0) 11

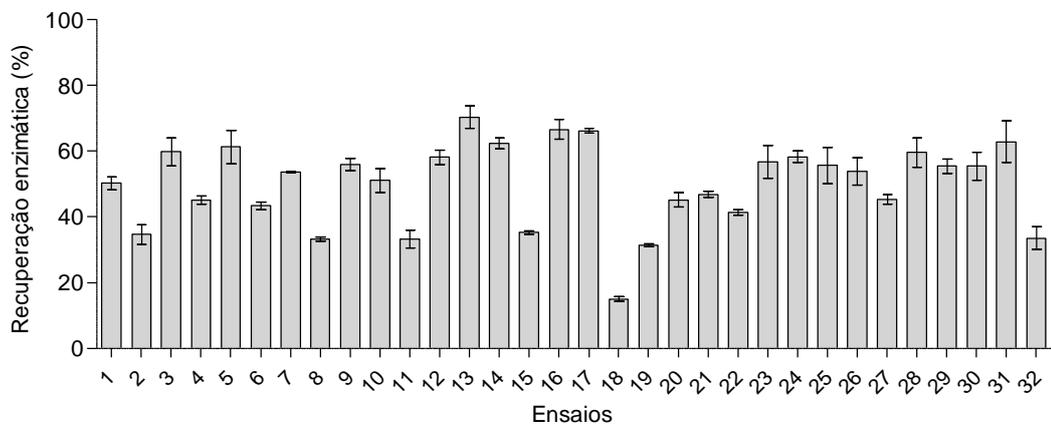


Gráfico 4: Rendimentos obtidos para a extração da enzima asparaginase nos ensaios de composto central para otimização da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) por planejamento experimental.

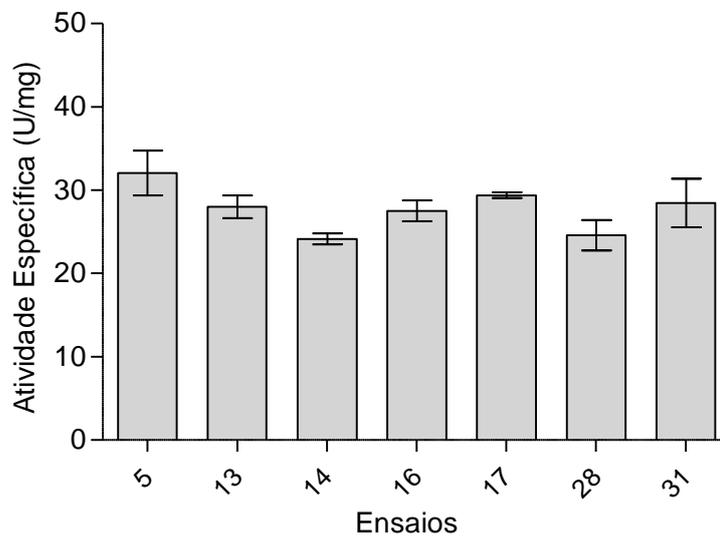


Gráfico 5: Atividade específica das amostras que apresentaram rendimento superior a 60% nos ensaios de composto central para otimização da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) por planejamento experimental.

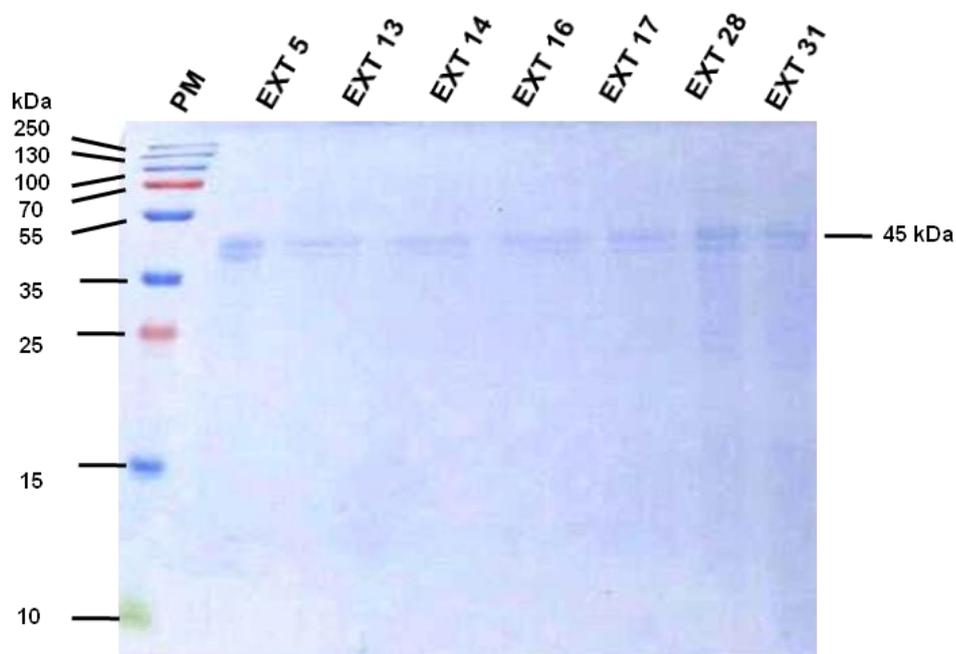


Figura 17: Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE de 10 μ L das amostras que apresentaram rendimento superior a 60% nos ensaios de composto central para otimização da composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) por planejamento experimental. PM- Pageruler Plus Prestained Protein Lader (Invitrogen); ASP- Asparaginase purificada; EXT- Extrato bruto enzimático (5, 13, 14, 16, 17, 28, 31).

De acordo com a análise estatística, apresentada no Gráfico 6, os efeitos lineares da concentração de fosfato, concentração de cisteína e pH do meio reacional, em especial os dois primeiros fatores, foram significativos para a recuperação enzimático extrato bruto. Pois são fatores que se estendem para

além da linha de referência, demonstrando sua relevância para a extração. Os coeficientes foram calculados com intervalo de confiança de 95% ($p= 0,05$).

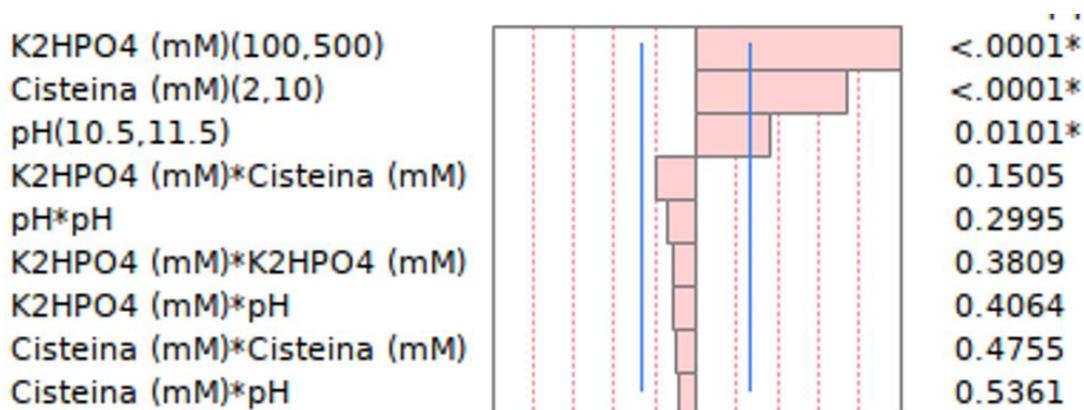


Gráfico 6: Efeitos dos fatores avaliados para composição da solução extratora (fosfato de potássio dibásico, cisteína e pH) no desenho de composto central.

Os perfis da resposta (recuperação da atividade enzimática) em função das variáveis, apresentados no Gráfico 7, mostram que o maior rendimento de extração da asparaginase periplásmica é obtido para a seguinte composição de solução extratora: fosfato de potássio dibásico 500 mM, cisteína 10 mM e em pH 11,2. Com relação às condições empregadas por Ferrara e col.(2010) para a extração da asparaginase (fosfato de potássio dibásico 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,5), observa-se que foi possível reduzir o valor do pH do meio reacional de 11,5 para 11,2, mantendo-se as concentrações de fosfato e de cisteína. Os resultados obtidos também demonstraram que o uso dessas concentrações e de pH alcalino são de extrema importância para o processo de extração, corroborando com dados da literatura (ZHAO, YU, 2001).

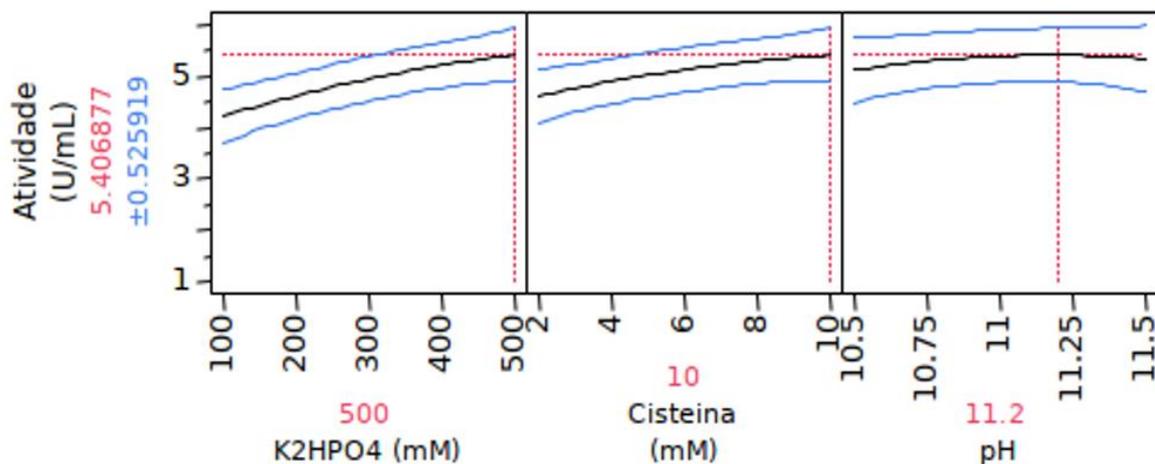


Gráfico 7: Perfis das respostas das variáveis relevantes (concentração de fosfato de potássio, concentração de cisteína e pH) na extração da enzima asparaginase e composição da solução extratora otimizada.

O modelo de previsão para a variável de resposta pode ser descrito pela equação 5.

$$4,381 + 0,827 XF + 0,615 XC + 0,299 XP + FX (CX - 0,188) + FX (PX - 0,107) + CX (PX - 0,079) + FX (FX - 0,136) + CX(CX - 0,111) + PX(PX - 0,162) \text{ (Equação 5)}$$

Onde :

$$F = ((\text{fosfato} - 300) / 200)$$

$$C = ((\text{cisteína} - 6) / 4)$$

$$P = ((\text{pH} - 11) / 0.5)$$

A modelagem de superfície de resposta ajuda na identificação dos níveis em que se atinge o rendimento ótimo de extração para as respostas estudadas (concentração de fosfato de potássio, cisteína e pH), sendo demonstrada no gráfico 8. Observa-se que a resposta (concentração de enzima) aumentou com o aumento da concentração de fosfato de potássio e de cisteína em toda a faixa estudada.

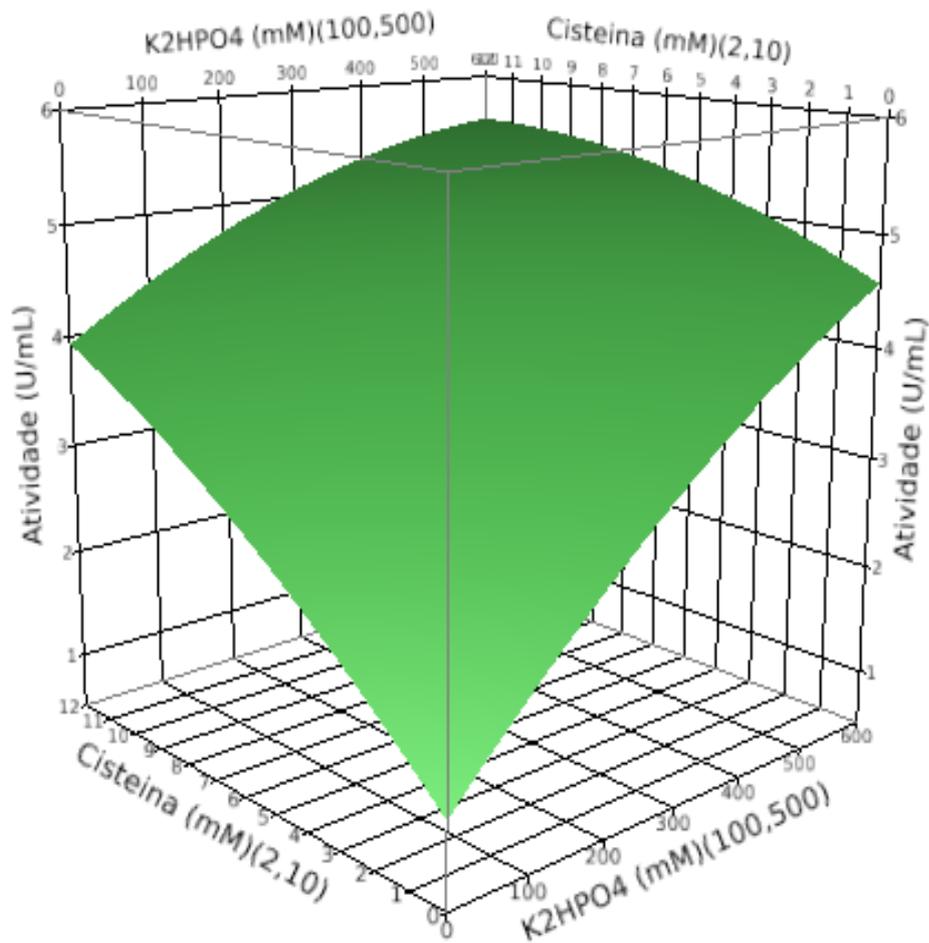


Grafico 8: Superfície de resposta da extração da enzima asparaginase em função das concentrações de fosfato de potássio e cisteína em pH 11,2. Dados obtidos a partir do planejamento experimental realizado conforme a tabela 7.

6.2.3. Avaliação do tempo de extração da enzima asparaginase

Com a finalidade de avaliar a influência do tempo de reação no rendimento de extração da enzima asparaginase, foi realizado um experimento cinético empregando-se a solução extratora otimizada (fosfato de potássio dibásico 500 mM, cisteína 10 mM em pH 11,2) e mantendo-se as mesmas condições do experimento anterior, isto é, temperatura de 28°C, agitação de 200 rpm e proporção massa celular (em peso seco) : volume de solução extratora de 1:70.

Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 9. Observa-se que com 30 minutos de reação, a recuperação da asparaginase foi de 66,13%, aumentando

para 74,22% em 60 minutos. A partir deste ponto, não foi observada variação significativa na recuperação enzimática, demonstrando que em 60 minutos é possível realizar a extração da asparaginase com rendimento satisfatório. Este resultado significa uma redução expressiva, de 120 minutos para 60 minutos, no tempo de extração em relação ao trabalho realizado por Ferrara e col. (2010).

A curva de atividade específica dos extratos enzimáticos (Gráfico 9) seguiu o mesmo perfil cinético observado para a recuperação da asparaginase, obtendo-se entre 23,21 a 25,45 U/mg a partir de 60 minutos de reação. Os perfis proteicos dos extratos enzimáticos obtidos nos diversos tempos de extração, apresentados na Figura 18, são bastante semelhantes, com presença majoritária da enzima asparaginase, indicando que o processo de extração é seletivo, conforme reportado por Ferrara e col. (2010).

Este conjunto de resultados indica que o extrato enzimático apresentou estabilidade nas condições drásticas da extração, uma vez que a recuperação enzimática, a atividade específica e o perfil proteico foram mantidos nos mesmos níveis por pelo menos 210 minutos de processo, corroborando os dados de Ferrara e col. (2010), que observaram estabilidade por no mínimo 18 h de reação.

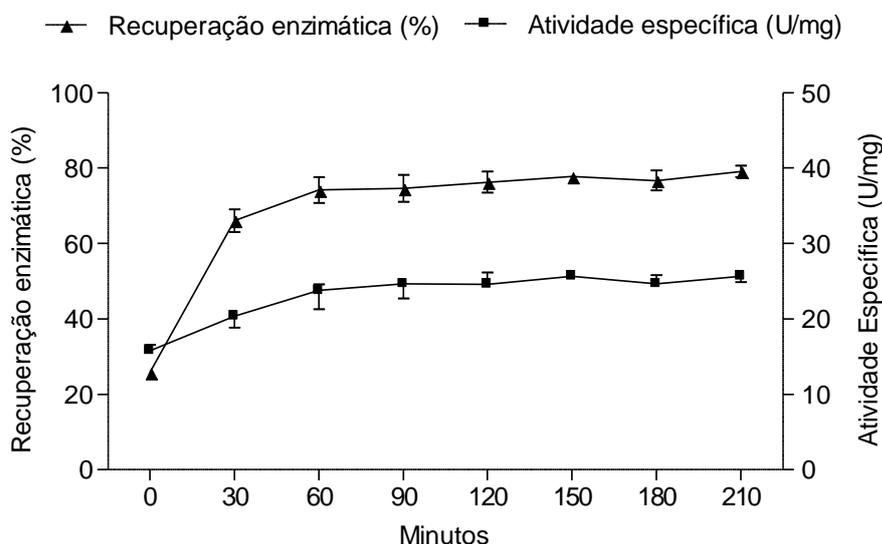


Gráfico 9: Cinética de extração da enzima asparaginase com frações de 10 mL de cultura empregando a solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM em pH 11,2) em 28 °C a 200 rpm.

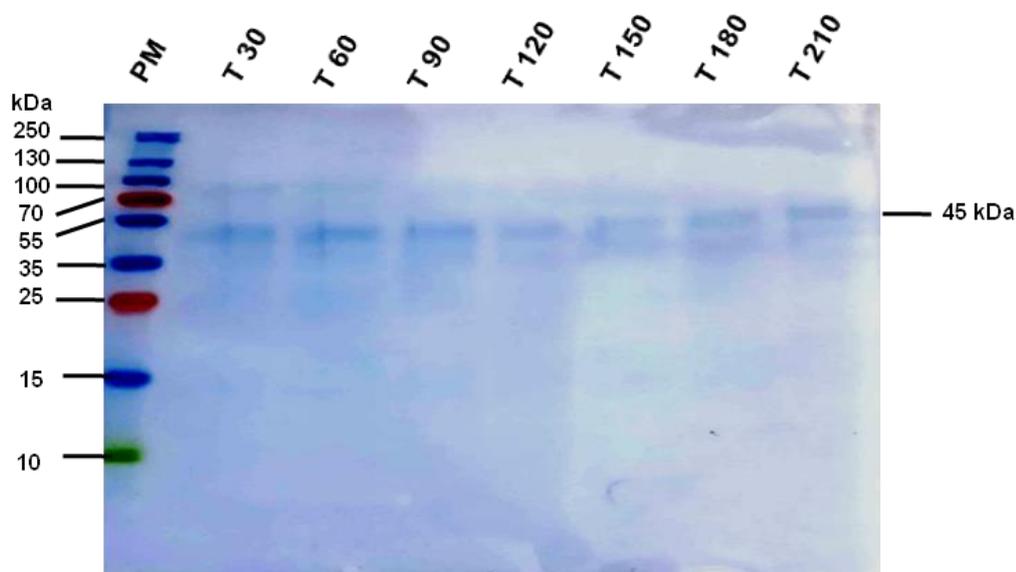


Figura 18: Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE de 10 μ L dos extratos enzimáticos em função do tempo de extração. Condições da extração: 0,085 g de massa celular (base seca); 6,4 mL de solução extratora otimizada (fosfato de potássio dibásico 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2); 28°C; 200 rpm. PM- Pageruler Plus Prestained Protein Lader (Invitrogen), T- Tempo de extração: 30 min; 60 min.; 90 min; 120 min; 150 min; 180 min e 210 min.

6.2.4. Avaliação da temperatura de extração

Para avaliar o rendimento de extração da asparaginase em diferentes temperaturas, foram conduzidos experimentos de extração nas temperaturas de 15, 25 e 28°C. Alíquotas de *pellet* celular correspondentes a 10 mL de cultura, foram tratadas com 6,4 mL de solução extratora otimizada (fosfato de potássio dibásico

500 mM, cisteína 10 mM em pH 11,2), por 1 h a 200 rpm. Os resultados estão apresentados no Gráfico 10 e mostram que para as temperaturas de 25 °C e 28 °C não ocorreu uma variação significativa no rendimento de extração (69,3% e 71,01% respectivamente) e na atividade específica do extrato enzimático (23,43 e 26,43 U/mg. Já a 15°C, tanto o rendimento de extração quanto a atividade específica (59,75% e 9,49 U/mg, respectivamente) foram menores. Esses resultados demonstram que a extração pode ser realizada à temperatura entre 25 e 28 °C e sem um controle rígido de temperatura, ou seja com menor gasto de energia no processo.

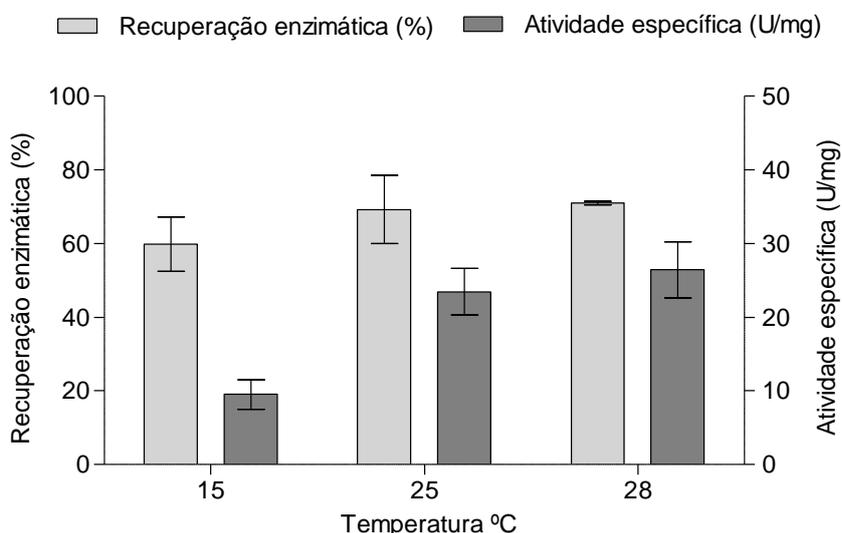


Gráfico 10: Recuperação enzimática e atividade específica dos extratos em função da temperatura de extração da enzima asparaginase. Condições de extração: 0,085 g de massa celular (base seca); 6,4 mL de solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH11,2); 60 min; 200 rpm.

Estes resultados corroboram com o trabalho realizado por Lam e GrootWassink (1985) que extraíram a enzima inulase localizada no espaço periplasmático da levedura *Kluyveromyces fragilis*. A maior recuperação foi obtida para o tratamento das células com solução aquosa de cisteína 8 mM, tampão fosfato 300 mM em pH 8, nas temperaturas de 25 °C e 30 °C por 1 h e 30 minutos, respectivamente, mantendo a viabilidade celular.

Em contraste com nossos resultados, Klis e col.(2007) reportaram maior seletividade na extração de proteínas periplasmáticas de *S. cerevisiae* na presença dos agentes redutores β -mercaptoetanol ou ditioneitol 2 mM, a 4 °C. Segundo os autores, essas condições favoreceriam a integridade da membrana periplásmica, evitando a liberação de proteínas citosólicas.

6.2.5 Avaliação de diferentes proporções de massa celular : solução extratora

No trabalho de extração da asparaginase periplásmica realizado por Ferrara e col. (2010) foi utilizada a proporção de massa celular em peso úmido : solução extratora de 1 g : 10 mL, representando, quando se leva em conta a massa celular seca, a proporção de 1 g : 70 mL. Considerando que o cultivo de *P. pastoris* em biorreator atinge elevada densidade celular, da ordem de 100 g/L em peso seco (FERRARA *et al.*, 2006), para extração da massa celular obtida, por exemplo, em um biorreator de 2 L, seria necessário empregar aproximadamente 15L de solução extratora, volume este consideravelmente grande.

Com a finalidade de reduzir o custo de processo e viabilizar o processo de extração em escala industrial foram realizados ensaios de extração com a mesma quantidade de massa celular utilizada nos ensaios anteriores, empregando-se menores proporções de solução extratora. Os ensaios foram conduzidos a partir de alíquotas correspondentes a 10 mL de cultura, que contém 0,085 g de *pellet* celular seco. As extrações foram realizadas nas condições otimizadas (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2, temperatura de 28 °C e tempo de 60 minutos, empregando-se as seguintes proporções de massa celular seca (g) para solução extratora (mL) 1:70; 1:35; 1:17,5 e 1:7.

Os rendimentos e atividades específicas obtidos para cada ensaio estão dispostos no Gráfico 11.

Observa-se que a recuperação da asparaginase não variou de forma significativa quando do uso das proporções de 1:70, 1:35 e 1:17,5, situando-se na faixa de 75%. Já para a proporção de 1:7, a recuperação enzimática ficou abaixo de 60%. Esses resultados indicam que o volume de solução extratora pode ser reduzido para um valor no mínimo quatro vezes menor do que o empregado no trabalho de Ferrara e col. (2010), significando uma expressiva redução de custos do processo de extração. A atividade específica aumentou com a diminuição do volume

de solução extratora, sugerindo uma maior seletividade para a asparaginase quando do uso de menores quantidades de solução extratora, o que representa uma vantagem adicional.

Os perfis protéicos dos extratos enzimáticos obtidos para as diferentes proporções de solução extratora apresentaram-se semelhantes e demonstram que a asparaginase é majoritária no extrato bruto enzimático, confirmando que este método de extração é seletivo para a asparaginase (Figura 19).

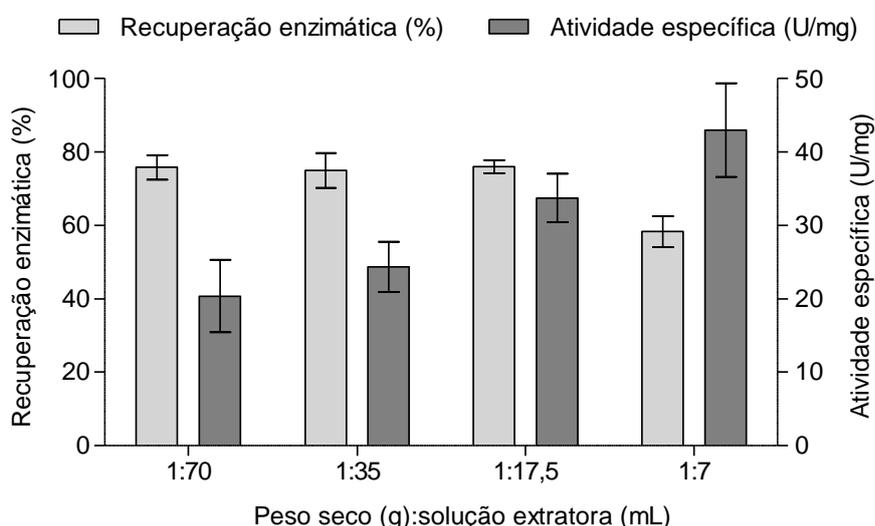


Gráfico 11: Recuperação enzimática e atividade específica dos extratos em função da proporção de peso seco de célula (g) : volume de solução extratora (mL) empregada para a extração da asparaginase. Condições de extração: 0,085 g de massa celular (base seca); solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH11,2); 60 min; 28 °C; 200 rpm.

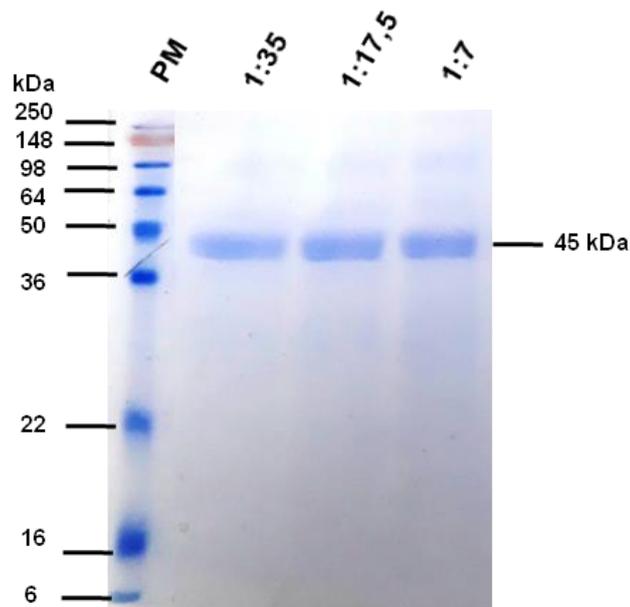


Figura 19: Análise em gel de eletroforese SDS-PAGE de 5 μ g dos extratos enzimáticos obtidos com diferentes proporções de peso seco de célula (g) : volume de solução extratora (mL). Condições de extração: 0,085 g de massa celular (base seca); solução extratora otimizada (fosfato de potássio dibásico 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2); 60 min; 28 °C; 200 rpm. PM- SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (Life technologies). Proporções de massa celular seca (g): volume de solução extratora (mL)- 1:35, 1:17,5 e 1:7.

Os valores de pH inicial e final das extrações estão apresentados no Gráfico 12. Conforme esperado, o ensaio com menor proporção de solução extratora (1:7), apresentou uma maior variação no pH, de 0,69 unidades ($pH_{\text{inicial}} = 11,23$; $pH_{\text{final}} = 10,54$). Esta redução no pH reacional pode estar relacionada à diminuição do rendimento da extração para esta proporção de solução extratora.

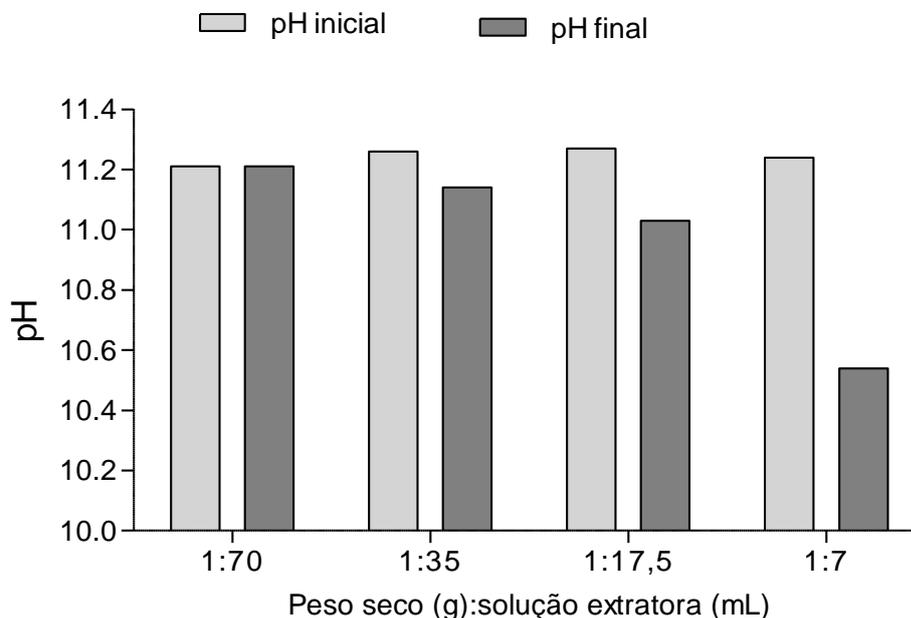


Gráfico 12: Avaliação do pH inicial e final dos extratos em função da proporção peso seco de célula (g) : volume de solução extratora (mL) empregada para a extração da asparaginase. Condições de extração: 0,085 g de massa celular (base seca); solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2); 60 min; 28 °C; 200 rpm.

6.2.5 Transposição das condições ótimas de extração para 0,5 g de *pellet* celular

Os ensaios de otimização do processo de extração da asparaginase periplásmica produzida por *P. pastoris* recombinante foram conduzidos em escala de 0,085 g de massa celular seca. A presente etapa do trabalho teve como objetivo avaliar o uso das condições de extração otimizadas para uma quantidade cinco vezes maior de massa celular, isto é, cerca de 0,5 g de célula (em peso seco). Paralelamente, objetivou-se também testar a resposta do método de extração para um novo lote de células visando avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

Para isto foi realizado um novo cultivo da levedura partindo-se de 1000 mL de meio de cultura. Os dados da cultura, resumidos na Tabela 8, situaram-se dentro da faixa esperada.

Tabela 8: Dados da produção da enzima asparaginase expressa em *P. pastoris* INCQS 50002 para ensaio de extração com 0,45 g de *pellet* celular (peso seco)

Dados da produção	Valores
Volume da cultura	1 L
D.O. (600nm)	34,4
Concentração de massa celular (peso seco)	8,9 g/L
Atividade enzimática por g de célula (peso seco)	916,82 U/g

Ao final do cultivo, a cultura foi fracionada em alíquotas de 50 mL, correspondendo a 0,45 g de massa celular seca.

Inicialmente, foi realizado um experimento cinético, empregando-se as condições otimizadas de extração (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2, temperatura de 28°C) e proporção de massa celular seca (g) para solução extratora (mL) de 1:70, retirando-se alíquotas a cada hora.

O perfil cinético de extração, apresentado no Gráfico 13, foi similar ao realizado com 0,085 g de célula (item 6.2.3, Gráfico 13). Observa-se que com 1 hora de extração, a recuperação da enzima foi de 74,76% \pm 1,04. A partir deste ponto, não foi observada variação significativa na recuperação enzimática, de forma similar à atividade específica, que situou-se em 26,3 U/mg \pm 3,8 com 1 h de extração, estabilizando-se a seguir. Os valores de rendimento de extração e de atividade específica do extrato bruto enzimático obtidos para 0,45 g de *pellet* celular foram semelhantes aos obtidos com quantidade cinco vezes menor de massa celular.

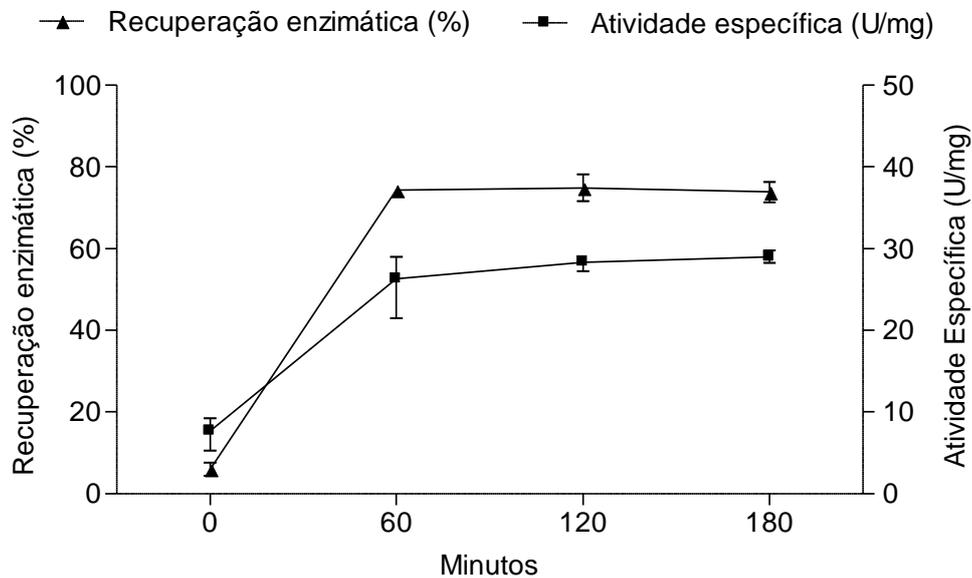


Gráfico 13: Cinética de extração da enzima asparaginase. Condições de extração : 0,45 g de massa celular (base seca); 30 mL de solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH11,2) (proporção 1:70); 28 °C; 200 rpm.

Como próximo passo para verificar a reprodutibilidade dos resultados em escala cinco vezes maior e com um novo lote de células, foram realizados ensaios de extração com 0,45 g de massa celular nas condições otimizadas (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2, tempo de 1 h, temperatura de 28 °C), empregando-se as proporções de massa celular seca (g) para solução extratora (mL) de 1:70, 1:35 e 1:17,5. Os resultados são apresentados no Gráfico 14. Da mesma forma que os dados obtidos para a extração com 0,085 g de célula, não foram observadas variações significativas quando do uso das diferentes proporções de solução extratora, na faixa estudada, confirmando que a extração da asparaginase poder ser conduzida com proporção de solução extratora no mínimo quatro vezes menor do que a utilizada nos ensaios iniciais. Em termos de rendimento de extração e atividade específica da enzima no extrato bruto, os resultados observados para os ensaios com diferentes quantidades de massa celular foram bastante semelhantes, indicando a reprodutibilidade do processo de extração para a faixa estudada.

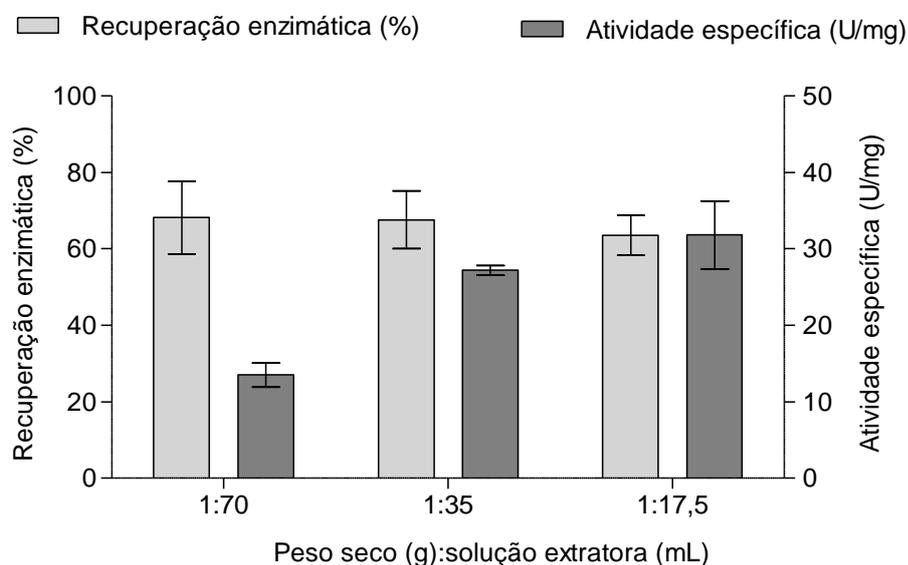


Gráfico 14: Recuperação e atividade específica dos extratos em função da proporção peso seco de célula (g) : volume de solução extratora (mL). Condições de extração: 0,45 g de massa celular (base seca); solução extratora otimizada (fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2); 60 min; 28 °C; 200 rpm.

A tabela 9 compara as características do extrato bruto enzimático resultante do processo anteriormente desenvolvido por Ferrara e col. (2010) com aquelas do extrato enzimático obtido pelo processo otimizado no presente trabalho. Observa-se que a otimização do processo de extração propiciou a obtenção de um extrato enzimático com atividade asparaginásica semelhante, na faixa de 20 U/mL, e com metade da concentração de proteínas totais, conseqüentemente com o dobro de atividade específica, demonstrando que o processo otimizado possui maior seletividade na extração da enzima asparaginase, o que corrobora com o perfil protéico (Figura 17) em que a enzima se encontra majoritária no extrato bruto enzimático.

Tabela 9: Características dos extratos enzimáticos resultantes do processo desenvolvido por Ferrara e col. (2010) e do processo otimizado no presente trabalho.

Processo de extração	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Ferrara e col. (2010)*	1,22	19,1	15,7
Processo otimizado (0,1g de peso seco)**	0,67	22,6	33,7
Processo otimizado (0,5 g de peso seco)**	0,66	20,07	30,5

*Solução extratora: fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM e pH 11,5. Proporção 1:70 (massa celular seca g: volume mL), 28 – 30 °C, 2 h.

** Solução extratora: fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM e pH 11,2. Proporção 1:17,5 (massa celular seca g : volume mL), 28 °C, 1 h.

7 CONCLUSÕES

- O planejamento experimental mostrou que as três variáveis avaliadas para otimização da solução extratora, concentração de fosfato de potássio, concentração de cisteína e pH do meio reacional, foram significativas para a extração da asparaginase periplásmica por choque osmótico em pH alcalino.
- A otimização dessas variáveis por delineamento composto central indicou a seguinte composição ótima para a solução extratora: fosfato de potássio 500 mM, cisteína 10 mM, pH 11,2, significando uma redução de 0,3 unidades de pH em relação ao processo anteriormente desenvolvido.
- O tempo ótimo para extração da asparaginase foi de 60 min, representando uma redução de 60 min em relação ao processo anteriormente desenvolvido.
- A extração pode ser realizada à temperatura ambiente, entre 25 e 28 °C, indicando que não há necessidade de um controle rígido de temperatura, levando a uma diminuição de energia no processo.
- A proporção de volume de solução extratora : massa celular pode ser reduzida de 70 mL para 17,5 mL por grama de célula seca, representando uma redução de quatro vezes em relação ao processo anteriormente desenvolvido. Foi observada maior seletividade para extração da asparaginase quando do uso de menores quantidades de solução extratora, o que representa uma vantagem adicional.
- O processo de extração otimizado foi transposto da escala de 0,085 g de célula para 0,45 g de célula sem alterações significativas no rendimento de extração e na atividade específica do extrato, indicando a reprodutibilidade do processo de extração para a faixa estudada.
- O processo desenvolvido no presente trabalho para a extração da asparaginase expressa em *P. pastoris* resultou em 75 % de recuperação enzimática e permitiu a redução do tempo de processo, da quantidade de insumos e do pH do meio reacional, além da obtenção de extrato enzimático com maior atividade específica, significando uma redução do custo e maior sustentabilidade do processo de extração.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar o rendimento de extração da asparaginase utilizando proporções de massa celular seca (g) : volume de solução extratora (mL) entre 1:17,5 e 1:7.
- Transpor o processo de extração otimizado para escala de 10 g de célula em peso seco.
- Realizar a extração da asparaginase em condições otimizadas a partir de células obtidas em cultivo de alta densidade celular em biorreator de 2L.
- Testar o processo de purificação já desenvolvido para a asparaginase expressa em *Pichia* no extrato enzimático obtido nas condições otimizadas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABI, N.; ROSTAMINEZHAD, P.; BEHNAMMOGH DAM, M.; RAHMANI, F. Management and treatment in acute lymphoblastic leukemia: A review article. **Adv Env Biology**, v.8, n. 10, p. 1642-1647, 2014.
- ALI, A.U.; NAVEED, M.; ULLA, A.; ALI, K.; SAHA, A.S.; FAHAD, S.; MUMTAZ, A.S. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European J Pharmacol**, v. 771, p. 199–210, 2016.
- ALLEN, J.R.; PATKAR, A.Y.; FRANK, T.C.; DONATE, F.A.; CHIU, Y.C.; SHIELDS, J.E.; GUSTAFSON, M.E. Use of glycol ethers for selective release of periplasmic proteins from Gram-negative bacteria. **Biotechnol Prog**, v. 23, n. 5, p. 1163-70, 2007.
- ARIGA, O.; WATARI, T.; ANDOH, Y.; FUJISHITA, Y.; SANO, Y. Release of thermophilic α -amylase from transformed Escherichia coli by addition of glycine. **J Ferment Bioeng**, v. 68, n. 243, 1989.
- ASSELIN, B.L. The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. **Adv Exp Med Biol**, n 457, p. 621–629, 1999.
- ASSELIN, B.L.; LORENSEN, M.Y.; WHITIN, J.C. Measurement of serum L-asparagine in the presence of L-asparaginase requires the presence of an L-asparaginase inhibitor. **Cancer**, v. 51, p. 6568-6573, 1991.
- ASSELIN, B.L.; RYAN, D.; FRANTZ, C.N. In vitro and in vivo killing of acute lymphoblastic-leukemia cells by L-asparaginase. **Cancer Res**, v. 49, p. 4363-8, 1989.
- ASSLIN, B.; RIZZARI, C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. **Leukemia e Lymphoma**, v. 56, n. 8, p. 2273–2280, 2015.
- AVRAMIS, V.I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Res**, v. 32, n. 7, 2423–37, 2012.
- AVRAMIS, V.I.; ETTINGER, L.; MARTIN-ARAGONM; S. Determination of anti-asparaginase antibody in pediatric patients in a high risk ALL study (CCG 1961): correlation of AB and clinical allergy. **Proc Am Soc Clin Oncol**, v. 9, p. 589, 2000.
- AVRAMIS, V.I.; PANOSYAN, E.H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. **Clin Pharmacokinet**, v. 44, p. 367-93, 2005.
- AVRAMIS, V.I.; PERICLOU, P.; MAJLESSIPOUR, F. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of PEG-asparaginase in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: CCG 1962. **Blood**, v. 94, p. 295, 1999.
- AVRAMIS, V.I.; SPENCER, S.; PERICLOU, A.P. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**, v. 99, p. 1986-94, 2002.

BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.T.L. Influence of the extent of disruption of bakers' yeast on protein adsorption in expanded beds. **J Biotechnol**, v. 133, p. 360–369, 2008.

BALASSUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D.G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, 2009.

BANSAL-MUTALIK, R.; GAIKAR, V.G. Cell permeabilization for extraction of penicillin acylase from *Escherichia coli* by reverse micellar solutions. **Enzyme Microb Technol**, v. 32, n. 14, 2003.

BANSAL-MUTALIK, R.; GAIKAR, V.G. Reverse micellar solutions aided permeabilization of baker's yeast. **Process Biochem**, v. 41, p. 133–41, 2006.

BARROS, N.E.; SCCARMIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. **Editora da Unicamp**, Campinas, SP. 2001.

BATOOLL, T.; MAKKY, E.; JALAL, M.; YUSOFF, M.A. Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 178, p. 900–923, 2016.

BELVISO, S.; IULIANO, R.; AMATO, R.; PERROTTI, N.; MENNITI, M. The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 174 -178, 2017.

BON, E.P.S.; CARVAJAL, E.; STAMBROUGH, M.; MAGASANIK, B. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: GLN3/URE2. Regulation of a periplasmic enzyme. **Applied Biochem Biotechnol**, v. 63-65, p. 203-212, 1997.

BOREK, D.; JASKOLSKI, M. Crystallization and preliminary crystallographic studies of a new L-asparaginase encoded by the *Escherichia coli* genome. **Acta Crystallogr**, v.56, p.1505–1507, 2001.

BOWMAN, S.M.; FREE, S.J. The Structure and Synthesis of the Fungal Cell Wall. **Bioessays**, v. 28, p. 799–808, 2006.

BOYSE, E.A.; OLD, L.J.; STOCKERT, E. Inhibitory effect of guinea pig serum on a number of new leukaemias in mice. **Nature**, v. 25; n. 198, p. 800–800, 1963.

BOYSE, E.; OLD, L.; CAMPBELL, H.; MASHBURN, L. Suppression of murine leukemias by L-asparaginase, incidence of sensitivity among leukemias of various types: Comparative inhibitory activities of guinea pig serum L-asparaginase and *Escherichia coli* L-asparaginase. **J Exp Med**, v.125, p.17–31, 1967.

BRADFORD, M. M.A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, J.L.; VAGHETTI, J.C.P.; ROYER, B.; JUNIOR, A.A.S.; SIMON, N.M.; PAVAN, F.A.; DIAS, S.L.P.; LIMA, E.C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada

utilizando-se casca de nozes pecã como bioissorvente. **Quim Nova**, v. 30, n. 3, p. 548-553, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

BRINKS, V.; JISKOOT, W.; SCHELLEKENS, H. Immunogenicity of Therapeutic Proteins: The Use of Animal Models. **Pharm Res**, v. 28, p. 2379–2385, 2011.

BROOME, J. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, v. 191, p. 1114–1115, 1961.

BRUNEAU, L.; CHAPMAN, R.; MARSOLAIS, F. Co-occurrence of both L-asparaginasesubtypes in Arabidopsis: At3g16150 encodes a K⁺ dependent L-asparaginase. **Planta**, v. 224, n. 3, p. 668-79, 2006.

BUCKHOLZ, R.; GLEESON, M. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Nat Biotechnology**, v.9, p. 1067–1072, 1991.

CACHUMBA, J.J.M.; ANUNES, F.A.F.; PERES, G.F.D.; BRUMANO, L.P.; SANTOS, J.C.; SILVA, S.S. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian J of Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 77-85, 2016.

CAZÉ, M.O.; BUENO, D., SANTOS, M.A.F. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **HCPA**, v. 30, n. 1, p. 5-12, 2010.

ÇELIK, E.; ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnol Advances**, v. 30, p. 1108–1118, 2012.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbiol Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CHAN, W.K.; LORENZI, P.L.; ANISHKIN, A. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, v. 123, n. 23, p. 3596– 3606, 2014.

CLEMENTI, A. La Désamidation Enzymatique De L'asparagine Chez Les Différentes Espèces Animales Et La Signification Physio Logique De Sa Presence Dans L'organisme. **Arch Physiol Biochem**, v. 19, n. 4, p. 369–398, 1922.

COSTA, I.M.; SCHULTZ, L.; DE ARAUJO B.P.; PEDRA B. A.B.; FARSKY, S.H.P.; OLIVEIRA, M.A.; PESSOA, A.; MONTEIRO, G. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Sci Rep**, v. 6, n. 36239, 2016.

CREGG, J.M.; CEREGHINO, L.; SHI, J.; HIGGINS, D.R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol Biotech**, v.16, p. 23–52, 2000.

DALY, R.; HEARN, M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recognit**, v. 18, p. 119–138, 2005.

DAMASCENO, L. M.; HUANG, C.J.; BATT, C.A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, p. 31-39, 2012.

DE NOBEL, J. G., DIJKERS, C., HOOIJBERG, E. AND KLIS, F. M. Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. **J Gen Microbiol**, v.135, p. 2077-208, 1989.

DE NOBEL, J.G.; KLIS, F. M.; PRIEM, J.; MUNNIK, T.; VAN DEN, H. The Glucanase-Soluble Mannoproteins Limit Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 6, n. 49, p. 1499, 1990.

DORIYA, K.; KUMAR, D.S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal. **Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2016.

DUNLOP, P.C.; MEYER, G.M.; BAN, D.; ROON, R.J. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. **J of Bacteriology**, v. 253, n. 4, p. 1297-1304, 1978.

EGLER, R.A.; AHUJA, S.P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leucemia. **J of Pharmacol and Pharmacotherap**, v. 7, n. 2, 2016.

FENTON, D.M. Solvent treatment for α -D-galactosidase release from yeast cells. **Enzyme Microb Technol**. v. 4, p. 229–32, 1982.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International J of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FERRARA, M.A.; MATTOSO, J.M.V.; BON, E.P.S.; PEREIRA, J.N. Kinetics of asparaginase II fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* ure2d al 80 mutant: Effect of nitrogen nutrition and pH. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 113, n. 116, p. 299-305, 2004.

FERRARA, M.A.; SEVERINO, N.M.B.; MANSURE, J.J.; MARTINS, A.S.; OLIVEIRA, E.M.M.; SIANI, A.C.; PEREIRA, J.N.; TORRES, F.A.G.; BON, E.P.S. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme Microb Technol**, v. 39, p. 1457-1463, 2006.

FERRARA, M.A.; SEVERINO, N.M.B.; VALENT, R.H.; PERALES, J.; BON, E.P.S. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 47, p. 71-76, 2010.

FERRARA, M.A.; SIANI, A.C.; BON, E.P.S.; TORRES, F.A.G.; MARTINS, A.S.; OLIVEIRA, E.M.M.; PEREIRA, J.N.; CAVALCANTI, N.M.B.S. Processo para produção da enzima antileucêmica asparaginase a partir da clonagem do gene *ASP3* de *Saccharomyces cerevisiae* em uma levedura metilotrófica. **Patente**. PI 0406168-3, 09/12/2004.

FIOCRUZ- Prospecção referente a l-asparaginase de *Escherichia coli*, *saccharomyces cerevisiae*, de origem humana; propriedade intelectual e estudo de mercado. Coordenação de Gestão de Tecnológica / **GESTEC**- Rio de Janeiro: 2017.

FONSECA, L.P.; CABRAL, J.M.S. Penicillin-acylase release from *Escherichia coli* cells by mechanical cell disruption and permeabilization. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 77, p. 159–167, 2002.

FRENCH, C.; KESHAVARZ-MOORE, E.; JOHN M. Ward Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 332-338, 1996.

FRENCH, C.; KESHAVARZ-MOORE, E.; WARD, J.M. Development of a Simple Method for the Recovery of Recombinant Proteins from the *Escherichia coli* Periplasm. **Enzyme Microb Technol**, v. 19, p. 332–338, 1996.

GAENSLY, F. Incorporação de ferro pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sua influência na formação de biomassa e na capacidade fermentativa. 2010. 77. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos. 2018.

GECIOVA, J.; BURY, D.; J, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry review. **International Dairy J**, v. 12, p. 541–553, 2002.

GIRÃO, L.F.C. Escalonamento da purificação, estudo estrutural e formulação de asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* clonada e expressa em *Pichia pastoris*. **Tese de doutorado** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química. 2018.

GIRÃO, L.F.C.; ROCHA, S.L.G.; SOBRAL, R.S.; BOM, A.P.D.; SAMPAIO, A.L.F.; JUNIOR, J.G.S.; FERRARA, M.A.; BOM, E.P.; PERALES, J. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukemic drug: Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 118-125, 2016.

GIRÃO, L.F.C.; ROCHA, S.L.G.; TEXEIRA, R.S.S.; BOM, A.P.A.; SAMPAIO, A. L. F.; SILVA, J.G.; FERRARA, M.A.; BOM, E.P.S.; PERALES, J. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukaemic drug: purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 118-125, 2016.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.I. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546–67, 1996.

GRIGOROPOULOS, N.F.; PETTER, R.; VAN'T'VEER, M.B.; SCOTT, M.A.; FOLLS, G.A. Leukemia up date. Part 1: diagnosis and management. **BMJ**, v. 346, p. 660, 2013.

HÄBERLE . Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. **Orphanet J of Rare Diseases**, v. 7, n. 32, 2012.

HAK, L.J. Asparaginase pharmacodynamics differ by formulation among children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 6, p. 1072–1077, 2004.

HAMILTON, S.R.; BOBROWICZ, P.; BOBROWICZ, B. Production of complex human

glycoproteins in yeast. **Science**, v.301, n.5637,p. 1244–1246, 2003.

HEYLAND, J.; FU, J.A.; BLANK, L.M.; SCHMID, A. Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. **Biotechnol Bioeng**, v.107, p. 357–68, 2010.

HIJIYA, N.; SLUIS, I.M.V. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia e linfoma**, v. 5, n. 4, p. 748–757, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil)- ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; organização Mario Jorge Sobreira da Silva. – 4. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: **INCA**, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil) Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: **INCA**, 2017.

JAHIC, M.; VEIDE, A.; CHAROENRAT, T.; TEERI, T.; ENFORS, S.O. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. **Biotechnol Prog**, v. 22, n. 6, p. 1465-73, 2006.

JAIN, R; ZAIDI, K.U.; VERMA, Y.; SAXENA, P. L-Asparaginase: A Promising Enzyme for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **People's J of Scientific Research**, v. 5, n. 1, 2012.

JOZALA, A.F.; GERALDESB, D.C.;TUNDISIB L.L. FEITOSA, V.A.; BREYERD A.C.;CARDOSOE,S.L.; MAZZOLAF,P.G. OLIVEIRA-NASCIMENTOF, L.; RANGEL-YAGUIC, C.O.; MAGALHÃES, P.O.; OLIVEIRA, M.A.; JR, A.P. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian j of microbiol**, v. 4, n. 7, p. 51–63, 2016.

LANVERS-KAMINSK, C. Cancer Chemother Pharmacol.Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 79, n. 3, p. 439-450, 2017.

KEATING, M.J. L-asparaginase and PEG asparaginase – past, present, and future. **Leuk Lymphoma**, v. 10, p. 153–157, 1993.

KEATING, M.J.; HOLMES, R.; LERNER, S.; HO, D.H. L-Asparaginase and PEG Asparaginase Past, Present, and Future. **Leukemia and Lymphoma**, v. 10, p.153-157, 1993.

KESSLER, M.; GOLDSMITH, D.; SCHELLEKENS. H. Immunogenicity of biopharmaceuticals. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, n. 5, p. 9–12, 2006.

KIDBY, D.K.; DAVIES, R. Thiol induced release of invertase from cell walls of *Saccharomyces fragilis*. **Biochim Biophys Acta**, v. 20, p. 261–6, 1970.

KIDD, J.G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by meansof normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kindsin mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **J Exp Med**, v. 98, n. 6, p. 565–582, 1953.

KLIS, F.M.; JONG, M.; BRUL, S.; PIET W. J. Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells de Groot. **Yeast**, v. 24, p. 253–258, 2007.

KOLLAR, R.; REINHOLD, B.B.; PETRAKOVA, E.; YEH, H.J.; ASHWELL, G.; DRGONOVA, J. Architecture of the yeast cell wall. β (1-6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1-3)-glucan, and chitin. **The J of Bio Chem**, v. 272, p. 17762–17775, 1997.

KOPRIVINAKAR, J.; McCLOSKEY; FARDEL, S. Safety, efficacy, and clinical utility of asparaginase in the treatment of adult patients with acute lymphoblastic leucemia. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 1413–1422, 2017.

KRISHNAPURA, P.R.; BELUR, P.D.; SUBRAMANYA, S. A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases. **Crit Rev Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 720–737, 2016.

LAM, K.S.; GROOTWASSINK, J.W.D. Efficient, non-killing extraction of α -D-fructofuranosidase (an exo-inulase) from *Kluyveromyces fragilis* at high cell density. **Enzyme Microb Technol**, v. 7, p. 239–42, 1985.

LARSON, R.A. Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 12, n. 5, p. 660–665, 1998.

LEITE, E.P.; MUNIZ, M.T.C.; AZEVEDO, A.C.A.C.; SOUTO, F.R.; MAIA, A.C.L.; GONDIM, C.M.F. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Rev Bras Saude Mater Infant**, v. 7, n. 4, p. 413-21, 2007.

LI, P.; ANUMANTHAN, A.; GONG, X.; GAO, G.; KUPPUSAMY, G.; ILANGOVAN, K.; VECENT, V.; DUZGUNES, N.; RENUGOPALAKRISHMAN V. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 142, p. 105–124, 2007.

LIN, C.; J., CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol**, v. 24, p. 45–66, 2000.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. **J of Bacteriol**, p. 3735–3740, 1998.

LIU, D.; DING, L.; SUN, J.; BOUSSETTA, N.; VOROBIEV, E. Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 181–192, 2016.

LOPES, A.M.; NASCIMENTO, O.L.; RIBEIRO, A.; TAIRUM, C.A., BREYER, C.A.; OLIVEIRA, M.A.; MONTEIRO, G.; MOTTA, S.C.M.; MAGALHÃES, P.O.; AVENDAÑO, J.G.; CAVACO, P.A.M.; MAZZOLA, P.G.; YAGUI, R.C.O.; SETTE, L.D.; CONVERT, A.; PESSOA, A. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Crit Rev Biotechnol**, v. 37, n. 1, p. 82-99, 2015.

MACAULEY, P.S.; FAZENDA, M.L.; McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v., 22, p. 249–270, 2005.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249–70, 2005.

MATTANOVICH, D.; GRAF, A.; STADKMANN, J.; DRAGOSITS, M.; REDL, A.; MAURER, M. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. **Microb Cell Fact**, v. 8, n. 29, 2009.

MENEGUETTI, G.P. Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando a tecnologia de pegulação. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Tecnologia bioquímico-Farmacêutica. Universidade de São Paulo. 2017.

MIDDELBERG, A.P.J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnol Adv**, v. 13, p. 491–55, 1995.

MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 704, DE 8 DE MARÇO DE 2017. Define a lista de produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS), nos termos dos anexos a esta Portaria. Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saldelegis/gm/2017/prt070410032017.html>>. Acesso em: 20 jun, 2017.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments, 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991.

MULLER, H.J.; BOOS J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 28, p. 97-113, 1998.

NARTA, U.K.; KANWAR, S.S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 61, p. 208-21, 2007.

OLIVEIRA, E.M.M.; CARVAJAL, E.; MARTINS, A. S.; BON, E.P.S. The role of GATA factors Nil1p and Dal80p on ASP3 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, p.31-37, 2003.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 23, p. 655–674, 2009.

OUTSCHOOTN, M.U.E.; PAGES, M.P.; PESTELL, R.G.; SOTGIA, F.; LISANTI, M.P. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. **Nature Reviews Clin Oncol**, v. 14, n. 11–31, 2017.

PANOSYAN, E.H.; SEIBEL, N.L.; MARTIN, A.S. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 26, p. 217–226, 2004.

PARMENTIER, J.H.; MAGGI, M.; TARRASCO, E. Glutaminase activity determines cytotoxicity of L-asparaginases on most leukemia cell lines. **Leukemia**, v. 39, n. 7, p. 757–762, 2015.

PEDROSA, F.; MECNEIDE, L. Leucemia Linfóide aguda: uma doença curável. **Rev Bras Saúde Mater Infant**, v. 2, n. 1, p. 63-8, 2002.

PIETER, R. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2010.

PIETERS, R.; HUNGER, S.P.; BOOS, J.; RIZZARI, Z.; SILVERMAN, L.; BARUCHEL, A.; GOEKBUGET, N.; SCHAPPE, M.; PUI, C.H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2011.

PINGZUO, L.; ANUMANTHA, A.; GAO, X.H.; ILANGO VAN, K.; SUZARA, V.V.; DUZGUNES, N.; GOPALAKRISHAN, V. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 142, p. 105–124, 2007.

PINHEIRO, A.M.S. Avaliação das propriedades bioquímicas e físico-químicas da enzima asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante. **Dissertação de mestrado**. Farmanguinhos/Fiocruz, Pós graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na indústria Farmacêutica-Rio de Janeiro, 2015.

ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Curr Opin Biotechnol**, v. 6, p. 527–533, 1995.

ROTH, G.; NUNES, J. E. S.; ROSADO, L. A.; BIZARRO, C. V.; VOLPATO, G.; NUNES, C.P.; RENARD, G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D. S.; CHIES, J.M. Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch culture. **Brazilian J of Chem Eng**, v. 30, n. 02, p. 245 - 256, 2013.

SCHMIEGELOW, K.; VESTERGAARD, T.; NIELSEN, S.M.; HJALGRIM, H. Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. **Leukemia**, v. 22, n. 12, p. 2137-2141, 2008.

SHIRIVASTA, A.; HAHAN, A.A.; KHURSHID, M.; KALAN, M.A.; Jain, S.K.; SIGGHAL, P.K. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Onco Hematol**, v. S1040, p. 1–12, 2016.

SILVA, J.A.; DAMASCENO, D.B.G.L.; SILVA, F.L.H.; MADRUGA, M.S.; SANTANA, D.P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta par otimização da fermentação alcoólica. **Quim Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008.

SINCLAR, K.; WARNER, J.P.; BONTHRON, D.T. The ASP1 gene *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracelular isozyme of L-asparaginase. **Gene**, v. 144, p.37–43, 1994.

SMITH, M.; ARHUR, D.; CAMITTA, B. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 14, p. 18-24, 1996.

UENO, T.; OHTAWA, K.; , MITSUI, K.; KODERA, Y.; HIROTO, M.; MATSUSHIMA., A.; INADA, Y.; NISHIMURA, H. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. **Leukemia**, v. 11, p. 1858–1861, 1997.

VASSILIOS, I.; AVRAMIS, E.H. Panosyan. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationships of Asparaginase Formulations: The Past, the Present and Recommendations for the Future. **Clin Pharmacokinet**, v. 44, n. 4, 2005.

VERMA, N.; KUMAR, K.; KAUR, G.; ANAND, S. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Crit Rev Biotechnol**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.

VERONESE, F.M.; PASUT, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 21, p. 1451–1458, 2005.

VIMAL, A.; KUAR, A. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. **Biotech and genetic eng reviews**, v. 33, p. 40-61, 2017.

WALTHER, C.; DARAUER, A. Microscale disruption of microorganisms for parallelized process development. **Biotechnol J**, v. 12, n. 1600579, 2017.

WEIMBERG, R.; ORTON, W.L. Elution of exocellular enzymes from *Saccharomyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, v. 91, p. 10–13, 1966.

WEISS, M.A.; LAMANNA; N. In adult ALL, less is now more. **Blood**, v. 107, p. 852-853, 2006.

WENGER, M.D.; DE PILLIPS, P.; BRACEWELL, D.G.A Microscale Yeast Cell Disruption Technique for Integrated Process Development Strategies. **Biotechnol Prog**, v. 24, n. 606–614, 2008.

WENNER, K.A. asparagine concentration in plasma after 2,500 IU/m² PEG-asparaginase i.v. in children with acute lymphoblastic leukemia. **Klin Padiatr**, v. 217, n. 6, p. 321–326, 2005.

WERTEN, M.W.T.; VAN DEN BOSCH, T.J.; WIND, R.D.; MOOIBROEK, H.; WOLF, F.A. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 15, n.11, p. 1087–1096. 2000.

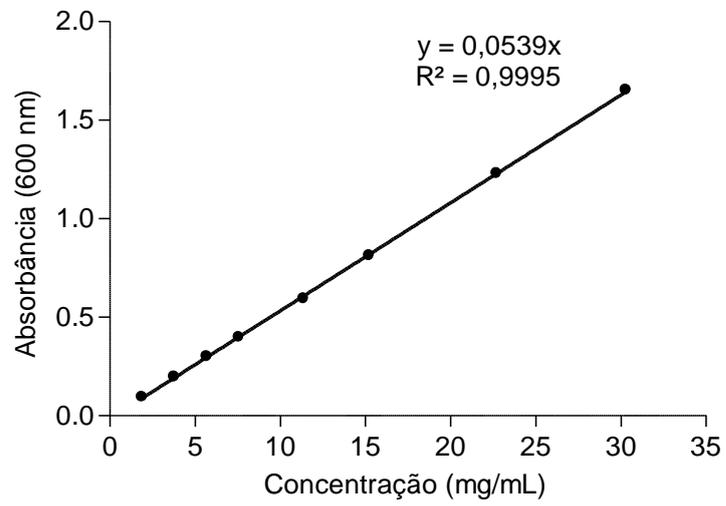
WOO, M.H.; HAK, L.J.; STORM, M.C.; SANDLUND, J.T.; RIBEIRO, R.C.; RIVERA, G.K.; RUBNITZ, J.E.; HARRISON, P.L.; WANG, B.; EVANS, W.E.; PUI, C.H.; RELLING, M.V. Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 7, p. 1525–1532, 2000.

WORKMAN, W.E.; DAY, D.F. Purification and properties of the beta fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **FEBS Lett**, v. 160, p. 16–20, 1983.

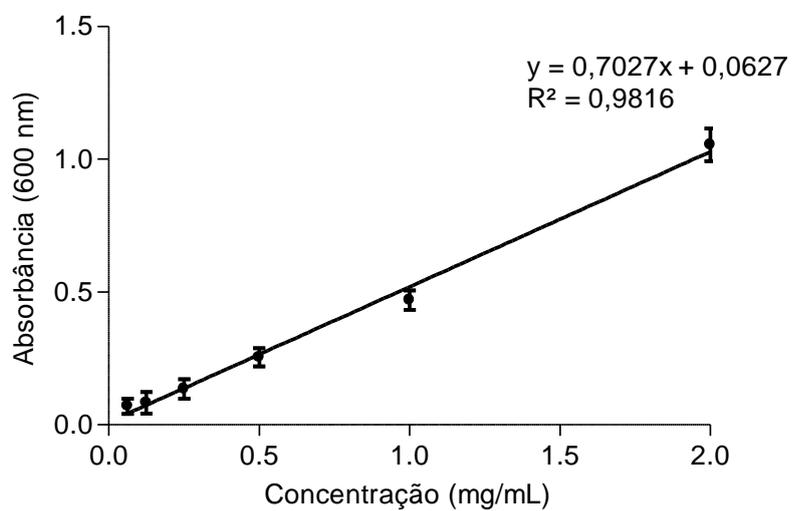
ZHAO, F.; YU, J. L-Asparaginase release from *Escherichia coli* cells with K₂HPO₄ and Triton X-100. **Biotechnol Prog**, v. 17, p.490–494, 2001.

ZEIDAN, A. Pegasparaginase: where do we stand?. **Expert Opin Biol Ther**, v. 9, n. 1, p. 111–119, 2009.

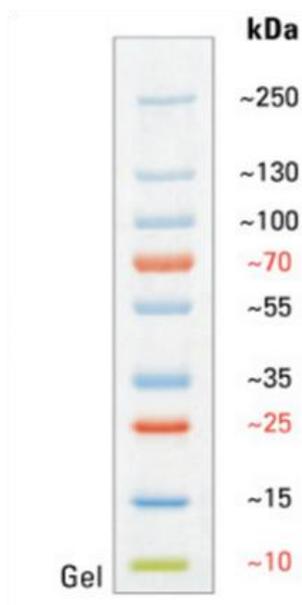
ANEXO A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO



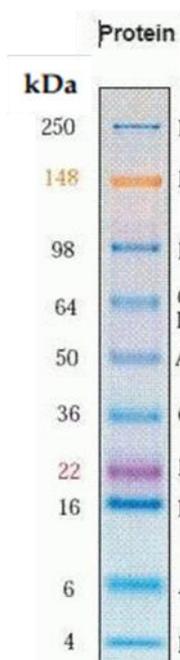
ANEXO B – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA



ANEXO C – PADRÃO DE PESO MOLECULAR



Pageruler Plus Prestained Protein Lader (Invitrogen)



SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard (Life technologies)