

Adriana Michelli Silva Pinheiro

**Avaliação das propriedades bioquímicas e físico-químicas da
enzima asparaginase produzida por *Pichia pastoris*
recombinante**

Rio de Janeiro

2015

Adriana Michelli Silva Pinheiro

**Avaliação das propriedades bioquímicas e físico- químicas da enzima
asparaginase produzida por
Pichia pastoris recombinante**

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 – FIOCRUZ

Orientadora : Dr^a. Maria Antonieta Ferrara

Rio de Janeiro
2015

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

P654a Pinheiro, Adriana Michelli Silva

Avaliação das propriedades bioquímicas e físico-químicas da enzima asparaginase produzida por *Pichia pastoris* recombinante. / Adriana Michelli Silva Pinheiro. – Rio de Janeiro, 2015.

xiv, 58f. il : 30 cm.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Antonieta Ferrara

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2015.

Bibliografia: f. 54-58

1. Asparaginase. 2. *Pichia pastoris*. 3. Câncer. 4. Leucemia Linfoblástica Aguda. 5. Cinética enzimática. 6. Título.

CDD 571.9

Adriana Michelli Silva Pinheiro

**Avaliação das propriedades bioquímicas e físico-químicas da enzima
asparaginase produzida por
Pichia pastoris recombinante**

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 29 de Maio de 2015.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a Maria Antonieta Ferrara
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (Presidente da Banca)

Prof. Dr. Ricardo Sposina Teixeira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr^a Edna Maria Moraes Oliveira
EMBRAPA

Prof^a. Dr^a Mariana Conceição de Souza
Farmanguinhos-FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2015

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu querido Deus, por ter realizado o desejo do meu coração.
E a toda a minha família, especialmente meus filhos Jonathas, Victor e Nicholas
por todo o amor e compreensão que demonstraram nesse grande desafio em
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Quero, primeiramente, agradecer a Deus, por ter aberto esta porta para mim e ter me dado forças e as suas bênçãos para prosseguir, e a inspiração, sabedoria e discernimento em toda esta trajetória.

A minha orientadora Dr Maria Antonieta Ferrara, por ter me dado esta oportunidade, pela confiança depositada em mim, paciência, dedicação, compreensão, atenção e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos e que além de orientadora, se mostrou uma verdadeira amiga e motivadora para a realização e conclusão deste trabalho.

A minha família, em especial, Marcos Elias e aos meus filhos Jonathas, Victor e Nicholas, pelo carinho, amor, compreensão, apoio, por terem sido meus verdadeiros companheiros e os meus maiores incentivadores para a conclusão dessa nova etapa na minha vida.

Aos meus pais Narciso e Eliane, ao meu irmão Narciso Neto, pelo apoio e suporte nos momentos mais difíceis, pelo carinho, amor e por acreditarem no meu potencial.

Ao meu amado e amigo Marcelo Aristides, que me incentivou com muito carinho a prosseguir nesse grande sonho.

A Luciana Girão, pela atenção, carinho, pelo suporte com o material necessário para a realização deste trabalho e a disposição em me ajudar sempre que eu precisava.

Aos colegas da minha turma de Mestrado que me incentivaram e com os quais pude compartilhar grandes momentos de aprendizado.

Aos colegas de laboratório Roberta e Felipe que me ajudaram com as rotinas do laboratório, aos estagiários Matheus e Jéssica pelo apoio inicial nas tarefas de bancada e a aluna de IC, Laís, pelo auxílio na realização dos experimentos.

A todos os professores que me transmitiram o conhecimento necessário para a realização e concretização deste trabalho.

A Fiotec pela concessão da bolsa de pesquisa.

Porque dele, e por ele, e para ele são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém!

RESUMO

SILVA PINHEIRO, Adriana Michelli. *Avaliação das Propriedades Bioquímicas e Físico-Químicas da enzima Asparaginase produzida por **Pichia pastoris** Recombinante*. 2015. 121f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

A asparaginase de origem bacteriana é o principal medicamento para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda, um câncer que afeta principalmente as crianças. Apesar de efetivo, o medicamento causa sérias reações imunológicas por ser produzido por um procarioto. Atualmente, o medicamento existente no mercado brasileiro é importado, o que acarreta dependência tecnológica, alto custo na obtenção do medicamento e dificuldade de abastecimento. As asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* codificada pelo gene *ASP3* apresenta, por suas características, potencial para uso como medicamento antileucêmico. Em trabalhos anteriores, este gene foi clonado e expresso em altos níveis na levedura *Pichia pastoris*. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as propriedades físico-químicas e bioquímicas da asparaginase periplásmica recombinante produzida por *P. pastoris*, tendo sido avaliados as melhores condições de estocagem da enzima após ressuspensão, o efeito de alguns íons e de alguns compostos na atividade asparaginásica, a afinidade da asparaginase pelos substratos D e L-asparagina e L-glutamina e os seus parâmetros cinéticos. Observou-se que a ressuspensão da asparaginase de levedura em água destilada e mantida a 4 °C reteve em torno de 98% da atividade original após 96 horas, na presença de sorbitol 0,1 M, mostrando ser esta a melhor condição de estocagem. Os valores do K_m e da $V_{máx}$ foram determinados, obtendo-se $2,461 \pm 0,170\text{mM}$ e $0,090 \pm 0,0017\text{mM min}^{-1}$, respectivamente. A asparaginase de *P.pastoris* recombinante apresentou maior afinidade pela D-asparagina, de forma semelhante à asparaginase nativa de *S. cerevisiae*; e baixa atividade glutaminásica, o que favorece a sua utilização como medicamento pelo menor risco de efeitos tóxicos. O EDTA não apresentou efeito negativo sobre a asparaginase de levedura, indicando não ser a mesma uma metaloenzima. A influência negativa de agentes redutores sobre a atividade enzimática indica a presença de pontes de enxofre na estrutura proteica. Os resultados obtidos são de extrema importância para a continuidade dos estudos da utilização da asparaginase de *Pichia pastoris* recombinante como agente antileucêmico.

Palavras-chave: Asparaginase. *Pichia pastoris*. Câncer. Leucemia Linfoblástica Aguda. Cinética enzimática.

ABSTRACT**EVALUATION OF THE PHYSICOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL
PROPERTIES OF THE RECOMBINANT ASPARAGINASE PRODUCED BY
*Pichia pastoris***

Adriana Michelli Silva Pinheiro

Bacterial asparaginase is the main medicament for the treatment of acute lymphoblastic leukemia, a cancer that primarily affects children. Although effective, the medicine causes serious immunological reactions due to its prokaryotic origin. Currently, the existing drug in the Brazilian market is imported, which carries a technological dependence, high cost and supply difficulties. The asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the *ASP3* gene, given its characteristics, has potential to be used as an antileukemic drug. In previous work, this gene was cloned and expressed at high levels in the yeast *Pichia pastoris*. The present work aimed to characterize the physicochemical and biochemical properties of the recombinant periplasmic asparaginase produced by *P. pastoris*, having been assessed the best enzyme storage conditions after resuspension, the effect of some ions and some compounds in asparaginase activity, asparaginase affinity for the substrates D- and L-asparagine and L-glutamine and its kinetic parameters. It was observed that the yeast asparaginase resuspension in distilled water and kept at 4 °C retained about 98% of the original activity after 96 hours in the presence of 0.1 M sorbitol, showing this to be the best storage condition. The values of K_m and V_{max} were determined to be $2,461 \pm 0,170\text{mM}$ e $0,090 \pm 0,0017\text{mM min}^{-1}$, respectively. The recombinant asparaginase showed higher affinity for D-asparagine, similarly to the native *S. cerevisiae* asparaginase; and low glutaminase activity, which favors its use as a medicine due to the lower risk of toxic effects. EDTA showed no negative effect on the yeast asparaginase, indicating that it is not a metalloenzyme. The negative influence of reducing agents on the enzymatic activity indicates the presence of sulfur bridges in the protein structure. These results are extremely important for the further studies on the use of the recombinant *Pichia pastoris* asparaginase as antileukemic agent.

Keywords: Asparaginase. *Pichia pastoris*. Cancer. Acute lymphoblastic leukemia. Enzyme Kinetics.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Leucemia Linfoblástica Aguda	17
1.2	Asparaginase para tratamento da LLA	18
1.3	Aparaginase no Brasil	23
1.4	Asparaginase de levedura	25
2	OBJETIVO	29
2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Materiais	30
3.1.1	Enzimas.....	30
3.1.2	Reagentes.....	30
3.2	Métodos	31
3.2.1	Determinação da atividade asparaginásica.....	31
3.2.1.1	Ensaio de determinação da atividade enzimática.....	31
3.2.1.2	Curva Padrão de análise do amônio	32
3.2.2	Ensaio de estabilidade da enzima.....	32
3.2.3	Efeitos de diferentes íons metálicos e compostos orgânicos na atividade enzimática da asparaginase de levedura e bacteriana.....	33
3.2.4	Ensaio de avaliação catalítica da enzima sobre diferentes substratos.....	33
3.2.5	Determinação dos parâmetros cinéticos da asparaginase de levedura.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Estabilidade da asparaginase de levedura liofilizada, após ressuspensão em água destilada, tampão fosfato e soro fisiológico	35
4.1.1	Estabilidade da asparaginase ressuspensa em água destilada.....	35
4.1.2	Estabilidade da asparaginase ressuspensa em tampão fosfato 20mM pH 7,1... 36	
4.1.3	Estabilidade da asparaginase ressuspensa em soro fisiológico (NaCl 0.9%)... 37	
4.2	Estabilidade da asparaginase bacteriana, medicamento Aginasa, após ressuspensão em água esterilizada	39

4.3	Efeitos de diferentes sais metálicos e compostos orgânicos na atividade enzimática de asparaginase de <i>P. pastoris</i> e do medicamento Aginasa.....	41
4.4	Avaliação da atividade glutaminásica.....	47
4.5	Ensaio de afinidade pelo substrato.....	47
4.6	Determinação dos parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten-K _m e velocidade máxima -V _{máx}) para a asparaginase de levedura (<i>Pichia pastoris</i> recombinante).....	48
5	CONCLUSÕES.....	51
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema ilustrado do mecanismo de reação da L-asparaginase.....	20
Figura 2.	Importação brasileira de asparaginase.....	24
Figura 3.	Padrão de glicosilação protéica de <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pastoris</i> e mamíferos superiores.....	26
Figura 4.	Produtividades volumétricas em asparaginase obtidas por <i>S. cerevisiae</i> e por <i>P. pastoris</i> recombinante em diversas condições de cultivo.....	28
Figura 5.	Estabilidade da asparaginase produzida por <i>P. pastoris</i> recombinante ressuspensa em água destilada	36
Figura 6.	Estabilidade da asparaginase produzida por <i>P. pastoris</i> recombinante ressuspensa em tampão fosfato 20mM pH 7,1.....	37
Figura 7.	Estabilidade da asparaginas produzida por <i>P. pastoris</i> recombinante ressuspensa em soro fisiológico.....	38
Figura 8.	Estabilidade da asparaginase bacteriana ressuspensa em água esterilizada.....	40
Figura 9.	Efeitos de íons metálicos sobre a atividade enzimática da asparaginase produzida por <i>P. pastoris</i> recombinante.....	43
Figura 10.	Efeitos de determinados compostos orgânicos sobre a atividade enzimática da asparaginase produzida por <i>P. pastoris</i> recombinante.....	44
Figura 11.	Efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática da asparaginase bacteriana (medicamento Aginasa).....	45

- Figura 12. Efeitos de determinados compostos orgânicos sobre a atividade enzimática da asparaginase bacteriana (medicamento Aginasa)..... 46
- Figura 13. Influência da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática catalisada pela asparaginase produzida por *P.pastoris* recombinante..... 49

INDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda.....	18
Tabela 2.	Propriedades químicas e farmacológicas das diferentes preparações de asparaginase.....	21
Tabela 3.	Equivalência de doses da asparaginase de acordo com a sua origem e formulação.....	22
Tabela 4.	Comparação dos resultados das asparaginases produzida por <i>P. pastoris</i> recombinante e bacteriana.....	41
Tabela 5.	Medida da atividade enzimática da asparaginase produzida por <i>P. pastoris</i> recombinante sobre os substratos L-asparagina e D-asparagina.....	48
Tabela 6.	Valores calculados de V_{max} e K_m da asparaginase de <i>P. pastoris</i> recombinante em relação ao substrato L-asparagina	49
Tabela 7.	Parâmetros cinéticos de asparaginases de outros micro-organismos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LLA-	Leucemia Linfoblástica Aguda
AOX-	Álcool oxidase
Da-	Daltons
GRAS –	<i>Generally recognized as safe</i>
Km –	Constante de Michaelis-Menten
NCBI-	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PEG–	Polietilenoglicol
RENAME–	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SDS-PAGE –	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas na terapia medicamentosa tem sido amplamente empregada, devido às suas características bioquímicas específicas, como alta especificidade por determinado substrato e capacidade catalítica. Atualmente, existem vários medicamentos disponíveis no mercado contendo enzimas em sua formulação e que são utilizados, muitas das vezes, como a única opção em determinados protocolos de tratamento. Dentre esses medicamentos, a asparaginase é um biofármaco utilizado como principal medicamento no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) e também para outros tipos de doenças hematopoéticas. O seu uso é preconizado com base em um defeito metabólico na síntese da asparagina de algumas células malignas, que são dependentes de fontes exógenas de asparagina para a sua proliferação, ao contrário das células normais que são capazes de sintetizar esse aminoácido. A presença do biofármaco, que esgota a asparagina da corrente sanguínea, provoca a morte seletiva das células tumorais.

Os medicamentos à base de asparaginase, atualmente empregados, são preparados a partir de enzimas bacterianas produzidas por *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. Apesar de ser considerado um medicamento de primeira escolha no tratamento da LLA, a asparaginase apresenta limitações relacionadas à sua origem bacteriana, podendo provocar sérias reações imunológicas e diversos efeitos colaterais, entre os quais pancreatite, reações anafiláticas, agravamento de disfunções hepáticas e até mesmo o desenvolvimento de resistência ao medicamento.

Além dos problemas de hipersensibilidade encontrados, um fator que tem dificultado o uso de asparaginase na terapêutica é a sua meia-vida muito curta, causando a necessidade de administrações sucessivas do medicamento, o que tem cooperado para o alto custo do tratamento.

No Brasil, a asparaginase é classificada como enzima terapêutica antineoplásica, constando na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Ministério da Saúde – RENAME. Atualmente, o medicamento existente no mercado brasileiro é importado, acarretando uma dependência tecnológica, um alto custo na obtenção do medicamento e dificuldade de abastecimento do produto.

Portanto, há a necessidade de desenvolver, no país, tecnologia para a produção dessa enzima terapêutica, através do fomento à pesquisa de micro-organismos que sejam novas fontes produtoras de asparaginases.

Diversas fontes produtoras de asparaginases podem ser encontradas na natureza. Entre elas, está a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que produz a asparaginase II, codificada pelo gene designado *ASP3* e que apresenta potencial para uso terapêutico *per se* e para pacientes que desenvolveram hipersensibilidade à enzima bacteriana.

Apesar do seu potencial terapêutico, a asparaginase produzida por *S. cerevisiae* é expressa em baixas quantidades, o que sugeriu a utilização de um outro micro-organismo geneticamente modificado que pudesse expressar a enzima com maior produtividade. Neste contexto, iniciou-se 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* na levedura *Pichia pastoris* sob o controle do promotor *AOX1* (Ferrara e col., 2006) processo para produção da enzima em biorreator de 2 L compreendendo cultivo multiestágio em batelada alimentada com altas densidades celulares (Ferrara e col., 2006); processo para extração da enzima periplasmática (Ferrara e col., 2010); protocolo para purificação da enzima em escala analítica caracterização parcial da enzima (Girão e col.; 2012). Em testes preliminares realizados *in vitro* a asparaginase de levedura apresentou atividade sobre a proliferação de linhagem de célula leucêmica, apontando para a viabilidade de seu uso como medicamento. Os esforços subsequentes têm como foco finalizar a caracterização físico-química e bioquímica da enzima; estudos estruturais; desenvolvimento de processo de purificação escalonável; realização de ensaios pré-clínicos; e desenvolvimento de formulação.

Neste contexto, o presente trabalho tem como proposta a caracterização e a avaliação das propriedades bioquímicas e físico-químicas da asparaginase recombinante produzida por *P. pastoris*. Os resultados encontrados são fundamentais para dar seguimento à pesquisa da proposta de utilização da asparaginase de *P. pastoris* recombinante como medicamento antileucêmico.

1-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

A leucemia é um câncer do sistema hematopoiético que possui origem desconhecida, entretanto, diversos estudos (Muller e Boos; 1998) mostram fatores de risco que podem contribuir para o desenvolvimento desta doença. Um dos fatores em potencial são as mutações genéticas que podem estar associadas a exposições a radiações ionizantes, exposições químicas, tratamento por certos medicamentos, anormalidades cromossômicas e alguns tipos de infecções. A leucemia pode se apresentar de diversas formas e é classificada de acordo com os tipos de células tumorais envolvidas, linfóides e mielóides, e o progresso de manifestação da doença, agudas e crônicas, que pode primariamente envolver a medula óssea e em seguida atingir outros órgãos do organismo. A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma doença que se caracteriza pela ocorrência de uma proliferação desregulada de células imaturas e precursoras dos linfócitos e o seu acúmulo na medula óssea, e posteriormente no sistema sanguíneo (Inaba e col., 2013; Viele, 2003; Harrison, 2001; Moscardó e col., 2013). A LLA pode atingir crianças e adultos, mas, geralmente, ocorre uma maior incidência em crianças na faixa de 2 a 5 anos de idade, apesar de ter um pior prognóstico em adultos, que pode estar associado ao estágio de maturação da célula leucêmica, pois nessa faixa etária, as células progenitoras de linfócitos B estão amplamente se proliferando. A LLA pode ser dividida em subtipos (Tabela 1), o subtipo L1 é observado com maior frequência em crianças, cerca de 76 a 89%; o subtipo L2 é observado mais frequentemente em adultos, 49 a 60%; e o subtipo L3 é mais raro, mas pode ser observado em adultos com um pouco mais de frequência do que em crianças (Viele, 2003). Há evidências de alta incidência de LLA em crianças com defeitos em sua constituição genética. Os sintomas clínicos da leucemia aguda podem ser divididos em duas categorias: manifestações primárias e secundárias. As manifestações primárias são aquelas que envolvem a medula óssea como anemias, hiperplasias, hipoplasias e trombocitopenias e

as secundárias são aquelas que envolvem todos os outros sistemas do corpo, como febre, fraquezas, fadigas, sangramentos, infecções e etc. (Muller e Boos,1998). A LLA considerada o câncer mais frequente na infância, pode ser tratada através de algumas drogas quimioterápicas, sendo a L-asparaginase uma das utilizadas nos protocolos de tratamento, juntamente com uma série de agentes quimioterápicos. A terapia para o tratamento da LLA é dividida em fases cujo objetivo é a remissão total da doença e se inicia pela fase de indução da remissão seguida da fase de terapia de manutenção (Muller e Boos,1998)

Tabela 1. Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda

Categorias	Características
L1	População de células relativamente homogênea com 75% ou mais células com citoplasma escasso, cromatina finamente dispersa, forma nuclear regular; nucléolos são imperceptíveis em mais de 75% das células.
L2	População celular heterogênea em relação ao padrão de cromatina e forma nuclear; as células são geralmente grandes, com o citoplasma ocupando 20% ou mais da superfície da área celular. Nucléolos são grandes em 25% ou mais das células
L3	População de células grandes e relativamente homogênea com núcleos regulares e padrão de cromatina fina; nucléolos são proeminentes; citoplasma é moderadamente abundante com vacuolização e basofilia profunda; linfoblastos se assemelham aos do linfoma de Burkitt.

Fonte: C. S Viele, 2003

1.2. Asparaginase para tratamento da LLA

Uma das dificuldades apresentadas pelos quimioterápicos convencionais no tratamento do câncer é que as doses utilizadas para destruir

as células cancerígenas podem apresentar toxicidade para as células normais, portanto o desenvolvimento de medicamentos mais seletivos se faz necessário. Uma das bases para essa seletividade é o fato de que as células tumorais apresentam alterações no seu metabolismo como a deficiência na síntese de alguns aminoácidos, necessitando de uma fonte externa de obtenção dos mesmos para a sua síntese proteica. A utilização de medicamentos que diminuem a disponibilidade sistêmica destes aminoácidos provoca a morte das células malignas com um menor efeito sobre as células normais. Dentre esses medicamentos se encontra a L-asparaginase.

A L-asparaginase foi descoberta e desenvolvida a partir de estudos nos quais se observou a regressão de linfomas transplantados em ratos e camundongos submetidos ao tratamento com o soro de cobaias e a sua posterior identificação no soro como responsável pelo efeito antitumoral (Muller e Boos, 1998) As células tumorais da LLA, por serem imaturas, possuem uma deficiência da enzima asparagina sintetase, enzima ATP-dependente que catalisa a conversão de L-aspartato em L-asparagina, portanto, as células malignas necessitam da asparagina do meio extracelular para realizar a sua síntese proteica (Balasubramanian e col., 2013; Jha e col., 2012; Bon e col.,1997).

O efeito antitumoral da asparaginase pode estar associado a sua afinidade pela asparagina que pode ser determinada através dos estudos de cinética enzimática, ou seja, a determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m), a velocidade máxima (V_{max}) e a constante catalítica (K_{cat}). A asparaginase catalisa a hidrólise da asparagina produzindo aspartato e amônio e como consequência, atuará de forma que indisponibilizará a asparagina do meio extracelular para a célula leucêmica, levando-a a sua morte (Labrou e col., 2010; Stern e col., 1976; Cappelletti e col., 2008; Kumar e col., 2013).

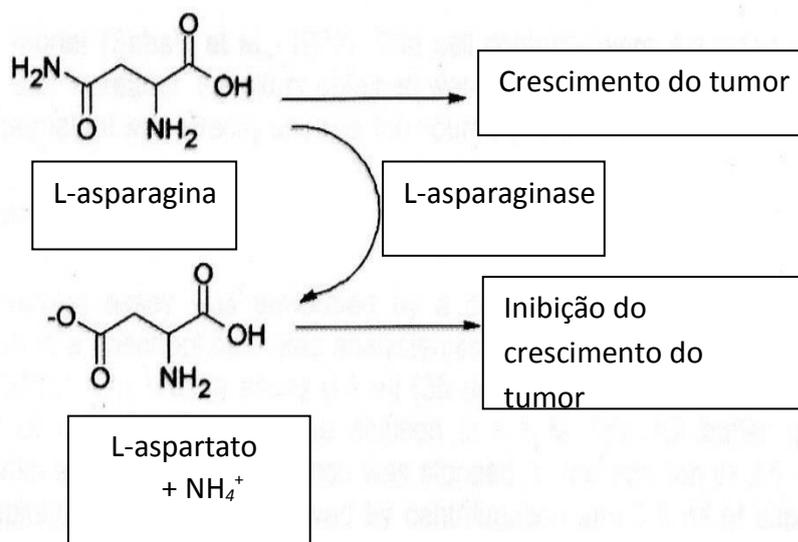


Figura 1. Esquema ilustrado do mecanismo de reação da L-asparaginase

A asparaginase é uma enzima encontrada em diversos organismos, mas, somente as de origem bacterianas, atualmente, são as utilizadas como medicamentos para o tratamento da LLA e para alguns subtipos de linfomas não-Hodgkin. E dentre as asparaginases somente a do tipo II tem atividade anticâncer. Isto acontece pelo fato da L-asparaginase do tipo II ter maior afinidade pela asparagina quando comparada à do tipo I. Os dois tipos de enzima possuem diferentes atividades catalíticas, estruturas, sequências de aminoácidos e localização nas células (Gervais e col., 2103). A enzima do tipo II está localizada no espaço periplásmico, enquanto a enzima do tipo I está localizada no citoplasma.

A asparaginase de origem bacteriana revela toxicidade e efeitos adversos associados a reações de hipersensibilidade e a formação de anticorpos, contribuindo para um efeito de resistência ao medicamento que causará a diminuição na atividade enzimática e conseqüentemente diminuindo a sua eficácia. Sabe-se que a imunogenicidade de proteínas estranhas está associada ao aumento da massa molecular e a maior complexidade da estrutura e de proteínas constituídas com uma massa molecular maior do que 10.000 Da. A molécula de asparaginase consiste em quatro subunidades idênticas e tem massa molecular de cerca de 140.000 Da, justificando, assim,

seu caráter imunogênico. Adicionalmente, a depleção da L-asparagina está associada também a uma menor síntese de outras proteínas como a albumina, insulina e outras que interferem nos processos de coagulação e fibrinólise, originando trombose, pancreatite e hiperglicemia somados a rápida eliminação da circulação sanguínea e limitada distribuição farmacocinética resultantes da sua formulação e de curta meia vida (Moscardó e col., 2013).

Estudos (Pokrovskaya e col. 2012, Kumar e col., 2011; Miller e Balis, 1969; Abe e col., 1972) mostram ainda que a asparaginase bacteriana realiza a hidrólise da L- glutamina produzindo um excesso de L-glutamato que pode induzir a manifestação dos efeitos tóxicos.

Existem três formulações medicamentosas disponíveis de asparaginase: asparaginase de *E. coli*, asparaginase peguilada de *E. coli* e asparaginase de *Erwinia chrysanthemi*, diferindo elas em suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas (Moscardó e col., 2013; Fernandes e Gregoria, 1997; Gervais e col., 2013; Lanvers e col., 2002, Avramis e col., 2005). A asparaginase isolada de *E. coli* apresenta uma massa molecular de 138000 a 141000 Da, consistindo em 4 subunidades idênticas com um centro ativo em cada uma. A asparaginase de *Erwinia* apresenta uma massa molecular de 138000 Da. As enzimas provenientes de ambas as bactérias se mostram com alta atividade e estabilidade, apresentando constante de Michaelis-Menten em torno de 6 a 15 μM . (Tabela 2.)

Tabela 2. Propriedades químicas e farmacológicas das diferentes preparações de asparaginase

Fonte	Massa molecular (Da)	Km (μM)	Ponto isoelétrico (pH)	Meia vida aparente (dias)
<i>E. chrysanthemi</i>	138000	12	8.7	0,65±0,13
<i>E. coli</i>	141000	10	5.0	1,24±0,17
PEG-<i>E. coli</i>	145000	10	5.0	5,73±3,24

Fonte: H.J Muller e col, 1998

A enzima peguilada é utilizada em substituição a forma nativa nos casos em que ocorrem reações de hipersensibilidade, pois a sua formulação mediante a conjugação com unidades de monometoxipolietilenoglicol (PEG) diminui seus efeitos adversos. Além disso, a ligação do PEG à asparaginase promove o aumento da meia-vida da enzima, permitindo a diminuição da frequência da administração (Labrou e col., 2010), o número, a quantidade e a frequência de doses preconizadas para o tratamento são descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Equivalência de doses da asparaginase de acordo com a sua origem e formulação

Origem- formulação	Doses	Frequência	Número de doses
<i>E. coli nativa</i>	5.000-10.000 UI/m ²	48-72h	4x5.000 UI/m ²
<i>Erwinia nativa</i>	10.000-20.000 UI/m ²	48h	6x10.000 UI/m ²
<i>E. coli peguilada</i>	1.000-1.250 UI/m ²	Semana	1x2.500 UI/m ²
	2.250 UI/m ²	1 a 2 semanas	

Fonte: Moscardó e col., 2013.

As vias intramuscular e intravenosa são as formas de administração das formulações, e as suas diferenças se baseiam na biodisponibilidade e nos efeitos adversos. A maioria das pesquisas realizadas das análises das curvas de concentração plasmática mostra uma meia vida da enzima em torno de 4-15h sendo, de acordo com alguns estudos, eliminada através do sistema retículo endotelial. Estudos comparativos das duas formas de administração não mostraram diferenças significativas na eficácia clínica, mas a via

intramuscular tem sido a mais utilizada, para evitar reações alérgicas. Nos protocolos de tratamento geralmente a asparaginase é combinada com agentes corticoides como a prednisona para evitar possíveis reações alérgicas e outros antineoplásicos como a vincristina, (Moscardó e col., 2013) mas a monoterapia tem sido relatada com sucesso.

1.3 Asparaginase no Brasil

A asparaginase que abastece o sistema de saúde do país é importada na sua totalidade, gerando uma situação de dependência tecnológica, além da dificuldade de abastecimento devido ao alto valor do medicamento que possui sua cotação em dólar. De acordo com dados do Sistema único de Saúde (SUS), o Brasil gasta cerca de R\$ 4 bilhões na importação de biofármacos por ano, representando 32% dos gastos com medicamentos. (<http://www.inovacaotecnologica.com.br/19/09/2013>). Dentro do contexto mundial, o mercado de biofármacos movimentou US\$ 199,7 bilhões em 2013 com a perspectiva de atingir um crescimento anual de 13,5%; o mercado de medicamentos formulados a base de enzimas movimentou cerca de US\$ 1bilhão em 2009 (Freedonia, 2009). O mercado externo brasileiro de enzimas especiais, foi de 180 milhões de dólares nesse mesmo ano, aumentando para cerca de 220 milhões de dólares em 2011, de acordo com dados do MDIC, disponível no site <http://alicesweb2.mdic.gov.br>. Importante ressaltar que desse mercado, 98% correspondem a importações, mostrando o atraso tecnológico do Brasil em referência ao mercado mundial em termos de produção, disponibilidade e uso destes biofármacos. Até o ano de 2012, quando foi suspensa a sua fabricação, somente o medicamento Elspar, fabricado originalmente pela Merck Sharp & Dome e, posteriormente, pela Lundbeck, ambas empresas americanas, estava disponível no Brasil. Atualmente, o Brasil tem utilizado o medicamento Aginasa, fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co.,

Ltd., Japão, em substituição ao medicamento Elspar, de forma a suprir as necessidades do mercado brasileiro pelo período de dois anos. Estão também em fase de implantação duas PDPs (Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo), envolvendo Farmanguinhos/FIOCRUZ (laboratório público) e as empresas NT Pharma e United Biotec (parceiros privados). A instabilidade de fornecimento da asparaginase, fato recorrente, torna o país e a saúde de muitas crianças reféns de uma situação de absoluta dependência externa deste medicamento e também dos interesses econômicos que permeiam estas situações.

A Figura 2 apresenta os valores de importação desta enzima no período de 2001 a 2013 de acordo com dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), disponível no site <http://aliceweb2.mdic.gov.br>. As importações em 2013 totalizaram US\$ 2,2 milhões.

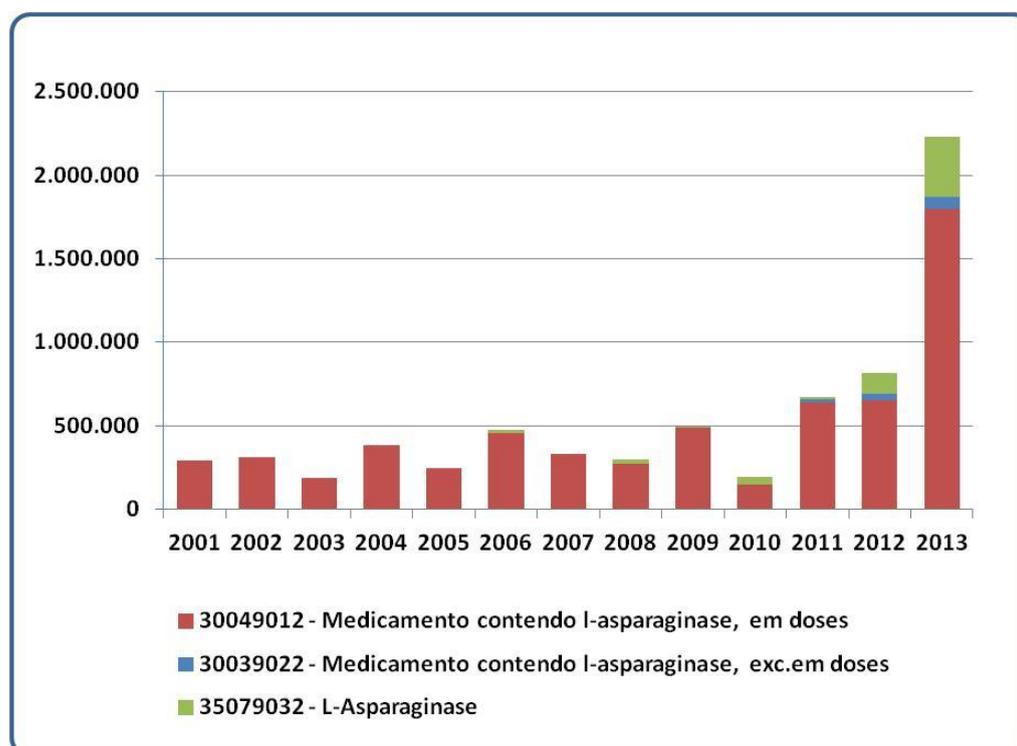


Figura 2. Importação brasileira de asparaginase. Fonte: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (<http://aliceweb2.mdic.gov.br>).

1.4 Asparaginase de levedura

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta a enzima constitutiva asparaginase I e a periplásmica asparaginase II codificada pelo gene *ASP3*. Considerando algumas propriedades bioquímicas e físico-químicas das duas isoformas de asparaginase produzidas por *S. cerevisiae*, a asparaginase II representa uma alternativa para tratamento de LLA, especialmente para pacientes que desenvolveram forte resposta imunológica à enzima bacteriana. Contudo, os níveis de produção desta enzima são bastante baixos. A utilização de um hospedeiro eucariótico que pudesse expressar o gene *ASP3* com elevados níveis tem se revelado como uma proposta para a produção desta enzima (Bon e col., 1997; Oliveira e col., 1999; Oliveira e col., 2003; Ferrara e col., 2004).

Pichia pastoris, uma levedura metilotrófica, vem sendo empregada com sucesso para a expressão de proteínas heterólogas, tendo sido já expressas centenas de proteínas nesta levedura. O sucesso do sistema de expressão heteróloga de *Pichia pastoris* é atribuído ao fato da levedura alcançar altos níveis de densidade celular em meios de cultura simples e por ter a indução da produção da enzima por metanol. Diversos produtos farmacêuticos produzidos por *P. pastoris* já estão no mercado ou em fase de teste, incluindo insulina, albumina sérica humana, antígeno da hepatite B, EGF (fator de crescimento epidermal) e anticoagulante hirudina. Além de *P. pastoris* ser um organismo GRAS (“generally recognised as safe”), apresenta um padrão de glicosilação proteica mais semelhante ao de mamíferos, do que o de *S. cerevisiae*, o que sugere para a molécula menor antigenicidade em humanos, aspecto este relevante para a produção de proteínas terapêuticas (Cereghino e col., 2002; Gellissen e col., 2005) (figura 3).

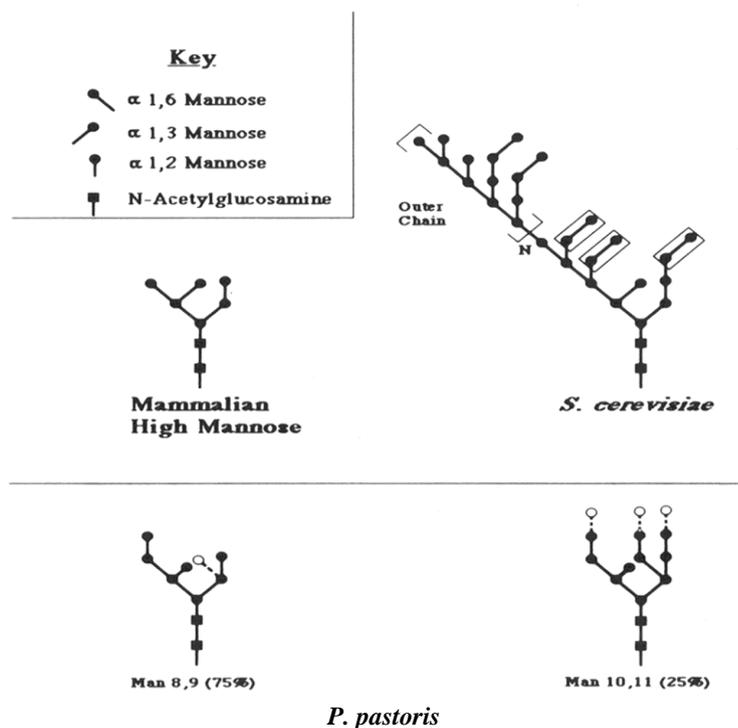


Figura 3. Padrão de glicosilação protéica de *S. cerevisiae*, *P. pastoris* e mamíferos superiores.

Desde o início do ano 2000, estabeleceu-se uma cooperação entre o Laboratório de Tecnologia Enzimática do IQ/UFRJ e o Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos/FIOCRUZ objetivando o desenvolvimento de processo para a produção da asparaginase de levedura visando sua utilização como medicamento.

Como resultado dos trabalhos desenvolvidos até o momento, o gene ASP3, que codifica para a asparaginase II de *S. cerevisiae*, foi clonado na levedura metilotrófica *P. pastoris*, com grandes ganhos em termos de níveis de atividade enzimática. A atividade específica obtida foi de 800 U g^{-1} de célula, representando um aumento de sete vezes em relação aos valores alcançados para *S. cerevisiae* (115 U g^{-1}) (Ferrara e col., 2003).

O bioprocesso de produção de asparaginase pela linhagem recombinante de *P. pastoris*, que compreende um cultivo multiestágio em

batelada alimentada no qual são atingidas altas densidades celulares (da ordem de 100 g L^{-1}) foi desenvolvido em biorreator de 2 e de 5 L. O processo foi otimizado com relação à composição do meio de cultivo e forma e vazão de alimentação de nutrientes (glicerol e metanol), chegando-se a produção de 85.600 U L^{-1} e $1.083 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Ferrara e col., 2003.) (Figura 4).

Foram desenvolvidos também dois processos para a extração da enzima periplásmica produzida pela linhagem de *P. pastoris* recombinante: tratamento da biomassa com 6 ciclos de congelamento / descongelamento seguido de extração com tampão fosfato, com recuperação de asparaginase em torno de 85%; extração alcalina em presença de cisteína, com valores de recuperação de atividade de 100 % em 2 horas de tratamento. O extrato bruto da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante mostrou-se estável à estocagem por dez meses em congelador (Ferrara e col., 2010)

A etapa de purificação está em desenvolvimento em colaboração com o IOC/FIOCRUZ. O extrato bruto enzimático obtido por tratamento das células com cisteína em pH alcalino, após filtração centrífuga em membrana, foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular Superdex G-200 e a seguir em uma coluna de troca iônica Mono-Q. A fração com atividade enzimática apresentou uma atividade específica de 204 U mg^{-1} , representando um grau de purificação de 10,9 vezes e uma recuperação de atividade de 51,3% em relação ao extrato bruto. Ressalta-se que a atividade específica do medicamento Elspar é de 225 U mg^{-1} . O SDS-PAGE 12,5% foi revelado por impregnação por prata, apresentando apenas duas bandas em 42 e 44 kDa, correspondentes à asparaginase, conforme identificado por espectrometria de massas utilizando o banco de dados NCBI nr com a ferramenta Mascot, indicando uma purificação eficiente (Girão e col., 2012; Girão, 2012).

Quanto à caracterização da enzima produzida por *P. pastoris* recombinante, a massa molecular foi estimada por filtração em gel, apresentando 118 kDa, o que sugere que a enzima possui mais de um monômero. Testes com reagente de Schiff evidenciaram que a enzima é glicosilada, o que está de acordo com as propriedades intrínsecas da levedura *P. pastoris* de glicosilar proteínas extracelulares (Girão e col., 2012).

O ponto isoelétrico estimado para a asparaginase recombinante foi de 4,33, próximo ao teórico de 4,55. Foram observados dois valores de pH ótimo, um em pH 7,2 e outro em pH 9,0, o que indica a presença de duas isoformas. A temperatura ótima, medida em ambos os valores de pH, foi de 46°C; entretanto, a atividade enzimática medida na temperatura fisiológica (37°C) em pH 7,2 correspondeu a aproximadamente 92% do máximo, o que é uma importante característica considerando o uso potencial da enzima como um biofármaco.

Testes preliminares *in vitro* para a avaliação da atividade da asparaginase recombinante contra células K562, de leucemia mielóide aguda mostraram que a asparaginase produzida por *P. pastoris* apresenta atividade sobre a proliferação desta linhagem, apontando para a viabilidade de seu uso terapêutico.

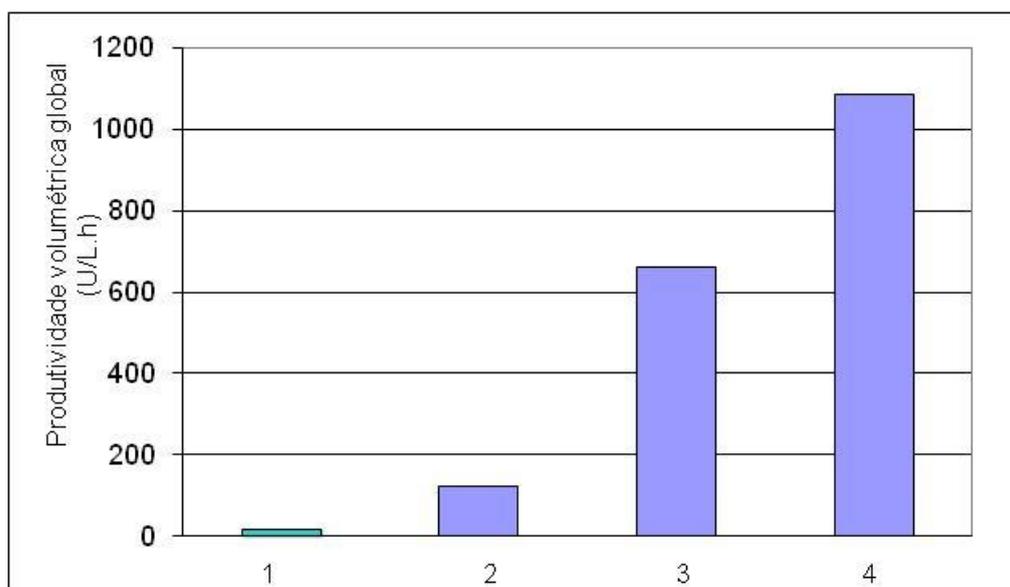


Figura 4. Produtividades volumétricas em asparaginase obtidas por *S. cerevisiae* e por *P. pastoris* recombinante em diversas condições de cultivo (Fonte: Ferrara *et al.*, 2006.)

- (1) *S. cerevisiae* - frascos agitados;
- (2) *P. pastoris* – frascos agitados
- (3) *P. pastoris* - biorreator alta densidade celular
- (4) *P. pastoris* - biorreator alta densidade celular; condições de cultivo otimizadas

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Determinação das propriedades físico-químicas e bioquímicas da asparaginase produzida por *Pichia pastoris* recombinante.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade da enzima à estocagem em temperatura ambiente (25° C); em geladeira (4° C) e em congelador (-4°C);
- Avaliar a atividade catalítica da enzima sobre substratos L-asparagina, D-asparagina e L-glutamina;
- Avaliar a influência de íons metálicos sobre a atividade enzimática;
- Comparar as propriedades bioquímicas e físico-químicas da asparaginase de levedura (*P. pastoris* recombinante) com as da asparaginase bacteriana (medicamento Aginasa);
- Determinar os parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten- Km e velocidade máxima -Vmax) para a asparaginase de levedura (*Pichia pastoris* recombinante)

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Enzimas

Asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante contendo o gene *ASP3*, de *S. cerevisiae*. A enzima foi extraída do espaço periplásmico da levedura de acordo com Ferrara e col., (2010), purificada e liofilizada de acordo com Girão e col., (2012). A enzima foi recebida em tubos Eppendorf de 2 mL contendo aproximadamente 164 µg de proteína, correspondendo a 300 µL de suspensão enzimática em sorbitol 0,1M.

Asparaginase bacteriana: medicamento Aginasa, fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Japão, embalado por Medac GmbH, Wedel, Alemanha e distribuído pelo Laboratório Bagó do Brasil S.A., Rio de Janeiro. Cada frasco ampola do medicamento contém o equivalente a 10.000 U de L-asparaginase de *E. coli* e, de acordo com instruções da bula, para dissolução deve-se utilizar 4 mL de água para injeção (água esterilizada).

3.1.2 Reagentes

L-Asparagina e L-glutamina foram obtidas da Merck; D-asparagina foi obtida da Sigma.

Todos os demais reagentes não listados utilizados são de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1. Determinação da atividade asparaginásica

A atividade asparaginásica foi determinada com base na reação de hidrólise da asparagina formando aspartato e amônio.

Reação: asparaginase + asparagina → aspartato + amônio

A dosagem de amônio foi efetuada utilizando um método adaptado do kit enzimático de análise de ureia (Urea 500) do fabricante Doles. Na presença de salicilato, nitroprussiato de sódio e hipoclorito, os íons amônio reagem dando origem a um composto cromógeno azul esverdeado que é analisado espectrofotometricamente, a 600 nm.

Uma unidade de atividade asparaginásica é definida como a quantidade de enzima envolvida na reação suficiente para liberar 1 μmol de amônio por min a 37°C.

3.2.1.1 Ensaio de determinação da atividade enzimática

Para o ensaio de análise da atividade enzimática, reagiram-se 50 μL de L-asparagina 0,1 M com 50 μL de solução contendo a asparaginase, incubando-se por 30 minutos a 37 °C. Imediatamente após, uma alíquota de 40 μL do meio reacional foi transferida para um tubo falcon contendo 40 μL de solução de TCA 1,5 M para interromper a reação. Em seguida, foram adicionados 2 mL do reagente 1 (salicilato de sódio 9,61 g; nitroprussiato de

sódio 1,01 g; EDTA 0,50 g) e, após agitação em vortex, foram adicionados 2 ml do reagente 2 (hipoclorito de sódio 4-6% 8,9 mL; hidróxido de sódio 6,01 g). Após nova agitação em vortex, a solução foi incubada por 5 min a 37 °C. O produto da reação foi quantificado após leitura em espectrofotômetro a 600 nm, contra um branco (40 µL de tampão fosfato Na⁺/ K⁺ 20 mM + 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 seguintes controles foram realizados para validação dos resultados: misturas reacionais nas quais a enzima foi substituída por tampão; e misturas reacionais nas quais a asparagina foi substituída por tampão.

O cálculo foi realizado de acordo com a seguinte equação: UI/L = $(\Delta\text{Abs}_{600\text{nm}} \times 2 \times \text{diluição amostra}) / (\text{FC curva padrão} \times \text{treção})$

3.2.1.2. Curva padrão de análise de amônio

Determinou-se o fator de correção dos reagentes utilizados no método adaptado salicilato/hipoclorito através de uma curva de calibração para a quantificação de amônio em diferentes concentrações de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄.

3.2.2 Ensaios de estabilidade da enzima

Foram realizados testes de estabilidade térmica da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante e da asparaginase bacteriana (medicamento Aginasa) na temperatura de 25 °C (temperatura ambiente), 4 °C (geladeira) e -4 °C (congelador). Para a realização dos testes a enzima de levedura liofilizada foi ressuspensa em 300 µL das seguintes soluções: tampão fosfato 20 mM, água esterilizada e soro fisiológico; enquanto que o medicamento foi ressuspensa de acordo com as instruções da bula, isto é, em

4 mL de água esterilizada. As soluções enzimáticas foram submetidas às condições de estocagem descritas acima, retirando-se alíquotas em intervalos de 24 h para determinação da atividade enzimática. Na estocagem do medicamento à temperatura ambiente, retirou-se também uma alíquota no tempo de 6 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.3. Efeito de diferentes íons metálicos e compostos orgânicos na atividade enzimática da asparaginase de levedura e bacteriana

Foram testados os efeitos de diferentes íons metálicos e compostos orgânicos, na concentração de 20 mM, sobre a atividade enzimática da asparaginase. Para isto, a enzima produzida por *P. pastoris* recombinante foi ressuspensa em 300 µL de tampão fosfato 20 mM e a bacteriana em 4 mL de água estéril. As suspensões foram incubadas durante 2 horas na presença dos compostos em temperatura ambiente e em seguida, a atividade enzimática foi determinada. Os compostos analisados foram: NaCl, KCl, CaCl₂, NiCl₂, CoCl₂, BaCl₂, CuCl₂, AgCl, EDTA, iodoacetamida, 2-mercaptoetanol e glutathione. A análise foi realizada em triplicata

3.2.4 Ensaio de avaliação catalítica da enzima sobre diferentes substratos

Realizou-se a análise da atividade enzimática da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante utilizando-se como substratos L-asparagina, D-asparagina e L-glutamina. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito no item 3.2.1, substituindo-se a L-asparagina por D-asparagina ou L-glutamina quando foi o caso.

3.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da asparaginase de levedura

Preparou-se o substrato L-asparagina em concentrações de 5,0 g/l; 2,5g/l; 1,25 g/l; 1,0 g/l; 0,75 g/l; 0,5 g/l e 0,25 g/l. Ressuspendeu-se a enzima em 300 μ L de tampão fosfato de sódio 20 mM e, após a devida diluição, submeteu-se à reação com a L-asparagina nas concentrações descritas acima.

O amônio liberado foi quantificado conforme descrito no item 3.2.1 e a velocidade da reação foi calculada para cada concentração de substrato utilizada, plotando-se os resultados em um gráfico velocidade da reação contra concentração de substrato. Para a determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) realizou-se a regressão não linear da curva utilizando-se o programa de computador denominado GraphPad Prisma versão 6.0. As análises foram realizadas em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabilidade da asparaginase de levedura liofilizada, após ressuspensão em água destilada, tampão fosfato e soro fisiológico

A asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante foi recebida de forma liofilizada em frascos contendo o equivalente a 300 µL de suspensão enzimática em sorbitol 0.1 M. A primeira etapa deste estudo constituiu em avaliar o melhor meio para ressuspender a enzima (água destilada, tampão fosfato 20 mM ou soro fisiológico) e a estabilidade da enzima reconstituída à estocagem em temperatura ambiente, em geladeira e em congelador.

4.1.1 Estabilidade da asparaginase ressuspensa em água destilada

Os resultados dos ensaios de estabilidade da asparaginase purificada ressuspensa em água destilada realizados são mostrados na Fig. 5. Observa-se que a 25 °C a preparação da enzima reteve 77,9% da atividade original após 24 horas, mantendo-se a seguir estável ao longo do tempo de estocagem nessas condições.

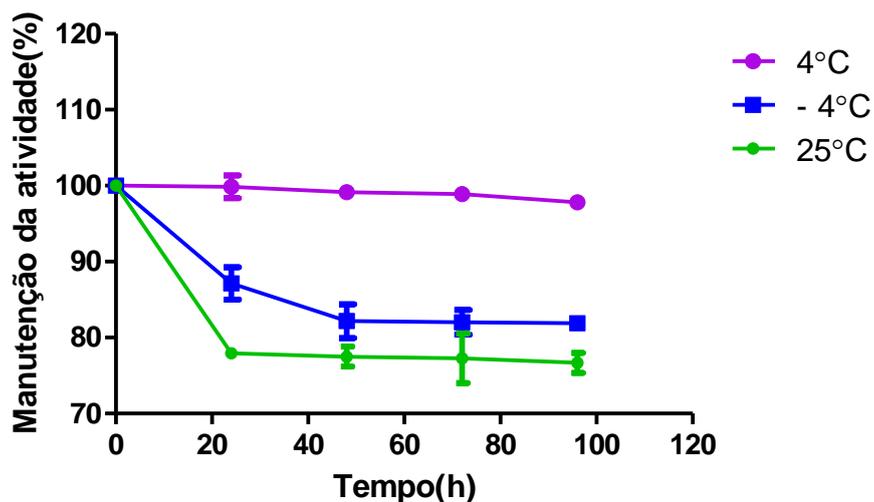


Figura 5. Estabilidade da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante ressuspenso em água destilada

Observa-se que a enzima ressuspenso em água, quando mantida a 4°C, reteve 98% da sua atividade enzimática original com 96 horas, indicando ser esta uma condição adequada para estocagem. Já quando mantida na temperatura de -4°C, observa-se que ocorreu uma perda de cerca de 18% da atividade original da enzima nas primeiras 48 horas, estabilizando a seguir.

4.1.2 Estabilidade da asparaginase ressuspenso em tampão fosfato 20 mM pH 7,1

Os resultados dos ensaios de estabilidade da asparaginase purificada ressuspenso em tampão fosfato pH 7,1 são mostrados na Fig. 6. Observa-se que a preparação da enzima reteve apenas 69,4% da atividade original após 24 horas de estocagem a 25°C, caindo para 9,6% após 48 horas de estocagem, indicando que a enzima não apresenta estabilidade nas condições ensaiadas.

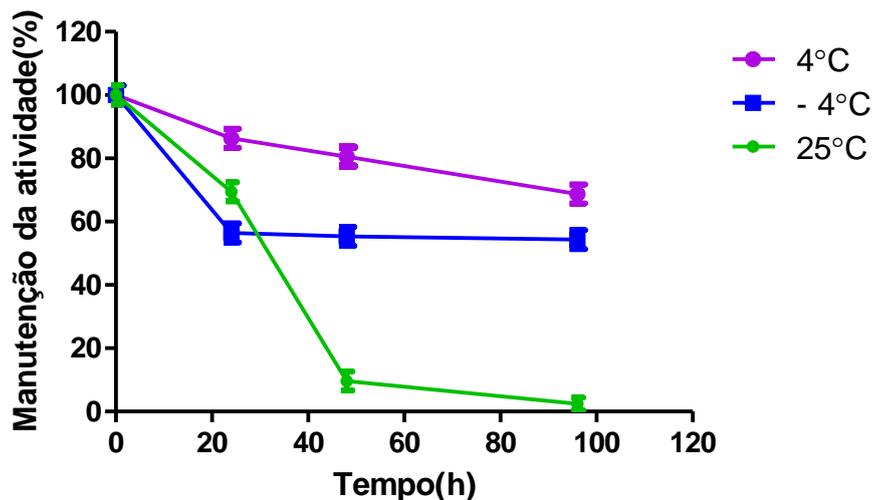


Figura 6. Estabilidade da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante ressuspenso em tampão fosfato 20 mM pH 7,1.

Na temperatura de 4 °C, a preparação da enzima ressuspenso em tampão fosfato 20 mM, manteve 86,3% da atividade original após 24 horas de estocagem; 80,5% após 48 horas e 68,7% após 96 horas. Quando mantida na temperatura de -4 °C, observa-se que a preparação da enzima ressuspenso em tampão fosfato manteve 56,4% da atividade original após 24 horas de estocagem estabilizando-se a seguir.

Esses resultados sugerem que o congelamento da enzima poderia causar alterações na estrutura enovelada da proteína com consequente perda da atividade (Cleland e col., 2000).

4.1.3 Estabilidade da asparaginase ressuspenso em soro fisiológico (NaCl 0,9%)

Os dados obtidos nos ensaios de estabilidade da asparaginase purificada ressuspenso em soro fisiológico são mostrados na Fig. 7. Quando mantida a 25°C, observa-se uma queda acentuada na atividade enzimática da enzima nas

primeiras 24 h, com manutenção de apenas 18,8% de sua atividade original, continuando a cair até perder toda sua atividade no período de 72 h.

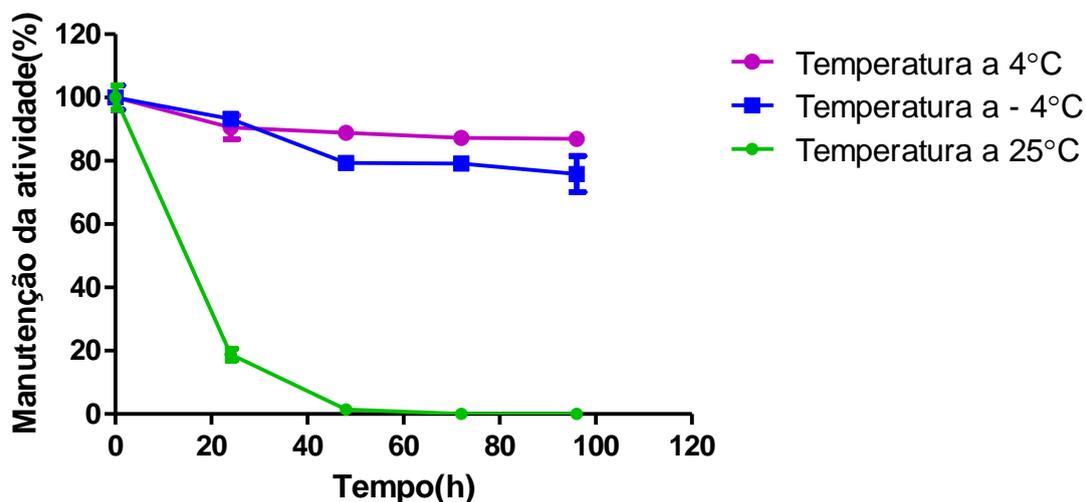


Figura 7. Estabilidade da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante ressuspensa em soro fisiológico

Na temperatura de 4 °C, observa-se que a retenção da atividade após 24 h foi de 90% da atividade original, mantendo-se a seguir na faixa de 87% até 96 h de estocagem.

Para a temperatura de -4 °C (congelador), observa-se uma perda de 7% da atividade enzimática original com 24 h e de 21% com 48 h, estabilizando-se a seguir.

Comparando-se os resultados de estabilidade da asparaginase de levedura recombinante ressuspensa em água, em tampão fosfato de Na^+/K^+ 20 mM pH 7,1 e em soro fisiológico, observa-se que a estabilidade da enzima foi muito maior quando ressuspensa em água. A temperatura de estocagem mais adequada foi de 4 °C (geladeira). Nessas condições, a enzima manteve-se estável, sem perda significativa de atividade, por até 4 dias. De acordo com Girão (2012), esta condição de estocagem foi também indicada como a mais

adequada para o extrato bruto da asparaginase de *P. pastoris*. Deve-se salientar que a enzima foi liofilizada na presença de sorbitol 0,1 M.

A perda de atividade enzimática na presença de tampão fosfato de Na^+/K^+ e de soro fisiológico poderia ser atribuída a uma possível interferência dos íons Na^+ e/ou K^+ na atividade da enzima.

4.2 Estabilidade da asparaginase bacteriana, medicamento Aginasa, após ressuspensão em água esterilizada

A asparaginase bacteriana foi recebida de forma liofilizada em frasco-ampola contendo o equivalente a 10.000 U de L-asparaginase de *E. coli* e, de acordo com instruções da bula, foi ressuspensa em 4mL de água para injeção. O objetivo desse estudo constituiu em avaliar a estabilidade da enzima reconstituída à estocagem em temperatura ambiente, em geladeira e em congelador e comparar os resultados com os da asparaginase de levedura.

Os resultados dos ensaios de estabilidade da asparaginase bacteriana ressuspensa em água para injeção são mostrados na Fig. 8.

Observa-se que a preparação do medicamento reteve 96,2% da sua atividade enzimática original após 6 h de estocagem a 25°C e manteve-se na faixa de 90%, com 96 horas, indicando certa estabilidade nessa condição de estocagem.

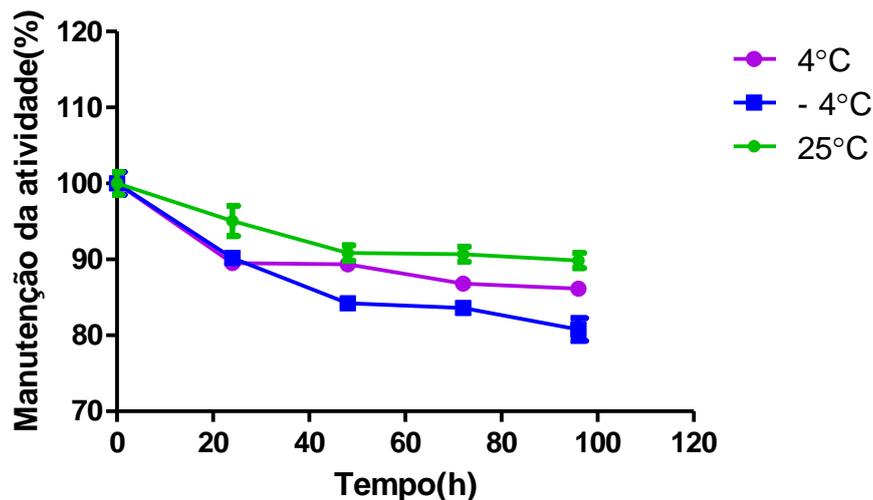


Figura 8. Estabilidade da asparaginase bacteriana ressuspenso em água esterilizada

Na temperatura de 4°C, observa-se que a enzima perdeu cerca de 10,5% da atividade original nas primeiras 48 h, estabilizando a seguir. Já a 4°C, observa-se que a enzima reteve 90 % da sua atividade original após 24h, caindo para 84% após 48h, estabilizando a seguir.

A tabela 4 resume os resultados obtidos nos ensaios de estabilidade da asparaginase de levedura e bacteriana ressuspendidas em água destilada. Observa-se que na temperatura ambiente (25°C), a asparaginase bacteriana reteve maior porcentagem de atividade enzimática ao longo do tempo (90% com 96 h), indicando ser mais estável do que a asparaginase de levedura nessa condição. Já em condições de estocagem em geladeira (4°C), a enzima de levedura apresentou maior estabilidade permanecendo com atividade em torno de 98% da original ao longo de 96 h. Nas condições de estocagem em congelador (-4°C), a manutenção da atividade enzimática situou-se na faixa de 82 a 85% para ambas as enzimas indicando a mesma estabilidade dentro dessa condição.

Tabela 4. Comparação dos resultados de estabilidade das asparaginases produzida por *P. pastoris* recombinante e bacteriana

Condição de Estocagem (Ressuspensão em água destilada e esterilizada)	Asparaginase de <i>P. pastoris</i> recombinante X Asparaginase bacteriana (Medicamento Aginasa)
Temperatura de 25°C Ambiente	Asparaginase bacteriana reteve maior porcentagem de atividade enzimática ao longo do tempo (90% com 96 h), indicando ser mais estável do que a asparaginase de levedura nessa condição.
Temperatura de 4°C Geladeira	A enzima de levedura apresentou maior estabilidade permanecendo com atividade em torno de 98% da original ao longo de 96 h.
Temperatura de -4°C Congelador	A manutenção da atividade enzimática situou-se na faixa de 82 a 85% para ambas as enzimas indicando a mesma estabilidade dentro dessa condição.

4.3 Efeitos de diferentes sais metálicos e compostos orgânicos na atividade enzimática de asparaginase de *Pichia pastoris* e do medicamento Aginasa

De acordo com Gonçalves e col. (2013) os estudos dos efeitos inibidores ou ativadores de íons metálicos e de determinados compostos sobre a atividade da enzima são de suma importância para a avaliação de sua estabilidade em diversas condições ambientais e para a caracterização de sua estrutura química. A exposição da enzima a alguns agentes quelantes como o EDTA pode indicar a presença de íons metálicos em sua estrutura e a sua utilização como cofatores para diminuir a energia de ativação da quebra de ligações químicas caracterizando-a como uma metaloenzima. Bem como,

a exposição a agentes redutores pode indicar a presença de pontes dissulfeto que vão participar da atividade catalítica da enzima.

A Figura 9 apresentam os resultados dos ensaios dos efeitos dos íons metálicos sobre a atividade da asparaginase purificada e liofilizada de *Pichia pastoris*. Observa-se que cada preparação da enzima purificada em presença de tampão fosfato de Na^+/K^+ 20mM, pH 7,1, e após adição dos compostos e incubação por 2 horas manteve respectivamente: Na^+ 79,8%; K^+ 83,2%; Ca^{+2} 70,8 %; Ba^+ 67,4%; Co^{+2} 94,5 % Ni^{+2} 103,5%; Cu^{+2} 102,9% e Ag^+ 84,1% da atividade original.

Analisando os resultados obtidos, observa-se que os íons Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} e Ag^+ testados na concentração de 20 mM influenciaram negativamente na atividade enzimática da asparaginase, enquanto que os íons Ni^{+2} e Cu^{+2} potencializaram o efeito da atividade enzimática. Kumar e col. (2013), observaram os mesmos resultados para a asparaginase de *Cladosporium sp*, diferindo apenas quanto aos efeitos do íon Cu^{+2} . Já nos relatos de Singh e col. (2013), há um aumento na atividade enzimática da asparaginase de *Bacillus aryabhatai* na presença dos íons Na^+ e K^+ , mas para os restante do íons observa-se uma perda significativa na atividade da enzima. A influência negativa dos íons Na^+ e K^+ na atividade enzimática da asparaginase de levedura explica a baixa estabilidade observada para a enzima ressuspendida em tampão fosfato de Na^+/K^+ e em soro fisiológico (itens 4.1.2 e 4.1.3).

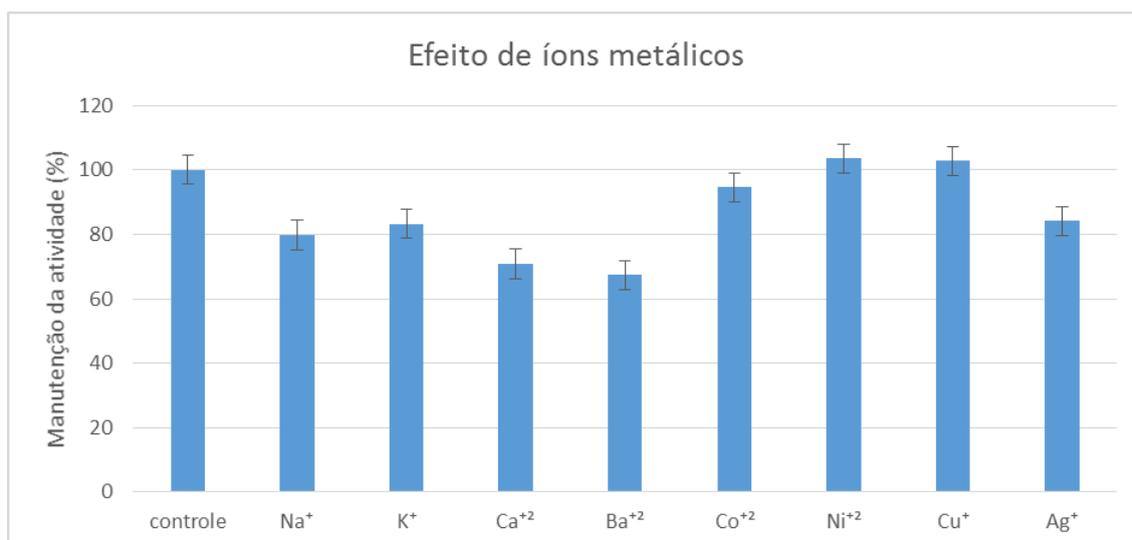


Figura 9- Efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante.

A Figura 10 apresenta os resultados dos ensaios dos efeitos de diversos compostos orgânicos sobre a atividade da asparaginase de levedura purificada e liofilizada. Observa-se que cada preparação da enzima purificada em presença de tampão fosfato de Na⁺/K⁺ 20 mM, pH 7,1, e após adição dos compostos e incubação por 2 horas a 25°C, manteve respectivamente: EDTA 102,76%; Iodoacetamida 91,%; Glutaciona 121,38 %; 2-Mercaptoetanol 97,93% da atividade original.

Através da análise dos resultados obtidos, observa-se que a iodoacetamida e o 2-mercaptoetanol na concentração de 20 mM influenciaram negativamente na atividade enzimática da asparaginase, enquanto que o EDTA e glutaciona potencializaram o efeito da atividade enzimática. A diminuição da atividade na presença de agentes redutores indica a presença de pontes de enxofre (S-S). O aumento da atividade enzimática na presença de um agente quelante como o EDTA indica que a asparaginase não é uma metaloenzima. Este dado está de acordo com os resultados relatados na literatura (Shing e col., 2013) para a enzima produzida por *Bacillus aryabhatai*. Os efeitos da glutaciona e iodoacetamida são os mesmos relatados por Elshafei e col. (2012) para a asparaginase de

Penicillium brevicompactum NRC 829, mas diferem em relação a influência do 2-mercaptoetanol e EDTA.

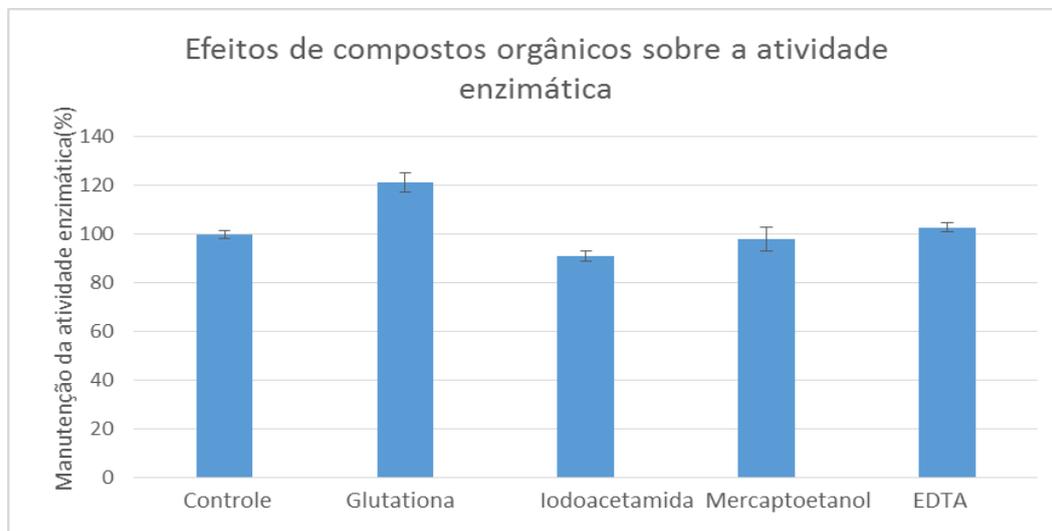


Figura 10- Efeito de determinados compostos orgânicos sobre a atividade enzimática da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante.

A Figura 11. apresenta os resultados dos ensaios dos efeitos dos íons metálicos sobre a atividade da asparaginase bacteriana, medicamento Aginasa.

Observa-se que a preparação da enzima ressuspensa em água esterilizada e após adição dos compostos e incubação por 2 horas a 25°C, manteve respectivamente: Na⁺ 126,4%; K⁺ 143,8%; Ba⁺² 116,7%; Ca⁺² 131,1%; Cu⁺² 147,8%; Ni⁺² 234,8%; Co⁺² 82,9% e Ag⁺ 93,6% da atividade original. Analisando os resultados obtidos, observa-se que os íons Na⁺, K⁺, Ca⁺², Ba⁺², Cu⁺² e Ni⁺² potencializaram o efeito da atividade enzimática, enquanto que os íons Co⁺² e Ag⁺ influenciaram negativamente sobre a atividade enzimática.

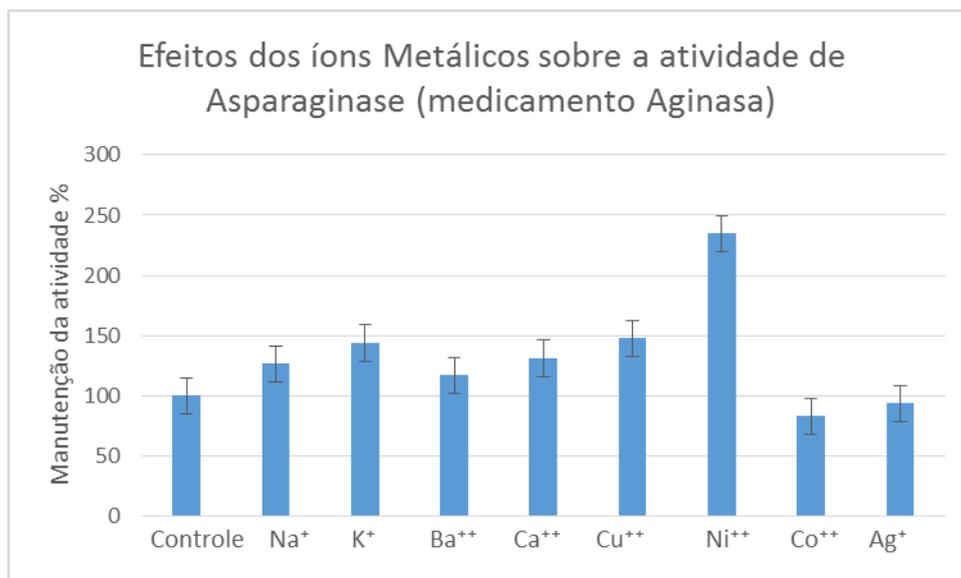


Figura 11. Efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática da asparaginase bacteriana (medicamento Aginasa).

Os dados obtidos dos ensaios dos efeitos de diversos compostos orgânicos sobre a atividade da asparaginase bacteriana ressuspensa em água esterilizada, são mostrados na Fig. 20. Observa-se que após preparação da enzima, adição dos compostos e incubação por 2 horas a 25°C manteve-se respectivamente: glutathione 86,8%; iodoacetamida 122,3%; 2-mercaptoetanol 137,35% e EDTA 99,6% da atividade original. Analisando os resultados obtidos, observa-se que somente a glutathione influenciou negativamente na atividade enzimática.

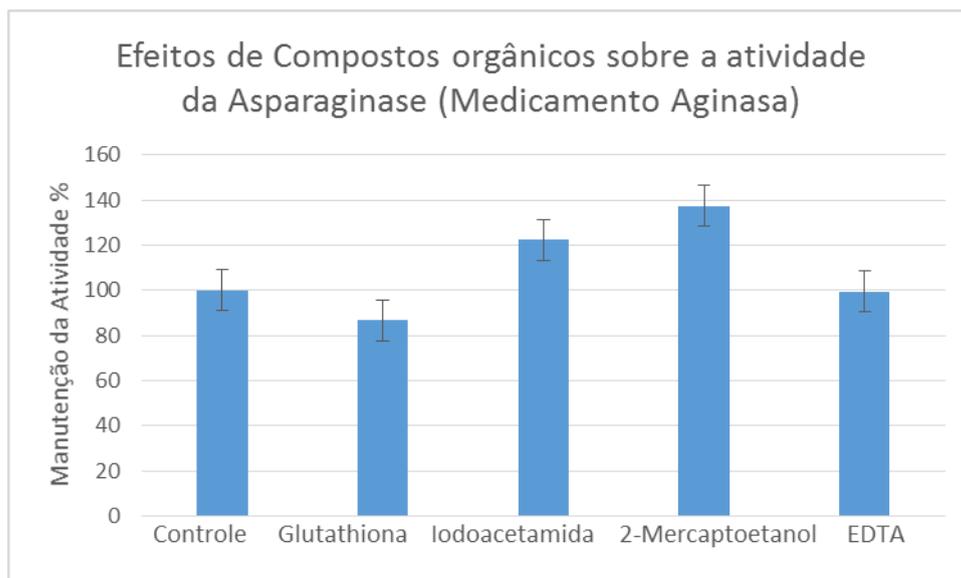


Figura 12. Efeito de determinados compostos orgânicos sobre a atividade enzimática da asparaginase bacteriana. (medicamento Aginasa).

Ao analisar e comparar os efeitos de determinados compostos orgânicos e íons metálicos sobre a asparaginase bacteriana e a de levedura, observa-se que alguns íons metálicos influenciam de forma divergente sobre as enzimas, em especial os íons Na^+ e K^+ , que potencializam a atividade enzimática da asparaginase bacteriana ao contrário da asparaginase de levedura; assim como os compostos orgânicos, indicando que os resultados em relação a influência desses compostos podem diferir, dependendo do micro-organismo produtor da asparaginase.

4.4 Avaliação da atividade glutaminásica

O resultado obtido para a análise da atividade glutaminásica foi de 0,46 UI/ml mostrando que a asparaginase de *Pichia pastoris* recombinante possui baixo poder catalítico sobre o substrato L-glutamina e conseqüentemente baixa atividade glutaminásica. Esta pode ser considerada uma característica bastante interessante da asparaginase de levedura, uma vez que, de acordo com Müller e Boos (1998) a atividade glutaminásica pode induzir a manifestação de efeitos tóxicos.

De acordo com Miller e Balis (1969) as asparaginases de *E. coli* e de *E. chrysanthemi* apresentam atividade glutaminásica, ao contrário da asparaginase de *Penicillium brevicompactum* (Elshafei e col., 2012), que não apresentou poder catalítico sobre ambos substratos L-glutamina e D-glutamina.

4.5 Ensaio de afinidade pelo substrato

A tabela 5 mostra os resultados obtidos na análise de atividade da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante utilizando como substratos a L-asparagina e a D-asparagina. Observa-se que a atividade da enzima contra D-asparagina foi cerca de 1,30 vezes maior do que a atividade contra L-asparagina. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Dunlop et al. 1978 que observaram valores semelhantes quando compararam a atividade de hidrólise da asparaginase II de *S. cerevisiae* contra D- e L- asparagina. As asparaginases bacterianas apresentam atividade somente contra L-asparagina (Muller e Boos, 1998).

Tabela 5- Medida da atividade enzimática da asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante sobre os substratos L-asparagina e D-asparagina

Substrato	Atividade enzimática
L-Asparagina	63,25 UI/ml
D-asparagina	82,29 UI/ml

4.6 Determinação dos parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten- K_m e velocidade máxima - V_{max}) para a asparaginase de levedura (*Pichia pastoris* recombinante)

Os parâmetros cinéticos das catálises enzimáticas têm sido determinados tradicionalmente pelo uso da velocidade inicial (V_0), quando diferentes concentrações de um substrato são usadas. A determinação dos valores de V_{max} e K_m é importante numa reação enzimática. O valor de K_m indica a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor o K_m , maior a afinidade da enzima pelo substrato; logo, a velocidade da reação também será maior. O valor de V_{max} indica a maior taxa de reação que o sistema pode alcançar em condições de saturação da enzima pelo substrato. Segundo Naqui e Chance (1984), a cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas obedece à equação de Michaelis-Menten. A partir dos valores de velocidade da reação (V) e da concentração do substrato L-asparagina $[S]$, os coeficientes cinéticos, a velocidade máxima (V_{max}) e a constante (K_m) de Michaelis-Menten foram calculados.

Os resultados das atividade da enzima em diferentes concentrações do substrato estão apresentados na figura 21, observa-se que a atividade da enzima aumentou com o aumento da concentração de substrato até se estabilizar devido a saturação da enzima.

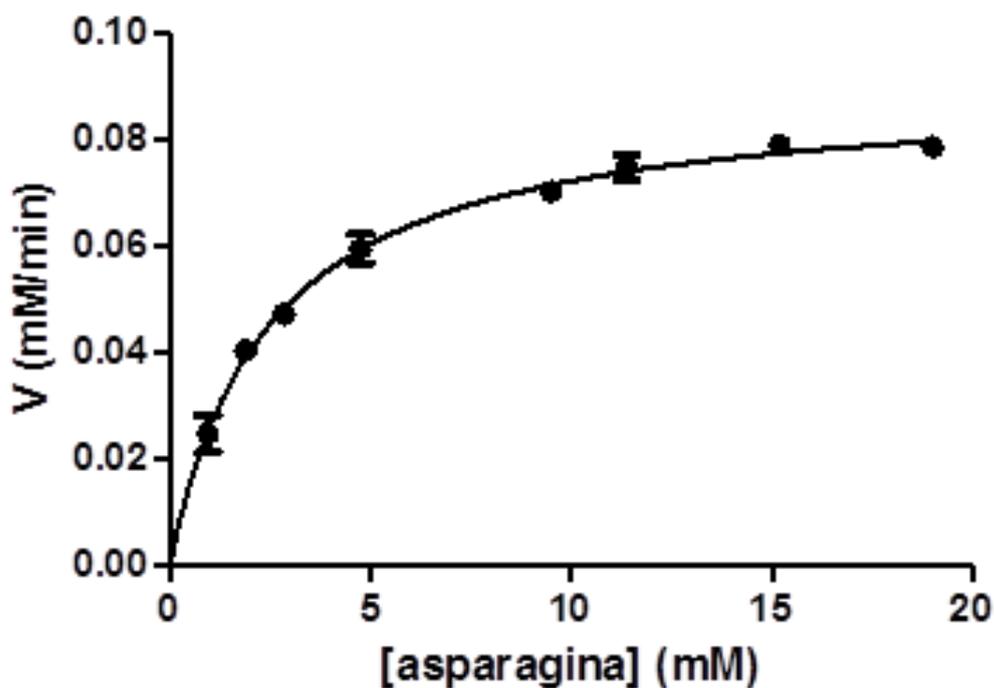


Figura 13. Influência da concentração de substrato na velocidade da reação enzimática catalisada pela asparaginase produzida por *P. pastoris* recombinante.

Os valores de K_m e V_{max} são mostrados na tabela 6, e foram calculados utilizando-se o programa de computador denominado GraphPad Prisma versão 6.0.

Tabela 6. Valores calculados de V_{max} e K_m da asparaginase de *P. pastoris* recombinante em relação ao substrato L-asparagina.

Parâmetros cinéticos	Valores calculados
V_{max} (mM min ⁻¹)	0,090 ± 0,0017
K_m (mM)	2,461 ± 0,170

Dunlop e col. (1978), determinaram V_{max} e K_m para a asparaginase de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando o substrato L-asparagina e encontraram

os valores de 57,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e 0,35 mM, respectivamente. Ao se comparar os valores dos parâmetros cinéticos das asparaginases provenientes das duas leveduras, observa-se que o K_m da enzima expressa em *Pichia pastoris* é cerca de 7 vezes maior do que o da enzima nativa de *S. cerevisiae*. As asparaginases obtidas de *E.coli* e de *E. chrysanthemi* apresentam K_m na faixa de 0,017 mM e 0,058 mM, respectivamente (Derst e col., 2000) (Elshafei e col., 2012) De acordo com relatos de Kumar e col. (2010), a asparaginase de *Pectobacterium carotovorum* apresenta valores de K_m e V_{max} de 0,657 mM e 4,45 UI μg^{-1} respectivamente. Já o valor de K_m da asparaginase de *Penicillium brevicompactum*, é de 1,05 mM, de acordo com Elshafei e col. (2012). Após análise e comparação dos valores dos parâmetros cinéticos encontrados para a asparaginase de expressa em *P. pastoris*, observa-se que a afinidade pelo substrato L-asparagina em termos de K_m é menor se comparado aos valores relatados das asparaginases dos micro-organismos descritos anteriormente (tabela 7). Deve-se ressaltar que o K_m é um parâmetro indicativo da afinidade da enzima pelo substrato nas condições do ensaio, que diferem significativamente das condições ambientais do plasma sanguíneo, não sendo possível, desta forma, inferir a atividade antileucêmica do medicamento a partir deste parâmetro. Para isto, deverão ser realizados ensaios pré-clínicos *in vitro* (contra células leucêmicas) e *in vivo* comparando a enzima de levedura com o medicamento Aginasa.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos de asparaginases de outros micro-organismos.

Micro-organismo	V_{max}	K_m (mM)
<i>Escherichia coli</i>	Não informado	0,017
<i>Erwinia chysanthemi</i>	Não informado	0,058
<i>Bacillus aryabhatai</i>	1,537 UI μg^{-1}	0,257
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	4,45 UI μg^{-1}	0,657
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57,8 mM min^{-1}	0,35
<i>Pichia pastoris</i> <i>recombinante</i>	0,090 \pm 0,0017 mM min^{-1}	2,461 \pm 0,170
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Não informado	1,05
<i>Cladosporium</i> sp.	4,5 mM min^{-1}	132

5. CONCLUSÕES

A asparaginase de levedura apresentou maior estabilidade do que a enzima bacteriana em condições de estocagem em geladeira (4°C), permanecendo com atividade em torno de 98% da original ao longo de 96 h. Já a asparaginase bacteriana apresentou maior estabilidade durante a estocagem a 25°C, com retenção de 90% da atividade com 96 h de estocagem. Nas condições de estocagem em congelador (-4°C), a manutenção da atividade enzimática situou-se na faixa de 82 a 85% para ambas as enzimas.

A atividade da asparaginase de levedura pode ser influenciada negativamente na presença dos íons Na⁺ e K⁺ o que justifica a baixa estabilidade para a enzima quando ressuspensa em tampão fosfato Na⁺/K⁺ e em soro fisiológico.

De acordo com a análise dos efeitos de íons e de determinados compostos sobre a atividade asparaginásica, conclui-se que a asparaginase de *P. pastoris* não é uma metaloenzima e que possui pontes de enxofre em sua estrutura proteica.

A influência de determinados íons metálicos e compostos orgânicos sobre a atividade enzimática da asparaginase diferem dependendo da origem da asparaginase.

A asparaginase de *P. pastoris* recombinante possui baixa atividade glutaminásica o que favorece a sua utilização como medicamento pelo menor risco de efeitos tóxicos.

A asparaginase de *P. pastoris* mostrou maior afinidade pelo substrato D-asparagina se comparado a L-asparagina.

A asparaginase de *P. pastoris* recombinante apresenta maior Km se comparado aos da asparaginase bacteriana, o que pode indicar uma menor afinidade pelo substrato.

O conjunto de resultados obtidos dão suporte à continuação da pesquisa visando o uso da asparaginase de levedura recombinante como medicamento antileucêmico.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinação da estrutura da asparaginase por cristalografia;
- Desenvolvimento de processo em larga escala para a purificação da enzima;
- Realização de ensaios contra células de leucemia;
- Realização de ensaios de imunogenicidade;
- Realização de ensaios pré-clínicos;
- Desenvolvimento de formulação e avaliação da atividade antileucêmica in vivo das formulações;
- Ampliação de escala do bioprocessamento de produção da enzima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE T.; TAMAURA Y.; NISHIMURA Y.; TAKENAKA O.; INADA Y. **Determination of the glutaminase activity of asparaginase.** Journal of Chromatography. 69, 388-390,1972.

AVRAMIS V I.; PANOSYAN E H. **Pharmacokinetic/Pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations.** Clinical Pharmacokinetics. 44(4), 367- 393, 2005.

BALASUBRAMANIAN M N.; BUTTERWORTH E A.; KILBERG M S. **Asparagine syntehetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology.** American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism. 304, E789-E799, 2013.

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

CAPPELLETTI D.; CHIARELLI L R.; PASQUETO M V.; STIVALA S.; VALENTINI G.; SCOTTI C. ***Helicobacter pylori* L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent.** Biochemical and Biophysical research Communications. 377, 1222-1226, 2008.

CEREGHINO G P L.; CEREGHINO J L.; ILGEN C.; CREGG J M. **Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *P. pastoris*.** Current Opinion in Biotechnology. 13, 329-332, 2002.

CLELAND K A P.; CARPENTER J F. **Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric β galactosidase.** Journal of pharmaceutical Sciences. 90, 1255-1268, 2001.

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

DERST C.; HENSENLING J.; ROHM K H. **Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248.** Protein Science. 9, 2009-2017, 2000.

ELSHAFEI A M.; HASSAN M M.; ABOUZED M A E.; MAHMOUD D A.; ELGHONEMY D H. **Purification, characterization and antitumor activity of L asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829.** British Microbiology Research Journal. 2(3), 158-174, 2012.

FERNANDES A I.; GREGORIADIS G. **Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics.** Biochimica et Biophysica Acta. 1341, 26-34, 1997.

FERRARA M A.; MATTOSO J M V.; BON E P S AND PEREIRA JR N. **Kinetics of asparaginase II fermentation in *Saccharomyces cerevisiae ure2dal80* mutant: Effect of nitrogen nutrition and pH.** Applied Biochemistry and Biotechnology. 113- 116, 299-305, 2004.

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

FERRARA M A.; SEVERINO N M B.; VALENTE 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. 47, 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 JR 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, 09/12/2004B.

GELLISSEN G.; KUNZE G.; GAILLARDIN C.; CREGG J M.; BERARDI E.; VEENHUIS M.; VAN DER KLEI I. **New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - A comparison.** FEMS Yeast Research. 5, 1079–96, 2005.

GERVAIS D.; ALLISON N.; JENNINGS A.; JONES S.; MARKS T. **Validation of a 30-year-old process for the manufacture of L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi***. Bioprocess and Biosystems Engineering. 36, 453-460, 2013.

GESTO D S.; CERQUEIRA N M F S A.; FERNANDES P A.; RAMOS M J. **Unraveling the enigmatic mechanism os L-asparaginase II with QM/QM calculations**. Journal of the American Chemical Society. 135, 7146-7158, 2013.

GIRÃO L F C.; ROCHA S L G.; TEIXEIRA R S S.; FERRARA M A.; PERALES J.; BON E P S. **Purificação e caracterização de asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* clonada em *Pichia pastoris***. Anais do X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, ENZITEC 2012, Blumenau, outubro 2012.

GIRÃO L F C.; ROCHA S L G.; TEIXEIRA R S S.; FERRARA M A.; PERALES J.; BON E P S. **Purificação e caracterização de asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* clonada em *Pichia pastoris***. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química.

GONÇALVES A M A Q P.; MAIA C.; SOUSA F.; QUEIROZ J A.; PASSARINHA L A. ***Pichia pastoris*: A recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins**. Journal of Microbiology and Biotechnology. 23 (5), 587-601, 2013.

GUILLEME C M.; DELGADO R F.; NAVARRO J S.; AGUIRRE I A.; SOLÀ S R.; CODINA J S D T.; SOLER J L F.; RAMIREZ L P.; GARICAÑO J M.; MARTINEZ B G.; LÓPEX L M. **Actualización del tratamiento com L-asparraginasa em pediatria**. Anales de Pediatria, 2013.

HARRISON C J. **Acute lymphoblastic leukaemia**. Best Practice & Research Clinical Haematology. Vol 14, N°3, 593-607, 2001.

INABA H.; GREAVES M.; MULLIGHAN C G. **Acute lymphoblastic leukaemia**. Lancet. 381, 1943-55, 2013.

JHA S K.; PASRIJA D.; SINHA R K.; SINGH H R.; NIGAM V K.; SHARAN A V. **Microbial L-asparaginase: A review on current Scenario and Future prospects**. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. Vol.3 (9), 3076-3090, 2012.

KUMAR N S M.; MANONMANI H K. **Purification, characterization and Kinect properties of extracellular L-asparaginase produced by *Clasdorporium* sp.** World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29, 577-587, 2013.

KUMAR S.; DASU V V.; PAKSHIRAJAN K. **Purification and characterization of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428.** Bioresource Technology. 102, 2077-2082, 2011.

LABROU N E.; PAPAGEORGIU A C.; AVRAMIS V I. **Structure-Function relationship and clinical applications of L-asparaginases.** Current Medicinal Chemistry. 17, 2183-2195, 2010.

LANVERS C.; PINHEIRO J P V.; HEMPEL G.; WUERTHWEIN G.; BOOS J. **Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum.** Analytical Biochemistry. 309, 117-126, 2002.

MILLER H K.; BALIS M E. **Glutaminase Activity of L-asparagine amidohydrolase.** Biochemical Pharmacology. 18, 2225-2232, 1969.

MÜLLER H J.; BOOS J. **Use of L-asparaginase in childhood ALL.** Critical Reviews in Oncology/ Hematology. 28, 97-113, 1998.

NAQUI A.; CHANCE B A. **Semi-integrated method for the determination of enzyme kinect parameters and graphical representation of the Michaelis-Menten equation.** Analytical Biochemistry. v. 141, p. 179-183, 1984.

OLIVEIRA E M M.; CARVAJAL E.; MARTINS A S. AND BON E P S. **The role of GATA factors Nil1p and Dal80p on *ASP3* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*.** Yeast. 20, 31-3, 2003.

OLIVEIRA E M M.; CARVAJAL E AND BON E P S. **L-asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: activity profile during growth using a *ure2* mutant P40-3C and a P40-3C + URE2p strain.** Applied Biochemistry and Biotechnology 77- 79, 311-6, 1999.

PLASSCHAERT S L A.; KAMPS W A.; VELLENGA E.; DE VRIES E G E.; DE BONT E S J M. **Prognosis in Childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation?** Cancer Treatment Reviews. 30, 37- 51, 2004.

POKROVSKAYA M V.; POKROVSKIY V S.; ALEKSANDROVA S S.; ANISIMOVA N Y U.; ANDRIANOV R M.; TRESCHALINA E M.; PONOMAREV G V.; SOKOLOV N N. **Recombinant Intracellular *Rhodospirillum rubrum* L- asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect.** Biomedical Chemistry. Vol 6, N°2, 123-131, 2012.

SINGH Y.; GUNDAMPATI R K.; JAGANNADHAM M V AND SRIVASTAVA S K. **Extracellular L-Asparaginase from a Protease- deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: Purification, Biochemical Characterization an Evaluation of Antineoplastic Activity In Vitro.** Applied Biochemistry and Biotechnology 171:1759-1774- 116, 299-305, 2013.

STERN M L.; PHILLIPS A W.; GOTTLIEB A J. **Physical properties of L-asparaginase from *Serratia marcescens*.** Journal of Bacteriology. Vol. 125, N°2, 719-727, 1976.

VIELE C S. **Diagnosis, treatment, and nursing care of acute leukemia.** Seminars in Oncology Nursing. Vol 19, N°2, 98-108, 2003.