UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade
antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus*
(cepa PC-1.7.A)**

Cláudio Battiston Loureiro

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade
antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus*
(cepa PC-1.7.A)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientado: Cláudio Battiston Loureiro

Orientadora: Profa. Dra. Suraia Said

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Loureiro, Cláudio Battiston

Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A). Ribeirão Preto, 2010.
50 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Said, Suraia

1. *Aspergillus terreus* 2. L-asparaginase 3. Purificação de enzimas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Cláudio Battiston Loureiro

Título: Purificação, conjugação e avaliação "in vitro" da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Suraia Said

Aprovado em: ____/____/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Wanderley e Maria Inês pelo apoio, dedicação e carinho,
à minha irmã Cíntia pelo incentivo,
à minha namorada Laís,
aos familiares e amigos.

Agradecimentos

À Professora Dra. Suraia Said pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos. Sua ética e postura profissional estarão sempre em minhas memórias.

À técnica do Laboratório de Enzimologia Industrial, Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti, por sua amizade e inestimável colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas de Laboratório de Enzimologia Industrial por todas sugestões, contribuições e intermináveis discussões.

A todos do Laboratório de Citogenética do Departamento de Puericultura e Pediatria do HC/FMRP – USP.

A todos os Funcionários do Laboratório de Bioquímica da FCFRP – USP, pela contribuição na parte de purificação enzimática.

Ao Professor Dr. Richard John Ward do Departamento de Química da FFCLRP – USP, pela disponibilização das resinas cromatográficas.

A todos os funcionários da FCFRP – USP que sempre me atenderam com carinho e competência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do projeto.

RESUMO

LOUREIRO, C. B. **Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A)** 2010. 50f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A enzima L-asparaginase (L-asparagina amino hidrolase, E.C. 3.5.1.1) é uma das drogas mais utilizadas no tratamento da leucemia linfoblástica aguda. A enzima catalisa a hidrólise do aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia. Algumas linhagens de células tumorais não são capazes de produzir asparagina, dependendo do aminoácido presente no plasma para a síntese proteica. A redução dos níveis plasmáticos de asparagina inibe a síntese de proteínas e depois a síntese de RNA e DNA das células leucêmicas levando-as a morte por apoptose. A cepa de *Aspergillus terreus* (PC-1.7.A) utilizada nesse trabalho foi isolada de solo e produziu altas concentrações de L-asparaginase. O objetivo do presente trabalho foi purificar, caracterizar, conjugar a enzima e avaliar sua atividade citotóxica em linhagens de células tumorais “in vitro”. Para a purificação da enzima foram utilizados métodos cromatográficos de interação por troca iônica (DEAE Sepharose) e por gel filtração em diferentes fluxos (Sephacryl S-200HR). A enzima pura foi conjugada com metóxi polietilenoglicol e manteve 93% da atividade inicial. A enzima presente no fluido da cultura dialisado e concentrado manteve sua atividade por até 90 dias a 5°C. Composta por uma subunidade com massa molecular de 125 kDa a L-asparaginase purificada de *A. terreus* apresentou atividade catalítica ótima em pH 9,5 e 40°C e foi estável nessa temperatura por pelo menos 120 minutos. A enzima pura e pura-conjugada apresentou valores de K_m de 2,42 e 2,51 mM e V_{max} de 11,91 e 12,08 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente. A enzima pura-conjugada perdeu metade de sua atividade em trinta minutos quando incubada com enzimas proteolíticas, enquanto que a enzima pura perdeu metade de sua atividade em cinco minutos sob as mesmas condições. A L-asparaginase pura na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em 50% as células viáveis das linhagens tumorais HL-60 e RS4;11 nos tempos de incubação de 72 e 96 horas, respectivamente, sob as mesmas condições a enzima pura não apresentou atividade citotóxica contra a linhagem controle (PBMC).

Palavras chave: *Aspergillus terreus*, L-asparaginase, atividade antineoplásica, purificação de enzimas.

1. Introdução

1.1. Descrição

A L-asparaginase (E.C.3.5.1.1) é a enzima responsável pela catálise da reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina resultando em ácido aspártico e amônia (NARTA *et al.*, 2007; VERNA *et al.*, 2007). Mais especificadamente catalisa a hidrólise do grupo amino da cadeia lateral do aminoácido, convertendo-o em ácido, portanto a L-asparaginase também foi denominada L-asparagina amino hidrolase. A Figura 1 esquematiza a reação de hidrólise do aminoácido.

Figura 1. Reação catalizada pela L-asparaginase. (modificado de NARTA *et al.*, 2007)

1.2. Histórico

Durante pesquisas com soro de mamíferos Clementi (*Apud* NARTA *et al.*, 2007) descobriu em 1922 que o soro de cobaias apresentava atividade da enzima L-asparaginase. Posteriormente, Kidd (1953) descreveu a regressão de linfomas transplantados em ratos, tratados com soro de cobaia. Broome (1961), pesquisador que atuava junto com Kidd, correlacionou os resultados de Clementi e Kidd, afirmando que a atividade antitumoral devia-se a atividade enzimática da L-asparaginase. Concomitantemente, os pesquisadores McCoy *et al.* (1956) observaram que o crescimento e a viabilidade de alguns tumores dependiam de aminoácidos obtidos de fontes externas às células tumorais e dentre esses de L-asparagina.

O desenvolvimento da pesquisa tornou-se cada vez mais limitado devido a baixa quantidade de L-asparaginase obtida do soro de cobaias para a realização de mais testes clínicos. Outras fontes passaram a ser pesquisadas especialmente as de origem microbiana. Em 1964, Mashbum e Wriston purificaram L-asparaginase produzida pela bactéria *Escherichia coli*, a qual possuía o mesmo efeito terapêutico da enzima encontrada no soro de cobaias. Essa descoberta abriu caminho para produção em larga escala da enzima, possibilitando os primeiros testes pré-clínicos e clínicos. Oettgen *et al.* (1967) foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem a eficácia terapêutica da enzima em humanos com leucemia.

1.3. Farmacologia e Toxicologia

A enzima atua na conversão de L-asparagina em ácido aspártico e amônia, (Figura 2). Alguns tipos de células tumorais necessitam de grandes quantidades de L-asparagina para seu crescimento e captam esse aminoácido do meio extracelular. Uma vez injetada na corrente sanguínea a enzima depleta as reservas de L-asparagina do plasma, impedindo que as células tumorais absorvam o aminoácido. As células normais não são afetadas porque a asparagina necessária para a síntese protéica é produzida no citoplasma em reação catalisada pela enzima asparagina sintetase, a qual não é sintetizada pelas células tumorais, devido a um silenciamento genético, forçando assim a célula tumoral a obter o aminoácido da corrente sanguínea (NARTA *et al.* 2007), o desbloqueio do gene que codifica a asparagina sintetase é suficiente para as células tumorais tornarem-se resistentes ao tratamento com L-asparaginase (ASLANIAN *et al.* 2001; RICHARDS e KILBERG, 2006).

Figura 2. Ilustração esquemática do mecanismo de ação da L-asparaginase. O intermediário covalente proposto é formado pelo ataque nucleofílico da enzima. As setas em negrito representam os ataques nucleofílicos. (modificado de VERMA *et al.*, 2007)

O atual tratamento com L-asparaginase apresenta dois padrões de toxicidade: reações de hipersensibilidade devido ao fato de ser uma proteína estranha ao organismo humano, efeitos adversos provocados pela liberação dos produtos da hidrólise enzimática e pela inibição de síntese protéica conseqüente da diminuição dos níveis de L-asparagina disponíveis na circulação (KURTZBERG, 2000).

Reações de hipersensibilidade atingem de 15 a 73% dos pacientes crianças ou adultos tratados com a enzima. Entre as reações são observadas: urticária, edema, febre, erupções na pele podendo ocorrer em certos casos choques anafiláticos fatais (OHNUMA *et al.*, 1970; KILLANDER *et al.*, 1976; KURTZBERG, 2000). A urticária pode ser tratada com aplicação de anti-histamínicos, contudo os outros sintomas só desaparecem com a troca de medicamento ou interrupção do tratamento (NARTA *et al.* 2007). Outro ponto importante é que as reações de hipersensibilidade são acompanhadas de formação de anticorpos anti-L-asparaginase, principal fator envolvido na redução da meia vida da enzima no plasma (CHEUNG *et al.*, 1986).

A hidrólise da asparagina, catalisada pela L-asparaginase, libera no sangue amônia, que em altas concentrações pode estar relacionado a casos de encefalopatia e hepatotoxicidade, observados durante o tratamento (KURTZBERG,

2000). Miller *et al.* (1969) foram os primeiros a descrever que a L-asparaginase de origem bacteriana pode hidrolisar além de asparagina o aminoácido glutamina, porém com uma afinidade bem menor (o K_m para glutamina é cerca de 100 vezes maior do que para asparagina). O glutamato e o aspartato, produtos da hidrólise da glutamina e da asparagina respectivamente, estão diretamente relacionado com a neurotoxicidade (depressão, letargia, fadiga, sonolência, confusão irritabilidade, agitação, tontura) que ocorre em 25% dos pacientes, principalmente em adultos (POCHEDLY, 1972).

Vários efeitos adversos são causados pela redução dos níveis séricos de asparagina e glutamina, como a diminuição da síntese protéica em tecidos normais como fígado e pâncreas (KURTZBERG, 2000; NARTA *et al.* 2007). No fígado ocorre a redução dos níveis séricos de albumina e lipoproteínas e o aumento de enzimas hepáticas como fosfatases alcalinas e bilirrubina. No pâncreas os efeitos observados são pancreatite e redução da secreção de insulina e de enzimas digestivas. Sérios problemas de hemorragia e tromboembolia podem ser causados devido à redução das concentrações de plasminogênio e dos fatores V, VII, VIII, IX (OETTGEN *et al.*, 1970).

1.4. Modificação enzimática

Desde a década de 70 os pesquisadores buscam soluções para prolongar a meia vida do medicamento e reduzir o potencial imunogênico da L-asparaginase sem perda de suas características terapêuticas (NARTA *et al.*, 2007). As modificações químicas são uma alternativa viável para contornar esses problemas, e atualmente a modificação, que apresenta mais vantagens, é a conjugação com o metoxi polietilenoglicol (m-PEG, Figura 3), que foi aprovada para utilização

terapêutica em 1994, pela Agência Norte Americana de Medicamentos e Alimentos (FDA).

Figura 3. Estrutura do m-PEG ramificado. O grupo succinato é a região do polímero que interage com a enzima e é separado do m-PEG por um aminoácido de lisina. (modificado de Veronese, 2001)

O conjugado m-PEG L-asparaginase é formado através de ligações covalentes entre o polímero e a enzima. Compostos intermediários heterocíclicos permitem que a reação entre m-PEG e a enzima se dê sob condições brandas de pH e temperatura em meio tamponado. O m-PEG se liga à enzima em grupamentos amino livres particularmente com o aminoácido lisina (SOARES *et al.*, 2002; VERONESE *et al.* 1996). Veronese *et al.* (1996) e Veronese (2001) relataram que a ligação das cadeias de m-PEG na enzima diminuiu a imunogenicidade desta, sem perda da atividade. Aliado a isso a conjugação da L-asparaginase com m-PEG aumentou a meia-vida da enzima bacteriana em mais de 24 horas. A tabela 1 ilustra o aumento da meia vida da enzima modificada em relação à nativa.

Tabela 1 – Efeito da conjugação com m-PEG da L-asparaginase sobre a meia-vida da enzima em experimentos “in vivo” com modelos animais

Fonte de asparaginase	L-	Via de administração	Modelo animal	Meia vida (h)	
				Nativa	Conjugada
<i>E. coli</i>		Intraperitoneal	Ratos	2,90	56,0
<i>E. coli</i>		Intravenosa	Camundongos	3,35	32,9
<i>E. coli</i>		Intravenosa	Coelhos	20,0	144,0
<i>Achromobacter</i>		Intravenosa	BDF1 Ratos	2,0	24,0

Modificado de Narta *et al.* 2007.

Outras modificações foram estudadas tais como: ligações químicas com dextrana e peptídeos de polialanina (SOARES *et al.*, 2002; VERONESE *et al.*, 1996); conjugações com albumina humana (POZNANSKY *et al.*, 1982), contudo

esses métodos são sempre acompanhados de certas desvantagens, por exemplo a não redução da imunogenicidade (VERONESE *et al.*, 1996; VERMA *et al.*, 2007).

1.5. Preparações de L-asparaginase utilizadas em terapias

A viabilidade do cultivo de microrganismos em larga escala possibilitou a produção de L-asparaginase, para ser utilizada na terapêutica do câncer. Atualmente, a L-asparaginase terapêutica está disponível em três preparações: duas obtidas a partir de formas nativas, ambas de origem bacteriana, e uma preparação obtida a partir da enzima de *E. coli* conjugada com m-PEG (NARTA *et al.*, 2007). *E. coli* e *Erwinia caratovora* são as espécies produtoras da L-asparaginase comercial nativa (Elspar da Merck® e Erwinase da Speywood®, respectivamente). As duas preparações possuem o mesmo mecanismo de ação e toxicidade, diferindo nas propriedades farmacocinéticas (DUVAL *et al.*, 2002). Pacientes hipersensíveis a uma das preparações pode utilizar a outra sem apresentar reações alérgicas originadas do primeiro tratamento, devido à epítomos diferentes (VERONESE *et al.*, 1996; VERMA *et al.*, 2007).

A preparação da enzima conjugada conhecida como PEG-L-asparaginase ou pegasparaginase foi desenvolvida na década de 1970 e os primeiros ensaios clínicos ocorreram no início da década de 1980 sendo atualmente empregada na quimioterapia de pacientes adultos (DOUER *et al.*, 2007) ou que apresentem hipersensibilidade às formas nativas da enzima (VERMA *et al.*, 2007).

1.6. Produção da L-asparaginase de origem fúngica

Microrganismos eucariotos, tais como leveduras e fungos filamentosos, são também produtores de L-asparaginase, mas atualmente os medicamentos

comercializados utilizam enzima de origem procariótica e a principal desvantagem de seu uso são as reações de hipersensibilidade, muitas vezes fatais. A utilização de L-asparaginase de origem eucariótica (leveduras e fungos filamentosos) pode apresentar reações alérgicas de menor intensidade, devido às propriedades pós-traducionais que ocorrem nestes microrganismos e estão ausentes nos seres procarióticos (SARQUIS *et al.*, 2004). A literatura científica cita, por exemplo, gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, como produtores de L-asparaginase (DE-ANGELI *et al.*, 1970; ARIMA *et al.*, 1972; IMADA *et al.*, 1973 e CARVALHO, 2003). Em 2006 o FDA aprovou a utilização de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* para a redução do teor de L-asparagina da massa de produtos à base de trigo e batata, para o preparo de alimentos utilizados na dieta de pessoas que fazem tratamento com L-asparaginase.

Diversos estudos, sobre as condições de cultivo dos microrganismos produtores da enzima L-asparaginase, mostraram que a produção da enzima é influenciada pelas condições de cultivo do microrganismo como suprimento de oxigênio, temperatura de incubação, pH e nutrientes presentes no meio de cultivo. Sarquis *et al.* (2004) demonstraram que em linhagens do gênero *Aspergillus* a produção de L-asparaginase é regulada pela fonte de nitrogênio. A repressão catabólica que o nitrogênio causa sobre a síntese da enzima L-asparaginase, em fungos filamentosos, é controlada pelos genes ARE-A e NIT-2, os quais codificam uma proteína regulatória, que exerce controle positivo sobre a transcrição da enzima. Essa proteína regulatória é inativada em condições de alto suprimento de amônia (CADDICK *et al.*, 1994; CARVALHO, 2003).

Em *A. nidulans* a produção de L-asparaginase está diretamente relacionada à concentração de L-asparagina presente no meio de cultivo e ao ciclo de

desenvolvimento do fungo, uma vez que a atividade máxima encontrada foi atingida durante a fase de conidiação, ou seja, 48 horas após o crescimento do fungo (SAXENA e SINHA, 1981). O mesmo não acontece com *A. tamarii* pois a máxima atividade de L-asparaginase foi detectada em presença de 2% de L-prolina (SARQUIS *et al.* 2004).

Broome (1968) relatou em seu trabalho que mesmo existindo diversos organismos produtores de L-asparaginase, para que esta enzima seja utilizada clinicamente, no tratamento de leucemias, é necessário que ela seja facilmente isolada, estável e ativa em pH e temperatura fisiológicos e que apresente um baixo valor de K_m , ou seja uma alta afinidade da enzima pelo substrato. Em seus estudos Wriston (1997) observou que as enzimas que apresentaram valores de K_m entre 1 a 5×10^{-5} M conseguiram inibir o crescimento do tumor, enquanto que valores de K_m da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} M, encontrados nas enzimas produzidas por *Bacillus coagulans* e de *Fusarium tricinctum*, por exemplo, não se mostraram eficientes na regressão de linfomas.

1.7. *Aspergillus terreus* como produtor de L-asparaginase

Foster e Said (2005a, 2005b) selecionaram, dentre 93 fungos isolados do solo e endofíticos aqueles que eram capazes de produzir e excretar L-asparaginase extracelulares. Dos selecionados, três cepas de *Aspergillus terreus* produziram altos níveis de L-asparaginase quando cultivados em cultura líquida. As condições ideais de cultivo para que as cepas produzissem L-asparaginase, foram adequadas estabelecendo-se o pH, o tempo de cultivo e as concentrações de carbono e de nitrogênio (FOSTER e SAID, 2006). Dessas três cepas selecionou-se a designada como PC-1.7.A. Esta cepa foi utilizada neste projeto e escolhida por apresentar os

maiores níveis de L-asparaginase, nas condições de cultivo previamente estabelecidas. Resultados preliminares demonstram que o fluido da cultura do *A. terreus* (PC-1.7.A), dialisado e concentrado apresentava atividade antineoplásica, contra as linhagens HL-60 (leucemia promielocítica humana), JURKAT (leucemia de células T aguda) e HEPG-2 (hepatocarcinoma humano).

Há relatos da produção de L-asparaginase por fungos filamentosos incluindo *A. terreus* e até seu efeito na regressão de linfomas em ratos (DE-ANGELI *et al.* 1970, SARQUIS *et al.* 2004), contudo não foi encontrado relato da purificação, caracterização bioquímica e modificação química com m-PEG desta enzima.

A perspectiva para o estudo da L-asparaginase é muito vasta e promissora. Em recente publicação, Verma *et al.* (2007) fizeram uma extensa revisão bibliográfica sobre a enzima e nas palavras dos autores:

“Concluindo, a L-asparaginase e sua pesquisa, mostrou apenas a ponta do iceberg. Embora muito tenha sido revelado, é evidente que ainda existe um longo caminho a ser trilhado explorando esta incrível enzima”.

2. Conclusões

Os procedimentos utilizados para isolar a L-asparaginase, ou seja, cromatografia de troca iônica DEAE Sepharose e duas colunas de gel filtração Sephacryl S-200 (a primeira coluna com fluxo de $9,6 \text{ mL.h}^{-1}$ e a segunda com $6,0 \text{ mL.h}^{-1}$), resultaram em uma fração enzimática pura com atividade específica de 6,78 U/mg de proteína e um fator de purificação de 10 vezes.

A massa molecular da L-asparaginase estimada por gel filtração foi de 136 kDa e em gel de SDS-PAGE com amostra não desnaturada foi de 125 kDa.

A enzima pura e a pura-conjugada apresentaram, respectivamente, K_m de 2,42 e 2,51 mmol.L^{-1} e velocidade máxima de 11,91 e 12,08 $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ na presença do substrato asparagina.

A enzima mostrou-se estável a 40°C por até 2 horas e apresentou pH e temperatura ótimos de 9,5 e 40°C , respectivamente;

A conjugação da enzima com m-PEG manteve 93% da atividade da enzima pura;

A enzima pura-conjugada apresentou meia-vida de 30 minutos a 50°C , enquanto a enzima pura de 15 minutos.

A meia vida da enzima pura-conjugada tratada com tripsina bovina foi superiora da enzima pura, ou seja, 30 minutos para a primeira e 5 minutos para a segunda;

As linhagens leucêmicas HL60 e RS4;11 apresentaram IC_{50} de 200 $\mu\text{g/mL}$ quando a enzima foi incubada por 72 e 96 horas respectivamente. A L-asparaginase pura não apresentou atividade citotóxica contra células mononucleares periféricas do sangue (PBMC). A linhagem leucêmica B15 mostrou-se resistente ao tratamento com a enzima pura.

3. Referências

AMENA, S.; VISHALAKSHI, N.; PRABHAKAR, M.; DAYANAND, A.; LINGAPPA, K. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.173-178, 2010.

ARIMA, K.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, C.; TAMURA, G. Production of extracellular L-asparaginase by microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.36, n.3, p.356-361, 1972.

ASLANIAN, A. M.; FLETCHER, B. S.; KILBERG, M. S. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. **Biochemical Journal**, v.357, p.321-328, 2001.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BORKOTAKY, B.; BEZBARUAH, R. L. Production and properties of asparaginase from a new *Erwinia* sp. **Folia Microbiologica**, v.47, p.473–476, 2002.

BOYUM, A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.21, p.1-108, 1968.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, v.119, p.1114-1115, 1961.

BROOME, J.D. Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. **Journal of Experimental Medicine**, v.127, p.1055-1072, 1968

CADDICK, M. X.; PETERS, D.; PLATT, A. Nitrogen regulation in fungi. **Antoine van Leeuwenhoek**, v.65, p.169-177, 1994.

CARVALHO, I. F **Produção, purificação e caracterização da enzima L-asparaginase de *Aspergillus nidulans***: programa de pós-graduação em Biotecnologia. 2003. 81 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Química de Araraquara , Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

CHAGAS, E. P; SODEK, L. Purification and Properties of Asparaginase from the Testa of Imature Seed of Pea (*Pisum sativum* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, p.239-245, 2001.

CHEUNG, N. K.; CHAU, I. Y.; COCCIA, P. F.; Antibody response to *Escherichia coli* L-asparaginase: prognostic significance and clinical utility of antibody measurement. **American Journal Pediatric Hematology Oncology**, v.8, p.99-104, 1986.

DAVIDSON, L.; BREAR, D. R.; WINGARD, P.; HAWKINS, J.; KITTO, G. B. Purification and Properties of an L-Glutaminase-L-Asparaginase from *Pseudomonas acidovorans*. **Journal of Bacteriology**, v.129, p.1379-1386, 1977.

DE-ANGELI, L. C.; POCOCHANI, F.; RUSSI, S.; TONOLO, A.; ZURITA, A. V.; CIARANFI, E.; PERIN. A. Effect of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* on ascites sarcoma in the rat. **Nature**, v.225, p.51-56, 1970.

DE-JONG, P. T. L-Asparaginase Production by *Streptomyces griseus*, **Applied Microbiology**, v.23, p.1163-1164, 1972.

DISTASIO, J. A.; NIEDERMAN, R. A.; KAFKEWITZ, D.; GOODMAN, D. Purification and Characterization of L-Asparaginase with Anti-lymphoma Activity from *Vibrio succinogenes*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.6929-6933, 1976.

DOUER, D.; YAMPOLSKY, H.; COHEN, L. J.; WATKINS, K.; LEVINE, A. M.; PERICLOU, A. P.; AVRAMIS, V. I. Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia, **Blood**, v.109, p. 2744-2750, 2007.

DRAINAS, C.; PATEMAN, J.A. L-asparaginase activity in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochemical Society Transactions**, v.41, p.1365-1371, 1977.

DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A.; RIALLAND, X.; NELKEN, B.; LUTZ, P.; BENOIT, Y.; ROBERT, A.; MANEL, A.; VILMER, E.; OTTEN, J.; PHILIPPE, N. L. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European

Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial, **Blood**, v.99, p.2734-2739, 2002.

EL-BESSOUMY, A. A.; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 Using Solid-state Fermentation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, p.387-393, 2003.

FINE, B. M.; KASPERS, G. J. L.; HO, M.; LOONEN, A. H.; BOXER, L. M. A Genome-Wide View of the *In vitro* Response to L-Asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Research**, v.65, p.291-295, 2005.

FOSTER, V. C.; SAID, S. Seleção de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase, In: **13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, CD de resumos, 2005a.

FOSTER, V. C.; SAID, S. Seleção de fungos de solo e endofíticos produtores da enzima antineoplásica L-asparaginase, In: **15º Simpósio Nacional de Bioprocessos**, CD de anais, 2005b.

FOSTER, V. C.; SAID, S. Influência da fonte de nitrogênio sobre a produção de L-asparaginase por cepas do solo, In: **VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, CD de resumos, 2006.

FREITAS, D. S.; ABRAHÃO-NETO, J. Biochemical and biophysical characterization of lysozyme modified by PEGylation, **International Journal of Pharmaceutics**, v.392, p.111-117, 2010.

GAFFAR, S. A.; SHETHNA, Y.I. Purification and some biological properties of asparaginase from *Azotobacter vinelandii*, **Applied And Environmental Microbiology**, v.33, p.508-514, 1977.

HASHIMOTO, K.; SUZUKI, F.; SAKAGAMI, H. Declined asparagine synthetase mRNA expression and enhanced sensitivity to asparaginase in HL-60 cells committed to monocytic differentiation. **Anticancer Research**, v.29, p.1303-1308, 2009.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. **Journal Genetics Microbiology**, v.76, p.85-99, 1973.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. **Journal Experimental Medicine**, v.98, p.565-581, 1953.

KILLANDER, D.; DOHLWITZ, A.; ENGSTEDT, L.; FRANZÉN, S.; GAHRTON, G.; GULLBRING, B.; HOLM, G.; HOLMGREN, A.; HÖGLUND, S.; KILLANDER, A. Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. **Cancer**, v.37, p.220-228, 1976.

KURTZBERG, J. Asparaginase. In: BAST, R. C.; KUFEL, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; HOLLAND, J. F.; FREI E. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 5. Ed. B.C.Becker, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v.227, p.690-685, 1970.

MASHBUM, L. T.; WRISTON, J. C. Jr. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*, **Archive Biochemistry Biophysics**, v.105, p.450-452, 1964.

MCCOY, T. A.; MAXWELL, M.; NEUMAN, R.E. The Amino Acid Requirements of the Walker Carcinosarcoma 256 in Vitro. **Cancer Research**, v.16, p.979-985, 1956.

MILLER, H.; SLASER, J.; BALIS, M. Amino acid levels following L-asparaginase amidohydrolase (EC.3.5.1.1.) therapy. **Cancer Research**, v.29, p.183-187, 1969.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia, **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v.61, p.208-221, 2007.

OETTGEN, H.F.; OLD, L.J.; BOYSE, E.A.; CAMPBELL, H.A.; PHILLIPS, F. S.; CLAEKSON, B.D.; TALLAL, L.; SCHWARTZ, M. K.; KIM, J. H. Inhibition of leukemia in man by L-asparaginase. **Cancer Research**, v. 27, p. 2619-2631, 1967.

OETTGEN, H. F.; STEPHENSON, P. A.; SCHWARTZ, M. K.; LEEPER, R. D.; TALLAL, L.; TAN, C. C.; CLARKSON, B. D.; GOLBEY, R. B.; KRAKOFF, I. H.; KARNOFSKY, D. A.; MURPHY, M. L.; BURCHENAL, J. H.; Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. **Cancer**, v.25, p.253-278, 1970.

OHNUMA, T.; HOLLAND, J. F.; FREEMAN, A.; SINKS, L.F. Biochemical and pharmacological studies with L-asparaginase in man. **Cancer Research**, v.30, p.2297-2305, 1970.

PETERSON, R. E.; CIEGLER, A. L-Asparaginase Production by *Erwinia aroideae*. **Applied Microbiology**, v.18, p.64-67, 1969.

POCHEDLY, C. Neurotoxicity due to CNS therapy for leukemia. **Medical and pediatric oncology**, v.3, p.101-115, 1972.

POZNANSKY, M. J.; SHANDLING, M.; SALKIE, M. A.; ELLIOT, J; LAU, E. Advantages in the Use of L- Asparaginase-Albumin polymer as an Antitumor agent, **Cancer research**, v.42, p.1020-1025, 1982.

PRITSA, A. A.; KYRIAKIDIS, D. A. L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.216, p.93-101, 2000.

RICHARDS, N. G. J.; KILBERG, M. S. Asparagine Synthetase Chemotherapy. **Annual Review of Biochemistry**, v.75, p.629-654, 2006.

ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. Ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1997.

SAKAMOTO, T.; ARAKI, C.; BEPPU, T.; ARIMA, K. Partial purification and some properties of extracellular Asparaginase from *Candida utilis* . **Agricultural and Biological Chemistry**, v.41, p.1359-1364, 1977.

SARQUIS, M. I. M.; OLIVEIRA, E. M. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by Filamentous Fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.489-492, 2004.

SAXENA, R. K.; SINHA, U. L.; L-asparaginase and glutaminase activities in the culture filtrates of *Aspergillus nidulans*. **Current Science**, v.50, p.218-219, 1981.

SOARES, A. L.; GUIMARÃES, G. M.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M.; ABRAHÃO-NETO, J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. **International Journal of Pharmaceutics**, v.237, p.163-170, 2002.

STONG, R. C.; KORSMEYER, S. J.; PARKIN, J. L.; ARTHUR, D. C.; KERSEY, J. H. Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. **Blood**, v.65, p.21-31, 1985.

VERMA, N.; KUMAR, K.; KAUR, G.; ANAND, S. L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent, **Critical Reviews in Biotechnology**, v.27, p.45-62, 2007.

VERONESE, F. M.; MONFARDINI, C.; CALICETI, P.; SCHIAVON, O.; SCRAWEN, M. D.; BEER, D. Improvement of pharmacokinetics, immunological and stability properties of asparaginase by conjugation to linear and branched monomethoxy poly(ethylene glycol), **Journal of Controlled Release**, v. 40, p.199-209, 1996.

VERONESE, F. M. **Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions**, *Biomaterials*, v. 22, p. 405-417, 2001.

YELLIN, T. O.; WRISTON, J. C. Jr. Purification and properties of guinea pig serum asparaginase, **Biochemistry**, v.5, p.1605-1612, 1966.

WRISTON, J. C.; **L-asparaginase**. In: BOYER, P. D. *The Enzymes*. 3rded. New York: Academic Press, 1977, v.4, p. 101-121.