www.fcf.usp.br/

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Produção biotecnológica de L-asparaginase
(ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* em
sistema de expressão heterólogo *Pichia*
pastoris

Aluna: Rafaela Coelho Correia

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo

2015

www.fcf.usp.br/

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica

Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris*

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

**Dissertação para Defesa do Curso
de Mestrado, apresentado para o
Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas –
Universidade de São Paulo.**

Aluna: Rafaela Coelho Correia

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

Co-Orientadora: Profa. Dra. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Correia, Rafaela Coelho
C824p Produção biotecnológica de L-asparaginase (*ASP3*) de
Saccharomyces cerevisiae em sistema de expressão heterólogo
Pichia pastoris / Rafaela Coelho Correia. -- São Paulo, 2015.
82p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Pessoa Júnior, Adalberto

Co-orientador: Souza, Gisele Monteiro de

1. Enzima : Biotecnologia I. T. II. Pessoa Júnior, Adalberto,
orientador. III. Souza, Gisele Monteiro de, co-orientador.

620.8 CDD

Rafaela Coelho Correia

Produção biotecnológica de L-asparaginase
(*ASP3*) de *Saccharomyces cerevisiae* em
sistema de expressão heterólogo *Pichia*
pastoris

Comissão Julgadora da Dissertação para Obtenção do Grau de
Mestre

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
1º. Examinador

Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira
2º. Examinador

São Paulo, 26 de Novembro de 2015.

“Não explicar a Ciência me parece perverso.
Quando alguém está apaixonado, quer contar a todo mundo.”

Carl Sagan

DEDICATÓRIA

À minha Mãe, Dinha, por não medir
esforços para realizar todos os meus
sonhos e por todo seu amor.

Ao meu irmão Renato, pela
companhia, amor e confiança.

À minha vó, Leonor, por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois quando não havia mais esperança ele me trouxe a força, a persistência e a coragem. A Fé me reergueu inúmeras vezes neste período.

À minha família, pelo incentivo, pelo carinho e amor inenarrável. Sou e serei eternamente grata. Quero agradecer especialmente a minha mãe e aos meus padrinhos, por tudo que fizeram por mim.

Ao meu Pai, que apesar da distância está sempre no meu coração.

À minha família de Portugal, mesmo com um oceano nos separando nossos corações estão bem próximos.

Ao meu Orientador, Prof. Adalberto, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela confiança no meu trabalho.

À minha coorientadora, Profa. Gi, serei eternamente grata por todo ensinamento, sugestões e risadas.

À minha siamesa, Afilhada e amiga, Bruna, simplesmente por tudo. Pelo companheirismo, pelo incentivo, pela amizade e pelo estímulo diário. Obrigada por cada dia.

Aos meus colegas do LabBiotec, da NanoBio e do lab da Prof. Gisele, pelo companheirismo, em especial à Marcela, por sempre tirar dúvidas e ajudar no que fosse possível.

Aos amigos que a Ciência me trouxe, TaliCami, Erick, Suellen, Val, Gê, Larissa, Alex, Tales e Valker, sem vocês não teria alegria. Obrigada por me aguentarem, por toda ajuda, sugestões e pela amizade sincera.

À minhas queridas amigas de longa data, May, Tati, Jeska e Lika obrigada pelas conversas diárias, pelos conselhos e pelo carinho.

Ao meu grande Amor, Edu, obrigada por dar cor a minha vida, por ser tão compreensivo, tão presente, paciente e amigo. Obrigada pelo carinho e amor. Todos os agradecimentos são pequenos diante de tanto bem que você me faz.

Aos Professores e funcionários da FCF-USP.

À FAPESP pelo constante apoio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 2013/13881-5) e pelo Projeto Temático 2013/08617-7.

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO DA DISSERTAÇÃO	13
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Leucemia Linfóide Aguda	17
2.2. Enzimas	18
2.3. L- Asparaginase	19
2.4. Sistema de Expressão de Proteínas heterólogas em Procariotos.	23
2.5. Sistema de Expressão de Proteínas heterólogas em Eucariotos.	23
2.6. <i>Pichia pastoris</i>	25
2.7. Purificação	29
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Materiais.....	32
4.1.1. Vetor e DNA molde	32
4.1.2. Meios de cultura	33
4.2. Micro-organismos	33
4.3. Reação da amplificação de <i>ASP3</i>	33
4.4. Digestão com enzimas de restrição e Purificação.	34
4.5. Reação de ligação.....	34
4.6. Transformação e Seleção de <i>E. coli</i> DH5 α	35
4.7. Purificação de Plasmídeo por Lise Alcalina	35
4.8. PCR do Plasmídeo purificado para confirmação da presença de Inseto.	36

4.9. Sequenciamento do gene <i>ASP3</i> após inserção nos vetores pPIC9 e pPIC9K.....	36
4.10. Preparação e purificação do Plasmídeo para inserção em <i>P. pastoris</i>	37
4.11. Transformação e Seleção da levedura <i>Pichia pastoris</i>	37
4.12. Confirmação da presença de inserto em <i>P. pastoris</i>	38
4.13. Expressão da proteína em <i>Pichia pastoris</i>	38
4.14. Quantificação de Atividade de L- Asparaginase pelo método de β Hidroxamato aspártico	39
4.15. Elefroforese SDS - PAGE.....	40
4.16. Curva de crescimento	40
4.17. Quantificação de Consumo de glicerol	41
4.18. Estudo da influência das variáveis (temperatura, pH inicial e concentração de indutor) na produção da enzima asparaginase utilizando planejamento fatorial	41
5. RESULTADOS	43
5.1. Primeira Etapa	43
5.1.1. Reação da amplificação de <i>ASP3</i>	43
5.1.2. Digestão com enzimas de restrição e Purificação.	44
5.1.3. Reação de ligação e Transformação das bactérias.	46
5.1.4. PCR do Plasmídeo purificado para confirmação de Inserto.	47
5.1.5. Sequenciamento das construções dos vetores de expressão de <i>ASP3</i>	48
5.1.6. Transformação, seleção e confirmação da presença de inserto em <i>P. pastoris</i>	48
5.2. Segunda Etapa	50
5.2.1. Reação da amplificação de <i>ASP3</i>	50
5.2.2. Digestão com enzimas de restrição e Purificação.	51
5.2.3. Reação de ligação e Transformação das bactérias.	52
5.2.4. Sequenciamento das construções dos vetores de expressão de <i>ASP3</i>	57
5.2.5. Transformação, seleção e confirmação da presença de inserto em <i>P. pastoris</i>	57
5.2.6. Seleção das colônias produtoras de L-asparaginase.....	60
5.2.7. Elefroforese SDS - PAGE.....	61
5.2.8. Curva de crescimento	62
5.2.9. Quantificação de Consumo de glicerol	64
5.2.10. Estudo da influência das variáveis na produção da enzima L- asparaginase utilizando planejamento fatorial	67
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	76
8. ATIVIDADES EXTRACURRICULARES	77
9. REFERÊNCIAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AOX1	Alcool oxidase 1
AOX2	Álcool oxidase 2
ASP3	Gene <i>ASP3</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Asn	Aminoácido asparagina
ASNS	Asparagina sintetase
ASPase	Enzima L-asparaginase
BMGY	Meio Tamponado Complexo contendo Glicerol
BMMY	Meio Tamponado Complexo contendo Metanol
DH5α	Linhagem da bactéria <i>Escherichiacoli</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
Gln	Aminoácido Glutamina
GS	Glutamina Sintetase
LB	Meio Luria-Bertani
LLA	Leucemias Linfoblásticas Agudas
Mut-	Fenótipo que não utiliza metanol em <i>Pichia pastoris</i> recombinante
Mut+	Fenótipo que utiliza mais metanol em <i>P. pastoris</i> recombinante
Muts	Fenótipo que utiliza lentamente o metanol em <i>P. pastoris</i> Recombinante
NotI	Enzima de restrição <i>NotI</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pPIC9[®]	Vetor de expressão utilizado em <i>P.pastoris</i>
pPIC9K[®]	Vetor de expressão utilizado em <i>P.pastoris</i>
RPM	Rotações por minuto
SnabI	Enzima de restrição <i>SnabI</i>
AvrII	Enzima de restrição <i>AvrII</i>
XhoI	Enzima de restrição <i>XhoI</i>
SaII	Enzima de restrição <i>SaII</i>
YPD	Extrato de levedura Peptona e Dextrose

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de Produtos Comerciais oriundos de <i>P. pastoris</i> . Modificado de http://www.pichia.com/science-center/commercialized-products/	28
Tabela 2: Variáveis em Estudo (pH inicial, Temperatura e concentração de Indutor) em seus pontos superiores, centrais e inferiores.	41
Tabela 3: Matriz completa de ensaios do planejamento fatorial fracionário 2 ³ para a otimização da produção da enzima L-asparaginase, utilizando a levedura <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão.	41
Tabela 4: Atividade de cada ensaio do planejamento experimental em 24, 48, 72, 96 e 120 horas de indução	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação catalisada pela L-Asparaginase.	21
Figura 2: Mecanismo de ação antineoplásica da L-Asparaginase.	21
Figura 3: Esquema mostrando a estrutura de leveduras.	23
Figura 4: Esquema do gene <i>ASP3</i> sintético otimizado com a sequência de clivagem da protease de rinovírus e a sequência de 10 histidinas.	30
Figura 5a: Mapa físico do vetor pPIC9.	32
Figura 5b: Mapa físico do vetor pPIC9K.	32
Figura 6: Amplificação do gene <i>ASP3</i> .	43
Figura 7: Vetores e gene <i>ASP3</i> digeridos e purificados.	45
Figura 8: Esquema de reação de ligação.	46
Figura 9: PCR para confirmação da presença de inserto.	47
Figura 10: PCR com <i>iniciadores AOX</i> para confirmação da integração correta no genoma.	49
Figura 11: Amplificação do gene <i>ASP3</i> .	50
Figura 12: Mini prep dos vetores pPIC9® e pPIC9K®.	51
Figura 13: Vetores e gene <i>ASP3</i> digeridos e purificados .	52
Figura 14: PCR de colônia.	53
Figura 15: Mini prep das construções.	54
Figura 16: Esquema da digestão para confirmação da presença de inserto.	55
Figura 17: Digestão para confirmação da presença de inserto.	56
Figura 18: PCR com <i>iniciadores AOX</i> para confirmação da integração correta no genoma.	57
Figura 19: a e b – Triagem de clones de <i>P. pastoris</i> com inserção de <i>ASP3</i> – pPIC9 no genoma. 58	58
Figura 20: a e b – Triagem de clones de <i>P. pastoris</i> com inserção de <i>ASP3</i> – pPIC9K no genoma.	59
Figura 21: Atividade de L-asparaginase pela metodologia de β Hidroxamato aspártico	60
Figura 22: Eletroforese SDS – PAGE.	62
Figura 23: Curva de crescimento de Biomassa (g/L) versus tempo	63
Figura 24: Curva de crescimento em Ln versus tempo.	63
Figura 25: Curvas padrão para quantificação de glicerol.	64
Figura 26: Curva do consumo de glicerol da levedura recombinante <i>P. pastoris</i> .	65
Figura 27: Curva de consumo de glicerol versus Biomassa da <i>P. pastoris</i> recombinante.	66

Figura 28 a: Gráficos de Superfície de contato da otimização da produção de L- asparaginase. **68**

Figura 28 b: Gráficos de Superfície de contato da otimização da produção de L- asparaginase **69**

Figura 28 c: Gráficos de Superfície de contato da otimização da produção de L- asparaginase. **70**

RESUMO

CORREIA, R.C. **Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris***. 2015, 82 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A leucemia linfóide aguda (LLA) é considerada uma doença grave dos glóbulos brancos, sendo mais comum e mais agressiva em crianças e adolescentes. O tratamento para a LLA tem avançado devido aos estudos para a otimização de drogas já utilizadas em quimioterapias. Entre essas drogas estão as enzimas L- asparaginases (ASPases) que atuam reduzindo a concentração de L-asparagina (Asn) na corrente sanguínea, impedindo a proliferação das células cancerosas, visto que essas não conseguem sintetizar quantidades apropriadas desse aminoácido. No entanto, o medicamento por ser oriundo de um procarioto causa severas reações alérgicas aos usuário, afim de diminuir a imunogenicidade deste quimioterápico, é importante gerar um biofármaco oriundo de um eucarioto. Neste âmbito, obtivemos a *Pichia pastoris* recombinante responsável pela produção da enzima ASPase intermembranar, oriunda do gene *ASP3* de *Saccharomyces cerevisiae*. Através do planejamento experimental, foi possível ter um aumento de 5 vezes na atividade obtida na condição inicial. O clone Mut+ alcançou sua melhor atividade de 8,6 U/g de célula nas seguintes condições: 20°C, pH inicial 6 e 1,5% de concentração de indutor.

Palavras-chaves: L-Asparaginase; *Pichia pastoris*; leucemia linfóide aguda; proteína recombinante; biotecnologia.

ABSTRACT

CORREIA, R.C. **Biotechnological Production of L- asparaginase (ASP3) of *Saccharomyces cerevisiae* in a heterologous expression system *Pichia pastoris*.** 2015 , 82 f . Thesis (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is considered a serious disease of white blood cells, is more common and more aggressive in children and adolescents. Treatment for ALL has advanced due to studies for drug optimization already used in chemotherapy. Among these drugs are the enzymes L-asparaginases (ASPases) which act by reducing the concentration of L-asparagine (Asn) in the bloodstream, preventing the proliferation of cancer cells, since these can not synthesize appropriate amounts of this amino acid. However, the drug to be derived from a prokaryote causes severe allergic reactions to the user, in order to decrease the immunogenicity of the chemotherapy, it is important to generate a biopharmaceutical derived from a eukaryote. In this context, we obtained the recombinant *Pichia pastoris* responsible for producing the enzyme ASPase intermembrane, coming from the ASP3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Through the experimental design, it was possible to have a 5-fold increase in activity obtained at the initial condition. The Mut + clone achieved their best activity of 8.6 U / g cell under the following conditions: 20 ° C, initial pH 6 and 1.5% of inducer concentration.

Keywords: L-asparaginase; *Pichia pastoris*; Acute lymphoblastic leukemia; recombinant protein; biotechnology

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leucemia é uma doença grave dos glóbulos brancos (leucócitos), que tem como principal característica o acúmulo de células jovens (blastos) anormais na medula óssea, substituindo as células sanguíneas normais. Acredita-se que a leucemia pode provir de diversos fatores, como genéticos, hereditários, imunológicos, epigenéticos e ambientais (IRONS; STILMANN, 1996; BELSON *et al.*, 2007). Toda neoplasia maligna que acomete indivíduos menores de 15 anos, é considerado câncer infantil, sendo a leucemia linfóide aguda (LLA) a mais comum nesta população (ELMAN; SILVA, 2007). Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia; caso contrário, o quadro pode ser irreversível, levando à morte. Apesar de ser menos frequente em adultos, essa doença pode aparecer em indivíduos com mais de 50 anos (KEBRIAIEI; LARSON, 2003). A LLA apresenta malignidade agressiva em crianças e adolescentes e isso ocorre com maior incidência entre 2 e 5 anos (SOUZA, 2012); também é considerada uma doença heterogênea por requisitar de múltiplas e específicas drogas para um tratamento eficiente (AVRAMIS, 2012).

O tratamento da LLA se dá através de uma combinação de quimioterápicos, a poliquimioterapia. Entre as drogas utilizadas no tratamento da leucemia estão as enzimas L-Asparaginases (ASPases) (ORTEGA *et al.*, 1977). Existem três formulações de ASPases terapeuticamente utilizadas: a L-Asparaginase nativa; a L-Asparaginase peguilada (PEG-asparaginase), que possui ligação covalente com um grupo polietileno glicol, ambas obtidas de *Escherichia coli*; e a L-Asparaginase obtida de *Erwinia chrysanthemi* (Crisantaspase) (CORTIJO-CASCAJARES *et al.*, 2012).

Entretanto, por ser uma droga oriunda de bactérias, a L-asparaginase pode induzir resposta imune, produzindo anticorpos anti-asparaginase. Estes são as principais causas de resistência ao medicamento resultando na redução de sua atividade (PIETERS *et al.*, 2012). Em 2010, a droga teve o fornecimento suspenso no país, o que causou muita ansiedade em todo o sistema de saúde; porém em 2015, a L-Asparaginase usada para o tratamento de LLA no Brasil, passará a ser produzida exclusivamente por meio de uma parceria entre a

Fiocruz e os laboratórios privados NT Pharma e UnitecBiotec. Até 2017 estes produtos terão fabricação 100% nacional (Canal Saúde – FIOCRUZ, 2015). A fim de reduzir custos e efeitos imunológicos, além de aumentar as alternativas na produção de biofármacos brasileiros, utilizando para tal, processos biotecnológicos, uma estratégia interessante e inovadora constitui em desenvolver a produção de L-Asparaginase de *S. cerevisiae* em sistema de expressão heteróloga *Pichia pastoris*.

O objetivo é obter uma cepa de *P. pastoris* que expresse a isoforma de L-Asparaginase 3 extracelularmente para facilitar o processo de purificação industrial. Para isso, será realizada a clonagem do gene sintético (ASP3), com códons otimizados para tradução em *P. pastoris*, em sistemas de expressão de *P. pastoris* e a otimização da produção de L-Asparaginase em agitador metabólico utilizando planejamento experimental, avaliando temperatura, e concentração de indutor (metanol) e pH inicial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leucemia Linfóide Aguda

Na medula óssea ocorre a hematopoese, um sistema responsável pela formação das células sanguíneas, os eritrócitos, leucócitos e plaquetas (ANJOS, *et.al.*, 2000). A leucemia é um processo neoplásico que afeta os glóbulos brancos, normalmente de origem desconhecida, pode ser de origem genética, hereditária, imunológica, epigenética e também ser acarretada por fatores ambientais, como exposição à radiação e a reagentes químicos (IRONS; STILMANN, 1996; BELSON *et al.*, 2007). Essa doença se dá através do acúmulo das células sanguíneas jovens anormais na medula óssea, prejudicando assim a produção das células normais. A carência das células normais pode causar anemia, infecções e hemorragia (BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Toda neoplasia em indivíduos menores de 15 anos é considerado câncer infantil. A Leucemia linfóide aguda é mais presente em crianças, porém pode também surgir em adultos (ELMAN; SILVA, 2007). A LLA incide em crianças de 0 à 14 anos, é mais comum em crianças brancas e meninos (PEDROSA *et.al.*, 2002). Para o diagnóstico é realizado um hemograma, que se apresentará alterado com a presença de células jovens, porém o diagnóstico só se confirma com o mielograma, um exame diretamente da medula óssea (INCA, 2015). Com o tratamento adequado a remissão chega a 95% (TEIXEIRA *et.al.*, 2000).

O tratamento para LLA pode variar de dois a três anos e são constituídos por várias fases: indução de remissão, intensificação-consolidação, reindução, prevenção da leucemia no sistema nervoso central e continuação/manutenção de remissão. As cinco fases são utilizadas em todos os centros (PEDROSA *et.al.*, 2002). A fim de extinguir as células leucêmicas para que a medula volte a produzir as células normais, os pacientes são tratados com a associação de diversos medicamentos, o que é chamado de poliquimioterapia (INCA, 2015).

As enzimas L-asparaginases estão entre os medicamentos utilizados no tratamento da LLA (ORTEGA *et al.*, 1977). As ASPases já comercialmente usadas para o tratamento são provenientes de bactérias como *Escherichia*

colie *Erwinia chrysanthemi*, porém causam alergias e isso pode até neutralizar o seu efeito (RICHA *et.al.*, 2012).

2.2. Enzimas

As enzimas são proteínas globulares de estrutura terciária ou quaternária e agem como catalisadores biológicos. São altamente específicas para os substratos e dirigem todos os eventos metabólicos (CHAMPE & HARVEY, 1989). Elas podem ser formadas por somente proteínas, ou podem apresentar uma fração protéica (apoenzima), juntamente com um cofator, esses quando juntos são chamados de holoenzima (TORTORA, *et.al.*, 2000).

A atividade catalítica das enzimas deve-se a sua integridade molecular, caso haja desnaturação ou dissociação de subunidades a enzima pode vir a perder sua atividade (LEHNINGHER, *et.al.*, 1995). As enzimas possuem sítios ativos formados por aminoácidos deixando que a superfície seja complementar ao substrato, ou seja, elas são extremamente específicas para cada substrato (PENZ JÚNIOR, 1998).

O aumento da temperatura pode acelerar diversas reações químicas; porém, para reações enzimáticas a temperatura elevada pode diminuir ou acabar com sua atividade, devido à desnaturação da proteína, rompendo as ligações de hidrogênio e ligações não-covalentes (TORTORA, *et.al.*, 2010). A temperatura para a desnaturação das enzimas irá variar de acordo com a estrutura da molécula; a desnaturação também pode depender de pH, força iônica e outros componentes presentes. Cada enzima apresenta suas condições ótimas (HALL, 1996).

As enzimas exercem uma função importante em sistemas biológicos e também na indústria, seja em produções do ramo alimentício, ou até mesmo de medicamentos. Em biotecnologia, as enzimas provêm de micro-organismos na maior parte das vezes. Os micro-organismos podem ser selecionados na natureza, ou, modificados geneticamente para expressão mais eficiente da enzima alvo (SERAFINI *et al.*, 2001).

A produção de enzima, em escala industrial, apesar de baixo impacto ambiental, pois essas são biodegradáveis, requerem um trabalho laborioso, caro e interdisciplinar para sua comercialização. É imprescindível o conhecimento de custos e benefícios da relação entre os micro-organismos, o

meio de produção, a fermentação, purificação e a demanda de mercado (MITIDIERI *et al.*, 2002).

2.3. L- Asparaginase

Um avanço no tratamento da LLA pode ocorrer através da otimização do uso de drogas já existentes com a introdução de uma combinação de quimioterapia. A enzima L-asparaginase já faz parte deste tratamento desde os anos 70 (ORTEGA *et al.*, 1977). Os aminoácidos asparagina (L-asparagina ou Asn) e glutamina (L-glutamina ou Gln) não são reconhecidos como essenciais na alimentação, pois muitas células são capazes de sintetizá-los; no entanto, são de extrema importância para a sobrevivência de células cancerosas, pois essas possuem deficiência na síntese de Asn, por não possuírem a enzima Asparagina sintetase devido a um silenciamento genético. Consequentemente, para as células leucêmicas a presença de Asn no meio extracelular e sua absorção são imprescindíveis (HAMERSCHLAK, 2008; MULLER E BOOS, 1998).

Nesse contexto, a enzima ASPase catalisa a desaminação da asparagina e glutamina em aspartato e glutamato, respectivamente, e em amônia, como podemos ver na Figura 1. Tal efeito ocasiona a diminuição da concentração de Asn na corrente sanguínea e as células tumorais que são dependentes do fornecimento exógeno da Asn morrem por apoptose, figura 2 (NOMME *et al.*, 2012). Analisando o fato de que proteínas também são responsáveis pela síntese protéica, regulação de genes envolvidos no crescimento celular e no metabolismo de aminoácidos, alterações da concentração plasmática de Asn e Gln levam à hiper-regulação da expressão de fatores de crescimento como *Insulin-like growth factor-binding protein 1* (IBP1), asparagina sintetase (ASNS), glutamina sintetase (GS) e de oncogenes como *c-JUN*, *c-FOS* e *BCL-2*. Estudos indicam que a queda drástica da concentração de Gln inicia nas mitocôndrias uma cascata intrínseca de apoptose e resulta em morte celular após 2 horas (AVRAMIS, 2012). Contudo, a atividade glutaminásica exacerbada tem sido relacionada ao efeito neurotóxico do tratamento com ASPases (OETTGEN *et al.*, 1970).

Figura 1: Reação catalisada pela L-Asparaginase. Modificado de E. Jaspard 2001.

Figura 2: Mecanismo de ação antineoplásica da L-Asparaginase.

As ASPases bacterianas do tipo II têm desempenhado um papel terapêutico importante no tratamento do câncer por mais de quatro décadas (ANISHKIN *et al.*, 2015). Esse medicamento vem sendo muito utilizado para o tratamento de LLA no Brasil. Estão comercialmente disponíveis 3 formas desta enzima: a L-Asparaginase nativa; a L-Asparaginase peguilada (PEG-asparaginase), ambas oriundas de *Escherichia coli* e a Crisantaspase obtida de *Erwinia chrysanthemi* (CORTIJO-CASCAJARES *et al.*, 2012). Os três tipos possuem o mesmo mecanismo de ação, mas diferem nas suas propriedades farmacocinéticas (RIZZARI *et al.*, 2013).

A ASPase pode induzir resposta imune, produzindo anticorpos anti-asparaginase. Estes são as principais causas de resistência ao medicamento resultando na redução de sua atividade. A resistência à ASPase pode ser sintomática, com sinais de hipersensibilidade clínica, ou assintomática. As reações de hipersensibilidade, devido à produção de anticorpos, têm sido observadas em 60% dos pacientes que fazem uso da enzima derivada de *E. coli*. A fim de reduzir a reação adversa causada pela quimioterapia, desenvolveu-se a PEG-ASPase (conjugada com polietileno glicol) que apresenta, ainda, a vantagem de ter um período de meia-vida biológico maior que a ASPase nativa (Pieters *et al.*, 2012). Entretanto, é comprovada a existência de reação-cruzada entre anticorpos desenvolvidos nos pacientes previamente tratados com ASPase nativa e PEG-ASPase, inviabilizando a mudança de uma formulação para outra. Nesse caso, uma alternativa é a utilização da crisantaspase, oriunda da bactéria *E. chrysanthemi*, pois essa não apresenta reação cruzada com anticorpos gerados contra as formulações de *E. coli*. Porém, a crisantaspase possui uma meia vida biológica menor e 33% dos pacientes ainda possuem reações alérgicas severas à formulação (PIETERS *et al.*, 2012; RIZZARI *et al.*, 2013).

Em contrapartida, existem outras isoformas da enzima L-asparaginase derivadas de diversos outros micro-organismos, como no caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa levedura apresenta duas isoformas dessa enzima, a L-asparaginase citoplasmática e constitutiva é codificada pelo gene *ASP1* e, a L-asparaginase intermembranar, que se encontra entre a membrana citoplasmática e a parede celular, codificada pelo gene *ASP3*, (WANARSKA, *et*

al., 2008). Na figura 3 podemos observar o espaço intramembranar na estrutura de uma levedura. A enzima L-asparaginase do gene *ASP3*, é do tipo L-asparaginase II e possui atividade antitumoral (BOREK e JASKÓLSKI, 2001), mas ainda a escolha da L-asparaginase mais adequada para o tratamento da LLA tem sido um dilema para a comunidade científica.

A L-Asparaginase utilizada no Brasil tem o nome de Elspar[®], originada a partir de *E. coli* e quando utilizada por longo prazo, pode causar hipersensibilidade, levando a reações alérgicas e anafilaxia (REYNOLDS e TAYLOR, 1993; KEATING *et al.*, 1993). Desta forma, seria interessante desenvolver a produção de L-Asparaginase eucariótica, a fim de reduzir os efeitos imunológicos.

Figura 3: Esquema mostrando a estrutura de leveduras. Pode se observar o espaço intermembranar, entre a parede celular e a membrana citoplasmática, onde a enzima L-asparaginase codificada pelo gene *ASP3* se encontra.

2.4. Sistema de Expressão de Proteínas heterólogas em Procariotos.

Já há alguns anos vitaminas, hormônios, antibióticos, enzimas, e medicamentos são produzidos a partir de processos biotecnológicos (VAZ, 2007). A produção de proteínas recombinantes é muito freqüente em *Escherichia coli*, pois é um sistema de fácil manipulação, rápido e barato (SWARTZ, 2001).

As vantagens desse sistema são: o seu rápido crescimento, o conhecimento genético e metabólico deste micro-organismo, disponibilidade comercial de inúmeros vetores e cepas mutantes para expressão de proteínas (BANEYX, 1999).

Entretanto esse sistema apresenta inúmeras desvantagens, pois quando se trata de uma proteína mais complexa os procariotos, mais especificamente a bactéria *E. coli*, não possui um sistema eficiente de enovelamento e também não realiza as modificações pós-traducionais de forma adequada, levando essas proteínas solúveis a aparecerem de forma insolúveis em corpos de inclusão. Dessa forma, a *E. coli* não é indicada para produção de proteínas que necessitam de modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação, isomerização dentre outras. A presença de metionina na porção de amino - terminal de proteínas expressas por *E. coli* pode acarretar reações imunológicas (DALY e HEARN, 2005).

Os corpos de inclusão podem apresentar vantagens quanto ao alto grau de pureza, alta concentração da proteína e proteção contra proteases, porém pode ocorrer perda da atividade, deficiência na integridade da proteína e maior custo devido à necessidade de renaturação das proteínas (TAN et.al., 2002; BANEYX, 1999).

Muitas proteínas foram expressas em *E. coli* de forma inadequada, ou obtidas em corpo de inclusão insolúveis, as mesmas proteínas expressas por *P. pastoris* apresentaram enovelamento correto e foram obtidas em forma solúvel (BOADO et.al., 2000; ROBIN et.al., 2003; MAENG et. al., 2012).

2.5. Sistema de Expressão de Proteínas heterólogas em Eucariotos.

A levedura *S. cerevisiae* foi a primeira a produzir proteínas recombinantes e vários destes biofármacos estão disponíveis comercialmente (SPADIUT et.al., 2014). Apesar da *S. cerevisiae* possuir duas isoformas da

enzima L-asparaginase (ASPase 1 e ASPase 2) suas características fisiológicas não são tão favoráveis para produção de proteínas heterólogas, pois além de produzirem baixo rendimento de conversão de substrato em biomassa, essas hiperglicosilam proteínas e aprisionam a biomolécula-alvo no espaço entre a parede e a membrana celular, o que dificulta os processos de purificação (WANARSKA, *et al.*, 2008). Além disso, o grupo da FIOCRUZ, que também estuda produção de L-asparaginase, realizou um estudo com a *Saccharomyces cerevisiae ure2dal80* mutante e não foi possível obter a enzima extracelularmente, apesar de melhorar sua produção endógena (FERRARA, *et. al.*, 2004).

Por esse motivo outras leveduras, como *Hansenula polymorfa*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arxula adenivorans*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia methanolica* e *Pichia pastoris*, passaram a ser testadas para a produção de proteínas heterólogas (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991; CREGG *et.al.*, 2009). Os sistemas de expressão em leveduras oferecem vantagens consideráveis em relação a sistemas procarióticos ou a outros sistemas eucarióticos. Leveduras não são partículas pirogênicas, são capazes de secretar proteínas e realizar processos de modificação relacionados à secreção. Como um sistema microbiano eucariótico, elas combinam a facilidade de manipulação genética e crescimento relativamente rápido a altas densidades celulares em meios relativamente simples (GELLISSEN, 2000).

Um grupo de leveduras se destaca em aplicações biotecnológicas, como poderosos sistemas de expressão, as leveduras metilotróficas. Nesses micro-organismos, os vetores utilizados para transformação são integrados ao genoma de forma estável, proporcionando um processo consistente de produção (GELLISSEN, 2000). Dentre as leveduras metilotróficas estão as *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* e *Pichia methalonica*; no entanto, a *Pichia pastoris* possui uma vantagem entre as demais, pois a construção de sistema heterólogo em *H. polymorpha* e em *P. Methalonica* são mais trabalhosos (SILVA, PERES e GATTAS, 2009; CREGG *et.al.*, 2009).

Quando comparamos essas células com linhagens de mamíferos e insetos mais uma vez a *P. pastoris* oferece vantagens, pois não necessitam de transfecção viral, as suas condições de cultivo são simples, sua manipulação

genética é relativamente fácil e também possui rotas para síntese de proteínas eucarióticas (MACAULEY – PATRICK *et.al.*, 2005). Quando se trata da expressão de glicoproteínas a melhor opção são as células de mamíferos, pois são as únicas que conseguem realizar a glicosilação semelhantes ao padrão dos humanos, apesar de adicionar ácidos siálicos, os quais não são encontrados em proteínas humanas, podendo aumentar a imunogenicidade (GONÇALVES *et.al.*, 2013).

2.6. *Pichia pastoris*

A *P. pastoris* pertence ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, subfilo *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales*, família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, espécie *P. pastoris* (POUTOU *et al.*, 2005; SILVA *et.al.*, 2009). É uma levedura anaeróbica facultativa, em meio sólido formam colônias de cor branca a creme. Analisando morfologicamente suas células são ovais ou esféricas e sua cor pode mudar de acordo com o meio de cultivo, e quando utilizada a coloração Gram, as células de *P. pastoris* adquirem a cor violeta (POUTOU *et al.*, 2005).

A levedura *P. pastoris* é considerada metilotrófica, pois consegue chegar a altas densidades celulares utilizando metanol como sua única fonte de carbono, sendo essa atividade regulada pelo gene álcool oxidase (AOX) (CEREGHINO, 2000).

Há alguns anos a *P. pastoris* vem sendo a levedura mais estudada por ser considerada um importante e inovador sistema hospedeiro para expressão de altos níveis de uma variedade de proteínas heterólogas (DAMASCENO, 2004; POTVIN *et.al.*, 2012). Esse sucesso é devido a algumas vantagens que a levedura possui, tais como:

- Seu metabolismo: essa levedura tem capacidade de alcançar alta densidade celular em meio mínimo salino simples (160 g/L^{-1} de biomassa seca) (MACAULEY – PATRICK *et.al.*, 2005, POTVIN, *et.al.*, 2012). Possui forte tendência em utilizar rotas aeróbicas e, diferentemente da *S. cerevisiae* que é fermentadora, não é acumuladora de etanol (SPADIUT, *et.al.*, 2014);

- Manipulação genética: a sua manipulação genética é relativamente simples quando comparada a células de mamíferos e insetos (CEREGHINO, 2000). O gene de interesse é integrado no genoma da *P. pastoris*, garantindo a estabilidade do sistema de expressão (PENNELL e ELDIN, 1998).
- Facilidade comercial: o sistema de expressão e ferramentas de manipulação genética se encontram comercialmente disponíveis (CEREGHINO, 2000; POTVIN *et.al.*, 2012)
- Promotor de indução (AOX1): possuem um eficiente promotor de indução por metanol derivado do gene álcool oxidase 1 (AOX1). A álcool oxidase, que catalisa a oxidação de metanol em formaldeído, é a primeira enzima da via de assimilação de metanol. O genoma de *P. pastoris* contém dois genes diferentes que codificam álcool oxidase: o AOX1, que é responsável pela maior parte da atividade álcool oxidase, e o AOX2. Existem três fenótipos em estirpes recombinantes de *P. pastoris*, que diz respeito a sua capacidade de utilizar metanol: a tipo selvagem, que utiliza mais metanol (Mut⁺), onde tanto o AOX1 quanto o AOX2 estão intactos; a tipo utilização lenta de metanol (Mut^s), resultante da supressão do gene AOX1 e a que possui incapacidade de utilização de metanol (Mut⁻), em que ambos genes, AOX1 e AOX2, são interrompidos. Normalmente para produção de proteínas heterólogas ocorrem duas fases, sendo que na primeira a levedura recombinante é cultivada com uma alta densidade celular em uma fonte de carbono não fermentável, como o glicerol. Após a exaustão do glicerol, a segunda fase é iniciada, pela adição do metanol, o que induz a produção de proteínas (CEREGHINO, *et. al.*, 2000). O sistema AOX1 necessita da ausência de glicose para ser plenamente ativado, uma vez que esse é controlado pela fonte de carbono no meio de cultura (TORRES e MORAES, 2000).
- Modificações pós-traducionais: as leveduras são células eucarióticas, assim como as células de mamíferos, por essa razão conseguem expressar proteínas recombinantes

complexas. Dessa forma, acontecem o enovelamento das proteínas de forma correta e as modificações pós-traducionais necessárias. Essas modificações são especialmente importantes para proteínas que precisam de glicosilação, fosforilação, metilação, pontes de dissulfeto entre outras. Outro aspecto importante é que *P. pastoris*, diferente da *S. cerevisiae*, não hiperglicosila as proteínas de interesse, adicionando muitas manoses que resultam em aumento das reações alérgicas (WANARSKA, M. *et al.*, 2008).

- Alta produção: com esse sistema de expressão consegue-se alto rendimento na produção da proteína alvo em meio relativamente simples, gerando baixo custo (MACAULEY – PATRICK *et.al.*, 2005, POTVIN, *et.al.*, 2012).
- Purificação: a própria *P. pastoris* funciona como um filtro, pois das suas proteínas nativas poucas são secretadas. Assim, com a ajuda dos fatores de secreção, as proteínas heterólogas são direcionadas para o meio de cultivo, representando 80 a 90% das proteínas totais do meio, o que facilita os processos posteriores de purificação (PENNELL e ELDIN, 1998; CREGG *et.al.*, 2009; POTVIN *et.al.*, 2012).

Apesar de inúmeras vantagens podemos listar algumas limitações do sistema, como:

- Metanol: apesar de ser um componente essencial para indução das proteínas heterólogas, são altamente inflamáveis. Por esse motivo, o metanol requer uma atenção especial, tanto no seu armazenamento (risco de explosões) como no seu manuseio (risco de intoxicação por inalação) (POTVIN, *et.al.*, 2012).
- Proteases: Durante o cultivo podem ser encontrados altos níveis de proteases e essas podem degradar a proteína recombinante. As proteases podem ser super-expressas quando houver falta de fontes

nitrogenadas ou de outros nutrientes e também quando estão em condições de estresse (Li *et.al.*, 2007).

- Tamanho da proteína: o tamanho da proteína recombinante pode ser outro limitante, as proteínas expressas nesse sistema são inferiores a 120 kDa (PENNELL e ELDIN, 1998).

Dessa forma, com as ferramentas genéticas disponíveis, com a facilidade e baixo custo de produção e purificação facilitada da proteína alvo, faz com que a *P. pastoris* seja a escolha para o sistema de expressão de diversas proteínas heterólogas (MACAULEY – PATRICK *et.al.*, 2005).

Na Tabela 1 podemos observar alguns produtos comerciais de uso terapêutico ou industrial produzidos em *P. pastoris*.

Tabela 1: Lista de Produtos Comerciais oriundos de *P. pastoris*. Modificado de <http://www.pichia.com/science-center/commercialized-products/>

PRODUTO	EMPRESA	USO
Kalbitor® (Inibidor da caliceína)	Dyax (EUA)	Tratamento de angioedema hereditário
Insugen® (insulina humana)	Biocon (Índia)	Tratamento para diabetes
Medway (albumina humana)	Mitsubishi Tanabe Pharma (Japão)	Regulação do Volume sanguíneo
Shanvac™ (Vacina contra Hepatite B)	Shantha/Sanofi (Índia)	Prevenção de Hepatite B
Shanferon™ (interferon-α 2b)	Shantha/Sanofi (Índia)	Tratamento de Hepatite C e Câncer
Ocriplasmin (microplasmina)	ThromboGenics (Bélgica)	Tratamento de adesão vitreomacular
Nanobody® ALX-0061 (fragmento de anticorpo anti-receptor IL6)	Ablynx (Bélgica)	Tratamento de artrite reumatóide
Nanobody® ALX00171 (fragmento de anticorpo anti - RSV)	Ablynx (Bélgica)	Tratamento de infecção pelo vírus respiratório sincicial
Heparin-binding EGF (fator de crescimento)	Trillium (Canadá)	Tratamento de cistite intersticial
Purifine (fosfolipase C)	Verenium/DSM (EUA)	Degomagem de óleos
Recombinanttrypsin (Tripsina)	Roche Applied Science (Alemanha)	Digestão de Proteínas
Recombinantcollagen (colágeno)	Fibrogen (EUA)	Preenchimento dermatológico
AQUAVAC IPN (vacina contra o vírus IPN)	Merck/Schering Plough Animal Health (EUA)	Prevenção da necrose pancreática infecciosa em salmão
Recombinantphytase (Fitase)	Phytex, LLC (EUA)	Aditivo de ração animal
Superior Stock (Nitrato redutase)	The Nitrate Elimination Co. (EUA)	Tratamento e teste de nitrato em água
Cystatin C (Cristatina C)	Scipac (Reino Unido)	Reagente para pesquisa

2.7. Purificação

Com os recursos da biologia molecular existe a possibilidade de integrar diversas sequências sinais nas proteínas, algumas delas são as caudas, normalmente compostas por aminoácidos, possibilitando a purificação por

cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (BRESOLIN et al., 2009).

A nossa proteína alvo, a L-asparaginase possui uma cauda de histidina (His-Tag). Essa cauda é composta por 10 resíduos de histidina na porção C-terminal. A histidina tem alta afinidade com Níquel, neste âmbito, a proteína poderá ser purificada por cromatografia de afinidade utilizando para isso colunas com Níquel imobilizado. Em seguida, a cauda pode ser retirada com o uso de proteases, pois o nosso gene otimizado possui a sequência de clivagem da protease de rinovírus, como podemos observar no esquema da figura 4.

Figura 4: Esquema do gene *ASP3* sintético otimizado com a sequência de clivagem da protease de rinovírus e a sequência de 10 histidinas.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a expressão extracelular da enzima L- Asparaginase (Gene *ASP3*) de *S. cerevisiae*, utilizando para tal propósito sistemas de expressão baseados em levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Como parte integrante deste trabalho, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Clonagem do gene sintético, *ASP3* com códons otimizados para expressão em *Pichia pastoris*;
- Construção de sistemas de expressão de L-Asparaginase 3 com e sem sequência sinal endógena para secreção em *P. pastoris*;
- Estudos das melhores condições de expressão de L-Asparaginase;
- Otimização da produção de L-Asparaginase em agitador metabólico utilizando planejamento experimental com as variáveis: temperatura, concentração de indutor (metanol) e pH inicial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Vetor e DNA molde

Nesse projeto utilizamos os vetores para expressão em *P. pastoris*: pPIC9® e pPIC9K® (Figura 5 a e b), ambos adquiridos da empresa Invitrogen® (Estados Unidos). O DNA molde para a sequência de ASP3 foi adquirido da empresa GenScript® (Estados Unidos).

Figura 5: Mapa do vetores. a) Mapa físico do vetor pPIC9. 5' AOX1: promotor do gene AOX1 de *P. pastoris*; S: peptídeo sinal de secreção do fator α de *S. cerevisiae*; 3' AOX1-TT: terminador de transcrição do gene AOX1 de *P. pastoris*; pBR322 origem de replicação em bactéria; Ampicilin: gene de resistência a ampicilina, marca de seleção em bactéria. b) Mapa físico do vetor pPIC9K. Semelhante ao vetor pPIC9, porém com um gene de resistência a mais, o da Canamicina. Os mapas estão disponibilizados pela empresa Invitrogen (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf).

4.1.2. Meios de cultura

Para *E.coli* foi utilizado o meio de cultura Luria Bertani (LB), composto por: Triptona 10g/L, Extrato de levedura 5g/L e Cloreto de Sódio 10g/L. Para a levedura *Pichia pastoris* foram utilizados os meios BGMV (extrato de levedura 1% (p/v), peptona de caseína 2% (p/v), tampão fosfato de potássio pH 6,0 (100mM), YNB sem aminoácidos + sulfato de amônio 1,34% (p/v), biotina 0,4 mg/L⁻¹, glicerol 1% (v/v), casaminoácidos 2% (p/v)), meio BMMV (extrato de levedura 1% (p/v), peptona de caseína 2% (p/v), tampão fosfato de potássio pH 6,0 (100mM), YNB sem aminoácidos + sulfato de amônio 1,34% (p/v), biotina 0,4 mg/L⁻¹, metanol 1% (v/v), casaminoácidos 2% (p/v)) e para a seleção dos transformantes os meios MD ágar (YNB sem aminoácidos 1,34% (p/v), biotina 0,4 mg/L⁻¹, glicose 2%(p/v) e ágar bacteriológico 1,4%(p/v)), e MM Ágar (YNB sem aminoácidos 1,34% (p/v), biotina 0,4 mg/L⁻¹, metanol 5%(v/v) e ágar bacteriológico 1,4%(p/v)).

4.2. Micro-organismos

A linhagem de bactéria *E. coli DH5α*, foi utilizada para realização de manipulações genéticas, como propagação e amplificação de DNAs plasmidiais provenientes de ligações de produtos de PCR nos vetores pPIC9[®] e pPIC9K[®]. A linhagem de levedura *Pichia pastoris* GS115 foi utilizada como sistema de expressão heteróloga.

4.3. Reação da amplificação de ASP3

Para a amplificação do gene ASP3 por PCR foi realizada uma reação com volume final de 50 µL. Utilizamos duas concentrações de DNA molde, que foram de: 100 pg e 10 pg, 5U da enzima PfxDNA Polimerase (Invitrogen[®]), 5,0 µL de Pfx Buffer 10X, 0,2 mM de dNTP mix, 15,0 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores, desenhados através do website “Integrated DNA Technologies”, com as seguintes sequências: ASP3 forward: 5´ CCG TAC GTA ATG AGA AGT TTG AAT ACC TTG TTG C 3´; ASP3Tforward: 5´ CGG TAC GTA ATG TTG CCT TCT ATT AAG ATT TTT GG 3´; ASP3 reverse: 5´ AAG GAA AAA AGC GGC CGC TTA GTG ATG ATG 3´, e 1,5 mM de MgSO₄. A reação foi realizada com 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 min e 35 ciclos de: 94°C por 45 segundos; 60 °C por 40 segundos (Anelamento);

68°C por 1 minuto (extensão) finalizando com 1 ciclo de 68°C por 7 minutos (Extensão final). A temperatura de anelamento dos iniciadores, *ASP3 forward*, *ASP3T forward* e *ASP3 reverse* são respectivamente 60,4°C, 59,2°C e 60,7°C, de acordo com essas, foi determinada a temperatura de anelamento de 59,0°C para o primeiro ciclo de PCR teste. Em uma segunda etapa um novo iniciador foi desenhado *ASP3(2)forward*: GGGCCTAGGATGAGAAGTTTGAATACCTTG e sua temperatura de anelamento é de 60,2°C.

4.4. Digestão com enzimas de restrição e Purificação.

A digestão, dos vetores e dos DNAs de inserto (gene *ASP3* e gene *ASP3* truncado – retirando a sequência nucleotídica que daria origem ao peptídeo de sinalização direcionamento intermembranar do gene *ASP3*, essa região é predita pelos 31 resíduos de aminoácidos iniciais) amplificados, foi realizada com as enzimas de restrição *Sna**bl* e *Not**I*. Na segunda etapa após realizar a amplificação do gene *ASP3*, o mesmo foi digerido com as enzimas *Avr**II* e *Not**I*. Para cada reação foi adicionado 30,0 µL de inserto, 6,0µL de tampão (Cutsmart) 10X e 2 µL de cada enzima de restrição (5U/µL de *Sna**bl* e 20U/µL de *Not**I*), para um volume final de 60 µL; as amostras foram incubadas a 37°C por 3 horas. Após a incubação as reações foram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) corado com brometo de etídeo (5µg/mL) e foi realizada a purificação dos vetores e do inserto do gel pelo kit, illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification, da empresa GE Healthcare UK Limited, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5. Reação de ligação

A reação de ligação dos produtos de PCR com os vetores pPIC9® e pPIC9K® previamente digeridos e purificados foram realizadas à 16°C por 16 horas. Utilizamos 15 ng do inserto e 40 ng dos vetores pPIC9® e pPIC9K®, 5U de T4 DNA Ligase (Promega®) e tampão de reação 1x, em um volume final de 15 µL.

4.6. Transformação e Seleção de *E. coli* DH5 α

A transformação dos micro-organismos foi realizada através da técnica de eletroporação que consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte de membrana, promovendo uma formação transitória de poros (INOUE, et. al., 1990). Para isso, usamos bactérias eletrocompetentes, aquelas que se encontram em um estado fisiológico que as tornam capazes de receber DNA exógeno, através do choque. Bactérias eletrocompetentes, tais como *E. coli*, podem ser produzidas através de uma série de centrifugações repetidas, primeiro para remover o meio de crescimento e substituí-lo com água ultrapura e, finalmente, para substituir a água com glicerol. Nos passos finais, as bactérias são suspensas novamente num pequeno volume de glicerol 10%, divididas em tubos e armazenadas por até 6 meses em uma temperatura de -80°C . Os parâmetros utilizados para eletroporação foram: voltagem de 2,5 KV, capacitância de 25 μF e o tempo de 4,5 ms. Após o choque foi adicionado 1 mL de meio LB estéril e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora. Foram plaqueadas em meio LB Agar, contendo antibiótico (carbenicilina $50\mu\text{g/mL}$) e incubadas por 16 horas a 37°C . A seleção se deu através do gene de resistência a carbenicilina contido no vetor na bactéria.

4.7. Purificação de Plasmídeo por Lise Alcalina

Extração de plasmídeo foi realizada segundo o método de lise alcalina-SDS (SAMBROOK, J. et.al., 1989). Colônias isoladas foram inoculadas em 3 mL de meio LB com carbenicilina ($50\mu\text{g/mL}$), em um agitador rotativo a 180 rpm e a 37°C , durante 16 horas. Após crescimento, cada cultura foi centrifugada a $3000 \times g$ por 2 minutos, a temperatura ambiente. Todo o sobrenadante foi descartado. Para cada pellet foi adicionado 100 μL da solução A (glicose 50 mM; Tris HCl 25 mM e EDTA 10 mM) e em seguida foi misturado até que o conteúdo dos tubos estivesse homogeneizado. Foram adicionados 200 μL de solução B (NaOH 0,2 M e SDS 1%), e misturado cuidadosamente por inversão, incubou-se por 2 minutos em temperatura ambiente. Após o período foram adicionados 200 μL de solução C (Ácido acético 3 M e Acetato de Potássio 5 M) e misturados por inversão 8 vezes; as amostras foram incubadas no gelo por 30 minutos e centrifugado $12000 \times g$ por 15 minutos. Enquanto os tubos

estavam na centrífuga foram adicionados 300 µL de isopropanol em tubos de 1,5 mL novos e nesses tubos foram adicionados 400 µL do sobrenadante, os tubos foram estocados a – 20 °C por 3 horas e centrifugados a 3500 x g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de etanol 70% gelado para lavar o pellet, centrifugou-se a 3500xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos secaram em estufa a 37°C. Depois que o precipitado secou, o mesmo foi dissolvido em água bidestilada contendo RNase (60 µg/mL), os tubos foram incubados a 37 °C por 16 horas. Os plasmídeos purificados foram separados e quantificados em gel de agarose 1%(m/v) .

4.8. PCR do Plasmídeo purificado para confirmação da presença de Inserto.

Foi realizado um PCR para a confirmação de presença dos insertos nos plasmídeos, utilizando a mesma metodologia do item 4.3. As amostras foram visualizadas e quantificadas, após eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Depois de quantificados, foi realizada mais uma PCR, dos plasmídeos que obtiveram insertos, para melhorar a concentração de inserto para sequenciamento.

4.9. Sequenciamento do gene *ASP3* após inserção nos vetores pPIC9 e pPIC9K

Para verificação da integridade das construções pPIC9-Asp3, pPIC9K - Asp3, pPIC9-Asp3T e pPIC9K-Asp3T foi realizado o sequenciamento. Para sequenciar o gene *ASP3*, as reações foram feitas utilizando o fluoróforo *BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit* e as corridas foram realizadas no aparelho de sequenciamento *ABI PRISM® 3100GeneticAnalyzer /HITACHI*(do laboratório de sequenciamento, IQ/USP). Foram realizados dois sequenciamentos. Na primeira etapa do nosso trabalho utilizamos o produto de uma PCR para ser seqüenciado, com os mesmos iniciadores da amplificação dos genes de interesse (Item 4.3.). Para sequenciamento da segunda etapa utilizamos uma miniprep da construção final como molde, e os iniciadores utilizados foram os de reconhecimento da *AOX*, os quais possibilitaram ver no sequenciamento a integração do gene com os vetores.

4.10. Preparação e purificação do Plasmídeo para inserção em *P. pastoris*

Após o sequenciamento, foi necessário adquirir uma grande concentração do plasmídeo para que a transformação em *P. pastoris* fosse eficiente; sendo assim, utilizamos o kit de Mega – Prep da Quiagen®; que consegue extrair e purificar altas concentrações de plasmídeo a partir de um cultivo de células. No nosso caso utilizamos para a Mega – prep 500 mL de cultivo de *E. coli* DH5α transformada com o plasmídeo recombinante.

O plasmídeo recombinante foi linearizado para se integrar genoma da levedura com a enzima *Sall* à 37°C por 1 hora. Através do equipamento *SpeedVacuum* da Eppendorf que faz a concentração e evaporação de amostras utilizando vácuo no processo, concentramos os plasmídeos linearizados.

4.11. Transformação e Seleção da levedura *Pichia pastoris*

Para adquirir células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115, plaqueamos uma cepa do estoque a -80°C em meio YPD, e essa placa foi mantida em estufa a 30°C até o crescimento de colônias, aproximadamente 3 dias. No pré inoculo, utilizou-se uma colônia isolada da cepa que cresceu em 5 mL de YPD a 30°C e 200 rpm, por 30 horas. Inoculou-se 300µL do pré-inóculo em 500 mL de meio YPD que foi incubado a 30°C e 200 rpm de agitação, até atingir OD₆₀₀ = 1,3 a 1,5. Centrifugou-se as células a 3000 x g por 15 minutos sob refrigeração de 4°C, o pellet passou por lavagens em 250 mL de água gelada estéril por duas vezes. Centrifugou-se as células a 3000 x g por 15 minutos a 4°C, ressuspendeu-se o *pellet* em 20 mL de sorbitol 1M gelado estéril e centrifugou-se as células a 3000 x g por 15 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se o pellet em 500 µL de sorbitol 1M gelado e aliquotou-se em tubos com 80 µL cada para eletroporar.

Nas alíquotas de 80 µL adicionamos 30 µg do plasmídeo linearizado, o conteúdo foi transferido para uma cubeta de 0,2 cm para eletroporação e mantidas em gelo por 10 minutos. As células foram pulsadas por um eletroporador (*MicroPulserElectroporator*- Biorad®) na seleção *Fungi*. Depois de eletroporadas, adicionou-se 1 mL de sorbitol, 200 µL foram plaqueados em

meio MM e o restante em outra placa de MM, meio seletivo para clones que possuem o gene *HIS4*. As placas foram mantidas a 30°C por 4 dias.

4.12. Confirmação da presença de inserto em *P. pastoris*

A presença do inserto em *P. pastoris* foi confirmada através de PCR utilizando os iniciadores comerciais AOX1, os quais possuem as seguintes sequências:

AOX15':GACTGGTTCCAATTGACAAGC

AOX13':GCAAATGGCATTCTGACATCC

Com esses *iniciadores* é possível observar se o gene foi inserido, ou se apenas o vetor vazio está integrado no genoma. O PCR foi realizado de acordo com instruções do manual da *Pichia pastoris* da Invitrogen®. Para uma reação de 50 µL utilizamos, 1 µL de mini-prep (GE – Healthcare life sciences), 5 µL do tampão 10X, 5 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTPs 25 mM, 1µl do iniciador AOX1 5' (10pmol/µL), 1 µL do iniciador AOX1 3' (10 pmol/µL), 1µl(5 unidades) da enzima *Taq* polymerase (Invitrogen®). A reação foi incubada no termociclador a 95°C por 5 minutos, em seguida passou por 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. A etapa de extensão foi realizada por 7 minutos a 72°C. Uma alíquota de 4µl foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.13. Expressão da proteína em *Pichia pastoris*

Após identificar os clones que possuíam o gene de interesse, foi realizada uma varredura para constatar o clone com maior produção de L-asparaginase ativa. Foram testados 30 clones da seguinte maneira: Inoculou-se 1 colônia isolada em 100 mL de meio BMGY por 24 horas, em seguida adicionou-se 1% de Metanol para a indução de proteínas e essa etapa se repetiu a cada 24 horas até completar 96 horas. As amostras foram retiradas após 24, 48, 72 e 96 horas de indução. A atividade de L-asparaginase foi quantificada pelo método de β Hidroxamato aspártico (Item 4.13).

4.14. Quantificação de Atividade de L- Asparaginase pelo método de β Hidroxamato aspártico

Com a metodologia de β Hidroxamato aspártico, podemos quantificar a atividade de L-asparaginase, uma vez que essa reduz asparagina em aspartato, o qual irá reagir com a hidroxalamina, originando um produto, o hidroxamato aspártico. Esse produto reage com FeCl_3 e produz cor avermelhada que absorve em comprimento de onda de 500 nm. Uma unidade de ASPase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de β -hidroxâmico-aspártico por minuto por mililitro (U/mL), quando testamos o sobrenadante ou por grama (U/g), quando foram testadas as células intacta (*pellet*).

Quando quantificamos as amostras do sobrenadante foram adicionados 0,6 mL do Tris HCl (1 M, pH 8,6), 0,2 mL de Asparagina (0,1 M), 0,2 mL de Hidroxalamina (1 M) e 1 mL de amostra (sobrenadante). A reação foi incubada por 30 minutos a 37 °C sob 180 rpm de agitação e posteriormente adicionou-se 0,5 mL de Cloreto férrico onde foi adicionado TCA (0,20 M) e HCl (0,66 M). Centrifugou-se à 10000 x g por 10 minutos e em seguida a absorbância foi medida 500 nm. Quando os *pellets* foram quantificados, utilizamos 0,1g de pellet (massa úmida), 1,5 mL do Tris HCl (1 M e pH 8,6), 0,2 mL de Asparagina (0,1 M) e 0,2 mL de Hidroxalamina (1 M). A reação foi incubada por 30 minutos à 37 °C sob 180 rpm de agitação em agitador metabólico, e posteriormente adicionou-se 0,5 mL de Cloreto férrico (0,3 M) onde foi adicionado TCA (0,20 M) e HCl (0,66 M). Centrifugou-se à 10.397 x g por 10 minutos e em seguida a absorbância foi medida 500 nm. Posteriormente, os pellets de 0,1 g foram secos em estufa a 50°C reduzindo sua biomassa para 0,02 g.

Foi realizado um branco para cada reação e para isso foi utilizado a mesma quantidade de amostra (1mL de sobrenadante ou 0,1 g de *pellet*), foi adicionado 0,6 mL do Tris HCl (1 M, pH 8,6). A reação foi incubada por 30 minutos a 37 °C sob 180 rpm de agitação e posteriormente adicionou-se 0,5 mL de Cloreto férrico onde foi adicionado TCA (0,20 M) e HCl (0,66 M), 0,2 mL de Asparagina (0,1 M) e 0,2 mL de Hidroxalamina (1 M).Centrifugou-se à

10000 x g por 10 minutos e em seguida a absorbância foi medida a 500 nm e então, subtraía-se essa absorbância da amostra em questão.

O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação1.

Equação1:

$$\frac{U}{g} \text{ ou } \frac{U}{mL} \text{ de ASPase} = \left[\frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico}) \times (\text{vol. da amostra}) \times (\text{vol. final da reação})}{(\text{tempo da reação})} \right]$$

4.15. Eletroforese SDS - PAGE

Para análise da enzima L-asparaginase foram corridas eletroforeses em gel SDS – PAGE (*sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) desnaturante e redutor. Foram utilizados géis de 20% de acrilamida (Biorad) e equipamento *Mini-protean* (Biorad) ajustado para 160 V. Após a corrida os géis foram corados com *Coomassie Blue* R-250 (Biorad®).

As amostras do sobrenadante analisadas na eletroforese foram precipitadas com TCA 25% e as amostras dos *pellets* foram lisadas com pérolas de vidro e tampão de lise. Esse tampão foi composto de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mM, PBS (Tampão fosfato-salino) 1x, glicerol 5% e PMSF (fluoreto de Fenilmetilsulfonil) 1mM. Em 15 µL do sobrenadante precipitado, ou do lisado celular, foram adicionados 3 µL do tampão de proteína 5X e 0,5 µL de DTT (ditiotreitól) 1M, as amostras foram incubadas por 5 minutos à 95°C e posteriormente aplicadas no gel SDS – PAGE. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (Composição: 25 mM de Tris, 0,025 M de Glicina e 0,1% de SDS)

4.16. Curva de crescimento

Depois de selecionado o melhor clone produtor de L-asparaginase pela *varredura*, foi realizada uma curva de crescimento do mesmo. Para isso crescemos 0,7 g de célula em 100 mL de meio BMGY 1% de glicerol. Para esse cultivo foi utilizado erlenmeyer de 250 mL, em pH 6,0 as amostras foram

incubadas a 30°C e 250 rpm. Foram tiradas alíquotas de 3 mL a cada duas horas. As amostras foram centrifugas à 4042 x g por 10 minutos e em seguida as células foram colocadas em estufa para secagem à 50°C por 24 horas em tubos previamente pesados. Em seguida, os tubos foram pesados novamente para estabelecermos a concentração de células. O sobrenadante foi conservado para análise de consumo de glicerol.

4.17. Quantificação de Consumo de glicerol

Para quantificar o glicerol foi utilizado o kit colorimétrico *Triglicerides Labtest* (Brasil), no qual o glicerol é convertido enzimaticamente em Glicerol-3-fosfato, oxidado a dihidroxiacetato e peróxido de hidrogênio e então ocorre um acoplamento entre o peróxido de hidrogênio com o 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo uma quinoneimina com absorbância a 505 nm. Anteriormente a quantificação do consumo de glicerol da *P. pastoris* recombinante, foram realizadas duas curvas padrão para quantificação de glicerol, sendo uma com água e a outra com o meio BMGY. As concentrações de glicerol da curva foram de: 0 g; 0,125 g; 0,250 g; 0,5 g; 1,0 g; 1,5 g; 2,0 g e 2,5 g. Foram adicionados 10 µL de amostra e 1 mL do reagente (Triglicerides Labtest), as amostras ficaram incubadas a 37°C por 10 minutos e lidas em espectrofotômetro a 505 nm. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras do cultivo fermentado. Os valores de absorbância foram convertidos à concentração de glicerol a partir de interpolação dos pontos formados da regressão linear da curva de calibração.

4.18. Estudo da influência das variáveis (temperatura, pH inicial e concentração de indutor) na produção da enzima asparaginase utilizando planejamento fatorial

Na etapa de crescimento, todos os cultivos foram inoculados com 1 g/L de células e 1% de glicerol, pH 6,0, 30 °C e com uma rotação de 250 rpm. Já na etapa de expressão de L-asparaginase foi realizado um planejamento fatorial 2³, apresentado nas Tabelas 2 e 3, tendo como objetivo investigar a influência de 3 variáveis independentes: pH inicial, temperatura, pH inicial e concentração do indutor, que em n, correspondem respectivamente aos

valores: X1, X2 e X3. Nesse planejamento o ponto central foi repetido 4 vezes para possibilitar o cálculo do erro experimental. Após a realização dos experimentos foi realizada a regressão multivariável dos resultados, com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, 2004), adaptado de Barros Neto *et al.* (2007) e Rodrigues e Iemma (2005). A validação do modelo foi obtida através do coeficiente de determinação (R^2) da análise de variância (ANOVA) da regressão multivariável.

Tabela 2: Variáveis em Estudo (pH inicial, Temperatura e concentração de Indução) em seus pontos superiores, centrais e inferiores.

	-1	0	+1
x1 (Temperatura °C)	20	25	30
x2 (pH)	6	6,5	7
x3 (Indutor %)	0,5	1	1,5

Tabela 3: Matriz completa de ensaios do planejamento fatorial fracionário 2^3 para a otimização da enzima L-asparaginase, utilizando a levedura *Pichia pastoris* como sistema de expressão.

Ensaio	x1	x2	x3	T(°C)	(pH)	I (%)
1	-	-	-	20	6	0,5
2	+	-	-	30	6	0,5
3	-	+	-	20	7	0,5
4	+	+	-	30	7	0,5
5	-	-	+	20	6	1,5
6	+	-	+	30	6	1,5
7	-	+	+	20	7	1,5
8	+	+	+	30	7	1,5
9	0	0	0	25	6,5	1
10	0	0	0	25	6,5	1
11	0	0	0	25	6,5	1
12	0	0	0	25	6,5	1

5. RESULTADOS

5.1. Primeira Etapa

Os resultados serão apresentados em primeira e segunda etapa, pois houve duas tentativas de construções para o sistema de expressão heterólogo em *Pichia pastoris*.

5.1.1. Reação da amplificação de *ASP3*

O gene *ASP3* de *Saccharomyces cerevisiae* foi amplificado através da Reação em cadeia da polimerase (PCR), que é um método que visa à criação de múltiplas cópias de um gene, sendo uma replicação do DNA *in vitro*, que se dá pelo uso da enzima DNA polimerase. Para isso também são necessários iniciadores específicos, os quais se ligam por pontes de hidrogênio ao início da fita de DNA que se quer multiplicar. O par de iniciadores *ASP3forward* e *reverse* amplificou uma região de 1152 pares de bases e o par de iniciadores *ASP3Tforward* e *reverse* amplificaram uma região de 990 pares de bases, ambos correspondentes aos nucleotídeos responsáveis por codificar a enzima L-asparaginase. Podemos observar o resultado da amplificação dos DNAs de acordo com a Figura 6.

Estudamos duas formas da enzima, sua forma nativa e sua forma truncada. A forma truncada é a clonagem do DNA de *S. cerevisiae* sem os 31 resíduos de aminoácidos iniciais, pois a L-asparaginase de *S. cerevisiae* possui 32 aminoácidos iniciais que não alinham no sequenciamento com as isoformas bacterianas. Essa região é predita como sequência de direcionamento para secreção da proteína, que deve ser clivada na forma madura da L-asparaginase. Entretanto, um estudo da autora FERRARA et. al., 2006 com a forma truncada mostrou que não foi possível obter a enzima expressa extracelularmente. Sendo assim é importante para o grupo comparar diversos parâmetros da proteína truncada com a proteína selvagem, pois há sugestão de que o uso das sequências sinais endógenas de direcionamento para secreção, poderiam agir em sinergia com o fator alfa inserido durante a construção dos vetores de expressão, levando à secreção de proteínas que não foram secretadas somente em fusão com o fator alfa (LAROCHE, et al., 1994).

Figura 6. Amplificação do gene ASP3. 1 – Amplificação do gene ASP3na concentração de 100 pg de molde e purificado. 2-Padrão de quantificação *Low DNA Mass Ladder*. 3-Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®). 4- Amplificação do gene ASP3 forma truncada na concentração de 100 pg de molde.

Sendo assim, esses genes amplificados foram utilizados para as seguintes etapas.

5.1.2. Digestão com enzimas de restrição e Purificação.

Os produtos da PCR e os vetores pPIC9® e pPIC9K® foram digeridos com as enzimas *Sna* I e *Not* I separadamente; após a purificação das amostras do gel de agarose, a recuperação e quantificação das amostras digeridas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%(m/v), como nos mostra a Figura 7.

Escolhemos trabalhar com os dois vetores, pois ambos apresentam o gene *HIS4*, como marcador de seleção, que produz a enzima histidina desidrogenase, capacitando os transformantes a crescerem em meio sem Histidina (DALY e HEARN, 2005). Entretanto, o vetor pPIC9K é mais recente e possui um gene de resistência a Canamicina (bacteriano) que confere

resistência a Geneticina (G418) em *Pichia pastoris*. O nível de resistência à Geneticina depende do número de cópias de genes de resistência integrados ao genoma da *P. pastoris*. Uma única cópia de pPIC9K integrado nesse genoma, confere uma resistência à Geneticina para um nível de aproximadamente 0,25 mg/mL desse antibiótico. Quanto mais cópias de pPIC9K no genoma, maior será o nível de resistência a Geneticina, entre 0,5 mg/mL (1-2 cópias) até 4 mg/mL (7-12 cópias). Por causa da ligação genética entre o gene da canamicina e o "cassete de expressão" (*PAOX1* e o gene de interesse, no nosso caso *ASP3*), pode-se deduzir que os clones super-resistentes à Geneticina possuem várias cópias do gene *ASP3*. A expressão da proteína secretada pode aumentar por causada dosagem do gene. Assim, a presença do gene de Canamicina no pPIC9K pode ser usado como uma ferramenta para detectar transformantes pPIC9K que abrigam várias cópias do gene de interesse (Manual pPIC9K[®]. A Pichia Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression - Invitrogen[®]).

Figura 7. Vetores e gene *ASP3* digeridos e purificados. 1- Vetor pPIC9[®] recuperado do gel. 2- Vetor pPIC9K[®] recuperado do gel. 3- Gene *ASP3* recuperado do gel. 4 – Gene *ASP3na* forma truncada, recuperado do gel. 5 - Padrão de quantificação *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen[®]). 6 - Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder*

Através do gel da Figura 8 podemos quantificar a concentração das amostras, sendo de 10 ng/μL do vetor pPIC9[®], 20 ng/μL do vetor pPIC9K[®] e 2,5 ng/μL dos genes *ASP3* e *ASP3* na forma truncada. Essa quantificação é importante para sabermos as concentrações exatas a serem usadas na reação de ligação.

5.1.3. Reação de ligação e Transformação das bactérias.

A reação de ligação visa unir dois fragmentos de DNA, que tenham sido clivados formando extremidades coesivas, através da formação de uma ligação fosfodiéster e para isso usamos a enzima DNA ligase, que catalisa essa reação. Assim, conseguimos unir de forma direcional o nosso inserto no vetor desejado, como nos mostra a Figura 8.

Figura 8. Esquema de reação de ligação. Reação onde tanto o inserto como o vetor estão com extremidades coesivas e através da enzima DNA ligase, que cataliza essa reação, os fragmentos são unidos.

Utilizamos uma proporção molar de 3:1 de inserto:vetor, na presença da T4 DNA ligase e a reação foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, transformamos a *E. coli DH5α* com o plasmídeo recombinante adquirido. Com colônias isoladas resistentes à carbenicilina foram realizados inóculos, mantidos a 37°C por 16 horas; posteriormente, realizamos a

purificação de plasmídeo por lise alcalina e esses foram quantificados em gel de agarose 1%(m/v).

5.1.4. PCR do Plasmídeo purificado para confirmação de Inserto.

Foi realizado um PCR com as amostras da Purificação de lise alcalina para a confirmação da presença de inserto nesses vetores isolados, os quais foram confirmados para todas as construções (ASP3 - pPIC9[®], ASP3 - pPIC9K[®], ASP3T - pPIC9[®] e ASP3T - pPIC9K[®]), como podemos observar na Figura 9.

Figura 9:PCR para confirmação da presença de inserto. 1 e 2 –Confirmação da presença de inserto das amostras do gene *ASP3* com o vetor pPIC9[®]. 3 e 4 - Confirmação da presença de inserto das amostras do gene *ASP3* com o vetor pPIC9K[®]. 5- Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder*. 6 e 7- Confirmação da presença de inserto das amostras do gene *ASP3*, na sua forma truncada, com o vetor pPIC9[®]. 8 - Confirmação da presença de inserto das amostras do gene *ASP3*, na sua forma truncada com o vetor pPIC9K[®]

Para realizarmos o sequenciamento e confirmarmos se a construção está apta para prosseguirmos com o projeto utilizamos todas as amostras que apresentaram inserto da Figura 9.

5.1.5. Sequenciamento das construções dos vetores de expressão de ASP3

O equipamento utilizado para sequenciar foi o *ABI PRISM 3100GeneticAnalyzer/HITACHI*. Para realizarmos a reação do seqüenciamento utilizamos um produto de PCR utilizando os iniciadores específicos. O resultado adquirido do sequenciamento revelou que a sequência de nucleotídeos dos insertos das seguintes construções: ASP3 - pPIC9[®], ASP3 - pPIC9K[®], ASP3T - pPIC9[®] e ASP3T - pPIC9K[®], estão sem mutações.

5.1.6. Transformação, seleção e confirmação da presença de inserto em *P. pastoris*

Após o sequenciamento revelar que as construções obtidas estavam sem mutações, a levedura *P. pastoris* foi transformada com 30 µg do plasmídeo linearizados com a enzima *Sall*. Os clones foram selecionados pela capacidade de crescer em meio sem Histidina (MD), isso acontece, pois os transformantes possuem o gene *HIS4*. Em seguida, as colônias foram semeadas em MM ágar, um meio mínimo que contém altas concentrações de metanol; as colônias que conseguiram se desenvolver rapidamente nesse meio são capazes de metabolizar metanol, caracterizando nossas transformantes como Mut+, pois as colônias Mut s metabolizam o metanol lentamente.

Um PCR com os iniciadores AOX 5' e 3' foi realizado, para a confirmação da presença do gene *ASP3* de acordo com o item 4.12. Como podemos observar na figura 10, somente os vetores, sem o gene *ASP3* foram integrados ao genoma da *P. pastoris*. As amostras 1, 2, 4 e 5 representam as construções ASP3T - pPIC9K clones 1 e 2, ASP3T - pPIC9 e *P. pastoris* transformada apenas com pPIC9K vazio, respectivamente; todas as amostras possuem a banda do mesmo tamanho de 492 pb. De acordo com o manual da *Pichia pastoris* - Invitrogen[®], os vetores pPIC9K[®] e pPIC9[®] vazios possuem o tamanho de amplificado com os iniciadores AOX de 492 pb; caso o gene *ASP3* estivesse também integrado no genoma da *P. pastoris*, teríamos duas bandas para recombinantes Mut+, uma banda de 1482 pb (990 pb do gene de interesse + 492 do vetor) e a outra banda teria 2200 pb decorrentes do gene *AOX1*. As colônias Muts apresentariam uma única banda de 1482 pares de base.

Figura 10: PCR com *iniciadores AOX* para confirmação da integração correta no genoma. 1- ASP3T - pPIC9K1, 2- ASP3T - pPIC9K2, 3- Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder*. 4- ASP3T - pPIC9, 5 - pPIC9K vazio

Desta forma, foi necessário realizar novas construções, pois a transformação em *P. pastoris* não aconteceu de forma eficiente. Acreditamos que os vetores pPIC9K[®] e pPIC9[®] poderiam estar contaminados ou com alguma deficiência, uma vez que esses vetores foram doados ao nosso laboratório e estavam sendo usados há muito tempo. Outra possibilidade seria que os iniciadores específicos tenham sido contaminados com o gene *ASP3* durante as manipulações. Isso porque o produto de um PCR foi usado como molde para o sequenciamento possa ter, apresentando a sequência correta do mesmo, porém vetores vazios. Sendo assim foram adquiridos vetores novos e realizamos novas construções com novos iniciadores. As construções novas serão descritas brevemente como segunda etapa dos resultados.

5.2. Segunda Etapa

5.2.1. Reação da amplificação de ASP3

O par de *iniciadores* ASP3(2) *forward* e *reverse* amplificou uma região de 1152 pares de bases e o par de *iniciadores* ASP3T*forward* e *reverse* amplificou uma região de 990 pares de bases, ambos correspondentes aos nucleotídeos responsáveis por codificar a enzima L-asparaginase. Podemos observar o resultado da amplificação dos DNAs de acordo com a Figura 11.

Figura 11:Amplificação do gene ASP3. Amplificação do gene ASP3 truncada na concentração de 100 pg. 2- Amplificação do gene ASP3 truncada na concentração de 10 pg. 3- Amplificação do gene ASP3 na concentração de 100 pg. 4 - Amplificação do gene ASP3 na concentração de 10 pg. 5 - Padrão de quantificação *Low Mass DNA Ladder* 6-Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®).

Estoques dos vetores pPIC9K® e pPIC9® recém adquiridos da Invitrogen foram realizados.Houve nova extração desses vetores e na figura 12 observamos que ambos possuem o tamanho correto: vetor pPIC9K® com 9.3 Kb e vetor pPIC9® com 8.0 Kb.

Figura 12: Mini prep dos vetores pPIC9[®] e pPIC9K[®]. 1 e 2 - Mini prep do Vetor pPIC9[®]. 3 e 4 - Mini prep do Vetor pPIC9K[®]. 5- Padrão de massa molar 1kb plus DNA ladder. 6 - Padrão de quantificação Low DNA Mass Ladder (Invitrogen[®]).

5.2.2. Digestão com enzimas de restrição e Purificação.

Os produtos da PCR e os vetores pPIC9[®] e pPIC9K[®] foram digeridos separadamente com as enzimas *Sna*bl e *Not*I, para as construções do gene *ASP3* na sua forma truncada. Para as construções do gene *ASP3* na forma nativa os vetores pPIC9[®] e pPIC9K[®] e os produtos da PCR foram digeridos separadamente com as enzimas *Avr*II e *Not*I, por 3 horas à 37°C. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%(m/v), em seguida essas amostras foram isoladas e recuperadas do gel utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* da empresa GE Healthcare[®]. Após a purificação, a recuperação e quantificação das amostras digeridas foram analisadas através de um gel de agarose 1%(m/v), como nos mostra a Figura 13.

Figura 13: Vetores e gene ASP3 digeridos e purificados. 1 – Gene ASP3 recuperado do gel e purificado. 2 - Vetor pPIC9[®] digerido com as enzimas *AvrII* e *NotI*, recuperado do gel e purificado. 3 - Vetor pPIC9K[®] digerido com as enzimas *AvrII* e *NotI*, recuperado do gel e purificado. 4 - Gene ASP3 na sua forma truncada recuperado do gel e purificado. 5 - Vetor pPIC9[®] digerido com as enzimas *SnaBI* e *NotI*, recuperado do gel e purificado. 6 - Vetor pPIC9K[®] digerido com as enzimas *SnaBI* e *NotI*, recuperado do gel e purificado. 7 - Padrão de quantificação Low DNA Mass Ladder (Invitrogen[®]). 8 - Padrão de massa molar 1kb plus DNA ladder.

Através do gel da Figura 13 podemos quantificar a concentração das amostras, sendo de 30 ng/µL dos vetores pPIC9[®] e pPIC9K[®] e 50ng/µL dos genes ASP3 e ASP3 na forma truncada. Essa quantificação é importante para sabermos as concentrações exatas a serem usadas na reação de ligação.

5.2.3. Reação de ligação e Transformação das bactérias.

Em seguida, transformamos a *E. coli DH5α* eletrocompetente com o plasmídeo recombinante obtido. Após a transformação, realizamos um PCR de colônia, com as colônias isoladas resistentes à carbenicilina. O PCR foi realizado com os iniciadores específicos de cada construção de acordo com o item 4.3. Posteriormente, analisamos os produtos da PCR através de uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) como mostrado na Figura 14.

Figura 14: PCR de colônia. No gel superior: 1– 5 - PCR de colônia da construção ASP3 - pPIC9®, 6 – Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder*. 7 – 11 – PCR de colônia da construção ASP3 - pPIC9K®. No gel inferior 1 – 5 - PCR de colônia da construção ASP3T - pPIC9®, 6 – Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder*. 7 – 11 – PCR de colônia da construção ASP3T - pPIC9K®.

Os produtos da PCR de colônia apresentaram por volta de 1 kb, o tamanho esperado, confirmando assim a presença do gene *ASP3eASP3T* nas nossas construções, exceto a amostra 2 do gel inferior da construção ASP3T - pPIC9®. Em seguida, duas colônias de cada construção foram escolhidas para os ensaios posteriores.

Uma Mini prep das colônias selecionadas foi realizada, posteriormente uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) foi corrida para análise das amostras, apresentados na figura 15.

Figura 15: Mini prep das construções. 1 e 2 – Mini prep da construção do Gene *ASP3* ligado ao Vektor pPIC9[®].3 e 4– Mini prep da construção do Gene *ASP3* ligado ao Vektor pPIC9[®]K. 5 - Padrão de quantificação *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen[®]). 6 -Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder*. 7 e 8 - Mini prep da construção do *Gene ASP3*, na forma truncada ligado ao vetor pPIC9[®]. 9, 10 e 11 – Mini prep da construção do Gene *ASP3*, na forma truncada ligado ao vetor pPIC9K[®].

A Mini prep das construções apresentaram o tamanho esperado e para a confirmação da presença de inserto nas construções com o vetor pPIC9[®] foi realizada uma restrição com as enzimas *XhoI* e *Sall* à 37°C por 2 horas. O produto da digestão com as enzimas são dois fragmentos, como demonstra no esquema da figura 16. Sendo que o vetor vazio apresentou duas bandas, uma com 6305 pb e outra com 1695pb. Já os plasmídeos recombinantes apresentaram uma banda com 6305pb e outra com 2847 pb, obtendo 1152 pb a mais do que vetor vazio, que é exatamente o tamanho do gene *ASP3*, podemos então concluir que nossos vetores possuem o inserto. As bandas da digestão podem ser observadas na figura 17.

Figura 16:Esquema da digestão para confirmação da presença de inserto. a) Vetor pPIC9[®] vazio digerido com as enzimas *Xho* I e *Sal* I. b) Plasmídeo Recombinante digerido com as enzimas *Xho* I e *Sal* I.

Figura 17: Digestão para confirmação da presença de inserto. 1 - Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder*. 2 e 3 – Construção do gene ASP3 ligado ao Vetor pPIC9[®]. 4 – Construção do gene ASP3 T ligado ao Vetor pPIC9[®]. 5 – Controle com o vetor pPIC9[®] vazio.

Com as construções utilizando o vetor pPIC9K[®], realizamos um PCR com os *iniciadores* da AOX, conforme o item 4.12. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), apresentado na figura 18.

Figura 18: PCR com *iniciadores* AOX para confirmação da integração correta no genoma. 1 - 2 – Produto da PCR da construção do gene ASP3 ligado ao Vetor pPIC9K[®]. 3 - 4 – Produto da PCR da construção do gene ASP3 T ligado

ao Vetor pPIC9K[®]. 5 - 6 – Controle com o vetor pPIC9K[®] vazio. 7 - Padrão de massa molar *1kb plus DNA ladder*

Como observamos na figura 18, o vetor pPIC9K[®] vazio (a amostra 6) apresenta 492 pb, o mesmo valor que o manual da Invitrogen[®] disponibiliza. As construções ASP3 - pPIC9K[®] e ASP3T - pPIC9K[®], apresentaram o inserto, pois todas apresentavam o tamanho de seu inserto 1152 e 990 pb, respectivamente, adicionados de 492 do vetor pPIC9K[®].

Sendo assim, as 4 construções (ASP3 - pPIC9, ASP3 - pPIC9K, ASP3T - pPIC9 e ASP3T - pPIC9K) foram seqüenciadas.

5.2.4. Sequenciamento das construções dos vetores de expressão de ASP3

O sequenciamento do DNA é uma série de processos bioquímicos que tem por finalidade determinar a ordem dos nucleotídeos em uma amostra de DNA, podendo definir se amostra possui mutação ou não.

O equipamento utilizado para sequenciar foi o *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer/HITACHI*. O resultado adquirido do sequenciamento revelou que a sequência de nucleotídeos dos insertos das seguintes construções: ASP3 - pPIC9 e ASP3 - pPIC9K estão sem mutações. Entretanto, as construções: ASP3T - pPIC9 e ASP3T - pPIC9K, apresentaram mutações nas ligações dos genes com os vetores.

Desta forma, prosseguimos os ensaios somente com as construções do gene *ASP3* em sua forma nativa.

5.2.5. Transformação, seleção e confirmação da presença de inserto em *P. pastoris*

Após identificarmos que as construções não possuíam mutações, através do sequenciamento, a *P. pastoris* foi transformada com 30 µg do plasmídeo linearizados com a enzima *Sall*. Os clones foram selecionados pela capacidade de crescer em meio sem Histidina (MD). Em seguida, as colônias foram semeadas em MM ágar, um meio mínimo que contém metanol, as colônias que conseguiram se desenvolver nesse meio são capazes de metabolizar metanol, caracterizando nossas transformantes como Mut+.

Uma PCR com os iniciadores AOX 5' e 3' foi realizada, para a confirmação da presença do gene *ASP3* de acordo com o item 4.12. Como podemos observar na figura 19a, as colônias de 1 à 6 da construção ASP3 – pPIC9 testadas apresentaram insertos, já na figura 19b colônias 3, 5, 6 e 11 apresentaram o inserto desejado. Podemos identificar as colônias com o inserto, pois essas possuíam bandas de 1644 pb referentes a 1152 pb do gene de interesse + 492 do vetor; algumas colônias (por exemplo as colônias 1 e 2 da figura 19a) ainda apresentaram uma banda de 2200 pb, decorrentes do gene *AOX1*, essas são sugestivas de Mut+.

Figura 19: a e b – Triagem de clones de *P. pastoris* com inserção de ASP3 – pPIC9 no genoma.

As figuras 20a e 20b são produtos da PCR com os *iniciadores* da AOX da construção ASP3 – pPIC9K. As colônias que possuem inserto apresentam bandas de 1644 pb referentes a 1152 pb do gene de interesse + 492 do vetor, algumas colônias ainda apresentaram uma banda de 2200 pb, decorrentes do gene AOX1, essas são sugestivas de Mut+. As colônias da figura 20a que apresentaram insertos foram: 1, 2, 4, 6, 8, 11, já da figura 20b foram: 1, 4, 5, 9, 10, 11 e 13.

Figura 20: a e b – Triagem de clones de *P. pastoris* com inserção de ASP3 – pPIC9K no genoma.

Desta forma, as colônias de leveduras que possuíam o gene *ASP3* foram inoculadas e testadas quanto a atividade da L-asparaginase.

5.2.6. Seleção das colônias produtoras de L-asparaginase.

Todas as colônias que apresentaram a presença do gene *ASP3*, foram inoculadas em 100 mL de meio BMGY, e após 24 de crescimento, foram induzidas com 1,0% de metanol. As amostras foram induzidas a cada 24 horas, até completarem 96 horas e alíquotas do cultivo foram retiradas antes de cada indução. Apenas 4 das colônias testadas apresentaram atividade de L-asparaginase, pela metodologia do β Hidroxamato aspártico (item 4.14), como observamos no gráfico da figura 21.

Figura 21: Atividade de L-asparaginase pela metodologia de β Hidroxamato aspártico, das colônias pPIC9K C Mut +, pPIC9K B Mut +, pPIC9K A Mut +, pPIC9 A Mut s e *P. pastoris* vazia, sem o gene *ASP3*.

A colônia pPIC9K C foi a melhor produtora, sendo o sua máxima atividade de 1,87 U/g em 48 horas de indução com metanol. Em 72 horas de indução houve uma pequena queda na atividade, apresentando 1,61U/g. O sobrenadante das amostras não apresentaram atividade e a metodologia que utilizamos para detectar L-asparaginase intermembranar com o uso do *pellet* celular, não se aplica caso a enzima seja intracelular, pois os reagentes

utilizados não conseguem atravessar a membrana plasmática da levedura. As colônias pPIC9K A e pPIC9K B tiveram sua melhor atividade em 48 horas, ambas com 0,667 U/g, já a colônia pPIC9 A obteve sua melhor atividade em 96 horas com 0,876 U/g. Sendo assim, escolhemos a colônia pPIC9K C para realizar o planejamento experimental. A metodologia do β -Hidroxamato aspártico tem sido utilizada para quantificação de L-asparaginase em diversos trabalhos, como de EHERMAN, *et.al.*, 1970, e Ferrada *et. al.*, 2010.

No trabalho da autora FERARRA *et.al.*, 2006 obteve-se uma atividade de 562 U/g/L, porém não podemos comparar com a nossa melhor atividade que foi de 1,87 U/g, pois a atividade de 562 U/g/L foi obtida através de uma lise da parede celular da levedura, e no nosso trabalho obtivemos a atividade diretamente das células, desta forma a nossa atividade possivelmente será aumentada quando for lisada corretamente.

5.2.7. Elefroforese SDS - PAGE

Para análise da enzima L-asparaginase foram corridas eletroforese em gel SDS – PAGE (*sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) desnaturante e redutor, como explicado no item 4.14. As amostras do sobrenadante e do lisado estão apresentadas na figura 22, na qual podemos observar a banda da proteína no tamanho esperado, por volta de 40 kDa, nas amostras 5

(lisado de 24 horas), 7 (lisado de 48 horas), 8 (lisado de 72 horas) e 9 (lisado de 96 horas), nos confirmando então que a enzima está no espaço intermembranas. A amostra 10 é o lisado da *P. pastoris* transformada com o vetor vazio, sem a presença de inserto.

Figura 22: Eletroforese SDS – PAGE. 1 – Sobrenadante precipitado de 24 horas. 2 - Sobrenadante precipitado de 48 horas. 3 - Sobrenadante precipitado de 72 horas. 4 - Sobrenadante precipitado de 96 horas. 5 – Lisado de *P. pastoris* recombinante - 24 horas. 6 – Padrão de massa molar Precision Plus Protein – Biorad. 7 – Lisado de *P. pastoris* recombinante - 48 horas. 8 – Lisado de *P. pastoris* recombinante - 72 horas. 9 – Lisado de *P. pastoris* recombinante - 96 horas. 10 – Lisado de *P. pastoris* nativa (sem inserto). O quadro vermelho identifica a banda da enzima L-asparaginase.

A massa molecular prevista da nossa proteína recombinante era de 38,6 kDa, no gel da figura 22 conseguimos estimar uma massa de 40 kDa, muito próximo do que esperávamos, sendo assim acreditamos que a nossa enzima não sofreu glicosilações.

Apesar do objetivo do nosso trabalho ser a L-asparaginase extracelular, prosseguimos com o planejamento, uma vez que com a otimização da produção a enzima poderia vir a aparecer no meio extracelular.

5.2.8. Curva de crescimento

Afim de caracterizar o comportamento da *P. pastoris* recombinante realizamos uma curva de crescimento conforme descrito no item 4.15. A curva de produção de biomassa está representada pela Figura 23.

Figura 23: Curva de crescimento de Biomassa (g/L) *versus* tempo da *P. pastoris* recombinante em meio BMGY, com 1% de glicerol, 0,7 g de inóculo, pH 6, mantidos à 30°C e 250 rpm em agitador metabólico.

Observou-se um crescimento celular até 24 horas de cultivo, sendo que a biomassa atingiu um pico de 9,66 g/L em 18 horas de crescimento e então se iniciou a fase estacionária. Com a representação da biomassa em Ln, na Figura 24, podemos diferenciar melhor cada fase do crescimento da levedura recombinante. Até 3 horas de cultivo as células estavam em uma fase de adaptação (lag) ou de transição para a fase exponencial. Depois se iniciou a fase exponencial de crescimento (log) que durou até as 18 horas de crescimento e em seguida as células entraram na fase estacionária.

Figura 24: Curva de crescimento em Ln *versus* tempo da levedura *P. pastoris* recombinante em meio BMGY, com 1% de glicerol. Representação da fase lag, log e estacionária.

É mencionado, em alguns trabalhos que cultivos em alta densidade de *P. pastoris* são melhores para expressão de proteínas (ELDIN, *et. al.*, 1997). Porém, sabe-se que com o aumento da concentração celular, os níveis de protease também são aumentados, possibilitando a degradação da proteína alvo (LI *et.al.*, 2008). Por esse motivo, optamos por iniciar o cultivo com 1 g/L de células, assim como FERRARA *et.al.*, 2006, que apresentou alta atividade da enzima L-asparaginase nessa condição.

Calculando os parâmetros cinéticos do crescimento, podemos afirmar que nesse cultivo a velocidade máxima de crescimento específico ($\mu_{\max}$) foi em torno de $0,23 \text{ h}^{-1}$ e com o tempo de geração de 3 horas. Conseguimos calcular esses parâmetros através das equações 2 e 3.

Equação 2

Velocidade Máxima de crescimento (h^{-1})	$\mu_{\max} = \text{Coeficiente angular da reta } \ln x \text{ versus}$ Tempo
---	--

Equação 3

Tempo de geração	$T_g = \ln 2 / \mu_{\max}$
------------------	----------------------------

5.2.9. Quantificação de Consumo de glicerol

O consumo de glicerol foi quantificado conforme detalhado no item 4.16. Primeiramente, foram realizadas curvas padrão para quantificação do glicerol, sendo uma com água e outra utilizando o meio BMGY. As concentrações de glicerol da curva foram de: 0; 0,125; 0,250; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5. As curvas estão representadas pela Figura 25.

Figura 25: Curvas padrão para quantificação de glicerol. Em azul a curva utilizando água para diluição do glicerol e em vermelho a curva utilizando o meio BMGY para diluição do glicerol.

Com a curva padrão podemos converter a absorvância em concentração de glicerol a partir da regressão linear. A curva de consumo de glicerol está representada na Figura 26. A concentração inicial de glicerol foi de 16 g/L. O seu consumo foi decaindo até se esgotar em 21 horas de cultivo.

Figura 26: Curva do consumo de glicerol da levedura recombinante *P. pastoris*. A levedura foi cultivada em meio BMGY com 1% de glicerol, 0,7 g de inóculo, pH 6, mantidos à 30°C e 250 em agitador metabólico.

Na Figura 27 apresentamos as curvas de Biomassa e de Consumo de Glicerol em função do tempo. O crescimento celular se deu até 18 horas, ao mesmo tempo em que o glicerol já estava em aproximadamente 0g/L. Desta forma calculamos o fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) através da Equação 4, durante a fase de crescimento, que foi de $0,70 \text{ g/g}^{-1}$, ou seja, 70% do glicerol consumido foi convertido em células. Comparado com o trabalho da Ferrara et.al., 2006 que apresentou 56% do glicerol convertido em células, tivemos um rendimento melhor.

Equação 4: Fator de conversão de substrato em biomassa (g/g)

$$Y_{x/s} = X_0 - X_f / S_0 - S_f$$

As curvas de crescimento celular e de consumo de substrato foram importantes para tomarmos conhecimento do comportamento da levedura e das condições de cultivo e, com isto, orientar melhor a condução dos estudos com o planejamento experimental a ser realizado na sequencia.

Figura 27: Curva de consumo de glicerol *versus* Biomassa da *P. pastoris* recombinante, cultivadas em meio BMGY com 1% de glicerol, 0,7 g de inóculo, pH 6, mantidos à 30°C e 250 em agitador metabólico.

5.2.10. Estudo da influência das variáveis na produção da enzima L-asparaginase utilizando planejamento fatorial

Conforme descreve o item 4.17 foi realizado o estudo da influência das variáveis (Temperatura, pH e concentração de indutor) utilizando para isso o planejamento fatorial 2^3 . Na Tabela 4 podemos observar as atividades de cada ensaio do planejamento, nos tempo de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de indução. Identificamos o ensaio número 5 como o melhor produtor de L-asparaginase, em 120 horas de indução. Neste contexto, obteve-se, um gráfico de superfície utilizando 120 horas de indução, como apresentado na Figura 28. Concluiu-se que as condições de 20°C, pH 6 e indução com 1,5% de metanol são as melhores para expressão de L-asparaginase. Podemos afirmar então que o clone produtor é Mut +, pois além de apresentar melhor expressão da proteína em maior concentração de metanol, a mesma apresenta duas bandas no PCR com os iniciadores da AOX (amostra 4 da figura 20b), sendo uma banda de 1644 pb referentes a 1152 pb do gene de interesse + 492 do vetor e uma banda de 2200 pb, decorrente do gene AOX1. As colônias Mut s possuem o gene da AOX1 interrompido e por esse motivo não podemos observar essa banda no gel (Manual da *P. pastoris* - Invitrogen®).

Tabela 4: Atividade de cada ensaio do planejamento experimental em 24, 48, 72, 96 e 120 horas de indução

Ensaio	T(°C)	(pH)	I (%)	Atividade em U/g				
				24 H	48 H	72 H	96 H	120 H
1	20	6	0,5	0,462244	2,332082	2,816854	3,252399	6,212349
2	30	6	0,5	1,338757	1,442219	1,008344	1,060075	1,718815
3	20	7	0,5	0,84272	1,230705	3,212766	1,559449	3,320401
4	30	7	0,5	0,499791	1,016688	1,523154	1,449312	1,279099
5	20	6	1,5	1,377555	1,540259	6,223196	6,518148	8,571131
6	30	6	1,5	1,01335	1,403838	1,877764	1,232791	2,144764
7	20	7	1,5	1,046725	1,167292	5,706717	5,452649	5,874009
8	30	7	1,5	0,790154	0,954109	1,432207	1,803087	2,537338
9	25	6,5	1	1,04297	1,865665	4,235711	4,027534	5,139758
10	25	6,5	1	0,846058	2,774301	5,193158	4,359616	5,052983
11	25	6,5	1	1,427618	1,743846	5,116813	5,927409	5,99708
12	25	6,5	1	0,829787	0,899458	3,818106	4,313308	5,433876

a)

Atividade (U/g)

b)

c)

Figura 28: Gráficos de Superfície de contato da otimização da produção de L-asparaginase.a) Gráfico de superfície em 120 horas de indução, para otimização da produção de L-asparaginase com pH 6 fixo e atividade, temperatura e concentração do indutor variando.b) Gráfico de superfície em 120 horas de indução, para otimização da produção de L-asparaginase com temperatura fixa em 20°C e atividade, pH e concentração do indutor variando.c) Gráfico de superfície em 120 horas de indução, para otimização da produção de L-asparaginase com a concentração a 1,5% de indutor fixa e atividade, temperatura e pH variando.

Todas as variáveis testadas influenciaram significativamente na produção de L-asparaginase. Podemos observar que os três gráficos apresentam o mesmo comportamento mesmo quando mudamos as variáveis fixas, sendo de pH 6 na figura a, temperatura em 20°C na figura b e indutor de 1,5% na figura c, ou seja, todos mostram que em temperatura mais baixa, pH 6 ou menor e alta concentração de indutor temos maior atividade. Desta forma obteve-se uma atividade de 8,57 U/g de L-asparaginase em sua melhor condição, no ensaio 5. Será de grande importância realizar um novo planejamento utilizando temperatura e pH mais baixos, para que se confirme que 20°C e pH 6 sejam realmente a melhor condição para expressar a enzima e assim iniciar os cultivos em biorreator.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho escolheu a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* para produção de L-asparaginase provinda do gene *ASP3* de *Saccharomyces cerevisiae*, pois em diversos trabalhos esse micro-organismo tem sido exaltado como um ótimo produtor de proteínas heterólogas (CEREGHINO, 2000).

Isso se deve as suas inúmeras vantagens como: a capacidade que esta levedura tem em alcançar alta densidade celular em meio mínimo salino simples, a alta capacidade de produzir proteínas heterólogas intracelular ou extracelularmente e capacidade de realizar modificações pós-traducionais. A *P.pastoris* possui técnicas de manipulação genética simples e similares as técnicas utilizadas para *Saccharomyces cerevisiae*, que ainda hoje é um dos sistemas experimentais mais bem caracterizados. Além disso, há comercialmente disponível o sistema de expressão e outras ferramentas (CEREGHINO, 2000; CEREGHINO, *et.al.*, 2002; MACAULEY-PATRICK, *et.al.*, 2005; BAUMANN, *et.al.*, 2011).

Nesse trabalho não foi utilizado a *E. coli* como sistema de expressão, pois além das inúmeras vantagens da *P. pastoris* como realizar modificações pós-traducionais, nosso grupo do Projeto temático da L-asparaginase já havia utilizado a bactéria para produzir a L-asparaginase heteróloga do gene *ASP3* de *S. cerevisiae*. Contudo, a enzima não foi expressa em forma solúvel ativa, somente em corpo de inclusão, mesmo quando testadas 93 condições de crescimentos diferentes, incluindo diversas estirpes de *E. coli*, vetores, construções, concentração de indutor, temperatura e tempo de indução (Dados não publicados).

Uma diferença importante entre as leveduras em questão é que a *P. pastoris* possui um crescimento mais rápido e com maior produtividade que a *Saccharomyces cerevisiae*. Isso se dá, provavelmente, por que a *P. pastoris* não é uma forte fermentadora como a *S. cerevisiae*, ou seja, não produz etanol em grandes quantidades, que se torna tóxico quando acumulado (TORRES E MORAES, 2000). As células de *S. cerevisiae* também não são favoráveis para produção heteróloga de biofármacos injetáveis, pois essas células hiperglicosilam proteínas, utilizando muito mais manoses, e aumentando a chances de os pacientes apresentarem uma hipersensibilidade à proteína

produzida (WANARSKA, M. *et al.*, 2008). No trabalho de Dunlop, *et.al.*, 1978 obteve-se uma L-asparaginase do gene *ASP3*, produzida endogenamente em *S. cerevisiae* com atividade específica de 60 U/mg de proteína, porém essa proteína foi caracterizada como hipermanosilada, com aproximadamente 800 kDa, ou seja, deve ser altamente imunogênica, uma vez que as células do sistema imunológico humano possuem receptor para manose (LEE *et.al.*, 2011).

A *P. pastoris* por ser uma levedura metilotrófica, consegue utilizar o metanol como única fonte de carbono, reduzindo assim os custos da produção (CREGG *et.al.*, 1989). Possui também um gene, a Álcool Oxidase que contém um forte promotor responsável pela indução e regulação por metanol (FERRARA, *et al.*, 2006)

Um grupo de pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, vem estudando a produção de L-asparaginase do gene *ASP3* em sua forma truncada, isto é, sem os 32 aminoácidos iniciais, como já descrito anteriormente. O grupo iniciou estudos de produção na própria *S. cerevisiae*, fazendo mutações genéticas e também realizaram testes do efeito do pH e da fonte de nitrogênio sob a produção da enzima; porém, não conseguiram secretar a enzima e obtiveram baixas concentrações, sendo 265 IU/L o maior nível de L-asparaginase produzido por *S. cerevisiae*, cultivadas em ureia e prolina (FERRARA, *et. al.*2004). Depois, o mesmo grupo tentou realizar a expressão heteróloga em *P. pastoris*, mas, o trabalho de Ferrara *et. al.*(2006) mostra que apesar de produzirem altos níveis de L-asparaginase, sete vezes maior do que se produziu por *S. cerevisiae*, não foi possível secretar essa enzima para o meio de cultivo. Assim, afim de, secretar a enzima realizamos duas construções: com a forma truncada utilizando diferentes iniciadores e também a construção com a enzima na sua forma nativa. Porém, os estudos com a forma truncada não foram concluídos, uma vez que essas construções apresentaram mutações e para conseguir cumprir o prazo do mestrado optamos por seguir os experimentos somente com a forma nativa. Sendo assim, conseguimos verificar se a sequência de sinalização nativa de asparaginase de *S. cerevisiae* poderia ter efeito sinérgico com o fator alfa e aumentar as chances da proteína ser secretada para o meio.

Outro diferencial deste projeto para o trabalho da Ferrara *et al*, 2006, foi a linearização do nosso plasmídeo, com a enzima *Sall*, enquanto no trabalho da FERRARA foi utilizada *BglII*. Essa escolha foi feita, pois a enzima *BglII* está presente dentro gene *AOX1* e de acordo com o autor DALY e HEARN, 2005 a estirpe GS115, contém uma cópia funcional do gene álcool oxidase 1 (*AOX1*) responsável por aproximadamente 85% da utilização de metanol pela enzima oxidase, ou seja é um promotor forte e possui um alto nível de expressão, designado como fenótipos Mut+. O uso desta enzima iria gerar transformantes com fenótipos Mults ou Mult-, pois o gene *AOX1* poderia estar interrompido. Ao utilizarmos a enzima *Sall* a recombinação ocorreria preferencialmente no sítio *HIS4*, mantendo o gene *AOX1* intacto obtendo-se transformantes Mut+.

O nosso trabalho tinha como principal objetivo expressar a L-asparaginase extracelularmente. O trabalho da FERRARA *et. al.*, 2006, mostra um estudo desta enzima na sua forma truncada expressa em pPIC9[®], porém, o grupo não conseguiu expressá-la extracelularmente. Para tentar obter a enzima extracelular tentamos estudar duas formas da enzima, a nativa e a truncada em dois vetores diferentes, pPIC9[®] e pPIC9K[®], obtendo as seguintes construções: ASP3 - pPIC9[®], ASP3 - pPIC9K[®], ASP3T - pPIC9[®] e ASP3T - pPIC9K[®]. Apesar do vetor pPIC9[®] ser mais estudado, o pPIC9K[®] possui o gene de Canamicina, responsável pela resistência a Geneticina em leveduras, o que permite o rastreamento de transformantes que abrigam várias cópias do gene integrado ao genoma. Por outro lado, optamos por estudar as duas formas da enzima, pois apesar da forma truncada ter sido construída para ser expressa extracelularmente, no estudo já mencionado a enzima não foi secretada pela levedura, levando a maiores custos de produção, pois romper a parede celular da levedura não é tarefa tão simples como em *E. coli*. Além disso, os procedimentos para a extração e recuperação da proteína podem tornar a molécula intermembranar vulnerável ao meio físico, capaz de alterar sua configuração de proteína nativa, o que é muito importante se a proteína alvo é uma enzima, como no nosso caso (FERRARA, *et. al.*, 2010). Por isso, optamos por estudar as duas formas da enzima nos dois vetores conhecidos e definir qual seria a melhor produção.

Após realizar a construção dos vetores na primeira etapa, observamos que o plasmídeo não possuía inserto, o que pode ter sido decorrente do mal estado

dos vetores utilizados, ou uma contaminação com o próprio gene *ASP3* nos reagentes utilizados no PCR que antecede o seqüenciamento. Por esse motivo, realizamos uma nova construção, originando a segunda etapa do nosso trabalho. Para que essa etapa se desse de forma eficiente, novos vetores foram adquiridos e o sequenciamento foi realizado usando uma mini preparação da construção direto como molde, possibilitando ver a integração do gene com o vetor, excluindo assim qualquer dúvida de contaminação. As construções ASP3 – pPIC9 e ASP3 – pPIC9K foram obtidas de forma correta, produzindo dessa forma uma proteína com aproximadamente 39 kDa. Comparando com a proteína da autora FERRARA et.al., 2006, que apresentou 45 kDa, concluímos que nossa proteína não sofreu glicosilações e se apresentou no tamanho esperado que era de 38.6 kDa; já a autora Ferrara, esperava uma proteína de 35,184 kDa e atribuiu essa massa molecular de 45 kDa devido a glicosilações, justificando que a L-asparaginase possui dois sítios de N-glicosilação e também porque que a levedura *P. pastoris* pode adicionar porções de carboidratos nas proteínas secretadas. Neste âmbito, proteína obtida nesse trabalho pode apresentar vantagens, por ser menor e possuir menos glicosilações, diminuindo assim sua imunogenicidade.

Já se sabe que cultivos de *P. pastoris* em alta densidade são melhores para expressão de proteínas (ELDIN et al, 1997), porém devido ao aumento celular, os níveis de protease também são aumentados, possibilitando a degradação da proteína alvo (LI et.al., 2008). Por esse motivo, optamos por iniciar o cultivo com 1g/L de células, assim como FERRARA 2006, que apresentou alta atividade da enzima L-asparaginase nessa condição. Com a curva de crescimento e de consumo de glicerol observamos um pico de massa celular de 9,66 g/L em 18 horas de crescimento e então se iniciou a fase estacionária; por outro lado, a depleção do glicerol se deu em 21 horas e em seguida se iniciou a fase de indução para a expressão da enzima. A velocidade máxima de crescimento específico (μ_{max}) foi em torno de $0,23\ h^{-1}$, com o tempo de duplicação de 3 horas e a conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), durante a fase de crescimento, que foi de $0,70\ g\ g^{-1}$, ou seja, 70% do glicerol consumido foi convertido em células, um rendimento muito bom quando comparado ao

trabalho de Ferrara *et. al.*, 2006 que obteve 56% do glicerol convertido em células.

Com o planejamento experimental conseguimos melhorar a produção da enzima L-asparaginase, aumentando consideravelmente a sua atividade, sendo que em 30°C conseguíamos uma atividade de 1,87 U/g e com 20°C, pH 6 e 1,5% de Indutor obtemos uma atividade de 8,6 U/g, em 120 horas de indução. O grupo de Ferrara *et.al*, 2006 conseguiu uma atividade de 800 U/g/L, porém nesse trabalho houve rompimento celular e desta forma não conseguiremos comparar nossa atividade. Entretanto a atividade da enzima poderá ser aumentada com o rompimento da *P. pastoris* recombinante construída nesse trabalho. Desta forma, em etapas futuras, seria muito relevante um estudo para o melhor rompimento das células, sem a perda de atividade.

O pH pode apresentar mudanças significativas quanto a expressão de proteínas recombinantes por *P. pastoris* (CALIK, *et.al.*, 2010) e também está diretamente relacionado com a secreção dessas proteínas (SOYASLAN e CALIK, 2011). Sendo assim, foi importante estudar a variação do pH para expressão de L-asparaginase. Apesar de ser uma célula eucariota robusta, possibilitando ser cultivada em pH de 3 à 8 (CREGG *et.al.*, 2000) optou-se por estudar condições neutras como foi descrito em outros trabalhos de produção de L-asparaginase (FERRARA, *et.al.* 2006).

Outra consideração importante, apesar de obtermos apenas a enzima no espaço intermembranar alguns fatores podem ter desencadeado isso, como por exemplo, uma cauda de histidina muito extensa fazendo com que essa tenha uma forte integração com a parede celular e não consiga ser secretada para o meio, ou também pode ser que a presença de proteases no meio degrade a enzima no sobrenadante. Pensando nisso, seria importante, um estudo com o uso de inibidores de proteases no cultivo e, além disso, o uso de um tensoativo que facilite a secreção da enzima. A adição de casaminoácidos também pode vir a reduzir a degradação de proteínas, inibindo a proteólise enzimática (CLARE *et.al.*, 1991; WERTEN *et.al*, 1999). Os casaminoácidos são competitivos para as proteases extracelulares (ZHANG *et. al.*, 2006).

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O gene *ASP3* que codifica a proteína L-asparaginase foi amplificado e gerou um fragmento com 1152 pares de bases. Obtivemos também o gene *ASP3* amplificado na sua forma truncada, porém somente o gene *ASP3* em sua forma nativa foi clonado nos vetores pPIC9[®] e pPIC9K[®] com sucesso.

Posteriormente, os insertos já sequenciados foram inseridos no genoma da levedura *Pichia pastoris*, e obteve-se um clone Mut + melhor produtor. Através do planejamento experimental identificou-se uma melhor condição para produção da enzima L-asparaginase, sendo de: 20°C, pH inicial 6 e 1,5% de indução com metanol, aumento de 5x na atividade obtida na condição inicial. Nessas condições a melhor atividade da enzima de 8,6 U/gse deu em 120 horas de indução. Lembrando que os estudos de atividade foram realizados diretamente do pellet das células integras, uma vez que a enzima está no espaço intermembranas.

Seria muito relevante um estudo para o rompimento da levedura, sem a perda de atividade da enzima, além de estudos utilizando casaaminoácidos e inibidores de proteases para que se teste a possível degradação de L-asparaginase em meio extracelular.

8. Atividades extracurriculares

Resumo para o 1º Workshop do Projeto Temático Asparaginase, intitulado “Biotechnological production of L-asparaginase (ASP3) of *Saccharomyces cerevisiae* in a heterologous expression system *Pichia pastoris*.”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – FCF-USP (São Paulo – SP), 2014;

XXII Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXII ALAM). Apresentação do trabalho “Processo fermentativo sinérgico para obtenção de proteases, celulares, amilases e xilanases por *Cladosporium cladosporioides* isolado na Antártica. Cartagena – Colombia, 2014;

Artigo publicado: CORREIA, R.C.; JOZALA, A.F.; MARTINS, K.F.; PENNA, T.C.V.; DUEK, E.A.R.; RANGEL-YAGUI, C.O.; LOPES, A.M. Poly(lactic-co-glycolicacid) matrix incorporated with nisin as a novel antimicrobial biomaterial. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 31, p. 649-659, 2015.

Artigo submetido intitulado “L-Asparaginase from Fungi: A Comprehensive Review”, de autoria de Costa-Silva, T.A.; Camacho-Córdova, D.I.; Soler, M.; Divino, B.S.; Correia, R.C.; Silva, S.S.; Pessoa-Jr, A. Submetido em *Critical Reviews in Biotechnology*.

Os 25 créditos em disciplinas exigidos pelo programa foram cumpridos.

O exame de qualificação para obtenção do título de mestrado foi realizado e obteve-se o resultado de Aprovado por unanimidade pela banca examinadora.

9. REFERÊNCIAS

- ANISHKIN ,A.; VANEGAS, J.M; ROGERS, D.M.; LORENZI, P.L.; CHAN, W.K.; PURWAHA, P.; WEINSTEIN, J.N.; SUKHAREV, S.; REMPE, S.B. Catalytic role of the substrate defines specificity of therapeutic L-asparaginase (L-ASP). **Journal of Molecular Biology**, v. 427, p. 2867–2885, 2015.
- ANJOS, A.R.; SILVA, M.A.; BORELLI, P. Matriz Extracelular e Leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia**, v. 22, p. 404-412, 2000.
- AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. **International Journal of Cancer Research and Treatment**, v. 32, n. 7, p. 2423-2437, 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos. 3.ed. Campinas: Unicamp, 2007. 480p
- BAZAN, S. Expressão da Proteína L1 do Capsídio de HPV-16 em Leveduras Metilotróficas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2007.
- BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect**, v. 115, n.1, p. 138-145, 2007.
- Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde, 2007. Acessado em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/dicas/79leucemia.html>
- BOADO,R.; JI, A.; PARDRIDGE, W. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a genetically engineered single chain antibody against the rat transferrin receptor. **Journal of drug targeting**, v.8, p. 403-412, 2000
- BOK, S. DEMAIN, A. Improved colorimetric assay for polyols. **Analytical Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 18-20, 1977.
- BOREK, D.; JASKÓLSKI, M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 893-902, 2001
- BUCKHOLZ, R.G.; GLEESON, A.G. Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins. **Nature Biotechnology** , p. 1067 – 1072, 1991.
- CEREGHINO, Joan Lin; CREGG, James M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: Bioquímica Ilustrada. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989. 446 p.p. 53-66.

CORTIJO-CASCAJARES, S.; JIMÉNEZ-CEREZO, M.J.; HERREROS DE TEJADA, A. Review of hypersensitivity reactions to anti neoplastic agents. **Farm Hosp.**, v. 36, n. 3, p. 148-158, 2012.

CREGG, J.M.; TOLSTORUKOY, I.; KUSARI, A.; SUNGA, J.; MADDEN, K.; CHAPPELL, T.; Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. **Guide to Protein Purification, 2nd Edition**, v. 463, p. 169-189, 2009

DORS, G. Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas. Dissertação de mestrado na Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

DALY, R.; HEARN, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of molecular recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.

ELMAN, I.; SILVA, M. E. M. P. Crianças portadoras de leucemia linfóide aguda: Análise dos limiares de detecção dos gostos básicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n.3, p. 297-303, 2007.

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

FERRARA, M. A.; SEVERINO, N. M. B.; VALENTE, R.H.; PERALES, J.; BOM, E.P.S. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by ecombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzymeand Microbial Technology** v.47, p.71–76, 2010.

FERRARA, M. A.; MATTOSO, J.M; BOM, E.P.S, PEREIRA, N. Jr. Kinetics of asparaginase II fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* ure2dal80 mutant: effect of nitrogen nutrition and pH. p. 299-305, 2004.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 741-750, 2000.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. 52-57, 2008

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, vol. 96, n. 1, p. 23-28, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), Rio de Janeiro, Brasil, 2015. Disponível em :<http://www.inca.gov.br>

IRONS, R.D.; STILMAN, W.S. Impact of benzene metabolites on differentiation of bone marrow progenitor cells. **Environ Health Perspect**, v. 104, p. 1239-1246, 1996.

KEATING, M. J.; HOLMES, R.; LERNER, S.; HO, D. H. L-asparaginase and PEG asparaginase – Past, present and future. **Leuk Lymphoma**, v.10, p. 153-157, 1993.

KEBRIAEI, P; LARSON, R.A. Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Hematol**, v. 10, p. 284-289, 2003

Laroche, Y., Storme, V., Meutter, J. D., Messens, J., and Lauwereys, M. High-Level Secretion and Very Efficient Isotopic Labeling of Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Expressed in the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*. **Bio/Technology** v.12, p.1119-1124, 1994.

LEE, S. J; EVERS, S.; ROEDER, D.; PARLOW, A.F.; RISTELI, J. LEE, Y.C.; FEIZI, T. HANGEN, H. NUSSENZWEIG, M.C. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. **Science** v. 295, p 1898-1901, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. **Sarvier**.

MACAULEY – PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEILAND, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **YEAST**, v. 22, p.249-270, 2005.

MAENG, B.H.; JEONGYEON, C.; YOUNG, S.S.; JAE, H.S.; YONG, H.K. Functional expression of recombinant anti-BNP scFv in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and application as a recognition molecule in electrochemical sensors. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n 3, p. 1027-1034, 2012.

MITIDIERI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, Brasília, DF, 2002

MULLER, HJ; Boos, J. **Use of l-asparaginase in childhood ALL**. Crit Rev OncolHematol 1998;28:97–113

NOMME, J.; YING, S.; KONRAD, M.; LAVIE, A. Structures of Apo and Product-Bound Human L-Asparaginase: Insights into the Mechanism of Autoproteolysis and Substrate Hydrolysis. **Biochemistry**, v. 51, n. 34, p. 6816–6826, 2012.

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, n. 2, p. pages 253–278, 1970.

ORTEGA, J. A. et al. L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. **CancerResearch**, v. 37, n. 2, p. 535-540, 1977.

PEDROSA, F.; LINS, M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. **Rev Bras Saúde Matern Infantil**, v. 2, p. 63-68, 2002.

PENNEL, C.A.; ELDIN, P. *In vitro* production of recombinant antibody fragments in *Pichia pastoris*. **Research in Immunology**, v. 149, p. 599-603, 1998

PICHIA TECHNOLOGY FROM RCT. Acessado em: pichia.com

PIETERS, R.; TONG, W.H.; VAN DER SLUIS, I.M. Successful management of extreme hypertriglyceridemia in a child with acute lymphoblastic leukemia by temporarily omitting dexamethasone while continuing asparaginase. **Pediatric Blood&Cancer**, v. 58, n.2, p. 317-318, 2012.

PORTAL DA SAÚDE, 2012. Disponível em:<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/impressao/3400/162/saude-lanca-perfil-%3Cbr%3Edo-cancer-para-2012.html>. Acessado em 10 de Junho de 2013.

PORTAL DA TRANSPARÊNCIA, 2012. Disponível em: <http://www.portaltransparencia.gov.br/despesasdiarias/empenho?documento=250052000012012NE801976>.

POUTOU, R. et al. Influencia de lafuente de carbono sobre laexpresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. ISSN:1794-2470 VOL.3 No. 3:1-120, enero - junio, 2005.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. **Biochemical Engineering Journal**,v. 64, P. 91-105, 2012

PENZ JUNIOR, A.M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu-SP. p.165- 178

REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W.**The Fungal Holomorph**: A Consideration of Mitotic Meiotic and Pleomorphic Speciation,CAB International, Wallingford. UK. 1993.

RICHA, J.K.; ZAIDI, Y.V.; POOJA, S. L-Asparaginase: A Promising Enzyme for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **People's Journal of Scientific Research**, v. 5, p. 29-35, 2012.

RIZZARI, C.; CONTER, V.; STARY, J.; COLOMBINI, A.; MOERICKE, A.; SCHARAPPE, M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia.**Current Opinion in Oncology**, v. 25, p. 1-9, 2013.

ROBIN, S.; KLIMENT, P.; THIERRY, D.; KUJUMDZIEVA, A., TELLIER, C.; DION, M. Comparison of three microbial hosts for the expression of an active catalytic scFv. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 729-738, 2003.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão Editora, cap.3, p.95-119, 2005

SAMBROOK J., FRISTSCH E.F.; MANIATIS. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. **Guaíba: Agropecuária**, p.463, 2001

SILVA, V.V.; GATTAS, E.A.L. PERES, M.F.S. Application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* in the field of food industry—a review. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v.7, p. 268-273, 2009.

SOUZA, C.A. What is happening with the supply of oncology drugs in Brazil and the world? **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 34, n. 1, p. 1-2, 2012.

SPAUDIUT, et.al., Microbials for the production of monoclonal antibody variant for targeting breast cancer cells. **Trends in Biotechnology**, v.32. p. 54 - 60, 2014.

TEIXEIRA, R.A.P.; BRUNIERA, P.; BORSATO, M.L. Cancerologia atual: um enfoque Multidisciplinar. **Rocca**, p. 426-51, 2000.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. de. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 12, p. 20-22, 2000.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 6.ed. Artmed, cap. 5, p. 113-119, 2000.

WANARSKA, M., HILDEBRANDT, P., KUR, J. Yeast expression systems as a tool in modern industrial microbiology. **POSTĘPY MIKROBIOLOGII**, v.47, n. 3, p. 249-256, 2008.