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

Produção biotecnológica de L-asparaginase
(*ASP1*) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema
de expressão heterólogo *Pichia pastoris*

Aluna: Bruna de Souza Divino

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 (ASP1) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris*

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

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

**Dissertação para obtenção do grau de
Mestre apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo - USP.**

Aluna: Bruna de Souza Divino

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro de Souza

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

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

Divino, Bruna de Souza
D618p   Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de
Saccharomyces cerevisiae em sistema de expressão heterólogo
Pichia pastoris / Bruna de Souza Divino. -- São Paulo, 2015.
88p.

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 Junior, Adalberto,
orientador. III. Souza, Gisele Monteiro de, co-orientador.

620.8   CDD

Bruna de Souza Divino

Produção biotecnológica de L-asparaginase (*ASP1*) 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
Orientador/Presidente

Prof^a. Dr^a. Viviane Maimoni Gonçalves
1º Examinador

Prof^a. Dr^a. Angela Faustino Jozala
2º Examinador

São Paulo, 24 de Novembro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais
amados José Luiz e Maria José,
Aos meus irmãos Ricardo e Renato,
À minha avó Eurides (*in memoriam*),
E ao meu querido marido Felipe.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”
(Charles Chaplin).

AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo constante apoio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado (Processo FAPESP nº2013/14494-5, Parte do Projeto Temático, processo FAPESP 2013/08617-7).

Ao meu orientador Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior pela oportunidade de aprendizado, apoio e, sobretudo pela confiança depositada na realização deste projeto ao longo desses dois anos.

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Gisele Monteiro de Souza pela contribuição com a minha formação científica, apoio, dedicação, conselhos e ensinamentos que colaboraram para o meu crescimento.

Aos meus pais José Luiz e Maria José que sempre me incentivaram a correr atrás desse sonho, pois, eles sabiam que era algo muito importante para mim. Apoiaram-me com amor e sempre me deram o porto-seguro que precisei em todas as horas.

Aos meus irmãos Ricardo, Renato, minha prima-irmã Lara, meu sobrinho Enrico e minha cunhada Luana. Pelo amor, companheirismo, apoio, conforto e incentivos que me ajudaram a chegar aqui.

Ao meu amor eterno, meu marido Felipe pelos conselhos, carinho, compreensão e ajuda incondicional que me acalmavam nos momentos difíceis dessa jornada e me davam forças para sempre seguir, sem você não seria possível.

A minha amada avó Eurides (*in memoriam*) que sinto estar próxima a mim me encorajando em todos os momentos.

A minha querida amiga Rafaela por estar ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada, ajudando a superar os maus momentos e a curtir intensamente os bons momentos, obrigada por tudo.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica e Laboratório NanoBio.

Agradeço especialmente aos que além de colegas se tornaram amigos: Alex, João Vitor, Tales, Valker, Talita Camila, Angela, Suellen, Valéria, Erick, Larissa e Marcela por todos os conselhos, discussões, estímulo e conforto sempre que precisei e pela amizade que fez se tornar um pouco mais fácil o fato de estar longe de casa.

As minhas amigas de longa data Fernanda, Sasha, Letícia e Amanda pela amizade firme mesmo com a distância que nos separava.

Aos meus sogros Carlos Urbano e Margarete e meu cunhado André pelo apoio e carinho de sempre.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela oportunidade de realização da pós-graduação.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, sobretudo aos do Semi Industrial e em especial a Prof^a. Dr^a. Carlota Yagui por ter me dado a primeira oportunidade na USP.

A Deus pela vida e pelas belas oportunidades que me foram concedidas.

Enfim, a todas as pessoas que participaram de alguma forma deste processo de aprendizagem e crescimento, muito obrigada!

Sumário

Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	14
Lista de Abreviaturas.....	15
Resumo	16
Abstract	17
1.0 Introdução e Justificativa	18
2.0 Revisão Bibliográfica.....	20
2.1 Leucemia Linfóide ou Linfoblástica Aguda.....	20
2.2 L-Asparaginase.....	21
2.3 Expressão de Proteínas.....	24
2.3.1 <i>Pichia pastoris</i>	25
2.4 Desempenho da Produção	28
2.5 Cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	30
2.6 Purificação	30
3.0 Objetivos	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4.0 Material e Métodos.....	33
4.1 Micro-organismos	33
4.2 Os meios de cultura	33
4.3 Vetores e DNA molde	35
4.4 Preparo do plasmídeo recombinante.....	35
4.5 Preparo, transformação e seleção dos clones transformantes de <i>E. coli</i> DH5α.....	37
4.6 Purificação do plasmídeo recombinante	38

4.7 PCR do plasmídeo purificado para confirmação do inserto	38
4.8 Sequenciamento do gene <i>ASP1</i> incorporado ao vetor pPIC9	38
4.9 Preparo do plasmídeo recombinante para a inserção na <i>P. pastoris</i> GS115	39
4.10 Preparo, transformação e seleção dos clones de <i>P. pastoris</i> GS115 ...	39
4.11 Confirmação da presença do inserto em <i>P. pastoris</i> utilizando a Reação em cadeia da polimerase a partir de colônias.....	40
4.12 Indução em pequena escala para verificar a atividade	41
4.13 Eletroforese SDS-PAGE	41
4.14 Determinação da atividade pelo método do Ácido L-Aspartil- β -Hidroxâmico	42
4.15 Curva de Crescimento Celular	45
4.16 Curva de consumo do Glicerol.....	45
4.17 Planejamento Experimental	46
5.0 Primeiros Resultados	48
5.1 Amplificação do gene <i>ASP1</i> e Construção do vetor	48
5.2 Digestão de pPic9 e <i>ASP1</i> com enzimas de restrição	49
5.3 Ligação do gene <i>ASP1</i> ao vetor pPIC9	50
5.4 Sequenciamento	50
5.5 Preparo do plasmídeo para transformar <i>Pichia pastoris</i>	50
5.6 Transformação e seleção da levedura <i>Pichia pastoris</i>	51
5.7 Análise do resultado do <i>Dot blot</i> utilizando anticorpo anti-his	52
5.8 Indução em pequena escala para verificar a atividade	53
6.0 Novos Resultados	54
6.1 Amplificação do gene <i>ASP1</i> e Construção do vetor	54
6.2 Purificação do plasmídeo.....	54

6.3 Digestão de pPIC9 e <i>ASP1</i> com enzimas de restrição	55
6.4 Ligação do gene <i>ASP1</i> ao vetor pPIC9	55
6.5 Digestão com outras enzimas de restrição	56
6.6 Sequenciamento	57
6.7 Preparo do plasmídeo para transformar <i>Pichia pastoris</i>	59
6.8 Transformação e seleção da levedura <i>Pichia pastoris</i>	60
6.9 Indução em pequena escala para verificar a atividade	63
6.10 Etapa de crescimento celular (Biomassa g/L)	65
6.11 Etapa de consumo do Glicerol (g/L)	68
6.12 Planejamento experimental: experimentos conduzidos em frascos agitados	70
7.0 Discussão	74
8.0 Conclusões	79
9.0 Sugestões para trabalhos futuros	80
10.0 Considerações finais	81
11.0 Atividades realizadas no período	82
12.0 Referências	83

Lista de Figuras

Figura 1. Medula óssea normal em comparação com a medula óssea comprometida pela LLA	20
Figura 2. Reação catalisada pela L-Asparaginase.....	22
Figura 3. Mecanismo de ação antitumoral da L-Asparaginase	22
Figura 4. Características macro e microscópicas de <i>Pichia pastoris</i>	25
Figura 5. Relação custo/Rendimento dos sistemas de expressão de proteínas	29
Figura 6. Esquema representativo da purificação por His-tag.....	31
Figura 7. Mapa físico do vetor pPIC9.....	35
Figura 8. Reação colorimétrica que determina a atividade da enzima L-Asparaginase pelo método do hidroxamato aspártico	42
Figura 9. Reação enzimática envolvida na conversão do glicerol em quinoneimina pela ação sequencial das enzimas glicerol-quinase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase	46
Figura 10. Amplificação do gene <i>ASP1</i>	48
Figura 11. Amplificação do gene <i>ASP1</i> diluído	49
Figura 12. Confirmação da etapa de recuperação do gene e do vetor	49
Figura 13. <i>ASP1</i> presente no vetor pPIC9	50
Figura 14. Preparo do plasmídeo recombinante	51
Figura 15 (A). Seleção de <i>P. pastoris</i> transformada em ágar MD.....	51
Figura 15 (B). Seleção de <i>P. pastoris</i> transformada em ágar MM	52
Figura 15 (C). Seleção de <i>P. pastoris</i> sem ser transformada em ágar MD .	52
Figura 16. Ensaio de <i>Dot Blot</i> para as amostras do sobrenadante e do <i>pellet</i> lisado	53
Figura 17. Amplificação do gene <i>ASP1</i>	54
Figura 18. Preparo do vetor pPic9	54
Figura 19. Digestão e purificação do gene e do vetor.....	55

Figura 20. Confirmação da presença do gene no vetor recombinante.....	56
Figura 21. Confirmação do tamanho correto do vetor recombinante	56
Figura 22. Eletroferograma do sequenciamento do gene <i>ASP1</i> em vetor pPIC9	57
Figura 23. Sequenciamento do vetor pPIC9 ligado ao gene <i>ASP1</i> utilizando o iniciador 5'AOX	58
Figura 24. Sequenciamento do vetor pPIC9 ligado ao gene <i>ASP1</i> utilizando o iniciador 3'AOX	58
Figura 25. Plasmídeo recombinante linearizado e concentrado.....	59
Figura 26. <i>P. pastoris</i> transformada e identificada em ágar MD	60
Figura 27 (A). Produto da PCR com os iniciadores AOX 3' e 5' de <i>ASP1</i> em pPIC9 para verificar qual clone possuía o inserto integrado ao genoma.	61
Figura 27 (B). Produto da PCR com os iniciadores AOX 3' e 5' de <i>ASP1</i> em pPIC9 para verificar qual clone possuía o inserto integrado ao genoma.	61
Figura 27 (C). Produto da PCR com os iniciadores AOX 3' e 5' de <i>ASP1</i> em pPic9 para verificar qual clone possuía o inserto integrado ao genoma.	61
Figura 28. Resultados possíveis da PCR utilizando os iniciadores AOX 3' e AOX5' ..	62
Figura 29. Varredura de atividade asparaginasica em diferentes clones de <i>P.pastoris</i>	63
Figura 30. Resultado do experimento de varredura para triar a atividade dos clones da construção com o vetor pPIC9 e o gene <i>ASP1</i>	64
Figura 31(A). Gel SDS – PAGE do lisado	64
Figura 31(B). Gel SDS – PAGE do sobrenadante.	65
Figura 32. Cultivo da levedura <i>P. pastoris</i> em <i>shaker</i> para a determinação do perfil de crescimento celular	66
Figura 32. Curva de crescimento (Ln) <i>versus</i> tempo da <i>P. pastoris</i> recombinante em meio BMGY. Representação da fase lag, log e estacionária.	67
Figura 34. Linearização da fase exponencial de crescimento celular	67

Figura 34. Cultivo da levedura <i>P. pastoris</i> em <i>shaker</i> para a determinação do consumo de glicerol	62
Figura 35. Curva de biomassa <i>versus</i> consumo de glicerol da Levedura recombinante.	69
Figura 37. Superfície de resposta do planejamento experimental fatorial levando em conta o pH e a temperatura para a variável de resposta atividade.	71
Figura 38. Superfície de resposta do planejamento experimental fatorial levando em conta a concentração do indutor e a temperatura para a variável de resposta atividade.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1. Expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i>	27
Tabela 2. Composição do meio de cultivo LB.....	33
Tabela 3. Composição do meio de cultivo YPD.....	33
Tabela 4. Composição do meio de cultivo BMGY	34
Tabela 5. Composição do meio de cultivo BMMY	34
Tabela 6. Composição do meio de cultivo MD Ágar.....	34
Tabela 7. Composição do meio de cultivo MM Ágar	34
Tabela 8. Medida da atividade enzimática para L-asparaginase extracelular	43
Tabela 9. Medida da atividade enzimática para L-asparaginase presente em células intactas	44
Tabela 10. Níveis experimentais para as variáveis usadas no planejamento experimental	47
Tabela 11. Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com quatro pontos centrais para estabelecer as melhores condições para a produção da L-Asparaginase	47
Tabela 12: Cálculo dos parâmetros cinéticos de crescimento para a <i>Pichia pastoris</i> produtora de L- Asparaginase	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AOX1	Proteína Álcool oxidase 1
AOX2	Proteína Álcool oxidase 2
ASP1	Gene que codifica asparaginase 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ASP3	Gene que codifica asparaginase 2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BMGY	<i>Buffered glycerol-complex médium</i>
BMMY	<i>Buffered methanol-complex médium</i>
BMS	<i>Basalt Salt Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HRV3C	Protease de rinovírus
IMAC	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
LB	Meio Luria-Bertani
LLA	Leucemias Linfoblásticas Agudas
MD	<i>Minimal Dextrose</i>
MM	<i>Minimal Methanol</i>
Mut⁻	Fenótipo que não utiliza metanol em <i>P. pastoris</i>
Mut⁺	Fenótipo que utiliza mais metanol em <i>P. pastoris</i>
Mut^s	Fenótipo que utiliza lentamente o metanol em <i>P. pastoris</i> Recombinante
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Rpm	Rotações por minuto
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

RESUMO

DIVINO, B.S. **Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris*.** 2015. 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências Farmacêuticas, universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Utilizada amplamente no tratamento de Leucemias Linfoblásticas Agudas, a L-Asparaginase é uma enzima que atua diminuindo a concentração de L-asparagina livre no plasma e, dessa forma, impede a proliferação de células cancerígenas. Isso ocorre porque tais células, ao contrário das células saudáveis, não conseguem sintetizar o aminoácido L-asparagina que necessitam para a síntese proteica por não possuírem a enzima asparagina sintetase devido a um silenciamento genético. A L-Asparaginase utilizada no Brasil era importada e produzida em bactéria, o que gerava problemas com custo e abastecimento, além de causar algumas reações imunológicas aos usuários. Isso impulsiona a encontrar alternativas para produção nacional de tal enzima e, se possível, com menor potencial alergênico. Para isso, foi estudada a produção da enzima L-Asparaginase do gene *ASP1* de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heteróloga *Pichia pastoris* através da clonagem do gene sintético (*ASP1*), com códons otimizados para expressão em *P. pastoris*, estudo este nunca antes realizado ao que se sabe. Além disso, a produção da enzima foi realizada com auxílio de um planejamento experimental fatorial em agitador orbital levando em conta as variáveis: pH, temperatura e concentração do indutor. A melhor condição encontrada dentre as estudadas neste trabalho foi, a temperatura de 20°C, pH 6,0 e concentração de indutor de 1,5% que alcançou uma atividade de 6,9 U/g de célula e apesar do esforços, o peptídeo sinal utilizado (alfa da *S. cerevisiae*) não foi capaz de promover a secreção da enzima para o meio extracelular. Deve-se salientar que a realização de um maior número de ensaios através de um planejamento experimental fatorial fracionário para encontrar uma região de rendimentos máximos talvez melhore o ajuste dos modelos mostrados. Este trabalho foi a primeira tentativa de expressão do gene *ASP1* de *S. cerevisiae* em *Pichia pastoris* até o momento, e pretende-se aprofundar mais este estudo.

Palavras chave: *Pichia pastoris*, L- Asparaginase, *S. cerevisiae*, Expressão

ABSTRACT

DIVINO, B.S. **Biotechnological production of L-asparaginase (ASP1) of *Saccharomyces cerevisiae* in a heterologous expression system *Pichia pastoris***. 2015. 88p. Thesis (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

Used widely in the treatment of Acute lymphoblastic leukemia, L-Asparaginase is an enzyme that acts by decreasing the concentration of L-asparagine free in the plasma and thus prevents the proliferation of cancer cells. This is because such cells, in contrast to healthy cells can not synthesize L-asparagine amino acid for protein synthesis need not possess the enzyme asparagine synthetase due to a gene silencing. The L-asparaginase used in Brazil was imported and produced in bacteria, which caused problems with cost and supply, as well as cause some immune responses to users. This boosts find alternatives to domestic production of this enzyme and, if possible, less allergenic potential. For this, the production of L-asparaginase enzyme ASP1 *Saccharomyces cerevisiae* gene heterologous to *Pichia pastoris* expression system was investigated by cloning the synthetic gene (ASP1), with codons optimized for expression in *P. pastoris*, this study never before achieved to what is known. Furthermore, the enzyme production was performed with the aid of a factorial design in an orbital shaker taking into account the following variables: pH, temperature and concentration of inducer. The best condition found among those studied in this work was a temperature of 20 ° C, pH 6.0 and concentration of 1.5% inducer attained an activity of 6.9 U / g cell and despite the efforts, used signal peptide (*S. cerevisiae* alpha) was not able to promote the secretion of the enzyme into the medium extracelular. Deve be noted that the achievement of a greater number of tests using a fractional factorial design yields to find a region maximum might improve the fit of the models shown. This work was the first attempt to ASP1 gene expression of *S. cerevisiae* in *Pichia pastoris* to date, and is intended to further deepen this study.

Key words: *Pichia pastoris*, L-asparaginase, *S. cerevisiae* Expression

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A formação de todas as células sanguíneas ocorre na medula óssea que ocupa o espaço interno dos ossos. São encontradas na medula, as células mães ou precursoras que originam os componentes normais do sangue. A leucemia é uma doença com características malignas que afeta os glóbulos brancos e que na maioria dos casos tem origem desconhecida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

De forma geral, a leucemia é uma doença clonal resultante de mutações somáticas em uma célula linfóide progenitora que altera a regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose (YILMAZ and UDDEN, 2015).

O tipo de leucemia mais frequente na infância é a leucemia linfoblástica aguda ou LLA, que também pode ocorrer em adultos. Em crianças de 2 a 5 anos a incidência de LLA entre os cânceres é de vinte e cinco por cento. A população branca é normalmente mais acometida pela doença, assim como aqueles que vivem em zonas urbanas (LEITE et al., 2007; OTERO et al., 2014).

De acordo com as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil em 2014, informação publicada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2015), a leucemia ocupa a quinta posição na Região Norte (4 por 100 mil); no que se refere ao ranking nacional, ocupa a nona posição.

Apesar de em muitos casos não se saber a origem, a LLA pode se desenvolver por problemas cromossômicos, exposição à radiação, transplante de medula óssea e exposição a algumas toxinas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA - ABRALE, 2012).

A diminuição das células sanguíneas normais gera sintomas como:

- Anemia, gerando cansaço e sonolência;
- Aparecimento de manchas roxas mesmo sem ter ocorrido trauma, petéquias e também sangramentos prolongados provenientes de ferimentos muito pequenos;
- Com a queda na produção dos glóbulos brancos ocorre a diminuição da imunidade podendo gerar frequentes infecções (ABRALE, 2015).

Com relação ao tratamento, o objetivo principal é fazer com que as contagens de células sanguíneas voltem ao normal, e o primeiro tratamento indicado para tentar controlar esse aumento exagerado do número de células jovens é a quimioterapia,

no caso da LLA, a enzima L-Asparaginase é amplamente utilizada para este fim (HEALT, 2013). A importância da L-Asparaginase para o tratamento da LLA é baseada no fato das células malignas necessitarem de fonte exógena de asparagina para sua manutenção e na presença da L-Asparaginase a fonte sérica é suprimida, impedindo o desenvolvimento de tais células (STECHER et al., 1999).

Nem toda L- Asparaginase possui atividade antineoplásica e isso parece estar vinculado à afinidade enzima-substrato. As L-Asparaginases provenientes de alguns micro-organismos como de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* possuem atividade antineoplásica contra a LLA; todavia, possuem alguns efeitos colaterais, como alergias, que com o passar do tempo de uso podem neutralizar seu efeito (RICHA et al., 2012).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades - ABIFINA (2013), o Brasil apresenta fraca expressão no cenário mundial na pesquisa tecnológica e na produção industrial de biofármacos. Dessa forma, a necessidade de novas enzimas terapêuticas é de grande interesse tanto na biotecnologia quanto na indústria e na medicina brasileiras.

Uma das mais promissoras frentes de inovação tecnológica com grande potencial de impulsionar a produção industrial é a biotecnologia, pois, além de sermos consumidores de biofármacos, há forte tendência mundial em buscar rotas alternativas usando processos biotecnológicos para produção de princípios ativos farmacêuticos (ABIFINA, 2013).

Em função disto, este projeto estudou a produção da enzima L-Asparaginase advinda de *Saccharomyces cerevisiae*, importante biofármaco utilizado no tratamento de LLA a fim de produzir uma enzima estável, com custos mais baixos e menores potenciais alergênicos para os usuários.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leucemia Linfóide ou Linfoblástica Aguda

A leucemia é definida como um tipo de câncer no qual sua origem é dada como um dano genético adquirido e não passado por herança genética, de uma única célula na medula óssea. Esta doença se divide em duas formas principais, aguda e crônica. A leucemia aguda é uma doença de progressão rápida, que afeta a maior parte das células que ainda não estão completamente diferenciadas e, por isso, não conseguem realizar suas funções normais (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA - ABRALE, 2012). As células anormais se multiplicam de forma incontável e se acumulam na medula óssea como exemplificado na Figura1.

Figura1. Medula óssea normal em comparação com a medula óssea comprometida pela LLA (Autoria própria).

Esta é uma patologia predominante na infância, acomete com maior frequência crianças na faixa etária de 3 a 10 anos. Este tipo de neoplasia também pode acometer adolescentes e é mais raro o acometimento durante a vida adulta, voltando a aumentar a incidência após os 60 anos de idade. Entre crianças, a doença é mais comum naquelas de cor branca e do sexo masculino (MERCK, 2008; FARIAS, 2004).

As enzimas L-asparaginases estão entre os medicamentos que são utilizados nos protocolos de tratamento da doença, o uso dessa enzima se dá desde os anos 70 (ORTEGA *et al.*, 1977).

2.2 L-Asparaginase

Para a indústria, a produção de enzimas de fontes microbianas é um procedimento desejável, levando em conta que assim podem ser alcançadas altas quantidades em relativamente curto espaço de tempo, já que essas células possuem tempo de geração mais curto e possuem tecnologias desenvolvidas para a manipulação genética que permitem o aumento da produção dessas enzimas. Estas enzimas são substitutas muito boas na ausência ou dificuldade de obtenção de enzimas humanas (ANBU, *et. al*, 2015).

O uso de enzimas como agentes terapêuticos vem sendo reconhecido há muitos anos, no entanto, apenas nas últimas décadas essa aplicação tem despertado maior interesse, em função dos muitos avanços alcançados na área de processos biotecnológicos. Apesar da alta eficiência de catálise, do baixo impacto causado ao ambiente e da capacidade de ser usada em condições moderadas de temperatura e pH, também apresentam algumas desvantagens como por exemplo, extensas etapas de purificação para eliminar materiais tóxicos contaminantes, além de serem rapidamente degradadas no corpo e quase sempre imunogênicas (SOARES *et al.*, 2002).

Na década de 70, após vários estudos clínicos, a L-Asparaginase foi adotada em vários protocolos para o tratamento de doenças hematopoiéticas malignas, e suas formulações são usadas por via intravenosa (MULLER E BOOS, 1998).

A enzima L-Asparaginase é tetramérica e hidrolisa L-asparagina e L-glutamina, transformando-os em L-aspartato ou L-glutamato, respectivamente, e em amônia. A diminuição da disponibilidade desses aminoácidos leva à inibição da síntese de proteínas constitutivas, além de proteínas regulatórias fundamentais como as do ciclo celular e proteínas anti-apoptóticas, resultando na morte das células cancerosas. Alguns estudos sugerem que por causar efeitos drásticos nas células tumorais, as L-Asparaginases devem depletar alguns outros aminoácidos (AVRAMIS, 2012). A reação que ocorre com os aminoácidos na presença da L-Asparaginase é a hidrólise da ligação amida da cadeia lateral da L-asparagina, por

exemplo, gerando L-aspartato e amônia, conforme mostrado na Figura 2 (NARTA et.al., 2007).

Figura 2. Reação catalisada pela L-Asparaginase (modificado de NARTA et.al., 2007).

As células tumorais, devido à baixa expressão ou ausência da enzima Asparagina sintetase, necessitam de L-asparagina de fonte externa para realizar a síntese de proteínas. Assim, elas não conseguem se desenvolver e se proliferar na presença da L-Asparaginase no sangue, como representado no esquema da Figura 3 (NAGGAR, et al., 2014).

Figura 3. Mecanismo de ação antitumoral da L-Asparaginase (modificado de MULLER E BOOS, 1998).

Diversos estudos clínicos sustentam o uso de L-Asparaginase em toda a terapia e também seu uso em fases de remissão-indução da doença. Combinações de medicamentos utilizando L-Asparaginase com corticosteróides (prednisolona e dexametasona) e outros agentes quimioterápicos como o metotrexato, vincristina e mercaptopurina podem potencializar a atividade da enzima e, conseqüentemente, melhorar o resultado (ANDRADE et al., 2014).

Os pacientes que seguem o tratamento adequado com L-Asparaginase, com doses e horários respeitados, apresentam alto benefício clínico (RIZZARI et al., 2013). No entanto, o uso contínuo da L-Asparaginase pode induzir à resposta imune, levando à produção de anticorpos anti-Asparaginase, sendo esta a principal causa de resistência ao medicamento e redução de sua eficácia. Os sintomas dessa resposta imune incluem urticária, erupções, prurido, eritema, edema, bronco espasmos, hipotensão e raramente choque anafilático. Em alguns casos, também, podem ocorrer efeitos como disfunção hepática, alterações na coagulação sanguínea, diarreia, vômito, pancreatite, supressão da medula óssea, hiperglicemia e baixos níveis séricos de antitrombina III e fibrinogênio (AVRAMIS et al., 2012).

Estudos demonstram que duas isoformas de L-Asparaginase de *S. cerevisiae* (Asp1 e Asp3) tiveram sua caracterização bioquímica realizada ao final da década de 1970. Porém, até o momento poucos trabalhos realizaram uma caracterização detalhada das mesmas e verificaram seu potencial antileucêmico. A Asp1, por exemplo, ainda não teve seus parâmetros cinéticos determinados em razão de sua baixa abundância após os procedimentos de purificação realizados nos trabalhos publicados até o momento (DUNLOP et al., 1978).

A L-Asparaginase terapêutica está disponível em três formas diferentes de formulação, duas a partir de formas nativas e de origens bacterianas (*E. coli* e *E. chrysanthemi*) e uma obtida a partir da enzima de *E. coli* conjugada com polietileno glicol - PEG (NARTA et al., 2007). Esses medicamentos apresentam mecanismos de ação e toxicidade muito parecidos, embora suas propriedades farmacocinéticas difiram. As principais formulações existentes no mercado são Elspar® (de origem de *E. coli*), Erwinase® (de origem de *Erwinia chrysanthemi*) e Oncaspar® (forma covalentemente ligada a monometoxipolietilenoglicol (mPEG)).

A principal desvantagem do uso da enzima de origem procariótica é o aparecimento de reações de hipersensibilidade, por isso o desenvolvimento de uma enzima de origem eucariótica é muito promissor para minimizar esse fator antigênico, o que diminuiria os efeitos colaterais conhecidos dos biofármacos de origem bacteriana.

2.3 Expressão de Proteínas

Vários sistemas de expressão vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos para a produção de medicamentos a base de proteínas. A escolha do tipo de micro-organismo mais apropriado é baseada nas prioridades e necessidades de cada proteína heteróloga a ser expressa. Vários critérios devem ser preenchidos para se escolher um sistema de expressão como, por exemplo: alto nível de expressão do produto, estabilidade do material produzido, aplicabilidade humana, não ser patogênica nem pirogênica e preservar a atividade da proteína (SCHMIDT, 2004).

Os micro-organismos tais como bactérias e fungos, por serem de fácil modificação genética, terem elevadas taxas de crescimento e normalmente possuírem rendimento elevado de expressão de proteína heteróloga, são os sistemas mais utilizados para este fim (SCHMIDT, 2004). Os sistemas de expressão à base de proteínas recombinantes em leveduras têm provado ser uma eficiente fonte de proteínas de interesse industrial, sendo uma das alternativas mais frequentemente utilizadas para a produção de proteínas em larga escala (BUCKHOLZ e GLEESON, 1991).

Dentre os micro-organismos recomendados para expressar proteínas heterólogas, as leveduras têm sido desde os anos 70 as células mais comumente utilizadas, e a *Saccharomyces cerevisiae* a mais aplicada. Fato este que se justifica por serem organismos eucariotos, de fácil crescimento e manipulação e com habilidade para realizar modificações pós-traducionais (IDIRIS et al., 2010; PORRO et al., 2011).

Mesmo havendo bastante informação a respeito da genética da levedura *S. cerevisiae*, ela não apresenta o sistema de expressão de proteínas heterólogas mais favorável, por possuir baixa habilidade na secreção de tais proteínas e alta capacidade fermentativa, produção de etanol e hiperglicosilação quando comparada com outras leveduras (MULLER et al., 1998; DAMASCENO, HUANG E BATT, 2012).

2.3.1 *Pichia pastoris*

A levedura *Pichia pastoris* foi escolhida como micro-organismo produtor das L-Asparaginases nesse trabalho devido às suas características fisiológicas, que permitem aplicação em escala industrial. *Pichia* é um gênero que pertence à família *Saccharomycetaceae* (ordem *Saccharomycetales*, classe *Saccharomycetes*, filo *Ascomycota* e reino *Fungi*), se apresenta morfológicamente em células esféricas ou ovais e suas colônias apresentam coloração de branco a creme (Figura 4). (POUTOU et al., 2005).

Figura 4. Características macro e microscópicas da *Pichia pastoris* (Autoria própria).

A levedura *P. pastoris* tornou-se em uma das mais estudadas por ser um dos mais úteis e versáteis sistemas de expressão de proteínas heterólogas. Há alguns anos a *P. pastoris* vem sendo reconhecida como um sistema altamente eficaz para a produção de proteínas. Entre os principais fatores que deram tal reconhecimento a esta levedura estão:

- A facilidade com a qual são realizadas as técnicas necessárias para a modificação molecular de *P. pastoris*;
- A alta capacidade de produzir proteínas heterólogas intra ou extracelularmente;
- Capacidade de realizar modificações pós-traducionais; Disponibilidade do sistema de expressão e de outras ferramentas comercialmente (CEREHINO et al., 2000), (DALY et al., 2005).

É também muito usada por ser uma levedura metilotrófica, ou seja, que possui capacidade de utilizar o metanol como única fonte de carbono em seu crescimento em meio de cultura, além de possuir um promotor forte e muito bem caracterizado para produção heteróloga de proteínas (o promotor que regula a expressão da enzima álcool oxidase - *AOX1*). Possui também vetores de expressão integrativos e estáveis (INVITROGEN, 2010).

A espécie *P. pastoris* contém dois genes, denominados *AOX1* e *AOX2* (álcool oxidase 1 e 2). A enzima *AOX2* possui a mesma atividade que a *AOX1*, porém seu nível de expressão é muito menor, devido ao fato de seu promotor ser mais fraco. O promotor *AOX1* requer a presença de metanol para ser ativado e, na ausência dele, se torna reprimido. Além de metanol, o sistema *AOX1* necessita da ausência de glicose para ser plenamente ativado. Assim, o promotor *AOX1* é controlado pela manipulação da fonte de carbono adicionado ao meio de cultura (TORRES; MORAES, 2000).

Existem três fenótipos em estirpes recombinantes de *P. pastoris*, que diz respeito a sua capacidade de utilizar metanol: Mut^+ , Mut^S ou Mut^- . No fenótipo Mut^+ os genes *AOX* estão intactos, gerando crescimento rápido em metanol; o fenótipo Mut^S (lenta utilização de metanol) resulta da perda parcial da atividade de oxidação de álcool causada por uma alteração no gene *AOX1* (álcool oxidase 1), e o resultado disso é o crescimento lento em metanol em comparação com as taxas de crescimento observadas nas estirpes Mut^+ ; por fim a não utilização de metanol, resulta no fenótipo Mut^- , em que ambos os genes *AOX* são interrompidos (CEREGHINO et al., 2000).

As variantes como meio de cultivo, pH, temperatura, agitação e etc. para a produção de proteínas nessa levedura podem variar de acordo com a linhagem a ser utilizada ou de acordo com a proteína heteróloga a ser expressa. Pode-se dizer que não há protocolos fixos que vão garantir uma produção ideal, mas algumas orientações observadas ao longo das pesquisas realizadas geram uma melhoria importante na produtividade (COS et al., 2006).

A levedura *P. pastoris* possui como temperatura ideal de crescimento 30 °C. Verificou-se que em temperaturas acima de 32 °C ou muito baixas decai a expressão de proteínas heterólogas (COS et al., 2006; ZEPEDA et al., 2014).

O meio de cultura comumente utilizado para tal levedura é o BMS (*Basalt salt medium*), mas apesar de ser considerado um padrão, pode não ser o

ideal para alguns casos. Dessa forma, podem ser usados meios alternativos como o BGMV (meio complexo tamponado com glicerol) ou BMMV (meio complexo tamponado com metanol) (COS et al., 2006; HOLMES et al., 2009).

Quanto ao pH ideal a ser utilizado, *P. pastoris* se mantém bem na faixa de pH 3 a 7, porém, diferentes estudos utilizam pH 5 a 6 com o intuito de reduzir os efeitos de proteases no meio, e para melhorar a estabilidade da proteína heteróloga. Já se sabe também que valores de pH muito superiores a 5,0 podem causar precipitação e importantes problemas, como por exemplo, interferência na medição da densidade óptica - DO (COS et al., 2006).

Várias proteínas farmacologicamente importantes foram produzidas neste sistema de expressão, como pode-se ver na Tabela 1:

Tabela 1. Expressão heterólogas em *Pichia pastoris*.

Proteína	Níveis de Expressão (g/L).	Local de Expressão	Referências
Enzimas			
H-meprina β	0,058	Secretado	(Schlenzig et al., 2015).
L- Asparaginase	107	Intracelular	(Ferrara et al., 2006).
Polipeptídeos (ELPS)	0,25	Secretado	(Schipperus et al., 2009).
Canstatin-N	0,78	Intracelular	(Yin et al., 2012).
Pectate Lyase	0,004	Secretado	(Guo et al., 1995).
Spinach P.	0,1	Intracelular	(Brandes et al., 1996).

A levedura metilotrófica *P. pastoris* tem várias características que permitem que ela seja uma hospedeira ideal para a produção heteróloga de proteínas. Talvez o mais importante para a indústria é que essa levedura permite um processo de purificação mais rápido e mais eficiente, quando a proteína alvo é secretada, por causa da baixa concentração de proteínas endógenas que ela normalmente secreta (ZEPEDA et al., 2014).

2.4 Desempenho da produção

Com o desenvolvimento de tecnologias genéticas que são capazes de clonar e expressar um gene considerado estranho em um hospedeiro heterólogo, tornou-se possível produzir várias proteínas em quantidade abundante para uso terapêutico. Porém, o sistema de expressão melhor para cada proteína deve ser levado em conta, pois, proteínas expressas em diferentes hospedeiros são diferentes em muitas formas, principalmente nas suas modificações pós-traducionais e os fatores que afetam a estabilidade e a quantidade de proteína produzida.

Para obter um bom desempenho, um sistema de recombinação leva em conta fatores genéticos e fisiológicos. Dentre tais fatores estão: o número de cópias do gene, a transcrição eficiente usando promotores fortes, sinais de tradução, a translocação eficiente determinada pelo peptídeo sinal de secreção, processamento e dobramento no retículo endoplasmático e complexo de Golgi e, finalmente, a secreção (COS et al., 2006).

Os sistemas de expressão existentes têm pontos positivos e negativos que devem ser considerados na escolha de qual usar. Quanto à escolha do melhor sistema deve-se levar em conta a avaliação das opções de rendimento, padronização, aplicação e minimização de custos (RAI et al., 2001; AHMAD et al., 2014).

Quando se pretende expressar produtos nos quais mudanças pós-traducionais não sejam desejadas, o sistema nitidamente mais utilizado para tal fim é o procarionte *E. coli*, devido a sua alta produtividade volumétrica e rápido crescimento em meio simples e barato. Por outro lado, esta bactéria diferente dos eucariontes, não realiza modificações como N-glicosilações e O-glicosilações e em muitos casos, a proteína expressa por ela em quantidades grandes se agregam, gerando corpos de inclusão que interferem na atividade e purificação da proteína. Fatos esses que nos levaram a não escolher tal sistema (RAI et al., 2001; SCHMIDT, 2004). Já quando o sistema escolhido para a expressão é um eucarionte, temos como opções células de mamíferos, insetos e leveduras. A primeira, células de mamíferos, se a autenticidade do produto é absolutamente essencial para a clínica e eficácia, esta seria a melhor opção, pois oferece o maior grau de fidelidade do produto. Porém, tal sistema possui problemas com sua manutenção e contaminação. Manter as culturas

gera custo alto uma vez que exigem condições mais restritas de meio ambiente e meios de cultivo complexos, além de serem muito vulneráveis a contaminação e necessitarem de um maior tempo em relação as bactérias e as leveduras para crescer (WURM, 2004).

As células de insetos apresentam bons níveis de expressão de proteínas, mas, ainda menores que a expressão em leveduras. Fazem tipo de glicosilação diferente das de células mamíferas e possuem risco potencial de infecção viral o que degradaria as proteínas expressas, além de também necessitar de meios mais complexos para sua manutenção (KOLLEWE E VILCINSKAS, 2013).

Levedura foi o sistema de expressão escolhido para este trabalho, levando em consideração as características que ele possui tais como, não possuir pirógenos tóxicos de parede celular como a *E. coli* e não existir a possibilidade de conter DNA viral como as células de mamíferos ou de insetos. Além disso, estas podem ser cultivadas de forma relativamente rápida em meios simples e de elevada densidade celular. Possui ainda várias ferramentas disponíveis para expressão e secreção da proteína e realiza mudanças pós traducionais parecidas com as das células de humanos (RAI et al., 2001; AHMAD et al., 2014).

Na Figura 5 representada abaixo, podemos ver um esquema da relação custo e rendimento dos sistemas de expressão.

Figura 5. Relação custo/Rendimento dos sistemas de expressão de proteínas (Adaptado de Iemes, 2004).

2.5 Cultivo de *Pichia pastoris*

Várias listagens de proteínas que foram produzidas com sucesso com o sistema de *P. pastoris* destacam a relevância deste sistema de produção microbiana e algumas condições de cultivo como descrito em AHMAD et al., 2014 e CALIK et al., 2015.

Para a expressão em *P. pastoris*, geralmente, a levedura tem a sua fase de crescimento mantida em excesso de fonte de carbono, como o glicerol. Posterior ao esgotamento do glicerol inicia-se a fase de indução da expressão através da adição do metanol. É importante salientar que a faixa de concentração do indutor deve ser pequena, tendo em vista que seu acúmulo geralmente tem efeito tóxico para as células, assim a concentração final utilizada não costuma ultrapassar de 2% a cada 24 horas para manter a indução.

2.6 Purificação

O avanço da tecnologia do DNA recombinante permite a incorporação de sequências sinais nas proteínas, denominadas caudas (*tags*), naquelas que não são naturalmente espécies doadoras de elétrons, conferindo às mesmas a possibilidade de ser purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (BRESOLIN et al., 2009), por exemplo.

A proteína recombinante que foi expressa possui uma His-Tag inserida por meio de engenharia genética. Essa é uma cauda de resíduos de histidina na porção C-terminal, escolhida devido ao fato deste resíduo de aminoácido possuir alta afinidade por metais. Dessa forma, futuramente, a proteína poderá ser purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna contendo Níquel e a cauda retirada posteriormente com uso de proteases, pois a mesma possui uma sequência de clivagem da protease de rinovírus como esquematizado na Figura 6.

Figura 6. Esquema representativo da purificação por His-tag (Autoria própria).

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo geral:

Este trabalho teve como objetivo desenvolver novas linhagens geneticamente modificadas de *Pichia pastoris* produtoras da enzima L-Asparaginase (Gene *ASP1*) de *S. cerevisiae* extracelularmente e estudar sua produção em *agitador orbital*.

3.2 Objetivos específicos propostos no projeto inicial:

- Construção de um plasmídeo recombinante para a expressão da proteína;
- Transformação da levedura *Pichia pastoris* GS115 com o vetor de expressão para L-Asparaginase (*ASP1*);
- Analisar a expressão e atividade dessa asparaginase produzida em *P. pastoris*;
- Com auxílio de planejamento experimental, analisar a influência das variáveis temperatura, pH e concentração do indutor na produção da enzima.

4.0 Materiais e métodos

4.1 Micro-organismos

As linhagens utilizadas foram: Bactéria *E. coli* DH5 α e Levedura *P. pastoris* GS115. *E. coli* DH5 α foi utilizada para amplificação do plasmídeo, enquanto a *P. pastoris* GS115 foi utilizada como sistema de expressão heteróloga.

Quanto à manutenção das linhagens, as bactérias foram armazenadas em meio LB contendo glicerol a 10 % e estocadas a -80°C . As leveduras foram mantidas em meio sólido YPD a 4°C para utilização em curtos períodos e para a conservação em longo prazo, foram crescidas em YPD por 16 horas, e estocadas a -80°C contendo glicerol 15 %.

4.2 Os meios de cultura

Para experimentos utilizando a bactéria *E. coli* o meio de cultura selecionado foi o Meio Luria-Bertani (LB) da BD® mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Composição do meio de cultivo LB.

Meio LB	
Componentes	Concentração
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

Para *P. pastoris* os meios utilizados foram YPD, BMGY e BMMY, apresentados nas Tabelas 3 e 4 e 5.

Tabela 3. Composição do meio de cultivo YPD .

Meio YPD	
Componentes	Concentração
Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L

Tabela 4. Composição do meio de cultivo BMGY .

Meio BMGY	
Componentes	Concentração
YNB sem aminoácidos + sulfato de amônio	1,34 % (p/v)
Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona	2 % (p/v)
Tampão fosfato de potássio pH 6,0	100 mM
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
Glicerol	1 % (v/v)

Tabela 5. Composição do meio de cultivo BMMY.

Meio BMMY	
Componentes	Concentração
YNB sem aminoácidos + sulfato de amônio	1,34 % (p/v)
Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona	2 % (p/v)
Tampão fosfato de potássio pH 6,0	100 mM
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
Metanol	0,5 % (v/v)

Para a seleção dos transformantes os meios MD ágar e MM Ágar foram utilizados os meios apresentados nas Tabela 6 e 7.

Tabela 6. Composição do meio de cultivo MD Ágar.

Meio MD Ágar	
Componentes	Concentração
YNB sem aminoácidos	1,34 % (p/v)
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
Dextrose	2 % (p/v)
Ágar bacteriológico	1,4 % (p/v)

Tabela 7. Composição do meio de cultivo MM Ágar.

Meio MM Ágar	
Componentes	Concentração
YNB sem aminoácidos	1,34 % (p/v)
Biotina	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
Metanol	0,5 % (v/v)
Ágar bacteriológico	1,4 % (p/v)

4.3 Vetores e DNA molde

O vetor pPIC9 que pode ser visto na Figura 7 (Adquirido da empresa Invitrogen®) foi usado para a expressão da L-Asparaginase em *P. pastoris*.

Figura 7. Mapa físico do vetor pPIC9. 5' AOX1: promotor do gene AOX de *P. pastoris*; S: peptídeo sinal 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 para seleção em bactéria. *HIS4* marca auxotrófica de seleção de leveduras transformadas. Mapa disponibilizado pela empresa Invitrogen.

O DNA molde, sequência codificadora para L-Asparaginase (*ASP1*), foi obtido através da empresa *GenScript*® e possui 1209 nucleotídeos ou bps. Durante a síntese do gene *ASP1* pela *GenScript*®, além da otimização dos códons para expressão em *P. pastoris*, foi retirado o códon de terminação da tradução e foi adicionado, na porção C-terminal, uma cauda de histidina (dez histidinas) precedida pela sequência de reconhecimento da protease de rinovírus HRV3C (Novagen Merck Millipore® -71493-3). Assim, após a produção extracelular, a mesma poderá ser purificada por cromatografia de afinidade a metais e a cauda retirada pela ação da HRV3C.

4.4 Preparo do plasmídeo recombinante

Os iniciadores utilizados foram desenhados através do *website* “*Integrated DNA Technologies*” (<http://www.idtdna.com/site>), em que foram verificados os parâmetros necessários para um bom funcionamento dos mesmos e se apresentam com as seguintes sequências:

ASP1fw_Pp: 5'CCG GAA TTC ATG AAATCCGACTCCGTTG 3'

ASP1rev_Pp: 5´ AAG GAA AAA AGC GGC CGC CTA ATG ATGATG GTG 3´

As respectivas temperaturas de hibridização dos iniciadores são de 61,2 °C e 65,1 °C.

Para a amplificação do gene *ASP1* por PCR foi realizada uma reação com volume final de 20 µL, na qual foi utilizado:

- 1 µL DNA molde pUC57+*ASP1* (10 e 100 vezes diluídos);
- 5 U da enzima *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen®); 2,0 µL de *Pfx Buffer* 10X;
- 4,0 µL de dNTP (1,25 µM);
- 15,0 pmoles dos oligonucleotídeos e
- 0,4 µL de MgSO₄ (1,5 mM).

Esta reação foi realizada com os seguintes ciclos:

1 ciclo de 95 °C durante 5 min e 30 ciclos de 95 °C por 45 segundos; 58 °C por 45 segundos; 68 °C por 1 minuto e 20 segundos; finalizando com 1 ciclo de 68 °C por 7 minutos.

Após o PCR, as amostras foram verificadas por gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio (5µg/ml). Foram também utilizadas enzimas de restrição para criar extremidades coesivas complementares que permitiram ligar o DNA molde do gene *ASP1* de forma direcional ao vetor de expressão formando o plasmídeo recombinante e também, posteriormente, para linearizar o vetor previamente à transformação de *P. pastoris*. As enzimas selecionadas foram:

- *NotI*: 5' ... GC GGCCGC ... 3' / 3' ... CGCCGG CG ... 5'
- *EcoRI*: 5' ... G AATTC ... 3' / 3' ...CTTAA G ... 5'
- *Sall*: 5' ... G TCGAC... 3' / 3' ...CAGCT G ... 5'

EcoRI e *NotI* foram utilizadas para tornar coesivas as extremidades entre o vetor e o gene e *Sall* para linearizar o vetor contendo o gene *ASP1* para sua inserção na *P. pastoris*.

Para realizar a reação de restrição, foi adicionado:

- 28,0 µL de inserto;
- 10,0 µL de tampão (*Cut smart*) 10X;
- 1,0 µL de cada enzima de restrição;
- 60,0 µL de água para um volume final de 100 µL.

As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, as reações foram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v) e foi realizada a purificação dos vetores e do inserto do gel, recortando com um bisturi a região da banda visualizada na luz UV e utilizando o kit, *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification*, da empresa GE Healthcare™ UK Limited, seguindo o protocolo do fabricante.

Após a etapa de restrição utilizando enzimas, iniciamos a reação de ligação do produto de PCR com o vetor pPIC9, previamente digeridos e purificados. A reação foi realizada incubando as amostras a 16 °C *overnight* e para isso foram utilizados:

- 15 ng do inserto;
- 120 ng do vetor pPIC9;
- 5 U de T4 DNA Ligase (Promega®);
- tampão de reação 1x, em um volume final de 15 µL.

4.5 Preparo, transformação e seleção dos clones transformantes de *E. coli* DH5α

Para a obtenção de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α, uma alíquota (50 µL) da cepa estoque congelada à -80 °C foi inoculada em 50 mL de meio líquido LB e mantida em agitador rotativo a 37 °C, 200 rpm, *overnight*. Na manhã seguinte, mediu-se a OD₆₀₀, diluiu-se o pré-inóculo em 1 L de meio LB fresco para uma OD₆₀₀ 0,2. O inóculo foi incubado em agitador rotativo a 37 °C, numa rotação de 200 rpm até alcançar OD₆₀₀ em valores de 0,5 à 1. Quando atingida a OD₆₀₀ desejada, o frasco Erlenmeyer contendo a cultura foi colocado em banho de gelo por 30 minutos para inibir o crescimento celular. A cultura foi centrifugada por 15 minutos, 5.000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 500 mL de água destilada gelada e centrifugado por 15 minutos, 5.000 xg, a 4 °C, etapa realizada por duas vezes consecutivas. Após a lavagem com água, o *pellet* foi ressuspensionado em 20 mL de glicerol a 10 % gelado, centrifugado por 15 minutos, 5.000xg, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 3 mL de glicerol a 10 %. Dessa amostra foram feitas alíquotas de 40 µL em tubos Eppendorfs estéreis e estocadas a - 80 °C.

Os parâmetros utilizados para transformar a bactéria eletrocompetente foram: voltagem de 2,5 KV, corrente de 25 μ F 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 ug/mL) e incubadas por 16 horas a 37 °C em estufa. A seleção se deu na bactéria através do gene de resistência a carbenicilina contido no vetor.

4.6 Purificação do plasmídeo recombinante

Com colônias isoladas que cresceram após 16 horas incubadas a 37 °C (item 4.5), foram realizados inóculos e destes, posteriormente, foram purificados plasmídeos pelo *QIAprep Spin Miniprep Kit* da Qiagen®. Para verificação da recuperação plasmidial, as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8 % (m/v).

4.7 PCR do Plasmídeo purificado para confirmação de Inserto

Foi realizado um PCR com iniciadores específicos para o gene *ASP1* para a confirmação da presença dos insertos nos plasmídeos, utilizando a mesma metodologia do item 4.4. Os insertos foram quantificados após eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) para realização das reações de sequenciamento.

4.8 Sequenciamento do gene *ASP1* incorporado ao vetor pPIC9

Para sequenciar o gene *ASP1*, as reações de foram feitas utilizando:

- 100~200 ng de DNA;
- 3 μ L 5X *sequencing buffer*;
- 2 μ L *BigDye* v3.1;
- volume final de 15 μ L.

A programação das temperaturas no termociclador foi:

- 96 °C por 2 minutos; 1 ciclo
- 30 ciclos de 96 °C por 45 segundos;
- 62 °C por 30 segundos;
- 60 °C por 4 minutos; 1 ciclo.

Em seguida foi realizada a precipitação dessa reação de sequenciamento utilizando glicogênio, seguindo o seguinte protocolo:

- Aos 15 µL da reação de sequenciamento foi adicionado 25 µL do *coktail* de precipitação que contém etanol 100% gelado, 3 M NaOAc pH 5,2 e glicogênio 1 mg/mL;
- Agitou-se em vórtice e manteve-se em gelo por 15 minutos;
- Centrifugou-se a 4820 x *g* por 20 minutos a temperatura ambiente;
- Inverteu-se e descartou-se o excesso, dando a seguir um pulso de centrifugação de 1378 x *g* com o tubo invertido;
- Adicionou-se 50 µL de etanol 70% gelado por reação;
- Repetiu-se a centrifugação por 10 minutos e procedeu-se a drenagem dos tubos;
- Após secar por 1 hora em lugar protegido da luz, ou 1 minuto a 95°C no termociclador aberto, as amostras foram enviadas para a Central de Sequenciamento IQ/USP.

As corridas foram realizadas no aparelho de sequenciamento *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer /HITACHI* do laboratório de sequenciamento do IQ/USP.

4.9 Preparo do plasmídeo recombinante para a inserção na *P. pastoris* GS115

Para ser inserido na levedura, o plasmídeo foi linearizado em um primeiro momento com a enzima de restrição *BglII* a 37 °C por uma hora de reação e em um segundo momento com a enzima de restrição *Sall* a 37 °C por uma hora de reação . O plasmídeo linearizado passou também por um processo de concentração, no qual se utilizou o equipamento *Speed Vac* da Eppendorf que faz a concentração e evaporação de amostras utilizando vácuo no processo. Este foi também purificado pelo kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* da empresa GE Healthcare™ e a eletroforese em gel de agarose a 0,8% foi utilizada para confirmação do processo e quantificação.

4.10 Preparo, transformação e seleção dos clones transformantes de *P. pastoris* GS115 competente

Para a obtenção de células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115, uma alíquota foi plaqueada em meio YPD e mantida em estufa a 30 °C até o crescimento de colônias (aproximadamente 60 horas). Em 5 mL de meio YPD, inoculou-se uma colônia da cepa crescida na placa, em tubo Falcon estéril e manteve-se sob

agitação a 200 rpm e 30 °C, por 30 horas (pré-inóculo). Inoculou-se 300 µL do pré-inóculo em 500 mL de meio YPD e foi mantido sob agitação a 200 rpm e 30°C, *overnight* até atingir OD₆₀₀ = 1,3 a 1,5. Após alcançar a OD₆₀₀ desejada, centrifugou-se as células a 3.000 x g por 15 minutos a 4 °C e lavou-se o *pellet* em 250 mL de água gelada estéril por duas vezes. Centrifugou-se as células a 3.000xg por 15 minutos a 4 °C, ressuspendeu-se o *pellet* em 20 mL de sorbitol 1 M gelado estéril e centrifugou-se as células a 3.000xg por 15 minutos a 4 °C. Ressuspendeu-se o *pellet* em 500 µL de sorbitol 1 M gelado e aliquotou-se em tubos com 80 µL cada.

Para eletroporar a levedura foram misturados 80 µL das células com 30 µg de plasmídeo linearizado (num volume de 10 µL). Esse conteúdo foi transferido para cubetas de 0,2 cm previamente incubadas por 10 minutos em gelo. As células foram pulsadas conforme instruções para estas leveduras do eletroporador em uso (*MicroPulser Electroporator* - Biorad®). Após o pulso, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M na cubeta e o conteúdo transferido para um tubo *Eppendorf* estéril. Para selecionar os clones transformantes, as leveduras foram plaqueadas (200 µL) em meio seletivo MD e o volume restante (800 µL) em outra placa de MD. As placas foram mantidas em estufa a 30 °C, por 2 a 4 dias (o crescimento foi verificado a cada dia).

4.11 Confirmação da presença do inserto em *P. pastoris* utilizando a Reação em cadeia da polimerase a partir de colônias.

- 1 - Escolher uma colônia isolada e ressuspender em 10 µl de água;
- 2 - Adicionar 5 mL de uma solução a 5 U / mL de liticase (zymolyase) e incubar a 30 ° C durante 10 minutos;
- 3 - Congelar a amostra (colônia suspensa em água com adição de liticase) a -80 ° C durante 10 minutos;
- 4 – A amostra foi utilizada como molde para a reação de PCR.

A reação foi feita em:

- 5,0 µL 10X Reaction Buffer
- 2,0 µL de MgSO₄ (1,5 mM).
- 5,0 µL de dNTP (1,25 µM);
- 1,5 µL (15,0 pmoles) de cada oligonucleotídeo (5'AOX1 e 3'AOX1 - Invitrogen®);

- 0,1 µL da enzima *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen®);
- 1,0 µL de amostra;
- 30,4µL de água milli-Q.

Condições dos ciclos:

1 ciclo de 95 °C durante 5 minutos e 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto; 54 °C por 1 minuto; 72 °C por 1 minuto; finalizando com 1 ciclo de 72 °C por 7 minutos. Uma alíquota de 4 µL foi analisada em gel de agarose a 1%.

4.12 Indução em pequena escala para verificar a atividade

- Inoculou-se uma única colônia em 100 mL de meio BMGY num frasco Erlenmeyer de 1 L. A cultura cresceu a 30°C em agitador rotativo (250-300 rpm) até atingir OD₆₀₀ entre 2 e 6;
- Separaram-se as células por centrifugação a 3.000×g durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- Ressuspendeu-se o sedimento de células em meio BMMY usando 1/10 do volume de cultura original (cerca de 10 mL) em um frasco Erlenmeyer de 100 mL, o frasco foi tampado com duas camadas de gaze, e colocado novamente no agitador metabólico;
- Adicionaram-se metanol (100%) para uma concentração final de 0,5% a cada 24 horas para manter a indução;
- Foram retiradas alíquotas de 1 mL nos tempos de 24 h, 48h, 72h, 96h. Estas alíquotas foram centrifugadas em velocidade máxima numa microcentrífuga 3 minutos a temperatura ambiente. Estas amostras foram usadas para analisar os níveis de expressão e determinar o tempo de pós-indução ótimo para a colheita;
- Para expressão secretada, analisamos a presença de atividade no sobrenadante;
- Para a expressão intracelular realizamos a atividade nas células intactas.

4.13 Elefroforese SDS - PAGE

Foram realizadas análises da enzima L-Asparaginase através da técnica de eletroforese em gel SDS – PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) desnaturante. Para isso, géis de 12% de acrilamida (Biorad®) foram usados e o equipamento *Mini-protean* (Biorad®) com voltagem ajustada para 160 V e Tampão de corrida 1X (Tris 25 mM, glicina pH 8,3 0,25 mM , SDS 0,1%)

Após a corrida os géis foram corados com *Coomassie Blue* R-250 (Coomassie blue 2,5 g, Metanol 450 mL, Ácido acético glacial 100 mL, Água Milli-Q 450 mL) e descorados com solução descorante (Metanol 450 mL, Ácido acético glacial 100 mL, Água Milli-Q 450 mL).

As amostras do sobrenadante analisadas na eletroforese foram precipitadas com TCA 25% e as células foram lisadas com pérolas de vidro e tampão de lise (EDTA 1 mM, PBS 1x, glicerol 5% e PMSF 1 mM). Foram adicionados 3 µL do tampão de proteína 5X e 0,5 µL de DTT (ditiotreitól) 1 M á 15 µL das amostras de sobrenadante precipitado e de lisado, estas foram incubadas por 5 minutos à 95°C e posteriormente aplicadas no gel.

4.14 Determinação da atividade enzimática pelo método do Ácido L-Aspartil-β-Hidroxâmico

A determinação da atividade enzimática foi baseada na metodologia do β-Hidroxamato aspártico que fornece uma medida indireta da atividade da enzima. A reação (Figura 8) ocorre quando a L-Asparaginase reduz a L-asparagina em L-aspartato e este reage com a hidroxilamina, originando o hidroxamato aspártico. Esse produto reage com FeCl₃ e produz uma cor avermelhada que absorve em comprimento de onda de 500 nm.

Figura 8. Reação colorimétrica que determina a atividade da enzima L-Asparaginase pelo método do hidroxamato aspártico (Autoria própria).

Tabela 8. Medida da atividade enzimática para L-asparaginase extracelular

Amostra	Branco
0,6 mL Tris HCl pH 8,6 (20 mM)	0,6 mL Tris HCl pH 8,6 (20 mM)
0,2 mL L-asparagina (100 mM)	0,2 mL L-asparagina (100 mM)
0,2 mL hidroxilamina pH 7,0 (1 M)	0,2 mL hidroxilamina pH 7,0 (1 M)
1,0 mL da amostra (enzima ou extrato bruto)	↓
↓	Incubar 37 °C por 30 minutos
Incubar 37 °C por 30 minutos	↓
↓	Adicionar 0,5 mL de solução de cloreto férico/TCA/HCl
Adicionar 0,5 mL de solução de cloreto férico/TCA/HCl	↓
↓	Adicionar 1,0 mL da amostra (enzima ou extrato bruto)
Centrifugar a 14 000x g por 5 minutos	↓
↓	Centrifugar a 14 000x g por 5 minutos
Ler a 500 nm.	↓
	Ler a 500 nm.

Tabela 9. Medida da atividade enzimática para L-asparaginase presente em células intactas

Amostra	Branco
1,5 mL Tris HCl pH 8,6 (20 mM)	1,5 mL Tris HCl pH 8,6 (20 mM)
0,2 mL L-asparagina (100 mM)	0,1 g da amostra (<i>Pellet</i> úmido).
0,2 mL hidroxilamina (1 M)	↓
0,1 g da amostra (<i>Pellet</i> úmido).	Incubar 37 °C por 30 minutos
↓	↓
Incubar 37 °C por 30 minutos	0,2 mL L-asparagina (100 mM)
↓	0,2 mL hidroxilamina (1 M)
Adicionar 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl	Adicionar 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl
↓	↓
Centrifugar a 14 000x g por 5 minutos	Centrifugar a 14 000x g por 5 minutos
↓	↓
Ler a 500 nm.	Ler a 500 nm.

Sendo que de 0,1 g de *pellet* úmido corresponde a 0,02 g de massa seca.

Para calcular a atividade (U/g ou U/mL) foi utilizada a Equação 1.

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

Equação 1.

4.15 Curva de Crescimento Celular

O inóculo utilizado para realização da curva de crescimento celular foi preparado em frasco Erlenmeyer de 250mL contendo 100 mL de meio BMGY com 1% de glicerol. O cultivo foi realizado em agitador rotativo Tecna® (modelo TE-421) com temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm. Amostras de 3 mL foram retiradas a cada duas horas para a quantificação da concentração celular. Para a separação da fração sobrenadante do *pellet* celular, as amostras foram centrifugadas a 4000xg por 10 minutos em centrífuga refrigerada, marca Eppendorf®, modelo 5810-R. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação da concentração de glicerol enquanto os *pellets* celulares foram armazenados em estufa de secagem à 50 °C em tubos com massas previamente conhecidas para obtenção de massa seca.

A massa seca, em gramas, é resultado da massa do *pellet* antes da secagem, em gramas, subtraído da massa do *pellet* após a secagem em gramas (Equação 2).

$$\text{Massa seca} = \text{Pellet pré (g)} - \text{Pellet pós (g)}$$

Equação 2.

4.16 Curva de Consumo do Glicerol

Para este ensaio foi utilizado o kit colorimétrico comercial *Triglicerides* (Labtest®) no qual, como mostrado na Figura 9, o glicerol é convertido em Glicerol-3-fosfato pela glicerol-quinase, que depois é oxidado a dihidroxiaceto e peróxido de hidrogênio. Em seguida ocorre uma reação entre o peróxido de hidrogênio com o 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo um composto com coloração avermelhada, a quinoneimina, cuja intensidade é medida a 505 nm. Para a reação de quantificação do glicerol adicionaram-se 10 µL de amostra a 1 mL do reagente e incubou-se à 37 °C por 10 minutos e em seguida a absorbância lida a 505 nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em concentração de glicerol.

Ao iniciar os experimentos para a quantificação do glicerol, foram realizadas duas curvas padrão, uma com água e a outra com o meio BMGY (meio utilizado no cultivo). As concentrações de glicerol da curva foram de: 0; 0,125; 0,250; 0,5; 1,0;

1,5; 2,0 e 2,5. Para isso foram adicionados 10 µL de amostra e 1 mL do reagente. As amostras ficaram incubadas e lidas em espectrofotômetro. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras do cultivo. Os valores de absorbância foram convertidos a concentração de glicerol a partir da regressão linear da curva de calibração.

Figura 9. Reação enzimática envolvida na conversão do glicerol em quinoneimina pela ação sequencial das enzimas glicerol-quinase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase (Autoria própria).

4.17 Planejamento Experimental

Um planejamento experimental é uma ferramenta muito útil para realizar a seleção das variáveis relevantes de um sistema analítico. Com auxílio dessa ferramenta são executados experimentos que permitem aprimorar e conhecer peculiaridades do sistema utilizado.

Um bom planejamento de experimentos visa a replicação e aleatoriedade dos testes, e é também importante por permitir a obtenção do erro experimental. A estimativa desse erro é básica para verificar se as diferenças observadas nos dados são estatisticamente importantes. Em suma, o planejamento experimental resulta em objetividade científica nas conclusões (CALADO et al., 2003).

Foi realizado para este trabalho um planejamento experimental fatorial com 2 níveis e 3 variáveis (2³), com 4 repetições no ponto central para a determinação da variação experimental. Com esse planejamento o intuito foi descobrir como a resposta (atividade enzimática) poderia ser influenciada pelas variáveis temperatura, pH e concentração do indutor.

O planejamento experimental estatístico analisou as variáveis independentes: temperatura, pH e concentração do indutor que correspondem respectivamente a X1, X2 e X3, visando à otimização da produção da enzima L-Asparaginase.

Na primeira fase, a de crescimento celular, os cultivos foram feitos de forma idêntica com 1 g/L de inóculo e 1% de glicerol. A temperatura e a rotação utilizadas foram 30 °C e 250 rpm, respectivamente. Na segunda fase do cultivo microbiano, a de indução, utilizamos o planejamento fatorial 2^3 com quatro repetições do ponto central, como exemplificado nas Tabelas 10 e 11.

Após a realização dos experimentos foi realizada a regressão multivariável dos resultados, com o auxílio do software Statistica 8.0®, adaptado de Barros Neto *et al.* (2007) e Rodrigues e lemma (2005).

Tabela 10. Níveis experimentais para as variáveis usadas no planejamento experimental.

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

Tabela 11: Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com quatro pontos centrais para estabelecer as melhores condições para a produção da L-Asparaginase.

Experimento	x1	x2	x3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

A metodologia escolhida para o planejamento experimental é de fundamental importância, pois, permite a redução do número de experimentos a serem feitos e identifica a interação entre as variáveis utilizadas.

5. RESULTADOS

5.1 Amplificação do gene *ASP1* e Construção do Vetor

Os iniciadores *forward* e *reverse* amplificaram uma região de 1209 pares de base responsáveis por codificar a enzima L-asparaginase. O resultado da reação de amplificação do gene *ASP1* pode ser visto na Figura 10.

Figura 10. Amplificação do gene *ASP1*. 1 - Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®), 2 - gene *ASP1* amplificado.

A imagem do gel nos mostra que há um rastro, que pode ser justificado pela alta concentração do molde do gene *ASP1* (o gene sintético clonado pela GenScript no vetor pUC57) e/ou pela temperatura de anelamento utilizada (58 °C), que pode ter sido baixa. Por esse motivo, fizemos um novo PCR com outras condições de temperatura e diluições do molde para uma melhor padronização da reação de PCR. Após a eletroforese em novo gel verificou-se melhora considerável nos padrões de bandas, onde não foram visualizados rastros, e as diluições de 10 e 100 vezes apresentaram padrões parecidos entre si, como apresentado na Figura 11.

Figura 11. Amplificação do gene *ASP1* diluído. 1 - Gene *ASP1* amplificado com molde diluído 10 vezes, 2 - Amplificação do gene *ASP1* com molde diluído 100 vezes e 3 - Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®).

5.2 Digestão de pPIC9 e *ASP1* com enzimas de restrição

Os produtos resultantes da digestão, descrita no item 4.4, de *ASP1* e pPIC9 foram corridos em gel de agarose a 0,8% para isolar do gel os produtos obtidos. O gene *ASP1* e o vetor pPIC9, foram recuperados como descrito no item 4.4 utilizando *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* da empresa GE Healthcare®. Corremos um gel de agarose mostrado na Figura 12, que confirmou a presença dos mesmos após a etapa de recuperação e suas quantificações.

Figura 12. Confirmação da etapa recuperação do gene e do vetor. 1 – Confirmação da etapa de recuperação do gene *ASP1*, 2 - Confirmação da etapa de recuperação do vetor pPIC9, 3 - Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®) e 4 – Padrão de quantificação *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®).

5.3 Ligação do gene *ASP1* ao vetor pPIC9

A reação de ligação foi realizada como descrita no item 4.4, e esse material resultante da ligação foi inserido em *E. coli* DH5 α eletrocompetente, e uma miniprep utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* da Qiagen® foi feita. Com esse molde purificado pela etapa da miniprep, realizamos uma reação de PCR com os *iniciadores* específicos *forward* e *reverse*. O gel para a confirmação da presença do inserto no vetor pPIC9 é apresentado na Figura 13, compatível com o tamanho esperado para a amostra.

Figura 13. *ASP1* presente no vetor pPIC9. 1 – *ASP1* presente no vetor pPIC9 e 2- Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®).

5.4 Sequenciamento

O clone de pPIC9+*ASP1* foi sequenciado da forma descrita no item 4.8, para ver a integridade e fidelidade da sequência durante o processo de construção do vetor de expressão e o resultado adquirido revelou que a sequência de nucleotídeos do inserto *ASP1* no vetor pPIC9 foi encontrada sem nenhuma mutação.

5.5 Preparo do plasmídeo para transformar a *Pichia pastoris*

Para transformar *P. pastoris* são necessários no mínimo 10 μ g de plasmídeo. Assim, depois da confirmação da presença do plasmídeo recombinante, o mesmo foi linearizado, concentrado (item 4.9) e um gel de agarose foi analisado para quantificar o plasmídeo (Figura 14).

Figura 14. Preparo do plasmídeo recombinante. 1 – Plasmídeo recombinante linearizado. Plasmídeo recombinante linearizado e concentrado e 2 - Padrão de quantificação *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®).

5.6 Transformação e seleção da levedura *Pichia pastoris*

Para inserir o plasmídeo recombinante na levedura, necessita-se que ela esteja competente. Para isso, preparamos *P. pastoris* eletrocompetentes (vide item 4.10) que foram transformadas com o plasmídeo linearizado da Figura 14.

Posteriormente, as leveduras que se desenvolveram em meio MD também foram semeadas em meio MM ágar que é um meio mínimo contendo metanol. Conseguem se desenvolver neste meio somente as leveduras capazes de metabolizar o metanol, aumentando assim o nosso nível de seletividade e caracterizando nossas transformantes como Mut⁺, pois nos dois meios as leveduras se desenvolveram com a mesma velocidade como mostram as Figuras 15 A e B a seguir.

Figura 15 (A). Seleção de *P. pastoris* transformada em ágar MD.

Figura 15 (B). Seleção de *P. pastoris* transformada em ágar MM.

Em paralelo, leveduras *P. pastoris* eletrocompetentes que não foram transformadas com o plasmídeo, também foram semeadas em meio seletivo MD e as mesmas não se desenvolveram como se pode ver na Figura 18. Esse resultado é o que esperávamos, tendo em vista que a levedura não continha o plasmídeo recombinante que possui a marca auxotrófica de seleção de leveduras *HIS4*.

Figura 15 (C). Seleção de *P. pastoris* sem ser transformada em ágar MD.

5.7 Análise do resultado do *Dot blot* utilizando anticorpo anti-his

Para verificar a expressão da proteína recombinante realizamos a detecção da cauda de histidina inserida na proteína através de *dot blot* com anticorpos específicos que se ligam a esta cauda.

Através dos resultados obtidos com este ensaio, representados na Figura 16, podemos observar que a proteína está sendo expressa, porém a identificação ocorreu somente nas amostras dos *pellets* celulares lisados e não no sobrenadante.

Este problema pode ser em função da pequena quantidade de amostra utilizada e também por estar muito diluída.

Figura 16. Ensaio de *Dot Blot* para as amostras do sobrenadante e do *pellet* lisado.

5.8 Indução em pequena escala para verificar a atividade

Para produzir L-Asparaginase em sistema de expressão heteróloga *Pichia pastoris*, em um primeiro momento o molde do gene *ASP1* foi amplificado pela técnica de PCR, depois, esse gene e o vetor foram inseridos na bactéria *Escherichia coli* pela técnica de eletroporação, onde foram realizadas manipulações para concluir a construção de um plasmídeo recombinante para a expressão da proteína. Em uma segunda etapa, o plasmídeo recombinante construído foi transformado na levedura *Pichia pastoris* GS115 também por eletroporação. Foi verificada, através de expressão em pequena escala, a presença da enzima utilizando a técnica de *dot blot* com anticorpos comerciais anti-his (Invitrogen®), que reconhece a cauda de histidina inserida na proteína. Porém, após realizar os procedimentos citados no item 4.12 e 4.13, não foi verificada a presença de atividade no sobrenadante e nem nas células intactas.

No gel de SDS-PAGE não foi verificada a banda da proteína. Sendo assim, uma nova construção foi iniciada com um novo lote do plasmídeo pPIC9 comprado novamente da Invitrogen® para que pudesse ser descartado qualquer problema na construção que afetasse a expressão da proteína.

6. NOVOS RESULTADOS

6.1 Amplificação do gene *ASP1* e Construção do Vetor

Os iniciadores *forward* e *reverse* amplificaram uma região de 1209 pares de base responsáveis por codificar a enzima L-asparaginase e o resultado da reação de amplificação do gene *ASP1* pode ser visto na Figura 17.

Figura 17. Amplificação do gene *ASP1*. 1 – Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®), 2 - Padrão de quantificação *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®), 3 - Amplificação do gene *ASP1* com molde concentrado, 4 - Amplificação do gene *ASP1* com molde diluído 10 vezes.

Pode-se observar na raia 3 do gel da Figura 17 que há um rastro, que pode ser justificado pela alta concentração do molde do gene *ASP1* (o gene sintético clonado pela GenScript no vetor pUC57). Na raia 4 a diluição é de 10 vezes e não apresenta rastros, e foi a concentração utilizada nos experimentos seguintes.

6.2 Purificação do plasmídeo recombinante

Após amplificação do gene alvo, o vetor adquirido pPic9 foi purificado (Figura 18) através do *QIAprep Spin Miniprep Kit* da Qiagen® e apresentou seu tamanho adequado de 8,0 kb.

Figura 18. Preparo do vetor pPic9. 1- Miniprep do vetor pPic9, 2- Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®), 3- Padrão de quantificação *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen®)

Isto nos sugeriu que o mesmo estava adequado para seguir com a construção do plasmídeo recombinante.

6.3 Digestão de pPIC9 e *ASP1* com enzimas de restrição

Como descrito no item 4.4, os produtos resultantes da digestão de *ASP1* e pPIC9 foram corridos em gel de agarose a 0,8% para isolar do gel os produtos obtidos, e que posteriormente foram recuperados como detalhado no item 4.4 utilizando *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* da empresa GE Healthcare®. O gel de agarose mostrado na Figura 19 confirmou a presença do gene e do vetor após a etapa de recuperação e demonstrou suas quantificações.

Figura 19. Digestão e purificação do gene e do vetor. 1 – Padrão de quantificação *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen®), 2 - Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®), 3 – Gene *ASP1* (1209pb) e 4 – Vetor pPic9 (8000pb) após digestão e purificação.

6.4 Ligação do gene *ASP1* ao vetor pPIC9

A reação de ligação foi realizada como descrito anteriormente no item 4.4. O plasmídeo recombinante que resultou da reação de ligação foi inserido em bactéria *E. coli* DH5α eletrocompetente por eletroporação, e posteriormente, foi feita uma miniprep utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* da Qiagen®. Em seguida, um PCR de colônia foi executado utilizando colônias transformadas da *E. coli* DH5α com os iniciadores específicos para o gene *ASP1* (Figura 20).

Figura 20. Confirmação da presença do gene no vetor recombinante. 1 – *ASP1* (1209 pb) presente no vetor pPIC9 e 2- Controle negativo (pPic9 sem *ASP1*) 3 - Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®)

Os produtos obtidos do PCR de colônia apresentaram o tamanho ideal para o gene *ASP1*, por volta de 1209 pb.

6.5 Digestão com outras enzimas de restrição

Uma segunda maneira de se confirmar a inserção do gene ao vetor é a utilização de enzimas de restrição *Sall* e *XhoI*, que digerem o vetor em locais específicos que geram tamanhos diferentes entre o vetor vazio (6.305pb + 1.695pb) e o vetor recombinante (6.305pb + 2.904pb). Como se pode ver na Figura 21, na canaleta 1, o vetor que contém o inserto produziu bandas de tamanhos maiores do que o vetor vazio, isto se deve ao fato de que ele apresenta o gene inserido.

Figura 21. Confirmação do tamanho correto do vetor recombinante. 1-Vetor recombinante, 2- Vetor vazio, 3- Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®).

6.6 Sequenciamento

Para se ver a integridade e a fidelidade da sequência de nucleotídeos do inserto *ASP1* no vetor pPIC9 foi realizado o sequenciamento como detalhado no item 4.8. Porém, diferentemente da primeira tentativa de construção em que foi usado o produto de PCR para o sequenciamento, desta vez foi utilizado como produto o plasmídeo recombinante, evitando assim contaminação por DNA amplificado. Esse sequenciamento foi realizado com combinações dos iniciadores *forward* e *reverse* específicos para o gene *ASP1* e os iniciadores da *AOX* que sequenciam parte do vetor, permitindo verificar se o gene está integrado no mesmo. A sequência de codificação para a proteína L-Asparaginase foi encontrada no pPIC9 sem nenhuma mutação como se pode ver na Figura 22 que demonstra o eletroferograma do sequenciamento.

Figura 22. Eletroferograma do sequenciamento do gene *ASP1* em vetor pPic9.

Nas Figuras 23 e 24 podemos visualizar o alinhamento das amostras sequenciadas e da sequência correta de nucleotídeos para comparação. Pode-se perceber que no sequenciamento em que foram utilizados os iniciadores 5'AOX e 3'AOX, o plasmídeo pPIC9 contém o gene *ASP1* inserido de maneira correta para se realizar a expressão.

Figura 23. Sequenciamento do vetor pPIC9 ligado ao gene *ASP1* utilizando o iniciador 5'AOX.

Figura 24. Sequenciamento do vetor pPic9 ligado ao gene *ASP1* utilizando o iniciador 3'AOX.

6.7 Preparo do plasmídeo para transformar a *Pichia pastoris*

Para obter maior concentração do plasmídeo pPIC9 recombinante, este foi purificado através *QIAprep Spin Megaprep Kit* da Qiagen®, que consegue render uma concentração 100 vezes maior do produto do que o protocolo usado na primeira tentativa da construção.

Precisa-se de no mínimo 10 µg de plasmídeo para ser realizada uma efetiva transformação da levedura *Pichia pastoris*, dessa forma, o mesmo foi linearizado com a enzima *BglIII* que digere em duas porções (Figura 25), concentrado (item 4.9) e quantificado por Espectro Nanodrop (modelo ND-1000) Thermo Scientific®, em que sua concentração era de 10 µg/µl, sendo que 3 µl foram utilizados para a transformação, totalizando assim 30 µg. A Figura 25 além de nos mostrar que o plasmídeo foi digerido, nos permite realizar um controle ao perceber e confirmar mais uma vez que o gene ASP1 está inserido no vetor recombinante, uma vez que o plasmídeo vazio (controle negativo) também foi digerido com a mesma enzima de restrição e podemos ver que sua banda superior (raia 4) possui tamanho menor.

Figura 25. Plasmídeo recombinante linearizado e concentrado. 1 - Padrão de quantificação *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen®), 2 - Padrão de tamanho molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen®), 3 - Plasmídeo recombinante linearizado e concentrado e 4 - Plasmídeo vazio linearizado.

Como se pode observar na Figura 25, o plasmídeo vazio (controle negativo) possui bandas de 5.620 pb e 2.380pb e o plasmídeo recombinante (que possui o

gene *ASP1*) possui bandas de 6.829pb e 2.380pb e este último foi utilizado para a transformação da levedura.

6.8 Transformação e seleção da levedura *Pichia pastoris*

Após preparo da levedura eletrocompetente, o plasmídeo recombinante foi inserido utilizando a técnica de eletroporação como descrito no item 4.10.

Posteriormente, as leveduras que se desenvolveram em meio MD após a transformação foram selecionadas e numeradas em nova placa do mesmo meio para identificação dos clones (Figura 26).

Figura 26. *P. pastoris* transformada e identificada em ágar MD.

Foi realizado um PCR com os iniciadores AOX 5' e 3' (item 4.11) para mais uma vez confirmar a presença do gene *ASP1* no DNA genômico da *P. pastoris*. Das 47 colônias de leveduras selecionadas, 30 foram testadas quanto à presença do gene, resultado que podemos ver nas Figuras 27 A, B e C que foram interpretados como determinado pelo manual *Pichia Expression Kit da Invitrogen*®, o qual nos permite esclarecer, através do gel de agarose, qual dos clones possui a integração correta do plasmídeo.

Figura 27(A). Produto da PCR com os iniciadores AOX 3' e 5' de *ASP1* em pPIC9 para verificar qual clone possuía o inserto integrado ao genoma.

Figura 27(B). Produto da PCR com os iniciadores AOX 3' e 5' de *ASP1* em pPic9 para verificar qual clone possuía o inserto integrado ao genoma.

Figura 27(C). Produto da PCR com os iniciadores AOX 3' e 5' de *ASP1* em pPic9 para verificar qual clone possuía o inserto integrado ao genoma.

Como podemos observar na Figura 27(A), os clones nas raias do gel 3 e 7 apresentaram insertos. Na Figura 27(B), os clones nas raias 1 e 3 do gel apresentam o inserto. E, por fim, na Figura 27(C), os clones nas raias 2 e 3 apresentaram o inserto.

Os resultados podem ser melhor interpretados observando-se a Figura 28 que nos mostra os possíveis resultados a serem encontrados. Os nossos clones realizaram a integração correta possuíam as bandas de 1701 pb (1209 pb do gene mais 492 do vetor) e podemos ver também uma banda de 2200 pb, que corresponde ao gene AOX1 presente, o que sugere que estes clones são todos Mut⁺ por possuírem o gene AOX1 intacto (figura 28 – 1), ou seja, as mesmas possuirão crescimento rápido em presença de metanol.

Figura 28. Resultados possíveis da PCR utilizando os iniciadores AOX 3' e AOX5' (Autoria própria).

6.9 Indução para verificar a atividade

Para termos certeza de qual dos clones poderiam ter atividade, resolvemos testar os mesmos 30 clones, como explicado nos itens 4.12 e 4.13. Desses, 5 apresentaram atividade (Figura 29) nas células intactas nas mesmas condições de cultivo e não apresentaram atividade no sobrenadante. O clone que apresentou maior atividade após 96 horas de cultivo, numerado como 5, foi o escolhido para continuar os experimentos; a atividade L-asparaginase endógena da *Pichia pastoris* (vetor vazio) pode ser vista no clone 6.

Figura 29. Varredura de atividade asparaginásica em diferentes clones de *P.pastoris*.

A seguir na Figura 30 podemos visualizar o resultado do experimento de *varredura* quantitativo para triar a atividade dos clones transformados de *P. pastoris* para verificar a expressão de asparaginase.

Figura 30. Resultado do experimento de varredura para triar a atividade dos clones da construção com o vetor pPic9 e o gene ASP1.

O gráfico mostrado na Figura 30 nos mostra que o clone 5 apresentou melhor atividade enzimática quantificada pelo método Ácido L-Aspartil- β -Hidroxâmico, e o melhor tempo de cultivo para a expressão foi o de 48 horas. O clone 6 exibe a atividade da levedura sem inserto, a atividade quantificada nesta amostra é proveniente da Asparaginase endógena da *P. pastoris*.

Na Figura 31(A) podemos verificar o gel de SDS-PAGE da levedura lisada. A proteína heteróloga que possui aproximadamente 43 kDa é demonstrada em diferentes tempos do cultivo. Pode-se observar que a proteína já estava sendo expressa com 24 horas de indução e sua melhor expressão foi após 96 horas de indução.

Figura 31 (A). Gel SDS – PAGE do lisado. 1- Células lisadas após 24 horas de indução, 2- Células lisadas após 48 horas de indução, 3- Células lisadas após 72

horas de indução e 4- Células lisadas após 96 horas de indução e 5 – Precision Plus Protein (Biorad®) 6 – Células lisadas de *Pichia pastoris* vazia (sem inserto).

Na Figura 31(B) podemos visualizar o gel de SDS-PAGE do sobrenadante do cultivo, a proteína heteróloga não foi encontrada, o que nos mostra que a mesma não está sendo secretada, podemos assim concluir que o peptídeo sinal utilizado (alfa da *S. cerevisiae*) não conseguiu exportar a L-Asparaginase para o meio extracelular.

Figura 31 (B). Gel SDS – PAGE do sobrenadante. 1- Sobrenadante após 24 horas de indução, 2- Sobrenadante após 48 horas de indução, 3- Sobrenadante após 72 horas de indução e 4- Sobrenadante após 96 horas de indução e 5 – Precision Plus Protein (Biorad®).

6.10 Etapa de crescimento celular (Biomassa g/L)

A fase de crescimento celular foi estabelecida em meio BMGY (ver Tabela 3) e o experimento foi realizado com as condições comumente utilizadas para o crescimento de leveduras como a *P. pastoris* (30°C, 250 rpm e pH = 6,0). As amostras foram coletadas ao longo de 24 horas nos tempos de cultivo de 3, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 21 e 24 horas para a determinação da massa seca (g/L). A Figura 32 apresenta os resultados.

Figura 32. Cultivo da levedura *P. pastoris* em *shaker* para a determinação do perfil de crescimento celular.

A fase lag ou fase de adaptação das células ocorreu, provavelmente, durante as primeiras 5 horas de cultivo e não foi claramente detectada na nossa amostragem. O primeiro ponto, retirado após 3 horas de cultivo já indica o período de transição entre a fase lag e a fase log e, provavelmente o inóculo estava com células ativas o suficiente para iniciarem o processo de proliferação. A fase log ou fase de crescimento logarítmico ocorreu aproximadamente até a 21^a hora do cultivo e na sequência iniciou a fase de desaceleração da fase logarítmica e provável transição para a fase estacionária. Podemos verificar que com 24 horas de cultivo atingiu-se o valor de biomassa de 9,3 g/L de células. É importante observar que a partir dos pontos mostrados na Figura 32 é possível apenas afirmar que o cultivo estava tendendo a iniciar a fase estacionária.

Para identificarmos com maior precisão a fase de crescimento, apresentamos nas Figuras 33 e 34 a curva de crescimento (Ln) em função do tempo e a linearização de sua fase exponencial, assim podemos ver exatamente onde se iniciou cada fase do crescimento.

Figura 33. Curva de crescimento (Ln) em função do tempo da *P. pastoris* recombinante em meio BMGY. Representação da fase lag, log e estacionária.

Figura 34. Linearização da fase exponencial de crescimento celular.

Através dos gráficos (Figuras 33 e 34) conseguiremos calcular os parâmetros cinéticos, podendo assim conhecer a Velocidade máxima de crescimento μ_{Max} (h^{-1}), o Tempo de geração (h) e Fator de conversão de substrato em biomassa (g/g)

que são parâmetros importantes para se conhecer o comportamento da célula durante seu crescimento.

6.11 Etapa de consumo de glicerol (g/L)

Esta etapa também foi realizada em meio BMGY e foram mantidas as condições ótimas utilizadas para o crescimento de *P. pastoris*, 30°C e 250 rpm. As amostras foram coletadas ao longo de 24 horas nos tempos de cultivo de 3, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 21 e 24 horas para a determinação do consumo do glicerol (g/L). A Figura 35 nos mostra o perfil de consumo.

Figura 34. Cultivo da levedura *P. pastoris* em shaker para a determinação do consumo de glicerol.

Observa-se que, após 21 horas de cultivo o glicerol foi praticamente todo consumido, deixando apenas uma quantidade residual.

Analisando as curvas de biomassa e glicerol juntas (Figura 35), podemos ver como o crescimento é acompanhado pelo consumo do glicerol, inclusive pode-se verificar que o final da fase exponencial associa-se ao final do consumo do substrato, ou seja, aproximadamente às 22 horas.

Figura 35. Concentração de biomassa e de glicerol pela *P. pastoris* recombinante.

Calculando os parâmetros cinéticos temos:

Tabela 12. Cálculo dos parâmetros cinéticos de crescimento para a *Pichia pastoris* produtora de L- Asparaginase.

Velocidade máxima de crescimento μ_{Max} (h^{-1})	0,15
Tempo de geração (h)	4,60
Fator de conversão de substrato em biomassa (g/g)	0,59

Que foram calculadas utilizando as equações 3,4 e 5.

Velocidade máxima de crescimento (h^{-1})	$\mu_{\text{max}} = \text{coeficiente angular da reta } \ln X \text{ versus tempo}$ Equação 3.
Tempo de geração (h)	$T_g = \ln 2 / \mu_{\text{max}}$ Equação 4.
Fator de conversão de substrato em biomassa (g/g)	$Y_{x/s} = X_0 - X_f / S_0 - S_f$ Equação 5.

Nas mesmas condições, Mut+ alcançaram taxas máximas de crescimento específicas de até $0,15 \text{ h}^{-1}$ (KOBAYASHI et al., 2000). Para as estirpes mut^S, valores de μ_{max} eram consideravelmente inferior, por exemplo, até $0,035 \text{ h}^{-1}$ (BRIERLEY et al., 1990). Com esses dados podemos afirmar mais uma vez que o nosso clone escolhido para realizar os experimentos possui fenótipo Mut+ , por corroborar com dados apresentados na literatura.

Com o calculo da conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), durante a fase de crescimento obtivemos um valor de 0,59 g/g, o que significa dizer que 59% do glicerol consumido foi convertido em células, esse resultado comparado ao trabalho publicado pelo grupo de FERRARA et.al., 2006 que atingiu 56%, o que demonstra um bom desempenho.

6.12 Planejamento experimental: experimentos conduzidos em frascos agitados

Conforme descreve o item 4.16 foi feito um planejamento experimental 2³ para estudar as influências das variáveis temperatura, pH e concentração do indutor na produção de L-Asparaginase do gene ASP1 de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris*, este planejamento se fez importante tendo em vista que sua aplicação agregaria melhorias na redução da variação do processo, na diminuição do tempo do processo e na redução de custo operacional.

Podemos analisar as respostas dadas pelo planejamento através dos gráficos de superfície de resposta, que é a figura obtida quando uma variável resposta é representada graficamente em função de um ou mais fatores do processo (Figuras 37 e 38).

Figura 37. Superfície de resposta do planejamento experimental fatorial levando em conta o pH e a temperatura para a variável de resposta atividade.

Esta figura nos mostra que quanto menor o valor de temperatura e também de pH experimentados, 20°C e 6,0 respectivamente, melhor se produz a enzima, tendo em vista que foi o ponto onde observamos o maior valor de atividade até esta etapa do planejamento. Posteriormente uma otimização desses pontos poderá ser feita para tentar ainda melhorar a atividade.

Já é conhecido que as propriedades de uma enzima e a sua atividade são largamente influenciadas pelas alterações de pH. Vários estudos realizados para determinar o efeito do pH sobre a atividade da enzima L-asparaginases indicam que o pH ótimo pode variar entre a região alcalina e ácida de acordo com a origem microbiana da enzima como, por exemplo, o que foi descrito por KUMAR e MANONMANI, 2013; BORKOTAKY e BEZBARUAH, 2002 e PATRO e GUPTA, 2012.

É importante lembrar que para o uso terapêutico de L-asparaginase, é desejável que o pH ótimo esteja na gama fisiológica, pois, sua eficiente atividade em

condições fisiológicas é de suma importância para a sua utilização como um agente terapêutico.

Quanto à temperatura, seus efeitos sobre a atividade enzimática e estabilidade são importantes, tendo em vista que o aumento da temperatura interfere na taxa de catálise e atividade da enzima e também na sua inativação (ILLANES et al., 2008). Sendo assim, a temperatura ótima tem que ser determinada para cada enzima, de forma que o conflito seja equilibrado.

Figura 38. Superfície de resposta do planejamento experimental fatorial levando em conta a concentração do indutor e a temperatura para a variável de resposta atividade.

O segundo gráfico de superfície de resposta (Figura 38) nos mostra que quanto maior a concentração do indutor e a temperatura, maior a expressão da L-asparaginase. Esses dados nos permitem afirmar que a melhor condição para a expressão da enzima, dentre aquelas avaliadas neste estudo, foi a temperatura de 20°C, o pH de 6,0 e a concentração do Indutor de 1,5%.

De acordo com o as superfícies de respostas demonstradas nos gráficos, pode-se ver influências significativas das variáveis sobre a atividade da enzima. Verifica-se que a L- Asparaginase atinge taxas de atividade relevantes (6,9 U/g de célula) com temperatura de 20°C. Então, pode-se apontar uma tendência para o uso de valores mais baixos de temperatura, já que estes renderam valores um pouco maiores de atividade enzimática.

Por sua vez, o pH também se revela como uma variável importante, através do gráfico de superfície de resposta, uma vez que sua diminuição apresenta efeito positivo nos valores de atividade, em tons mais escuros na Figura 37. Portanto, trabalhar com valores de pH iguais ou menores que 6,0 podem contribuir com uma melhor atividade enzimática.

A variável concentração do indutor também demonstrou significância sobre a atividade enzimática uma vez que, entre as concentrações estudadas a maior delas contribuiu com o aumento da atividade, valor que pode ser aumentado em um segundo planejamento para melhoria da atividade, mas deve-se levar em conta que a faixa de concentração do indutor deve ser pequena, geralmente de 0,5 a 2%, tendo em vista que seu acúmulo geralmente tem efeito tóxico para as células.

De acordo com os gráficos de superfície mostrados nas Figuras 37 e 38, pode-se afirmar que a condição experimental que maximiza a atividade enzimática foi encontrada em pH 6,0, temperatura de 20°C combinados com concentração do indutor de 1,5%. Deve-se salientar que a realização de um maior número de ensaios através de um planejamento experimental fatorial fracionário para encontrar uma região de rendimentos máximos talvez melhore o ajuste dos modelos mostrados.

7. DISCUSSÃO

O trabalho que desenvolvemos faz parte de um amplo projeto em andamento no Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP que visa o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção da enzima L-Asparaginase.

Neste trabalho, optou-se por usar o gene *ASP1* de *Saccharomyces cerevisiae* para a expressão da proteína heteróloga no sistema de expressão da *P. pastoris* por ser um gene pouco estudado até o momento e por se saber que o mesmo está envolvido com a produção da L-Asparaginase II (BOREK, et al., 2001).

Trabalhos realizados por AHMAD et al., 2014, CALIK et al., 2015, CEREGHINO e CREGG, 2000 e MACAULEY-PATRICK et al., 2005 alcançaram sucesso utilizando o mesmo sistema de expressão escolhido e destacaram um aumento relevante do uso deste sistema para expressão de proteínas. Esta levedura foi também escolhida já que possui taxa de crescimento mais rápido do que *S. cerevisiae*, que é uma levedura muito utilizada para essa finalidade, com níveis mais elevados de produtividade, com conversão de 30 a 40% do seu peso em proteínas (TORRES E MORAES, 2000) e também porque as mudanças pós-traducionais de *P. pastoris* são mais semelhantes às de mamíferos, tendo em vista que, a *S. cerevisiae* realiza hiperglicosilação que pode interferir nos processos de enovelamento das proteínas, além de poder causar imunogenicidade por adicionar vários resíduos de manose terminais (CREGG et al., 1989). Além disso, ao contrário da *S. cerevisiae*, a *P. pastoris* tem a possibilidade de usar metanol como indutor da expressão do gene heterólogo, pois, por ser uma levedura metilotrófica, reduz os custos da produção (CREGG et al., 1989) (CEREGHINO et al., 2000). Adicionalmente, *P. pastoris* possui um promotor forte e facilmente induzível e regulável por metanol, derivado do gene da proteína álcool oxidase (CEREGHINO et al., 2000; FERRARA et al., 2006). Não é considerada forte fermentadora como a *S. cerevisiae*, que realiza fermentação gerando etanol, que em culturas de alta densidade pode atingir níveis tóxicos (TORRES; MORAES, 2000).

Outros sistemas já são conhecidos para a expressão heteróloga de L-Asparaginase, como o de *E. coli*, descrito por ROTH et al., 2013 e também por KHUSHOO et al., 2005 e o de *Erwinia chrysanthemi* elucidado por GOWARD et al., 1992. Porém tais sistemas não eram de interesse para o trabalho, tendo em vista

que por serem organismos procariontes, não apresentariam glicosilações como as encontradas em seres humanos, podendo gerar reações imunes, fator este que se pretendia melhorar com o trabalho, desta forma o uso destes sistemas não se tornou interessante.

Adiciona-se às justificativas supracitadas o prévio conhecimento de que a produção de proteínas heterólogas em leveduras é uma das principais estratégias biotecnológicas e diversas proteínas já foram expressas utilizando esta espécie de levedura, levando a um rendimento de expressão entre 1 g/L a 10 g/L de biomassa em meio de cultura contendo glicerol (HIGGINS E CREGG, 1998; CEREGHINO et al., 2000). *P. pastoris* é uma dessas leveduras bastante utilizadas com a finalidade de ser um sistema para expressar proteínas. Como exemplo disso, podemos mencionar a descrição de POTGIETER, T.I. et al., 2009, na qual obtém partes de anticorpos monoclonais e a produção de insulina descrita por XIE T et al., 2008.

Um trabalho que se propôs a usar a *P. pastoris* para a expressão de asparaginase foi do grupo de pesquisa referente aos artigos de FERRARA et al, 2006 e de GIRÃO et al, 2014. Os autores propõem a produção de L-asparaginase a partir da clonagem do gene *ASP3* de *Saccharomyces cerevisiae* em *Pichia pastoris*, sistema bastante semelhante ao utilizado neste trabalho. A diferença é o gene utilizado, pois o *ASP1* que utilizamos não havia sido expresso em *P. pastoris* até o momento. Os autores conseguiram altos níveis de expressão, mas, da mesma maneira que o nosso trabalho na forma intracelular. Além do já exposto, as leveduras são organismos seguros, não são patogênicos ou pirogênicos e apresentam menor risco de contaminação por patógenos humanos e vírus, fato importante tendo em vista que a proteína produzida será usada como medicamento injetável (GELLISSEN, 2000; GELLISSEN et al., 2005).

O sequenciamento e alinhamento do plasmídeo recombinante pPIC9+ASP1 apresentou 100% de identidade com a sequência de nucleotídeos desenhada para a expressão da proteína, o que nos deixou confiante quanto a sua inserção correta e integridade.

Ao analisarmos a transformação e seleção das leveduras, observamos resultados condizentes com a literatura. No meio sem histidina (MD) os transformantes se desenvolveram sem limitações, nos permitindo isolar as colônias His⁺.

A análise do gel de proteínas (Figura 21) nos sugeriu a presença da L-Asparaginase com 43 kDa, valor esperado após análise no software Expasy® - ProtParam, em que o valor teórico seria de 43,6 kDa para a proteína com a cauda de histidina. Não houve mudança no tamanho quando comparado com FERRARA et al., 2006 em que o tamanho esperado para a proteína era 35,184 kDa e o obtido foi de 45 kDa. Isso sugere que não foram realizadas glicosilações na proteína expressa pelo nosso sistema, pois, estas glicosilações podem aumentar seu tamanho ao inserir resíduos no C ou N terminais da molécula como sugerido por BRETTHAUER et al., 1999. É importante salientar que a nossa proteína pode apresentar vantagens, por ser menor e não possuir glicosilações, diminuindo assim um potencial imunogênico.

As melhores condições para a produção de uma proteína recombinante em *P. pastoris* diferem de acordo com a molécula e o promotor, por isso, para desenvolver um processo de produção de uma cepa de comportamento desconhecido, é essencial conhecer sobre seu crescimento. *P. pastoris* é capaz de crescer em muitas fontes diferentes de carbono e de energia dos quais glicerol e metanol são os mais amplamente utilizados. A escolha da fonte de carbono e, por conseguinte, a taxa de crescimento específico e uma boa produtividade são dependentes do promotor escolhido (LOOSER et al., 2015). Através da curva de crescimento apresentada na FIGURA 32, na qual a levedura recombinante apresentou boa taxa de crescimento em meio BMGY, podemos ver que o crescimento exponencial se deu até a 21 hora do cultivo, ou seja, a partir desse momento a levedura está na sua fase ótima para ser induzida e expressar a proteína de interesse.

Muitos dos protocolos de cultura disponíveis baseiam-se essencialmente nos descritos no kit de expressão comercial da Invitrogen (INVITROGEN, 2010) para a expressão em *P. pastoris*. No entanto, uma tendência recente é a utilização de protocolos mais específicos no sentido de uma abordagem que permita o desenvolvimento de uma estratégia de processo diferente para cada produto almejado (ZHANG et al., 2007). Tendo isso em mente, o planejamento experimental é de extrema importância para se desenvolver um protocolo específico para se encontrar melhores condições de produção. Para este planejamento, os experimentos foram feitos em frascos agitados inicialmente, pois, trabalhos sugerem que cultivos em alta densidade são melhores para expressão de proteínas (FERRARA et al., 2006). Porém, sabe-se que com o aumento da concentração

celular, os níveis de protease também aumentam, levando à degradação da proteína de interesse e por esse motivo, optamos por iniciar os ensaios em menores escalas até as melhores condições serem alcançadas.

De acordo com os resultados obtidos após realizar os experimentos do planejamento experimental, podemos dizer que as melhores condições para a expressão da L-asparaginase do gene *ASP1* de *S. cerevisiae* em *P. pastoris* foram: 20 °C, pH 6,0 e 1,5% de concentração do indutor. Ao que se sabe esta melhor condição encontrada neste trabalho, nunca antes foi estudada para a expressão neste sistema, tendo em vista que os trabalhos costumam usar a condição habitual de expressão em *Pichia pastoris* descrita pelo manual *Pichia Expression Kit da Invitrogen*®, o qual utiliza 30 °C, pH 6,0 e 1,0%.

A atividade máxima encontrada em células intactas (supostamente no espaço intermembranar) utilizando a metodologia do β -Hidroxamato aspártico foi de 6,9 U/g de célula. O método do β -Hidroxamato aspártico também foi o escolhido por FERRARA et. al., 2006. Neste trabalho o grupo conseguiu uma atividade de 562 U/g para a enzima L-Asparaginase proveniente do gene *ASP3*, um nível aproximadamente 80 vezes maior que o que foi encontrado neste trabalho para a L-Asparaginase vinda do gene *ASP1*. Deve-se lembrar que embora muitas proteínas sejam expressas com eficiência em cultivos em frascos agitados, os níveis de expressão são em geral menores quando comparados a experimentos com biorreator devido a dificuldades de controle de pH, limitação de oxigênio e limitação de nutrientes de cultivos em frascos.

Os dados obtidos sobre o pH são muito importantes, pois esta informação está diretamente relacionada com a secreção de proteínas (SOYASLAN e CALIK, 2011). Dados na literatura mostram que os níveis de enzimas são afetados pelo pH do meio de cultura. DUNLOP e ROON (1975) estudaram o efeito do pH na produção da L-Asparaginase, tendo observado atividade máxima com o pH na faixa de 6,5 e 7,0 e quando este valor de pH é aumentado a atividade da enzima começa a decair. Adicionalmente, resultados obtidos por KIM e ROON (1983) indicaram que a mesma enzima apresenta significativa retenção de atividade quando o valor do pH é de 3,4 e inativa-se em 3,2. Os experimentos conduzidos em frascos agitados indicaram que o melhor pH entre os estudados neste trabalho para a obtenção da enzima ativa foi o de 6,0.

É importante salientar que alguns fatores podem ter contribuído para a não secreção da enzima em questão, como o tamanho da cauda de histidina muito extensa, fazendo com que essa tenha uma forte integração com a membrana plasmática e não consiga ser secretada para o meio.

Diferentes organismos já foram estudados com intuito de produzir L-Asparaginase (HOWARD e CARPENTER, 1972; KHUSHOO et al, 2005;. FERRARA et al, 2006;. ONISHI et al., 2010), porém, as enzimas atualmente em uso clínico provem exclusivamente dos microrganismos *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, pois as enzimas de outras fontes ainda não foram bem caracterizadas para que seu uso fosse autorizado. Nosso estudo possui grande potencial vantajoso em comparação com as enzimas utilizadas no momento e, ao que se sabe, também frente a todas aquelas produzidas por outros microrganismos procarióticos, devido ao fator de ser mais semelhante às enzimas produzidas por mamíferos e pelo seu tamanho demonstrado, menor do que as encontradas até o momento, fatos estes que interferem positivamente no tratamento, pois, a taxa de imunogenicidade pode diminuir, levando a uma adesão maior da utilização dessa terapia.

Quanto as fontes naturais onde a L-Asparaginase é encontrada, podemos dizer que a combinação da tecnologia do DNA recombinante e processos de cultura de grande escala permitiu que enzimas possam ser produzidas em quantidades muito maiores do que o obtido por essas fontes, e isso diminui custos para a produção industrial dessas moléculas (ROTH et al., 2013).

Ademais os resultados obtidos mostraram a eficiência das técnicas utilizadas para a obtenção da enzima L-Asparaginase (ASP1) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heteróloga *Pichia pastoris* ativa corroborando com o objetivo pretendido nesse trabalho.

8. CONCLUSÕES

Ao fim do projeto conseguiu-se a construção de *P. pastoris* recombinante com o vetor pPIC9+ASP1 e a consequente produção intracelular da enzima L-Asparaginase. Esta última com atividade e tendo o pico de expressão em temperatura de 20 °C, pH 6,0 e concentração de indutor de 1,5%. No entanto e apesar dos esforços, o peptídeo sinal utilizado (alfa da *S. cerevisiae*) não foi capaz de promover a secreção da enzima para o meio extracelular.

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Purificação da proteína através de cromatografia de afinidade por cauda de histidina que a mesma possui;
- Continuar o estudo de otimização das variáveis que influenciam a produção da enzima nos cultivos em *shaker*.
- Análise de outras variáveis que podem influenciar na produção da proteína tais como: concentração do substrato (glicerol), concentração do inóculo e tempo de indução;
- Otimizar a produção da proteína heteróloga em biorreator com elevada densidade celular;
- Testar outras sequências sinais para uma possível expressão extracelular da proteína;
- Realizar a caracterização cinética da enzima.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização das asparaginases tem colaborado muito com a terapia para a leucemia. No entanto, ainda são observados muitos efeitos adversos com a aplicação terapêutica das enzimas disponíveis no mercado. Assim, estudos têm sido realizados para minimizar os efeitos colaterais observados no uso da asparaginase.

Até onde se sabe, esta é a primeira vez na literatura que a sequência da proteína asparaginase ASP1 de *S. cerevisiae* é clonada e expressa em sistema de expressão *Pichia pastoris*. Quanto à atividade, a enzima apresentou 6,9 Unidades por grama de célula o que será melhorado quando for realizada a atividade específica. Por fim, foi demonstrado neste trabalho um método competente para a obtenção da enzima asparaginase ativa e os próximos passos tratarão da produção em larga escala e purificação.

O avanço científico tem permitido o emprego de microrganismos modificados geneticamente objetivando a produção de proteínas de interesse em diversas áreas. O presente trabalho pretende permitir a produção do fármaco para uso na terapia da LLA e diminuir custos com importação do medicamento para que os pacientes que necessitam do mesmo possam ter sua terapia sem interrupções.

11. ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO

Os seguintes trabalhos foram elaborados e submetidos em diferentes eventos científicos e foram apresentados na forma de painel nestes eventos, a saber:

1) Resumo intitulado “L-ASPARAGINASE (ASP1) DE *Saccharomyces cerevisiae* EM SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGO *Pichia pastoris*”, de autoria de: **BRUNA DE SOUZA DIVINO**, RAFAELA COELHO CORREIA, GISELE MONTEIRO, ADALBERTO PESSOA JÚNIOR. O trabalho foi apresentado no ENZITEC – XI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, que ocorreu nos dias 14, 15 e 16 de abril de 2014 no Rio de Janeiro - Brasil.

2) Resumo intitulado “Biotechnological Production of L-Asparaginase (ASP1) of *Saccharomyces cerevisiae* in Heterologous expression system *Pichia pastoris*”, de autoria de: **BRUNA DE SOUZA DIVINO**, RAFAELA COELHO CORREIA, GISELE MONTEIRO E ADALBERTO PESSOA JÚNIOR. O trabalho foi apresentado no 1º Workshop do Projeto Temático Asparaginase, que foi realizado nos dias 03 e 04 de setembro de 2014, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – FCF/USP, São Paulo - Brasil.

3) Resumo intitulado “Biotechnological Production of L-Asparaginase (ASP3.1) of *Saccharomyces cerevisiae* in Heterologous expression system *Pichia pastoris*”, de autoria de: RAFAELA COELHO CORREIA, **BRUNA DE SOUZA DIVINO**, GISELE MONTEIRO E ADALBERTO PESSOA JÚNIOR. O trabalho foi apresentado no 1º Workshop do Projeto Temático Asparaginase, que foi realizado nos dias 03 e 04 de setembro de 2014, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – FCF/USP, São Paulo - Brasil.

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

5) 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.

6) Os 25 créditos em disciplinas exigidos pelo programa já foram cursados.

7) O exame de qualificação para obtenção do título de mestrado já foi realizado no dia 15 de agosto de 2014, e obteve resultado Aprovado por unanimidade pela banca examinadora após apresentação e arguição.

12. REFERÊNCIAS

ABIFINA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUÍMICA FINA, BIOTECNOLOGIA E SUAS ESPECIALIDADES. **Defensivos agrícolas**. Disponível em: <<http://www.abifina.org.br/noticiaSecao.asp?secao=1&noticia=1918>>. Acesso em: 07 fev. 2013.

ABRALE, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA. **O que é leucemia**. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/pagina/sintomas-da-lla>>. Acesso em: 26 abr. 2013.

ABRALE, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA. **O que é leucemia**. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/pagina/fatores-de-risco-lla>>. Acesso em: 26 abr. 2013.

ABRALE, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA. **O que é leucemia**. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br>>. Acesso em: 26 jul. 2015.

AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301-5317, 2014.

ANBU, P. ; SUBASH C. B. GOPINATH, BIDUR PRASAD CHAULAGAIN, THEAN-HOCK TANG, AND MARIMUTHU CITARTAN. “**Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2014**,” BioMed Research International, vol. 2015, Article ID 816419, 3 pages, 2015. doi:10.1155/2015/816419.

ANDRADE ,A.F; BORGES, K.S.; SILVEIRA, V.S. **Update on the Use of L-Asparaginase in Infants and Adolescent Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia**. Clinical Medicine Insights. Oncology 8, 95, 2014.

AVRAMIS, VASSILIOS I. **Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance**. Anticancer research, 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

BORKOTAKY B, BEZBARUAH RL. **Production and properties of asparaginase from a new *Erwinia* sp.** Folia Microbiol 47:473–6, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Leucemia Aguda**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344>. Acesso em: 10 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Leucemia Aguda**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

BRESOLIN, Igor Tadeu Lazzarotto; MIRANDA, Everson Alves; BUENO, Sônia Maria Alves. **Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas**. Quím. Nova, São Paulo, v. 32, n.5, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422009000500035&ng=en&nrm=iso>. acesso em 01 Mai 2013.

BRETTTHAUER R.K. and CASTELLINO F.J. **Glycosylation of Pichia-derived proteins**. Biothechnol. Appl. Biochem. 30, 193-200, 1999.

BRIERLEY RA, SIEGEL RS, BUSSINEAU CM, CRAIG WS, HOLTZ GC, DAVIS GR, et al. Mixed feed recombinant yeast fermentation. US, Patent WO90034311990.

BUCKHOLZ R., GLEESON M. **Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins**. Bio-Technology, v.9, n.11, p. 1067–1072, nov. 1991.

CALADO V.E MONTGOMERY D. Planejamento de Experimentos usando o Statistica.1º ed., editora E-papers. 260p. Rio de Janeiro, 2003.

CALIK, P., ATA, O., GUNES, H., MASSAHI, A., BOY, E., KESKIN, A., et al., 2015. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: from carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. Biochem. Eng. J. 95, 20–36.

CASTRO GIRÃO, LUCIANA ; DA ROCHA, SURZA ; TEIXEIRA, RICARDO ; FERRARA, MARIA ; PERALES, JONAS ; SILVA BON, ELBA . **Purification and characterization of asparaginase II from *Saccharomyces cerevisiae* cloned in *Pichia pastoris*: a study on a possible antileukemic drug**. BMC Proceedings , v. 8, p. P78, 2014.

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.

CHOI Y, SIMS GE, MURPHY S, MILLER JR, CHAN AP. **Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels**. PloS one;7:e46688, 2012.

COS O, RAMON R, MONTESINOS JL, VALERO F. **Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review**. Microb Cell Fact. 2006;12:17. doi: 10.1186/1475-2859-5-17.

CREEG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P. E STILLMAN, C. A. **Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia***. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 1316-1323, 1989.

DALY, R. ; HEARN, M.T. **Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production.** Journal of Molecular Recognition, vol. 18, no. 2, p. 119-138. 2005.

DAMASCENO LM, HUANG CJ, BATT CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Appl Microbiol Biotechnol** 93:31–39, 2012.

DUNLOP PC, MEYER GM, BAN D, ROON RJ. 1978. Characterization of two forms of Asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry** 253(4), 1297-1304.

DUNLOP PC, ROON RJ. **L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme.** *Journal of Bacteriology*. 1975;122(3):1017-1024.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. **Diagnóstico Laboratorial das leucemias linfóides agudas.** Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial, volume, 40, nº02, Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

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.

G. GELLISSEN, G. KUNZE, C. GAILLARDIN, J.M. CREGG, E. BERARDI, M. VEENHUIS, I.J. VAN DER KLEI. **New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*—A comparison.** FEMS Yeast Res., 5 (2005), pp. 1079–1096

GELLISSEN, G. **Heterologous protein production in methylotrophic yeasts.** *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 741–750, 2000.

GOWARD CR, STEVENS GB, TATTERSALL R, ATKINSON T. **Rapid large-scale preparation of recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase.** Bioseparation, 2(6), 335-41, 1992.

HEALT, PUBMED. **Acute Lymphocytic Leukemia (ALL).** 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/pmh0001568/>>. acesso em: 26 abr. 2013.

HIGGINS, D.R. AND CREGG, J.M. **Introduction to *Pichia pastoris*** In: *Pichia Protocols* (Higgins, D.R. and Cregg, J.M.,Eds.), pp. 1–15. Humana Press Inc., Totowa, 1998.

HOLMES, W.J.; DARBY R.A. ; WILKS M.D. ; SMITH R. ; BILL R.M. **Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime.** Microb Cell Fact, 8:35, 2009.

HOWARD, J. B. AND CARPENTER, F. H., **L-Asparaginase from *Erwinia carotovora***. The Journal of Biological Chemistry, 247, 4, 1020-1030 (1972).

IDIRIS A, TOHDA H, KUMAGAI H, TAKEGAWA K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. **Appl Microbiol Biotechnol.**;86:403–417, 2010.

ILLANES A, ALTAMIRANO C, WILSON L. Homogenous enzyme kinetics. In: Illanes A, ed. **Enzyme biocatalysis: principles and applications**. Netherlands: Springer: 140, 2008.

INVITROGEN. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. **Pichia Expression Kit**, 2010. Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf>. Acesso em: 30 Abr. 2013.

KHUSHOO, A., PAL, Y. AND MUKHERJEE, K. J., **Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor**. Applied Microbiology and Biotechnology, 68, 2, 189-197, 2005.

KIM, K.W.; ROON R.J. **Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of enzyme stability in vivo and in vitro**. Biochemistry, 22: 2704-2707, 1983.

KOBAYASHI, K., KUWAE, S., OHYA, T., OHDA, T., OHYAMA, M., TOMOMITSU, K., 2000. **High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy**. J. Biosci. Bioeng. 90, 280–288.

KOLLEWE C, VILCINSKAS A. **Production of recombinant proteins in insect cells**. American Journal of Biochemistry and Biotechnology . 9(3),255–271, 2013.

KUMAR NM, MANONMANI HK. **Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp.** World J Microb Biotechnol 29:577–87, 2013.

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.

LEITE, Edinalva Pereira et al . Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, Recife, v. 7, n. 4, Dez. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292007000400009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 28 Abr 2013.

LOOSER V., et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. Biotchenology advances doi:10.1016/j.biotechadv.2015.05.008.

MULLER, H.J.; BOOS, J. **Use of L- Asparaginase in childhood ALL.** Critical Reviews in Oncology: Hematology, 28:97-113, 1998.

MULLER, H.J.; Boos, J. **Use of L-asparaginase in childhood ALL.** Crit Rev Oncol Hematol 1998;28:97–113

NAGGAR EL, NOURA EL-AHMADY, SARA M EL-EWASY, AND NANCY M EL-SHWEIHY. **Microbial L-asparaginase As a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons.** International Journal of Pharmacology 10 (4): 182-199, 2014.

NARTA, Umesh K.; KANWAR, Shamsheer S.; AZMI, Wamik. Pharmacological and clinical evaluation of L-Asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 3, p. 208-221, 2007.

ONISHI, Y., YANO, S., THONGSANIT, J., TAKAGI, K., YOSHIMUNE, K. AND WAKAYAMA, M., **Expression in *Escherichia coli* of a gene encoding type II lasparaginase from *Bacillus subtilis*, and characterization of its unique properties.** Annals of Microbiology, (2010).

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

OTERO, A.G. et al . Tratamiento de la leucemia mieloide aguda del niño en Cuba. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter**, Ciudad de la Habana, v. 29, n. 2, 2014 .
Disponível em:
<http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086402892013000200010&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 20 set.2014.

PATRO KR, GUPTA N. **Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation.** Int J Biotechnol Mol Biol Res 3:30–4, 2012.

PORRO, D.; MATTANOVICH, D. **Recombinant protein production in yeasts.** Methods in molecular Biology, 267:241-58, 2004.

POTGIETER, T.I. et al. **Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*.** J. Biotechnol. 139, 318–325, 2009.

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

RAI, Meena; PADH, Harish. **Expression systems for production of heterologous proteins.** CURRENT SCIENCE-BANGALORE-, v. 80, n. 9, p. 1121-1128, 2001.

RICHA jain ku, ZAIDI yogota verma, POOJA saxena. **L-Asparaginase: A Promising Enzyme for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia.** People's Journal of Scientific Research, 2012, 5(1), 29-35.

RIZZARI C, Conter V, et al. (2013). Optimizing Asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Oncol** 25 Suppl 1: S1-9.

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

ROTH, G. et al . Recombinant Erwinia carotovora I-asparaginase II production in Escherichia coli fed-batch cultures. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo , v. 30, n. 2, p. 245-256, Jun, 2013 .

SCHMIDT, F. R. **Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry.** Applied microbiology and biotechnology, v. 65, n. 4, p. 363-372, 2004.

SOARES, A. L., GUIMARÃES, G. M., POLAKIEWICZ, B., PITOMBO, R. N. M., ABRAHÃO-NETO, J., 2002, "**Effects of Polyethylene Glycol Attachment on Physicochemical and Biological Stability of E. coli L-Asparaginase**", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 237, pp. 163-170.

SOYASLAN, E.S., AND ÇALIK, P. Enhanced recombinant human erythropoietin production by Pichia pastoris in methanol fed-batch/sorbitol batch fermentation through pH optimization, **Biochemical Engineering Journal**, 55(1), 59-65, 2011.

STECHER, A. L. et al. Stability of L-Asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. **Pharmaceutica acta helvetiae**, v. 74, n. 1, p. 1-9, 1999.

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

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnol**, v.22, n.11, p. 1393-8, Nov. 2004.

Xie T, Liu Q, Xie F, Liu H, Zhang Y: **Secretory expression of insulin precursor in Pichia pastoris and simple procedure for producing recombinant human insulin.** *Prep Biochem Biotechnol*, 38:308-317, 2008.

YILMAZ and UDDEN, **Tumor Board Review: Guideline and Case Reviews in Oncology: 9781936287178: Medicine & Health Science Books**, 2015.

ZEPEDA, A.B. et al. **Biomarkers to evaluate the effects of temperature and methanol on recombinant Pichia pastoris.** *Braz. J. Microbiol*, vol.45, n.2, pp. 475-483, 2014.

ZHANG, W., INAN, M., MEAGHER, M.M., 2007. **Rational design and optimization of fed-batch and continuous fermentations.** *Methods Mol. Biol.* 389, 43–64.