

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica
Área Tecnologia de Fermentações

Expressão da L-asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante extracelular com glicosilação humanizada em *Pichia pastoris*

Henrique Pellin Biasoto

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Gisele Monteiro

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica
Área Tecnologia de Fermentações

Expressão da L-asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante extracelular com glicosilação humanizada em *Pichia pastoris*

Henrique Pellin Biasoto

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Gisele Monteiro

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B579e	Biasoto, Henrique Expressão da L-asparaginase II de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante extracelular com glicosilação humanizada em <i>Pichia pastoris</i> / Henrique Biasoto. - São Paulo, 2019. 94 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Monteiro, Gisele
	1. Biotecnologia. 2. Asparaginase. 3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . 4. <i>Pichia pastoris</i> . 5. Leucemia Linfóide Aguda. I. T. II. Monteiro, Gisele, orientador.

Henrique Pellin Biasoto

Expressão da L-asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante extracelular com glicosilação humanizada em *Pichia pastoris*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dra. Gisele Monteiro
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gisele Monteiro, por me aceitar como seu aluno desde dezembro de 2014, por ter me ensinado muito sobre o mundo da biologia molecular e biotecnologia e por ter paciência por apontar meus erros. Mas além de tudo, por ser uma ótima professora e um exemplo a se seguir, espero poder ter a oportunidade de passar para frente o mesmo conhecimento da forma que me passou.

Aos colegas de laboratório, que por tanto tempo aguentaram fielmente as minhas piadas diárias e mesmo assim me ajudaram com conhecimentos diversos e conselhos.

Aos meus pais, Elaine e Silvio, por me apoiaram a seguir meu sonho, por terem me educado da forma que melhor lhes convieram. À minha irmã, Luiza, por sempre ter me apoiado e torcido por mim.

À Jaqueline, minha linda e amada noiva, por ter me apoiado todo esse tempo, por ter me aconselhado diversas vezes, por ter me consolado nos períodos mais difíceis e, sobretudo, por ter me amado todo esse tempo.

À Profa. Dra. Sandra H. P. Farsky e à Dra. Cristina B. Hebeda pelo auxílio e conhecimentos no teste de citotoxicidade, sem esse auxílio não teria sido possível realizar esse ensaio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP pelo apoio financeiro pelo projeto temático nº 2013/08617-7.

Venha sentar do meu lado, meu único filho
E ouça com atenção o que eu vou dizer
E se você fizer isso
Isso irá te ajudar em algum dia ensolarado
Aproveite seu tempo
Não viva com tanta pressa
Problemas virão e eles irão embora
Vai achar uma mulher e você vai achar o amor
E não esqueça filho, seja um homem simples
Seja algo que você ame e entenda

Gary Rossington / Ron Van Zant

RESUMO

BIASOTO, H. P. **Expressão da L-asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante extracelular com glicosilação humanizada em *Pichia pastoris*.** 2019. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

L-asparaginase é um inibidor eficiente do crescimento tumoral, usado em sessões de quimioterapia contra a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), resultando na remissão completa da doença em 90% dos pacientes tratados. A L-asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* (ScASNasell) tem alto potencial de superar os efeitos adversos da L-asparaginase de bactéria, porém sua produção endógena resulta em uma proteína hipermanosilada e, conseqüentemente, imunogênica. A cepa de *Pichia pastoris Glycoswitch* tem a maquinaria para expressar e secretar altas quantidades de enzima com glicosilação humanizada. Nesse trabalho, descrevemos o processo genético para expressar a ScASNasell no meio extracelular pela *P. pastoris Glycoswitch*, e também os parâmetros bioquímicos, perfil cinético, citotoxicidade contra células leucêmicas e a interferência da glicosilação na atividade da enzima obtida. Nossos dados mostram que a cepa aplicada foi capaz de expressar ScASNasell no meio extracelular passível de purificação de proteínas contaminantes com apenas um passo cromatográfico. A atividade específica para asparagina foi 218,2 UI/mg e a atividade glutaminásica representou 3,1% da atividade asparaginásica. Os parâmetros cinéticos foram $K_M = 120,5 \mu\text{M}$ e a eficiência catalítica de $3,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Análises por meio de gel nativo sugerem uma conformação tetramérica de aproximadamente 150 kDa. Essa é uma nova estratégia de produzir essa enzima de forma extracelular, com mais facilidade de purificação e com melhores propriedades biotecnológicas.

Palavras-chave: leucemia linfóide aguda, asparaginase, *Saccharomyces cerevisiae*, proteína recombinante, *Pichia pastoris*, expressão extracelular, purificação enzimática.

ABSTRACT

BIASOTO, H. P. **Extracellular expression of *Saccharomyces cerevisiae*'s L-asparaginase II in *Pichia pastoris* with humanized glycosylation.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

L-asparaginase is an efficient inhibitor of tumor development, used in chemotherapy sessions against acute lymphoblastic leukemia (ALL) tumor cell; its use results in 90% complete remission of the disease in treated patients. Saccharomyces cerevisiae's L-asparaginase II (ScASNasII) has a high potential to overcome the side effects of bacteria L-asparaginase, but the endogenous production of it results in hypermannosylated immunogenic enzyme. However, Pichia pastoris Glycoswitch strain has the machinery to express and secrete high quantity of the enzyme and with humanized glycosylation. Here we describe the genetic process to acquire the ScASNasII in the extracellular medium expressed by P. pastoris Glycoswitch, and the biochemical properties of the resultant enzyme, kinetic profile, cytotoxicity against ALL cell line and the interference of glycosylation in its activity. Our data show that the strain employed is able to express extracellular asparaginase active and possible to be purified of contaminant proteins using a single chromatographic step. The specific activity using asparagine was 218.2 IU.mg⁻¹ and the glutaminase activity represents 3.1% of its asparaginase activity. The kinetics parameters were $K_M=120.5 \mu M$ and a catalytic efficiency of $3.8 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$. The Native-PAGE suggested a tetrameric protein conformation, with approximately 150 kDa. This is a novel strategy to produce this enzyme extracellularly, easier to purify and with better biotechnological properties.

Keywords: acute lymphoid leukemia, asparaginase, Saccharomyces cerevisiae, recombinant protein, Pichia pastoris, extracellular expression, enzyme purification.

LISTA DE ABREVIações

α MF - α -Mating Factor

AOX1 – Álcool oxidase 1

AOX2 – Álcool oxidase 2

Asn – L-asparagina

ASNase – L-asparaginase

ASNS – L-asparagina sintetase

EcASNaseII – L-asparaginase de *Escherichia coli*

BMGY – *Buffered media yeast with glycerol* (meio de cultura de levedura tamponado com glicerol)

BMMY – *Buffered media yeast with methanol* (meio de cultura de levedura tamponado com metanol)

FDA – *U.S. Food and Drug Administration*

G418 – geneticina

Gln – Glutamina

LB – *Lysogenic-Broth*

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

m-PEG – metoxi-polietileno glicol

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

DO₆₀₀ – densidade ótica em 600nm

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PHO1 – Fosfatase ácida

Sc_ASNaseII – L-asparaginase codificada pelo gene *ASP3* de *S. cerevisiae*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TAE – 0,1 mM Tris- ácido acético pH 8,3 e EDTA

TEMED – N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamino

YPD– *Yeast extract, peptone, dextrose* (Extrato de levedura, peptona e dextrose)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação catalisada pela ASNase.

Figura 2: Alinhamento das sequências dos genes que codificam para as proteínas ScASNaseII, EcASNaseII e Erwinase.

Figura 3: Tipos de N-Glicosilação.

Figura 4: Processo de maturação do N-glicano, envolvendo enzimas do lúmen do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de golgi.

Figura 5: Representação dos processos de maturação dos tipos de oligomanose (presente em leveduras), híbridos, complexos (presentes em mamíferos) e da levedura geneticamente modificada para síntese de N-glicano similar ao dos mamíferos.

Figura 6: Obtenção do vetor pJAG com pontas para anelamento com as sequências sinalizadoras e o gene *ASP3*.

Figura 7: Obtenção das sequências sinalizadoras para secreção de proteína.

Figura 8: Obtenção do gene *ASP3* e sua fusão com as sequências sinalizadoras.

Figura 9: Obtenção final dos vetores de expressão.

Figura 10: Sequenciamento da construção pJAG+alfa+*ASP3* e da construção pJAG+*PHO1*+*ASP3*.

Figura 11: Obtenção do clone de *P. pastoris* com o gene *ASP3*+alfa inserido no genoma.

Figura 12: Obtenção do clone de *P. pastoris* com o gene *ASP3*+*PHO1* inserido no genoma.

Figura 13: Atividade específica aparente medida do meio extracelular dos clones 1, 3, 29 e controle.

Figura 14: Atividade asparaginásica no sobrenadante dos clones 1 e 3 nas concentrações de metanol 1,5% e 1%, respectivamente, por um período de até 120 horas.

Figura 15: Cromatograma da purificação do meio extracelular do clone 3 pela coluna cromatográfica HiTrap™ DEAE FF.

Figura 16: Análise por SDS-PAGE das frações da troca aniônica com atividade asparaginásica do clone 3.

Figura 17: Cromatograma da exclusão molecular pela coluna Superdex™ 200 Increase 10/300 GL da amostra do clone 3 e SDS-PAGE das frações com atividade asparaginásica da exclusão molecular.

Figura 18: Cromatograma da troca aniônica pela coluna HiTrap™ DEAE FF do meio extracelular do clone 29.

Figura 19: Análise por SDS-PAGE das frações com atividade asparaginásica da cromatografia por troca aniônica HiTrap™ DEAE FF.

Figura 20: Cromatograma da exclusão molecular pela coluna Superdex™ 200 Increase 10/300 GL da amostra do clone 29.

Figura 21: Atividade específica das enzimas purificadas dos clones 3 e 29 pelo método da hidroxiaminólise, em comparação com a Leuginase® nas mesmas condições de reação.

Figura 22: Parâmetros bioquímicos da ScASNasell, EcASNasell e Leuginase®

Figura 23: Estabilidade da ScASNasell em comparação com Leuginase® em 10% soro humano e 50 mM Tris-HCl pH 7,4 a 37°C por até 120 horas de incubação.

Figura 24: Atividade da ScASNasell, Gel Nativo e SDS-PAGE com e sem tratamento pela PNGase F.

Figura 25: Perfil cinético da ScASNasell.

Figura 26: Viabilidade celular da linhagem de LLA MOLT-4 após tratamento com ScASNasell e EcASNasell em diferentes concentrações.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características bioquímicas e semelhanças das ASNases utilizadas como biofármaco e ScASNasell

Tabela 2: Parâmetros cinéticos da hidrólise de Asn da ScASNasell e EcASNasell.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
1.1 A Leucemia Linfoblástica Aguda	15
1.2 A L-asparaginase	16
1.3 Asparaginases de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.4 Expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i>	24
1.5 Processo de glicosilação e modificação <i>Glycoswitch</i>	27
2. OBJETIVO	32
2.1 Objetivos específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Aquisição dos plasmídeos de expressão	32
3.2 Transformação em DH5 α eletrocompetente	34
3.3 Reação de sequenciamento de DNA	34
3.4 Transformação em <i>P. pastoris pep4- sub2-</i>	35
3.5 Expressão e análise da proteína	36
3.6 Purificação da Proteína	37
3.7 Caracterização bioquímica	38
3.7.1 Atividade específica	38
3.7.1.1 Atividade asparaginásica	39
3.7.1.2 Atividade glutaminásica	39
3.7.2 pH ótimo da ScASNasell	40
3.7.3 Efeito do soro humano na estabilidade da ScASNasell	40
3.7.4 Glicosilação	40
3.7.5 Cinética enzimática da ScASNasell	41
3.7.6 Citotoxicidade da ScASNasell contra MOLT-4	42
4. RESULTADOS	43
4.1 Amplificação dos fragmentos para construção do plasmídeo	43
4.2 Transformação em <i>P. pastoris Glycoswitch pep4- sub2-</i>	48
4.3 Indução em função do tempo e concentração de metanol	49
4.4 Purificação	51
4.4.1 Purificação da enzima do clone 3	53
4.4.2 Purificação da enzima do clone 29	55
4.5 Testes bioquímicos	57

4.6 Testes bioquímicos da ScASNasell do clone 29	58
4.6.1 Atividade específica e pH ótimo	58
4.6.2 Estabilidade no soro humano	60
4.6.3 Homogeneidade da glicosilação e efeito sobre a atividade específica	61
4.6.4 Cinética enzimática	62
4.6.5 Citotoxicidade contra MOLT-4	63
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	69
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO I	86
ANEXO II	87
ANEXO III	88
ANEXO IV	88
ANEXO V	88
ANEXO VI	89
ANEXO VII	90
ANEXO VIII	91
ANEXO IX	92
ANEXO X	93

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 A Leucemia Linfoblástica Aguda

Na medula óssea ocorre a hematopoese, que é responsável pela proliferação de células sanguíneas, como eritrócitos, linfócitos, macrófagos, etc, um processo finamente controlado (HAYASHI; SEZAKI; TAKIZAWA, 2019). A leucemia é a alteração desse processo em que ocorre proliferação descontrolada de células imaturas e pode ter origem genética e hereditária, mas também pode ter causa imunológica, epigenética ou ser acarretada por fatores ambientais, como exposição à radiação e a reagentes químicos (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). Os subtipos de leucemia são: Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Linfoblástica crônica, Leucemia Mieloide Aguda e Leucemia Mieloide Crônica. O acúmulo de células indiferenciadas culmina na carência de células normais que pode causar anemia, infecções e hemorragia (HAMERSCHLAK, 2008; *NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 2013).

A LLA é um tipo de leucemia que acomete principalmente crianças e adolescentes e pode ser de origem de linfócitos B (LLA-B) ou linfócitos T (LLA-T). Há uma maior prevalência dessa doença em homens, sendo aproximadamente 1,2 vezes mais provável para homem adquirir LLA-B (KATO; MANABE, 2018) e o dobro para LLA-T (DORES et al., 2012).

As alterações genéticas para essa neoplasia são diversas; a maioria envolve alterações do número de cromossomos, translocações e mutação, que podem gerar pior prognóstico (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; HEFAZI; LITZOW, 2018). Dessa forma, os casos de LLA-B e LLA-T são divididos em subtipos (HOELZER, 2015; ROBERTS; MULLIGHAN, 2015), com alteração no protocolo de tratamento.

A maioria dos casos é de LLA-B e dentre essas, 25 a 30% dos casos tem hiperploídia (mais de 50 cromossomos) devido ao ganho não aleatório de cromossomos, sendo o cromossomo 21 presente em trissomia ou tetrassomia em mais de 90% dos casos de hiperploídia (KATO et al., 2014). Os casos de LLA-B geralmente são considerados com bom prognóstico (MOORMAN et al., 2003; KATO et al., 2014). Os casos de hipoploídia (menos de 44 cromossomos) ocorrem

em 2 a 3% dos casos de LLA-B e têm um péssimo prognóstico (NACHMAN et al., 2007). Para esses casos é recomendado o transplante de células tronco alogênicas (KATO; MANABE, 2018).

Dentre as translocações (t) nos pacientes pediátricos com LLA, três se destacam: *ETV6-RUNX1* com frequência de 15-25%, causado pela $t(12;21)(p13;q22)$ (GOLUB et al., 1995); a segunda mais frequente é a *TCF3-PBX1*, que é causada pela $t(1;19)(q23;p13)$ e acomete 5-10% dos casos; por último, a $t(9;22)(q34;q11)$ que acarreta na formação do cromossomo Filadélfia (Ph) com o pior prognóstico, devido à fusão *BCR-ABL1*, e acomete 3-5% dos pacientes (KATO; MANABE, 2018). A idade é um fator a se considerar no prognóstico, de forma que o cromossomo Ph é mais comum em adultos jovens do que em crianças (ROBERTS; MULLIGHAN, 2015).

O tratamento da LLA no Brasil segue o protocolo do Grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Münster (BFM) desde 1982 para crianças até 15 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Os adultos jovens tem tratamento diferenciado com redução na dosagem de diversos medicamentos devido à toxicidade; porém, pesquisas internacionais mostram que o tratamento com protocolo infantil para adultos jovens é mais eficaz (BOISSEL et al., 2003; STOCK et al., 2008; BOISSEL; BARUCHEL, 2018; MUFFLY et al., 2018). O Brasil segue a tendência internacional, pois o protocolo para adultos jovens é minimamente alterado em relação ao protocolo infantil (LUDWIG et al., 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). A enzima L-asparaginase (ASNase) é utilizada como um dos componentes chave da terapia em quase todos os protocolos (infantil e adulto jovem).

1.2. A L-asparaginase

A ASNase (EC 3.5.1.1) é uma hidrolase que catalisa a reação de desaminação da L-asparagina (Asn), resultando em aspartato (Asp) e amônio (Figura 1). Essa enzima está presente em diversos organismos (BATOOL et al., 2015) devido a sua importância na captação de nitrogênio.

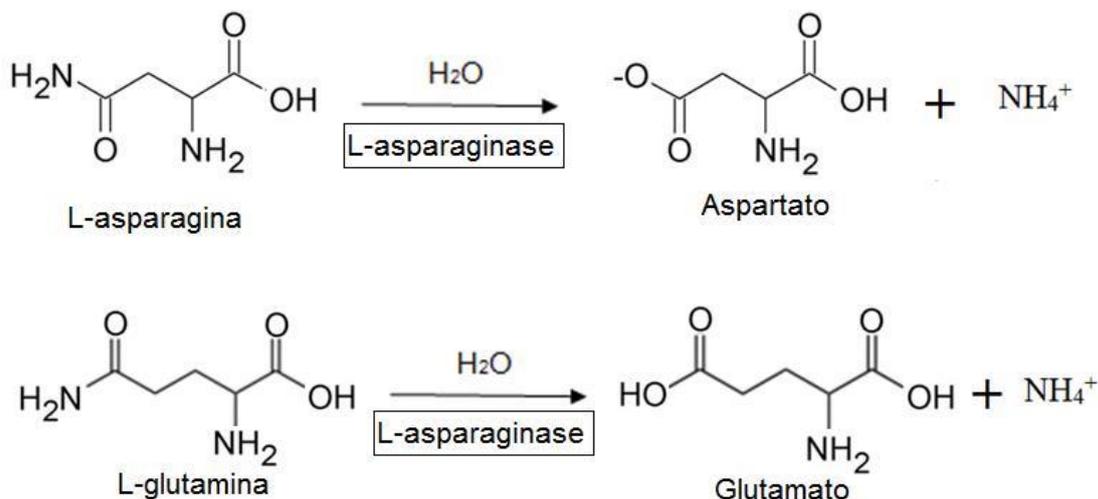


Figura 1: Reação catalisada pela ASNase. Adaptado de NARTA *et al.* 2007.

A descoberta dessa enzima se deu em 1922 quando Clementi reportou alta atividade asparaginásica no soro de porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) (revisão em KRISHNAPURA; BELUR; SUBRAMANYA, 2016). Em 1953, Kidd (KIDD, 1953) demonstrou que administrando o soro do porquinho-da-índia em ratos com linfoma, ocorria uma regressão no tamanho do tumor. Só em 1963, Broome (BROOME, 1963) demonstrou que essa atividade antineoplásica era devido à presença da atividade asparaginásica no soro do porquinho-da-índia. Esses reportes iniciaram pesquisas para caracterizar a ASNase do porquinho-da-índia (TOWER; PETERS; CURTIS, 1963; SULD; HERBUT, 1965). Em 1964 Mashburn e Wriston demonstraram a mesma atividade antineoplásica da ASNase purificada de *Escherichia coli* (MASHBURN; WRISTON, 1964). Pela facilidade biotecnológica da produção, em 1966 foi possível o primeiro teste clínico que utilizou ASNase de *E. coli* como parte do protocolo (DOLOWY *et al.*, 1966). Até então diversas fontes de ASNase tinham sido identificadas (BOYD *et al.*, 1971) e a ASNase se tornou um marco no tratamento da LLA, pois após a sua introdução como parte do protocolo, o índice de remissão completa da doença aumentou de 20 para 90% (MÜLLER; BOOS, 1998; KATO; MANABE, 2018).

Essa enzima passou a ser muito estudada, e foi descoberto que a bactéria *E. coli* apresentava duas proteoformas com atividade asparaginásica. Classificadas como bacterianas do tipo I e tipo II, elas têm diferenças estruturais, de expressão, e de características bioquímicas. As do tipo I podem ser encontradas em diferentes estados de oligomerização, residem no citosol, são expressas constitutivamente, geralmente têm afinidade baixa para a Asn e fazem parte do metabolismo da célula. As do tipo II geralmente são encontradas na forma tetramérica, são secretadas para o periplasma (região entre membrana plasmática e parede celular) e são expressas durante a privação de nutrientes, especialmente nitrogênio. Contudo, as do tipo II têm alta afinidade para Asn, o que as tornam viáveis para aplicação terapêutica devido à baixa concentração de Asn no soro humano (CAMPBELL et al., 1967; EMADI; ZOKAEE; SAUSVILLE, 2014). Uma característica das enzimas do tipo II é a atividade glutaminásica mais expressiva em relação as do tipo I. Essa classificação foi feita para as enzimas bacterianas, mas também são comumente aplicadas às enzimas fúngicas por apresentarem semelhanças estruturais. Outras fontes como as asparaginases de plantas e humanas não seguem essa classificação por apresentarem diferenças estruturais e funcionais muito grandes (BOREK; JASKÓLSKI, 2001). A ASNase humana não é utilizada como biofármaco, o que evitaria problemas imunogênicos por exemplo, por apresentar perfil de cinética enzimática alostérico, com $K_{0,5}$ próximo de 13 mM para Asn, e coeficiente de Hill de 6,9 (BELVISO et al., 2017), o que a torna inviável para aplicações terapêuticas, pois a concentração da Asn no sangue é da ordem de 1 a 30 μ M (RIFAI et al., 2010).

Devido a essas características, apenas as enzimas bacterianas do tipo II são utilizadas como biofármacos antileucêmicos. Há três formulações disponíveis comercialmente. A enzima nativa de *E. coli*, a nativa de *E. coli* ligada covalentemente com polietilenoglicol (ASNase peguilada) e por fim a enzima nativa de *Dickeya chrysanthemi* (erwinase). Também há a formulação da enzima de *E. coli* produzida de forma recombinante (Spectrila®, Medac) (BRUMANO et al., 2019).

Como citado anteriormente, as células leucêmicas apresentam diversas alterações genéticas, que influenciam a expressão de vários genes; um deles é o gene que codifica para a asparagina sintetase (*ASNS*). Essa enzima ocorre naturalmente nas células humanas e é responsável pela biossíntese endógena do aminoácido Asn a partir de glutamina (Gln). Células leucêmicas tem uma expressão reduzida desse gene (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; HAMERSCHLAK, 2008), o que as leva a depender da Asn circulante do sangue. A depleção desse aminoácido pela administração da ASNase causa escassez de nutrientes para síntese proteica e dessa forma, a célula cancerígena entra em apoptose (LOPES et al., 2017). Porém, nem todos os casos de LLA são sensíveis ao tratamento com ASNase. Algumas linhagens celulares não tem a expressão do gene *ASNS* alterada, e portanto, conseguem sobreviver ao tratamento por produzir normalmente a Asn (ASLANIAN; FLETCHER; KILBERG, 2001; CHEN et al., 2011). A expressão do gene *ASNS*, apesar de ser o fator central no sucesso da administração da ASNase, não é inteiramente responsável pela resistência ao tratamento com ASNase (KREJCI et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2017); a resistência da célula a entrar no processo de apoptose também leva à insensibilidade ao tratamento (SAVITSKIY; SHMAN; POTAPNEV, 2003).

A ASNase também tem atividade glutaminásica, que é tema de debate na comunidade científica; discute-se se essa atividade também é essencial para a capacidade antileucêmica da enzima (PARMENTIER et al., 2015; SUGIMOTO et al., 2015; HUSAIN et al., 2016), incluindo efeito citotóxico para outros tipos de leucemia não linfoides (EMADI; ZOKAEE; SAUSVILLE, 2014). Com a diminuição dos níveis de Gln, a célula leucêmica que apresenta expressão normal de *ASNS* não consegue produzir endogenamente a Asn, e dessa forma também entra em apoptose. Esse mecanismo dependente de atividade glutaminásica também apresenta resistência; os adipócitos podem produzir Gln suficiente para proteger as linhagens de LLA (EHSANIPOUR et al., 2013), e a expressão de glutamina sintetase também é um fator de resistência (ROTOLI et al., 2005; TARDITO et al., 2007).

O tratamento com a ASNase tem reações adversas sérias, como disfunção hepática e neurotoxicidade causada pelo aumento de amônio no sangue (EL-NAGGA; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014). Também são relatados casos de hipersensibilidade a formulações de ASNase, com formação de anticorpos que levam à inativação da enzima e reações alérgicas como *rash* cutâneo, edema e choque anafilático. Esse é um problema sério que ocasiona a interrupção do tratamento com ASNase, piorando o prognóstico do paciente. Em torno de 60% dos pacientes tratados inicialmente com a enzima de *E. coli* apresentam formação de anticorpos inativantes e hipersensibilidade (PIETERS et al., 2011). Nos Estados Unidos da América e na Europa, a enzima proveniente de *D. chrysanthemi* é utilizada como segunda ou terceira linha de tratamento para substituir a formulação de *E. coli* nativa ou peguilada, por não haver reação cruzada entre anticorpos gerados pelo tratamento anterior (PIETERS et al., 2011). Porém, essa troca de formulação triplica o custo do tratamento (KLOOS et al., 2019) e ainda 33% dos pacientes apresentam hipersensibilidade à enzima de *D. chrysanthemi* (WANG et al., 2003). Para tentar contornar esse custo elevado e a hipersensibilidade à segunda linha de tratamento, a formulação peguilada da enzima proveniente de *D. chrysanthemi* foi desenvolvida; porém a fase 2 dos testes clínicos foi interrompida devido a reações de hipersensibilidade e inativação silenciosa (PUI; LIU; RELLING, 2018; RAU et al., 2018). Essa reação foi devido à pré-existência de anticorpos anti-PEG (SCHORE et al., 2016; YANG et al., 2016), gerados durante o tratamento com a formulação da enzima peguilada de *E. coli*.

O Brasil apenas dispõe de duas formulações de asparaginase, a Oncaspar® sob o registro nº 169790012, vigente desde 26/02/2018; e, recentemente aprovada pela ANVISA, a Spectrila® sob o registro nº 1562600310016 vigente desde 14/01/2019. A Spectrila® é a enzima de *E. coli* produzida de forma recombinante, enquanto que a Oncaspar® é a forma da enzima nativa de *E. coli* peguilada. Apesar da Oncaspar® apresentar menor efeito imunogênico, ainda há reação cruzada entre anticorpos da nativa de *E. coli* e a peguilada, o que nos deixa sem uma segunda linha de tratamento caso haja reações de hipersensibilidade severa e inativação silenciosa. Isso é um problema grave, pois a interrupção do tratamento pode causar um prognóstico

pior do que o inicial e maior chance de recidiva (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; KATO; MANABE, 2018). Anteriormente, entre 2017 e 2018 era comercializada a Leuginase®, ASNase de *E. coli* fabricado pela Beijin SL Pharmaceutical Co. Ltd (China) e representada pela Xetley S.A. (Uruguai) no Brasil. A leuginase foi importada em regime de emergência pela falta do medicamento no país, porém foi alvo de polêmica sobre sua eficácia e pureza (CECCONELLO et al., 2018; INEZ; GADELHA, 2018; MICHALOWSKI; DAUDT; GOLDANI, 2018; PINI et al., 2018), o que levou o Ministério da Saúde a interromper o fornecimento.

1.3 Asparaginases de *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* tem duas ASNases: A ASNase 1 (diferente da ASNase do tipo I bacteriana) sendo citosólica, de cinética alostérica, codificada pelo gene *ASP1* (ScASNaseI) e estudada pelo nosso grupo quando expressa em *E. coli* (COSTA et al., 2016; SANTOS et al., 2017); e a ASNase 2 (ScASNaseII), presente no periplasma, de cinética michaeliana, codificada pelo gene *ASP3* e inicialmente estudada e caracterizada em 1978 (DUNLOP et al., 1978). As duas são consideradas pertencentes à família das ASNases bacterianas do tipo II por homologia na sequência de aminoácidos (BONTHRON; JASKOLSKI, 1997; BOREK; JASKÓLSKI, 2001).

A ScASNaseII foi estudada primeiramente por Dunlop, demonstrando que essa enzima era expressa em privação de nitrogênio (DUNLOP; MEYER; ROON, 1980b; ROON et al., 1982); esse grupo também iniciou a caracterização bioquímica da enzima que apresentou atividade específica de 48 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (UI/mg) e cinética michaeliana, com K_M em torno de 250 a 300 μM ; porém, a enzima estava apenas parcialmente purificada (DUNLOP et al., 1978; DUNLOP; MEYER; ROON, 1980a). Então, em 1984 foi identificado o gene *ASP3* que codifica para a ScASNaseII (KIM; ROON, 1984) e posteriormente foi descoberta a presença de 4 cópias desse gene no genoma da *S. cerevisiae* (KAMERUD; ROON, 1986); o mesmo grupo reportou estudo subsequente sobre a sequência de DNA do gene *ASP3* (KIM et al., 1988).

Em 1997 começaram os estudos relacionados a mutações de cepas de *S. cerevisiae* que interferem na sensibilidade a fontes de nitrogênio, como os genes *URE2* e *GLN3* (BON et al., 1997; OLIVEIRA; CARVAJAL; BON, 1999; SILVEIRA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Em 2004, o mesmo grupo começou os estudos da cinética de crescimento da cepa de *S. cerevisiae ure2dal80* (FERRARA et al., 2004). Esse último resultou em uma cepa de *S. cerevisiae* capaz de produzir 14 vezes mais a enzima ScASNaseII que a cepa selvagem utilizada por Dunlop em 1978. Em 2006 foi descrita uma cepa de *Pichia pastoris* modificada geneticamente para produzir de forma heteróloga a enzima ScASNaseII, obtendo uma expressão 7 vezes maior que a cepa mutante de *S. cerevisiae ure2dal80* (FERRARA et al., 2006). Esse grupo continuou os estudos da produção da ScASNaseII em *P. pastoris*, avaliando o método de extração da enzima (FERRARA et al., 2010) e características bioquímicas e de citotoxicidade (DE CASTRO GIRÃO et al., 2016). O maior valor de atividade específica dessa enzima descrito na literatura até então, é de 204,4 UI/mg para a enzima pura. Essa atividade elevada abriu possibilidade de aplicação dessa enzima como parte da terapia da LLA e aumentou o interesse em seu estudo e produção.

Mais recentemente, nosso grupo tentou expressar ScASNaseII em *E. coli*, porém a mesma se manteve insolúvel em corpos de inclusão na bactéria; ao tentarmos solubilizar e promover redobramento proteico, a enzima manteve apenas uma atividade residual de 3,8 UI/mg (SANTOS et al., 2017). Lopes et al. 2019 obtiveram resultado parecido, porém a enzima ficou solúvel e com atividade residual de 5,4 UI/mg. Rodrigues et al. 2019 estudaram a cinética de crescimento da cepa *P. pastoris* expressando ScASNaseII com relação à variação na concentração de glicerol e determinaram um protocolo de cultivo para atingir uma alta densidade celular em biorreator.

Com uma atividade de 204,4 UI/mg (DE CASTRO GIRÃO et al., 2016), a ScASNaseII se aproxima da enzima EcASNaseII, com atividade específica de aproximadamente 270 UI/mg (tabela 1), e apresenta entre 66% e 50% da atividade específica da ASNase de *D. chrysanthemi*, que é de 300-400 UI/mg (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

Tabela 1: Características bioquímicas e semelhança das ASNases utilizadas como biofármaco e ScASNasell

Enzima	Ativ. Esp. Asn (UI/mg)	Afinidade Asn (K_m , μ M)	Ativ. Esp. Gln (% relativa à Asn)	Semelhança com ScASNasell (%)	Referência
EcASNasell	270	12	3	39,14	(NARTA; KANWAR; AZMI, 2007)
Erwinase	300-400	12	10	34,96	(NARTA; KANWAR; AZMI, 2007)
ScASNasell	204,4	250-300	Não há dados	-	(DUNLOP et al., 1978; DE CASTRO GIRÃO et al., 2016)

A ScASNasell contém três sítios passíveis de N-glicosilação (Figura 2), que foram caracterizados como possuindo altas quantidades de manose (DUNLOP et al., 1978; KIM et al., 1988). Castro-Girão et al., 2016 expressou a ScASNasell em *P. pastoris*, obtendo uma enzima com uma glicosilação mais homogênea que a obtida em *S. cerevisiae* por Dunlop e Kim. Até então, a ScASNasell foi obtida apenas no periplasma da *P. pastoris* e *S. cerevisiae*. A obtenção de proteínas do periplasma enfrenta grandes desafios, como perda de rendimento e atividade, degradação proteolítica, toxicidade dos agentes de extração e o monitoramento da remoção deles, dificuldade na implementação industrial e contaminação com proteína periplasmáticas (LEGOUX; MALDONADO; SALOME, 1997). A produção intracelular de proteínas também enfrenta dificuldades, como uso de solventes que prejudicam a proteína de interesse, a dificuldade e o preço do aumento de escala e a alta contaminação por diversos componentes intracelulares (HU et al., 2015; SHEHADUL ISLAM; ARYASOMAYAJULA; SELVAGANAPATHY, 2017). Dessa forma, é de grande interesse a produção da ScASNasell no meio extracelular, e a *P. pastoris* se apresenta como um sistema de expressão eficiente em quantidade e em secreção.

```

ScASNaseII      EEKNSSLPSIKIFGTGGTIASKGSTSATTAGYSVG-LTVNDLIEAVPSLAEKANLDYLQV
Erwinase        ADK---LPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQF
EcASNaseII      -----LPNITILATGGTIAG-GGDSATKSNYTVGKVGVENLVNAVFPQLKDIANVKGEQV
                **.* *:*****. . . . : :.*.* : * : *::*::* : . *::. *
                :
ScASNaseII      SNVESNSLNYTHLIPLYHGISEALASDDYAGAVVTHGTDIMEETAFFLDLTINSEKPVCI
Erwinase        SNMASENMTGDVVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDIVEESAYFLHLLTVKSDKPVVF
EcASNaseII      VNIGSDMMNDNVWLT LAKKINT--DCDKTDGFVITHGTDIMEETAYFLDLTVKCDKPVVM
                *::*::*::* : * : : . * . * *::*****::*::*::* *::*::*::* :
                :
ScASNaseII      AGAMRPATATSADGPMNLYQAVSIAASEKSLGRGTMITLNDRIASGFWTTKMNANSLDTF
Erwinase        VAAMRPATAISADGPMNLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNASTLDTF
EcASNaseII      VGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVTKTINTTDVATF
                ..****:*: *****:* :** *..: * ..*::*::* : .. ** *::. : **
                :
ScASNaseII      RADEQGYLGYSFNDDVEFYYPVKPNGWQ-FFDISNLTDPSEIPEVIIILYSYQGLNPELI
Erwinase        KANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTRRSVFDVVRGLT---SLPKVDILYGYQD-DPEYL
EcASNaseII      KSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLN---ELPKVGIVYNYAN-ASDLP
                .: : * ** : . : : . : : *::* . . ::* *::* . . :
                :
ScASNaseII      VKAVKDLGAKGIVLAGSGAGSWTATGSIVNEQLYEEYGIPIVHSRRTADGTVPDDAPE-
Erwinase        YDAAIQHGVKGIYAGMGAGSVSVRG-IAGMRKAMEKGVVIRSTRITGNGIVPPDEELP-
EcASNaseII      AKALVDAGYDGIVSAGVGNGLYKSV-FDTLATAAKTGTAVVRSRVPTGATTQDAEVDD
                .* : * .*** ** * . . : : * : :.* * . * . . *
                :
ScASNaseII      ---YAIGSGYLNPQSRILLQLCLYSGYGMDQIRSVFSGVYGG
Erwinase        ---GLV-SDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIQEYFHTY---
EcASNaseII      AKYGFVASGTLNPQKARVLLQLALTQKDPQIQIFNQY---
                : * .*** :*::* * . * . . * . . *
                :

```

Figura 2: Alinhamento das seqüências dos genes que codificam para as proteínas ScASNaseII, EcASNaseII e Erwinase. Os aminoácidos em vermelho são os responsáveis pelo sítio ativo da enzima. Os aminoácidos em amarelo e verde participam no reconhecimento da Asn (BOREK et al., 2014). E os aminoácidos em azul, são as seqüências passíveis de N-glicosilação. O retângulo vermelho destaca o sítio passível de N-glicosilação adjacente à região de reconhecimento da Asn.

1.4 Expressão heteróloga em *P. pastoris*

A levedura *P. pastoris* era comercializada pela Philips Petroleum (Bartlesville, Oklahoma, EUA) como uma fonte de proteína proveniente de uma única célula para ração de animais, como aditivo alimentar por apresentar uma alta densidade celular ($>130 \text{ g.L}^{-1}$) e ser capaz de usar o metanol como fonte de carbono. Porém, em 1973 com o aumento do preço do petróleo, e como o metanol é proveniente da extração do petróleo, a comercialização da *P. pastoris* com esse fim se tornou inviável. Mais tarde, a Phillips Petroleum contatou a Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA) para o desenvolvimento da *P. pastoris* como um sistema de expressão de proteínas heterólogas. Com essa parceria, o promotor AOX foi caracterizado, cepas e protocolos de modificação genética foram desenvolvidos. Com a mistura dos

protocolos de crescimento de alta densidade celular desenvolvido pela Phillips Petroleum e inserção de um gene codificante para uma proteína heteróloga, a *P. pastoris* se tornou um marco na expressão de proteínas recombinantes e hoje se encontra como um dos microrganismos mais utilizados para tal fim (CREGG et al., 1985; CEREGHINO; CREGG, 2000; SCHMIDT, 2004; AHMAD et al., 2014; JUTURU; WU, 2018), especialmente para produção de proteínas heterólogas secretadas (SCHMIDT, 2004). Por ser uma levedura, e por leveduras serem muito utilizadas na indústria de alimentos, os produtos produzidos pela *P. pastoris* são reconhecidos como seguros (do inglês, *generally recognised as safe*, GRAS).

A *P. pastoris* tem diversos promotores já caracterizados (VOGL; GLIEDER, 2013; AHMAD et al., 2014); o mais conhecido e utilizado é o promotor que regula a expressão do gene que codifica a álcool oxidase (AOX), responsável pelo metabolismo do metanol. O genoma da *P. pastoris* contém dois genes que codificam para a álcool oxidase, o AOX1 que corresponde à 85% da atividade de álcool oxidase da célula e 30% das proteínas totais produzidas em meio com metanol como única fonte de carbono; e o gene AOX2, que corresponde aos restantes 15% de atividade de álcool oxidase da célula (JUTURU; WU, 2018). A maioria dos vetores de expressão é construído de forma que o vetor linearizado seja integrado dentro desse promotor na cepa de *P. pastoris*. Esse é um forte promotor, possibilitando grande produção de proteínas heterólogas na ordem de grandeza de gramas de proteína produzida por litro de meio de cultura, tanto intracelular quanto secretada para o meio extracelular (HASSLACHER et al., 1997; WERTEN et al., 1999).

A *P. pastoris* tem menos cepas comercialmente disponíveis que *S. cerevisiae*. As cepas disponíveis de *P. pastoris* variam de acordo com sua metabolização de metanol, síntese de proteases intra e extracelular. Por exemplo, cepas com características Mut⁺ contêm os dois genes AOX1 e AOX2 funcionais; as cepas Mut^S tem um crescimento e metabolização de metanol mais lento por terem deleção no gene AOX1; e as cepas Mut⁻ tem deleção nos dois genes AOX1 e AOX2. Essa cepa não é capaz de metabolizar o metanol, porém, ainda assim consegue expressar as proteínas heterólogas sob regulação dos promotores desses genes (BAGHBAN et al., 2019).

Um dos problemas da *P. pastoris* envolve a alta produção de proteases intra e extracelulares. Genes que codificam para proteases foram silenciados para contornar esse problema, como *pep4*, *prb1* e *sub2*. As proteínas *pep4p* e *prb1p* são proteases intracelulares e atuam em conjunto (*pep4p* ativa a *prb1p*, aumentando sua atividade em 50%), enquanto que a *sub2p* é uma protease secretada no meio extracelular. (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; SALAMIN et al., 2010). O *knockout* de genes que codificam para proteases tem sido muito utilizado para o aumento de expressão de proteínas heterólogas (AHMAD et al., 2014).

Outro fator importante da utilização da *P. pastoris* como sistema de expressão é a modificação pós-traducional, como processamento proteolítico, dobramento, fosforilação, ligação dissulfeto e glicosilação. Essa última de extrema importância por permitir o dobramento correto e a solubilização da proteína, como no caso da ScASNase (SANTOS et al., 2017; LOPES et al., 2019). Por ser levedura, a *P. pastoris* apresenta um perfil de glicosilação contendo altas quantidades de manose, porém menor que a de *S. cerevisiae* (AHMAD et al., 2014). Essa adição de manoses é prejudicial quando aplicado a um biofármaco, pois o contato prolongado com essa cadeia de dezenas a centenas de manoses pode causar reação imunológica, e diminuir o tempo de meia-vida do biofármaco no plasma (BAGHBAN et al., 2018). Dessa forma, a *P. pastoris* tem sido alvo de modificações genéticas para a humanização da glicosilação. Esse processo de modificação do padrão de adição de oligossacarídeos é bem descrito e há cepas disponíveis que mimetizam a glicosilação de mamíferos, chamada de *Glycoswitch* (VERVECKEN et al., 2004, 2007; JACOBS et al., 2009; DE POURCQ; DE SCHUTTER; CALLEWAERT, 2010).

1.5 Processo de glicosilação e modificação *Glycoswitch*

A glicosilação de proteínas secretadas pode prover solubilidade, hidrofobicidade e carga negativa à proteína; dessa forma, reduz interações não desejadas no meio extracelular e também protege contra proteólise. O processo de glicosilação é muito importante para a manutenção do estado normal da célula/organismo. Modificações no processo de glicosilação (por exemplo, por mutações que evitam a glicosilação inicial, a elongação da cadeia de glicanos ou até mesmo mutação na enzima que faz o reconhecimento dos sítios de glicosilação), podem ser a causa de comorbidades como fibrose hepática e coagulopatia (VARKI et al., 2015). Em alguns casos, modificações nesse processo tornam inviável o desenvolvimento do organismo (VERVECKEN et al., 2004).

Glicosilação mantém a enzima estável no meio externo ao microrganismo. A glicosilação era tida como um processo exclusivo de organismos; porém, hoje é estimado que 70% das proteínas eucarióticas e 50% das procarióticas sejam glicosiladas (DELL et al., 2010; LATOUSAKIS; JUGE, 2018).

A glicosilação ocorre com o reconhecimento da sequência primária da proteína. Sequências como Asparagina-X-Serina/Treonina (Asn-X-Ser/Thr) são susceptíveis a receber a cadeia de glicosilação no aminoácido asparagina. Esse tipo de glicosilação é chamado de N-glicosilação. Na N-glicosilação, o aminoácido que entra no lugar do X (Asn-X-Ser/Thr) não pode ser prolina, e dependendo do aminoácido, pode haver uma menor probabilidade de a Asn ser glicosilada (como no caso de aminoácidos polares ácidos, aspartato e glutamato), ou maior probabilidade (como no caso de fenilalanina). Mesmo com a sequência correta, o processo de glicosilação pode não ocorrer por incompatibilidades conformacionais entre a enzima que transfere o N-glicano para a Asn da proteína alvo e essa última. Dessa forma, essas sequências são localizações com alto potencial à N-glicosilação. A sequência Asn-X-Cisteína também pode receber N-glicosilação na Asn, porém essa ocorre raramente (ZIELINSKA et al., 2010).

Nos eucariotos, há três tipos de N-glicanos: (1) oligomanose, o qual apenas manoses são adicionadas à estrutura principal; (2) N-glicanos complexos, os quais há adição de N-acetilglicosamina (GlcNAc) à estrutura principal, dessa forma formando uma espécie de antena; e (3) os híbridos, os quais há adição de manose ao “braço” com a ligação α 1-6 à outra manose, e adição de um ou mais GlcNAc ao “braço” com ligação α 1-3 à manose (Figura 3). Todos os tipos de N-glicanos têm uma estrutura principal, constituído de 3 manoses e 2 N-acetilglicosaminas ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) ligados à asparagina (retângulo vermelho, Figura 3).

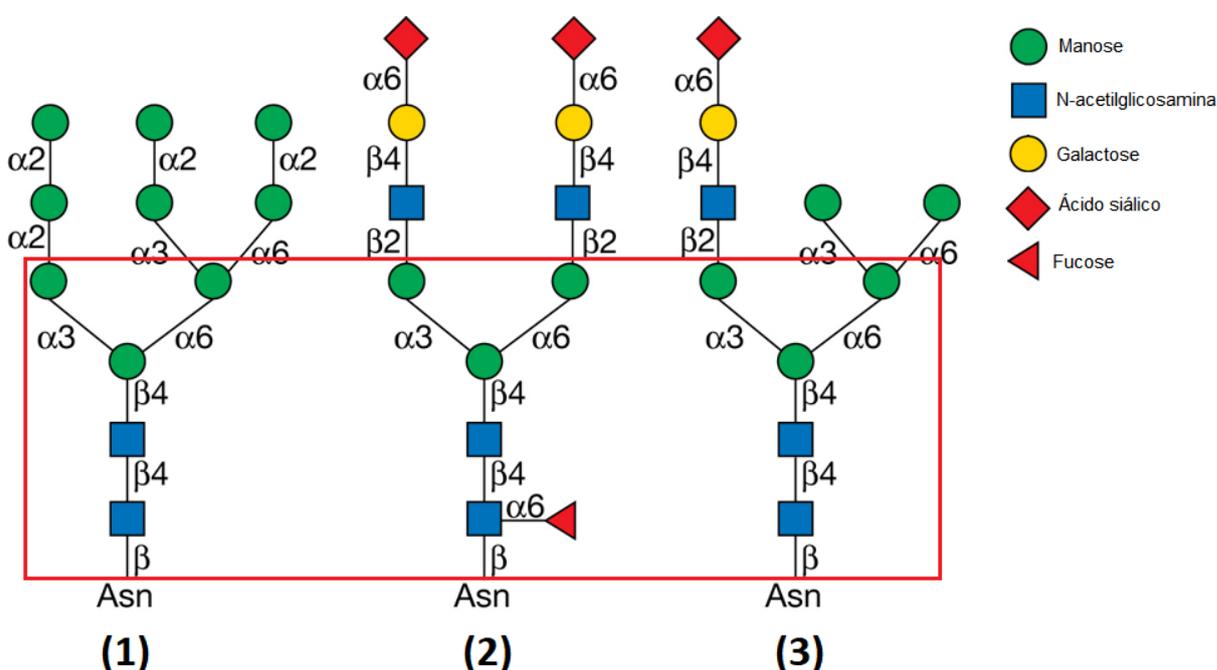


Figura 3: Tipos de N-Glicosilação. (1) Oligomanose, o qual apenas manose são adicionadas à estrutura principal; (2) N-glicanos complexos, com adição GlcNAc à estrutura principal; e (3) os híbridos, os quais há adição de manose à outra manose do “braço” com a ligação α 1-6, e adição de um ou mais GlcNAc à manose do “braço” com ligação α 1-3. O retângulo vermelho representa a estrutura $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, comum a todos os três tipos de N-glicano. Adaptado de VARKI et al., 2015.

A síntese dos sítios de N-glicosilação em eucariotos ocorre com um precursor chamado dolicol-fosfato (Dol-P) localizado no retículo endoplasmático rugoso (RER). O N-glicano é sintetizado no citoplasma (parte externa do RER) por ação de diversas enzimas que transferem os “blocos” de GlcNAc e manoses sucessivamente para o Dol-P. O Dol-P com 2 moléculas de GlcNAc e 5 manoses é internalizado para o lúmen do ER para mais adições de glicose (Glc) e manoses, totalizando 14 grupos de açúcares ligados ao Dol-P. Em seguida, o N-glicano

contendo 14 açúcares é transferido em bloco para a proteína. Esse processo de transferência ocorre no lúmen do RER pela proteína oligossacarídeo transferase (OST) em proteínas recém sintetizadas (SCHENK; FERNANDEZ; WAECHTER, 2001; AEBI, 2013; SHRIMAL; CHEREPANOVA; GILMORE, 2015; VARKI et al., 2015). A cadeia de açúcares nessa etapa é composta por $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

O N-glicano adicionado no retículo RER não é a forma final da glicosilação. Logo sofre maturação (Figura 4) por ação de enzimas α -glicosidases I e II, com ação no RER e remoção das glicoses com ligação $\alpha 1-2$ e $\alpha 1-3$, respectivamente. O N-glicano sofre nova remoção, por ação da α -manosidase I, a qual remove a manose $\alpha 1-2$ subsequente à Glc $\alpha 1-3$. Nesse ponto o N-glicano contém 8 manoses e 2 GlcNAc ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$). A partir desse ponto, a proteína é transportada por vesículas para o complexo de golgi, onde é continuada a maturação. As manoses ligadas por ligação $\alpha 1-2$ restantes são removidas por ação das $\alpha 1-2$ -manosidases IA e IB, formando o N-glicano $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (HERSCOVICS, 1999). Esse é o ponto em comum na maturação dos N-glicanos complexos e híbridos.

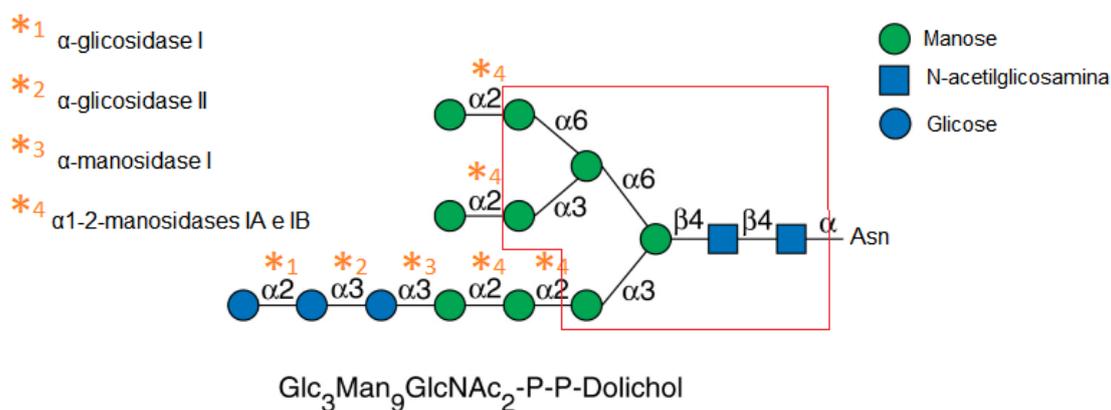


Figura 4: Processo de maturação do N-glicano, envolvendo enzimas do lúmen do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de golgi. Os asteriscos representam a ligação que as enzimas quebram e removem o açúcar. A região destacada em vermelho é o N-glicano $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, comum ao processo de maturação dos tipos complexo e híbrido. Adaptado de VARKI et al., 2015.

O processamento para a formação dos N-glicanos complexos e híbridos começa com a adição de GlcNAc pela ação de GlcNAc transferase I (GnT-I), dando origem ao tipo híbrido de N-glicanos (Figura 5). A partir desse ponto, o N-glicano pode ter as manoses ligadas ao braço contendo a manose com ligação α 1-6 removida pela ação da manosidase II e subsequente adição de GlcNAc pela GnT-II, dando origem aos N-glicanos complexos. Outros componentes podem ser adicionados nesses ramos como galactose e ácido siálico pela ação das enzimas galactosiltransferase e sialiltransferase, respectivamente. Esses tipos de glicosilação são presentes em mamíferos (KORNFELD; KORNFELD, 1985; VERVECKEN et al., 2004; VARKI et al., 2015).

As leveduras não processam o N-glicano a partir da cadeia $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$; o processo de maturação dos glicanos nas leveduras envolve novas adições de manose no complexo de golgi iniciada pela enzima Och1p com ação de α 1-6 manosiltransferase. Subsequentes manoses são adicionadas a esse novo ramo, formando uma cadeia externa constituída de dezenas a centenas de manoses (DEAN, 1999; JACOBS et al., 2009; DE POURCQ; DE SCHUTTER; CALLEWAERT, 2010). Esse processo é chamado de hipermanosilação (Figura 5) e é prejudicial quando aplicado à produção de um biofármaco, pois pode causar reação imunológica e diminuir o tempo de meia-vida do biofármaco no plasma (BAGHBAN et al., 2018).

Glicosilação humanizada geralmente ocorre na N-glicosilação, pois a inibição de proteínas relacionadas a esse processo não interfere no crescimento da *P. pastoris*. Isto não ocorre com a O-glicosilação, cujo silenciamento genético das proteínas envolvidas prejudica o crescimento da levedura, tornando-a inviável (JACOBS et al., 2009). A *P. pastoris* também é uma ótima opção para se estudar a humanização da glicosilação, pois ela não sofre redução na velocidade de crescimento da mesma forma que a *S. cerevisiae* (VERVECKEN et al., 2004).

A transformação de cepas de leveduras que produzem uma N-glicosilação com processo de hipermanosilação em células capazes de produzir uma N-glicosilação híbrida e complexa semelhantes à dos humanos, envolve deleção e adição de genes. O gene deletado é o *OCH1*, o qual inicia o processo de hipermanosilação. Os genes adicionados são relacionados à

maturação do N-glicano para tipo híbrido e complexo como glicosidades e glicosiltransferases (JACOBS et al., 2009). Cepas contendo essas modificações genéticas ou os plasmídeos para a confecção dessas cepas estão disponíveis no mercado, como por exemplo, a *Glycoswitch* (VERVECKEN et al., 2004, 2007; JACOBS et al., 2009; DE POURCQ; DE SCHUTTER; CALLEWAERT, 2010). A Biogramatics, Inc. detém os direitos de comercialização da cepa *Glycoswitch*, e no seu catálogo há disponível a cepa *P. pastoris Glycoswitch pep4- sub2-* utilizada nesse trabalho.

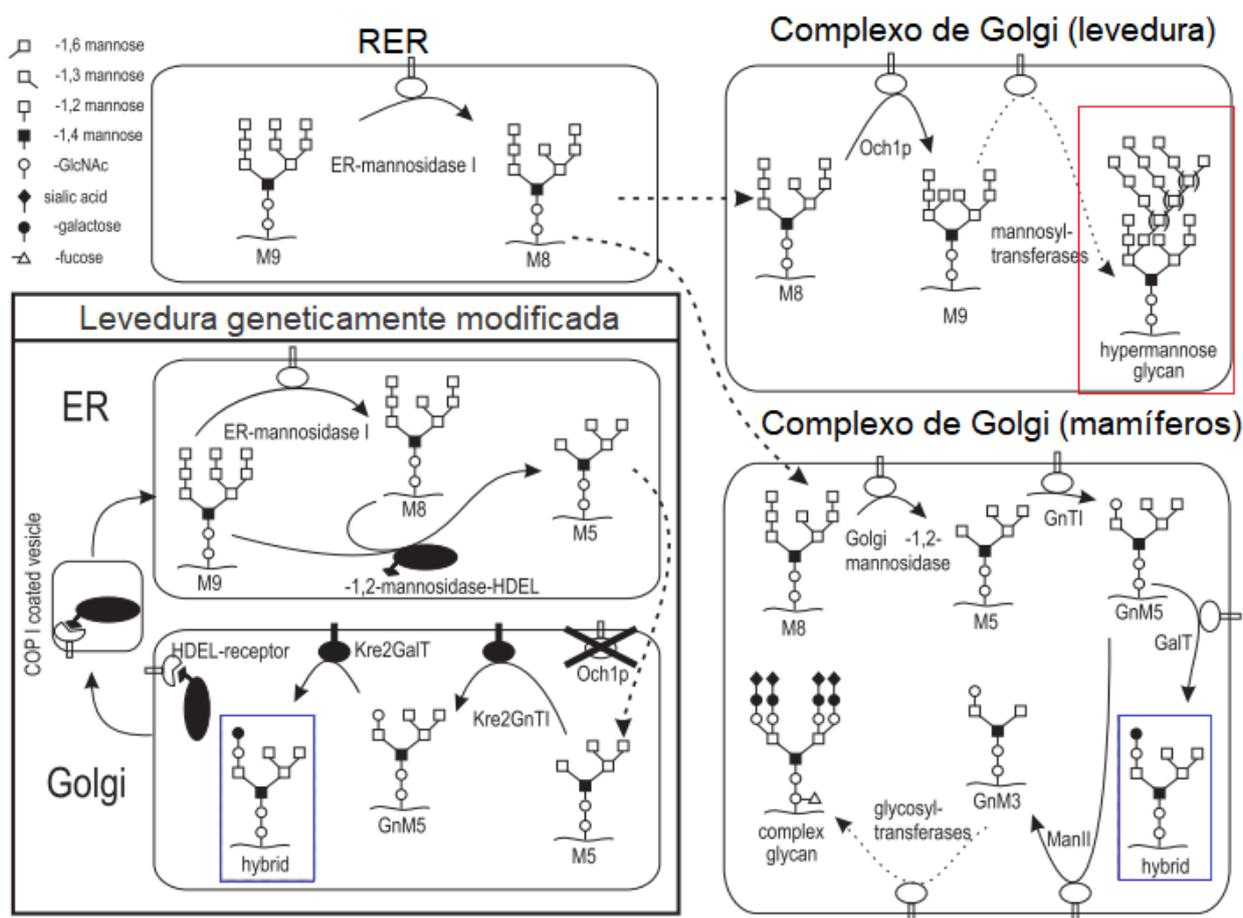


Figura 5: Representação dos processos de maturação dos tipos de oligomanose (presente em leveduras), híbridos, complexos (presentes em mamíferos) e da levedura geneticamente modificada para síntese de N-glicano similar ao dos mamíferos. O retângulo vermelho representa a hipermanosilação produzida por leveduras, e os retângulos azuis representam a glicosilação de mamíferos e a semelhança da glicosilação da levedura geneticamente modificada. A proteína Och1p está silenciada na levedura (representada por um X preto) e as proteínas adicionadas estão representadas com preenchimento preto. Adaptado de VERVECKEN et al., 2004.

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho é obter a cepa recombinante de *P. pastoris* com glicosilação humanizada expressando a proteína recombinante L-asparaginase II de *S. cerevisiae* extracelular e caracterizar os parâmetros bioquímicos, cinéticos e citotóxicos da enzima obtida em sua forma pura.

2.1. Objetivos específicos

- Obter a enzima ScASNaseII no meio extracelular;
- Determinar protocolo de purificação da ScASNaseII;
- Caracterizar parâmetros bioquímicos, estabilidade e cinética enzimática;
- Determinar atividade citotóxica contra célula leucêmica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aquisição dos plasmídeos de expressão

O vetor de expressão foi obtido pela técnica de clonagem por extensão circular pela polimerase (do inglês, *circular polymerase extension cloning*, CPEC) (BRYKSIN; MATSUMURA, 2010; QUAN; TIAN, 2011; SPELTZ; REGAN, 2013). As sequências dos iniciadores estão no anexo I. O gene *ASP3* com códon otimizado para expressão em *P. pastoris* foi sintetizado pela GenScript® (Anexo II) em puc57 e amplificado por PCR utilizando os iniciadores 3 e 4 (para anelar com a sequência α -amilase, anexo IV) e 11 e 4 (para anelar com a sequência *PHO1*, anexo III).

A sequência α -amilase foi obtida por PCR utilizando como molde o DNA fornecido pelo kit PichiaPink™ Expression System (Invitrogen™) com os iniciadores 1 e 2. A sequência *PHO1* foi obtida por amplificação do material genômico da *P. pastoris* GS115 com os iniciadores 9 e 10. O vetor pJAG-s1 (© Biogramatics, Inc.; Anexo V) foi linearizado por amplificação por PCR com os iniciadores 5 e 6 (para anelar com a α -amilase) e 5 e 12 (para anelar com a *PHO1*). O inserto (α -amilase+*ASP3* ou *PHO1*+*ASP3*) foi obtido por PCR utilizando os próprios componentes da reação, purificados, como iniciadores (sequências complementares), na proporção 1:15 razão molar (1 mol do gene

ASP3 para 15 mols da sequência sinalizadora) e posteriormente amplificados com os iniciadores 7 e 8 (para α -amilase) e 13 e 8 (para PHO1). Os vetores finais (pJAG+ α -amilase+ASP3 ou pJAG+PHO1+ASP3) foram obtidos por PCR utilizando os próprios componentes da reação purificados como iniciadores, na proporção 1:15 razão molar (1 mol do vetor pJAG para 15 mols do gene ASP3+sequência sinalizadora). O produto da reação de PCR foi transformado diretamente em *E. coli* DH5 α [*deoR endA1 gyrA96 hsdR17 Δ (lac)U169 recA1 relA1 supE44 thi-1 (Φ 80 lacZ Δ M15)*] (Novagen™) eletrocompetente por eletroporação.

Todas as reações (caso contrário, será apontado) seguiram o seguinte ciclo e componentes: 1x 98°C/2 min; 30x 98°C/30 s, 63°C/30 s, 72°C/1 min/kb; 1x 72°C/5 min, 4°C/ ∞ . 10 μ L do tampão 5x, 1 μ L da enzima PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc.), 4 μ L de dNTP 2,5 mM, 10 μ Mol de cada iniciador, 1 μ L do molde (10 ng) e 32 μ L de água esterilizada. Foi utilizado o termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies™).

Um esquema das sequências de reações de PCR está mostrado no Anexo VI e VII.

A quantidade de cada fragmento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{(ng \text{ do maior fragmento}) * (kb \text{ do menor fragmento})}{kb \text{ do maior fragmento}} = ng \text{ do menor fragmento para uma razão molar de 1:1}$$

Após as amplificações, cada componente foi purificado por extração de DNA do gel de agarose através do Illustra™GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit da GE®, seguindo as instruções do fabricante. A concentração de material genético foi medida usando NanoDrop™ One/OneC da ThermoFisher Scientific.

Todos os passos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% em 40 mL de TAE 1X (diluído 50x da solução-mãe TAE 50x: 242g de Tris-base, 50mM EDTA pH 8,0 e 57,1 mL ácido acético glacial) + 15 μ g de brometo de etídeo e submetidos a eletroforese horizontal em TAE 1X em cuba de eletroforese Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad™) por 45 min a 90 V.

3.2 Transformação em DH5 α eletrocompetente

Os vetores construídos foram transformados em DH5 α eletrocompetente, utilizando uma cubeta de eletroporação de 2 mm de espaçamento entre as placas a uma voltagem de 2,5 kV. Em seguida, as células transformadas foram recuperadas em 1 mL de Lysogenic-Broth (LB; 0,5% NaCl, 1% triptona, 0,5% extrato de levedura) estéril e incubado por 1h. Após a incubação, as células foram concentradas por centrifugação à 13000 g por 3 min em uma centrífuga Eppendorf 5415R e plaqueadas em meio LB sólido (2% de ágar) previamente preparado com carbenicilina (carb) 50 μ g/mL.

Dez clones foram selecionados do centro da placa e incubados em meio LB+carb (50 μ g/mL.) à 37°C *overnight*. Foi feita uma triagem dos clones por reação de PCR com 17 μ L de Platinum PCR SuperMix (Invitrogen®), 1 μ L de cada iniciador (15 μ mol/uL) (pJAGintFW 5' CGACTGGTTCCAATTGACAAG 3' e pJAG-s1RV 5' CTCGTACGAGAAGAAACAAAATGAC 3') e 1 μ L da cultura. Ciclos da reação foram: 1x 95°C/5 min; 30x 95°C/45 s, 55°C/30 s, 72°C/1 min 30 s; 1x 72°C/5 min, 4°C/ ∞ . Foi feito estoque em solução de glicerol 10% (v/v) dos clones que possuíam inserto e armazenados à -80°C. O plasmídeo bacteriano foi extraído pelo kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen™) exatamente como indicado pelo fabricante.

3.3 Reação de sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies™), de acordo com as instruções do SSDNA (Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da Universidade de São Paulo - IQ-USP Instituto de Química da Universidade de São Paulo - SSDNA). O equipamento sequenciador utilizado é o ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer (HITACHI™).

A reação de sequenciamento pelo método de Sanger se deu da seguinte forma: 10 μ Mol de primer pJAGintFW ou pJAG-s1RV; 3 μ L do sequencing buffer BigDye terminator; 2 μ L de BigDye terminator v3.1; 150 ng do vetor construído e água livre de DNase até 15 μ L. O ciclo utilizado no termociclador foi: 1x 96°C/2 min; 35x 96°C/45 s, 50°C/30 s, 60°C/4 min; 4°C/ ∞ .

Para a purificação do DNA foi utilizado o método de precipitação por glicogênio. Para preparar o *Cocktail* de precipitação para uma placa de 96 poços, foi misturado 2.750 μL de etanol 100% gelado; 110 μL de acetato de sódio 3 M pH 5,2; 110 μL de glicogênio 1 mg/mL.

Aos 15 μL da reação de sequenciamento foi adicionado 25 μL do *Cocktail*. Após agitar em vórtice, a mistura foi mantida em gelo por 15 min, centrifugada a 4000 g, 20 min, a temperatura ambiente. A placa foi invertida e o excesso foi descartado, dando a seguir um pulso de 1000 x g com a placa invertida. 50 μL de etanol 70% gelado (4°C) foi adicionado. A etapa de centrifugação foi repetida por 10 minutos e os tubos foram secados à 95°C por 1 minuto no termociclador. Em seguida as amostras foram enviadas para o SSDNA-IQUSP e os resultados analisados com o programa CLC Main Workbench 8.

3.4 Transformação em *P. pastoris pep4- sub2-*

As células eletrocompetentes da *P. pastoris* foram feitas no laboratório. *P. pastoris GlycoSwitch pep4- sub2-* foi inoculada em uma placa de YPD e incubada por 48 horas a 30°C. Uma colônia foi selecionada e estriada em uma segunda placa de YPD e incubada novamente a 30°C *overnight*. Dessa segunda placa foi selecionada uma colônia isolada e inoculada em meio YPD e incubada em *shaker* a 30°C e 200 rpm *overnight*. Esse cultivo foi posteriormente diluído para uma DO_{600} de 0,2 no volume final de 25 mL de YPD e incubado a 30°C e 200 rpm até atingir uma DO_{600} de 1,5. Em seguida, esse cultivo foi colocado em gelo por 15 minutos para coletar as células e centrifugado a 800 g a 4°C por 5 minutos. As células precipitadas foram ressuspensas em 2 mL YPD com 200 mM HEPES pH 6,8, lentamente foi adicionado 75 μL de DTT 1M e a suspensão de células foi incubada por 25 minutos a 30°C 100 rpm. Em seguida, essa solução foi diluída em água esterilizada a 4°C, centrifugada e as células precipitadas lavadas novamente com água esterilizada 4°C. As células foram lavadas uma última vez com 20 mL de sorbitol 1M estéril, centrifugadas e ressuspensas em 300 μL de sorbitol 1M a 4°C e aliqüotadas em tubos contendo 30 μL dessa suspensão de células em sorbitol e armazenadas a -80°C para transformação por eletroporação.

Os vetores construídos e confirmados por sequenciamento foram amplificados por minipreparação plasmidial e aproximadamente 200 ng de vetor linearizado com *PmeI* (New England Biolabs®) foram transformados para a incorporação do plasmídeo no genoma da *P. pastoris GlycoSwitch pep4-sub2-* no *locus* do promotor AOX1. Para isso, 1 μ L de *PmeI* e 5 μ L de tampão CutSmart® (New England Biolabs®) foram adicionados ao vetor e o volume completado para 50 μ L com água miliQ estéril e incubado à 37°C por 1 h. A reação de digestão do vetor foi purificada pelo Illustra™GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit da GE® e quantificada pelo Nanodrop™ One/One^c e 200 ng do vetor foram transformados em *P. pastoris GlycoSwitch pep4-sub2-* eletrocompetentes por eletroporação no Bio-rad Micropulser™ em cubetas de 1 mm de espessura e voltagem de 1.150 volts. As células foram recuperadas com 1 mL de meio de recuperação estéril 1:1 YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose; para meio sólido: 2% ágar) e 1 M sorbitol e incubadas à 30°C por 3 horas. Em seguida, as células foram concentradas na centrífuga Eppendorf 5415R à 600 g por 5 min e plaqueadas em YPD, previamente preparada com G418 (geneticina) a uma concentração de 1 mg/mL e incubada por 2 dias à 30°C. Colônias isoladas dessa placa foram transferidas para uma segunda placa de YPD com G418 (1 mg/mL) e incubadas à 30°C *overnight*. Previamente à análise da expressão, o DNA genômico foi extraído pelo protocolo do PureLink®Genomic DNA Mini kit (Life Technologies™) e usado como molde nas reações de PCR para ver a integração do material genômico, nas mesmas condições que a triagem da *E. coli* DH5 α foi realizada. Os clones com inserção do gene no genoma foram incubados em YPD e estoques foram feitos em 30% (v/v) de glicerol e armazenados à -80°C.

3.5 Expressão e análise da proteína.

Os clones foram incubados com 5 mL (inicialmente e posteriormente 500 mL) de BMGY (1% extrato levedura, 2% peptona, 0,34% YNB (*yeast nitrogen base*; base nitrogenada para levedura), 1% sulfato de amônio, 100 mM de fosfato de potássio pH 6,0, 0,75% glicerol) à 30°C 200 rpm por 20h. Após esse período, as células foram transferidas para 5 mL de meio BMMY (1% extrato levedura, 2% peptona, 0,34% YNB, 1% sulfato de amônio, 100 mM de fosfato de potássio pH 6,0, metanol x%) sendo x= à 0,5%, 1% ou 1,5% e incubadas

nas mesmas condições. Após 12h, adicionou-se 500 μL da mesma solução para manter a concentração final de 0,5%, 1% e 1,5% de metanol no meio de cultivo. Essa adição foi repetida a cada 12h, até 120h depois da troca do meio com glicerol pelo meio com metanol.

A atividade do sobrenadante foi analisada pelo método de hidroxilaminólise. 100 μL do sobrenadante foram incubados por 30 minutos à 37°C com Asn 100 mM e hidroxilamina 100 mM (neutralizada com NaOH para pH 7,0) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 no volume final de 200 μL . A reação foi interrompida com 50 μL de solução de 10% (m/v) FeCl_3 , 5% (m/v) TCA e 0,66M HCl. A absorbância dessa reação foi medida a 500nm. A absorbância foi comparada com uma curva padrão previamente feita com diferentes concentrações de β -hidroxamato aspártico. Esse método permite quantificar a catálise sequencial pela L-asparaginase da asparagina e a hidroxilamina formando β -hidroxamato aspártico. Este por fim na presença de cloreto férrico forma um complexo que absorve luz no comprimento de onda de 500nm (DUNLOP; MEYER; ROON, 1980).

3.6 Purificação da proteína

O meio de cultivo com as células foi centrifugado à 7100 g por 5 minutos e as células foram separadas do sobrenadante. O meio extracelular foi ultrafiltrado e concentrado duas vezes até um volume final do sobrenadante retido de aproximadamente 200 mL usando filtro Pellicon® XL Cassette Biomax® 5 kDa da Millipore, o que resulta em uma redução na quantidade de sais do meio em 100 vezes, e substituído por tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,6.

Em seguida, os 200 mL retidos foram carregados na coluna cromatográfica de troca aniônica HiTrap™ DEAE FF da GE Healthcare, previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (25 mL) com tampão 50 mM Tris-HCl com 1 M de NaCl pH 8,6 e em seguida 10 volumes de coluna (50 mL) com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,6. A eluição ocorreu em um gradiente de concentração de NaCl em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,6 com degraus de 100 mM de NaCl até um total de 1M. Foi medida atividade por hidroxilaminólise das frações eluídas para identificar quais continham atividade asparaginásica.

As frações com atividade asparaginásica foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE. Para 20 μL de cada fração, foi adicionado 5 μL de

tampão de amostra de eletroforese 5x (0,3 M Tris-HCl pH 6,8; 25% glicerol; 2% SDS; 0,5 mL de β -mercaptoetanol 3,6 mM; 0,1% Azul de Bromofenol;), incubadas à 95°C por 5 minutos e em seguida foram aplicados em uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% à 200 V por 1h 30 min (Gel empacotador: 0,1 M Tris-HCl pH 6,8; acrilamida/bis-acrilamida 4%; 50 μ L PSA 10%; 10 μ L TEMED; Gel de separação: 0,5 M tris-HCl pH 8,8; acrilamida/Bis-acrilamida 12%; 50 μ L PSA 10%; 10 μ L TEMED; Tampão de corrida Tris-glicina: 25mM Tris-base; 200mM glicina; 1% SDS). Ao final da eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie Blue* (0,1% (m/v) *coomassie blue*; 45% metanol; 10% ácido acético glacial) por 30 minutos e descorado com solução descorante (10% metanol e 10% ácido acético glacial) *overnight*.

As frações com maior grau de pureza foram concentradas por centrifugação em filtro Amicon® Ultra-4 *cutoff* 10kDa da Millipore para 500 μ L e injetados na coluna de exclusão molecular Superdex™ 200 Increase 10/300 GL da GE Healthcare, previamente lavada com água ultrapura (50 mL) e equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,6. A amostra foi eluída com o tampão de equilíbrio com fluxo 0,5 mL/min e foi analisada a atividade asparaginásica das frações e grau de pureza pelo método de hidroxilamina e por SDS-PAGE, respectivamente.

Os equipamentos utilizados para a purificação foram ÄKTA e ÄKTA start da GE Healthcare Life Sciences.

3.7 Caracterização bioquímica

3.7.1 Atividade específica

A atividade específica foi medida pelos métodos de hidroxilaminólise e Nessler. A concentração da enzima foi medida pelo método de Bradford. Para isso, 10 μ L da amostra foram adicionados à 200 μ L do reagente de Bradford previamente diluído 1:5 em água ultrapura e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, foi medida a absorbância no comprimento de onda de 595 nm e comparado com uma curva de calibração previamente feita com diferentes concentrações conhecidas de BSA, de acordo com as instruções do fabricante (Bio-rad Laboratories Inc.).

Previamente a análise da atividade específica, foi analisada a atividade da enzima a cada dois minutos para determinar o melhor tempo para medir a velocidade inicial; para as duas enzimas estudadas, o melhor tempo para detecção foi de 10 minutos.

3.7.1.1 Atividade Asparaginásica

Para o método de Nessler, uma concentração entre 25 a 150 nM de enzima foi incubada por 10 minutos a 37°C com 20 mM Asn em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4 no volume final de 370 µL na placa de 96 poços. Após os 10 minutos, 37 µL da reação retirada e diluída em água com ácido tricloroacético (TCA) na placa de 96 poços. Em seguida foi adicionado 37 µL do reagente de Nessler (Merck-Millipore), totalizando um volume final de 370 µL (diluição de 10 vezes da reação incubada). A solução colorimétrica formada teve sua absorbância medida no leitor de placa SpectraMax Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, California, EUA) no comprimento de onda de 440 nm, e os valores foram interpolados em uma curva padrão previamente feita de sulfato de amônio nas concentrações entre 0 e 5 µmol/mL. Os dados são apresentados em unidade internacional por miligrama de proteína (UI/mg). Uma unidade internacional de enzima é definida como 1 µmol de amônia liberada por minuto a 37°C.

Para o método de hidroxilaminólise, diferentes volumes da enzima asparaginase foram diluídos para atingir uma concentração final 30, 40, 50, 70, 80, 100 e 150 nM e foram incubados por 10 minutos à 37°C com 20 mM Asn e 100 mM hidroxilamina pH 7,0 em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 ou 7,4 (referenciado no texto). A reação foi interrompida com 50 µL de solução de 10% (m/v) FeCl₃, 5% (m/v) TCA e 0,66 M HCl. A absorbância dessa reação foi medida a 500nm.

3.7.1.2 Atividade Glutaminásica

A atividade glutaminásica foi medida pelo método de hidroxilaminólise. Uma faixa de concentração da ScASNase entre 250 nM e 1,5 µM foi incubada com 20 mM glutamina e 100 mM hidroxilamina pH 7,0 em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4. A reação foi interrompida com 50 µL de solução de 10% (m/v) FeCl₃, 5% (m/v) TCA e 0,66 M HCl. A absorbância dessa reação foi medida a 500nm.

Todas as reações enzimáticas foram realizadas em conjunto com uma solução branco e controle negativo. Solução branco foi definida como toda reação, com exceção da Asn, nas mesmas condições que as amostras; e o controle negativo foi definido como toda reação com exceção da enzima.

3.7.2 pH ótimo da ScASNasell

Para determinar o pH ótimo da ScASNasell, a atividade específica foi analisada pelo método do reagente de Nessler em diferentes tampões: citrato 100 mM pH 4 e 5; fosfato de potássio 100 mM pH 6,7 e 8; Tris-HCl 100 mM pH 9; bicarbonato de sódio 100 mM pH 10 e 11. Em adição aos tampões, 500 mM de NaCl foi adicionado para eliminar a interferência do efeito da força iônica dos tampões.

3.7.3 Efeito do soro humano na estabilidade da ScASNasell

ScASNasell foi incubada a 37°C com 10% (v/v) de soro humano por até 5 dias, e a atividade enzimática foi medida pelo método do reagente de Nessler, nos pontos de 2, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação. Os dados foram comparados com um controle (enzima na mesma concentração sem soro humano) e com a enzima comercial de *E. coli* Leuginase® nas mesmas condições (com e sem soro humano).

3.7.4 Glicosilação

Para analisar a presença de glicosilação, foram adicionados 1 µL de solução de SDS 5% e 1 µL de DTT 1 M à 12 µL da enzima purificada e incubados por 5 minutos à 95°C. Deixou-se esfriar a amostra à temperatura ambiente e adicionou-se 2 µL de tampão fosfato sódico 0,5 M pH 7,5, 2 µL de Triton X-100 10% e 2 µL de PNGase F (300UI/mL da Sigma-Aldrich®). Essa solução foi incubada à 37°C *overnight*. Uma solução controle foi feita nas mesmas condições com exceção da adição da PNGase F. O procedimento foi analisado por SDS-PAGE e comparado a migração no gel da amostra com o controle.

A análise da glicosilação também foi feita por protocolo de eletroforese em gel de poliacrilamida sem desnaturação. Uma quantidade suficiente de

ScASNasell (30 μg) foi incubada *overnight* a 37°C com 1 unidade de PNGase F (Sigma-Aldrich) em 50 mM de bicarbonato de amônio pH 7,8 no volume final de 20 μL . Um controle foi estabelecido sem a adição de PNGase F. A solução foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida nativo (Gel empacotador: 0,1 M Tris-HCl pH 6,8; acrilamida/bis-acrilamida 4%; 50 μL PSA 10%; 10 μL TEMED; Gel de separação: 0,5 M tris-HCl pH 8,8; acrilamida/Bis-acrilamida 12%; 50 μL PSA 10%; 10 μL TEMED; Tampão de corrida Tris-glicina: 25mM Tris-base; 200mM glicina; 1% SDS. Volume final = 6 mL), adaptado de KURIEN; SCOFIELD, 2012. Após a eletroforese, o gel foi incubado com 20 mL de 50 mM Asn e 0.5 M hidroxilamina pH 7 por 30 minutos, e em seguida lavado com água e incubado por alguns segundos à minutos com 10 mL de reagente férrico (10% (m/v) FeCl_3 , 5% (m/v) TCA e 0,66 M HCl). As bandas contendo atividade asparaginásica obtêm uma coloração alaranjada (denominado Zimograma). O gel foi lavado novamente com água e incubado com *Coomassie Blue R-250* (Bio-Rad®, California, USA) por 20 minutos (denominado PAGE-Nativo Azul).

Uma alíquota da reação foi usada para medir a atividade específica da ScASNasell glicosilada e após a remoção da glicosilação foram medidas pelo método do reagente de Nessler.

3.7.5 Cinética enzimática da ScASNasell

Os parâmetros cinéticos da ScASNasell foram medidos pelo método descrito e adaptado de RIGOUIN et al., 2017. Uma concentração fixa de 50 nM de ScASNasell foi incubada a 37°C com 0,4 mM α -cetogluturato, 0,13 mM β -dinucleótido de nicotinamida e adenina (β -NADH), 0,5 U malato desidrogenase (MDH) e Transaminase glutâmico-oxalacética (GOT). Nessa reação, a concentração de Asn varia em uma faixa de 0 a 2,5 mM.

A hidrólise da Asn libera ácido aspártico que é usado com α -cetogluturato para formar oxaloacetato e ácido glutâmico na presença de GOT. Em seguida o oxaloacetato em conjunto com β -NADH é transformado a malato e NAD⁺ na presença de MDH. A oxidação do β -NADH é medida continuamente no comprimento de onda de 340 nm e o coeficiente molar usado foi $6,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 340 nm.

3.7.6 Citotoxicidade da ScASNasell contra MOLT-4

A linhagem celular de LLA MOLT-4 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ/Brasil). As células foram incubadas a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) suplementado com 10% soro fetal bovino, 2,5 g/L de glicose, 10 mM HEPES e 1 mM piruvato de sódio (instruções do banco de células), até atingir confluência. As células foram centrifugadas a 200 g por 10 minutos e ressuspensa em 1 mL do mesmo meio. Para contagem de células, 10 µL dessa suspensão de células foram adicionados a 90 µL de azul de tripano 0,1%, e 10 µL dessa solução foram transferidos para uma Câmara de Neubauer e a concentração celular dessa suspensão foi definida. 5 x 10³ células foram incubadas em uma placa de 96 poços com 0, 0,01, 0,03, 0,05, 0,1, 0,5 e 1 UI/mL de ScASNasell no volume final de 150 µL. Como controle, as células foram incubadas com o veículo da enzima (50 mM Tris-HCl pH 7,4), ou somente com o meio de cultura. A incubação foi mantida por 72 horas e foi adicionado brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983) para uma concentração final de 0,5 mg/mL. A placa com MTT foi incubada a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ por 3 horas. A placa foi centrifugada a 2500 g por 10 minutos para precipitação dos cristais de formazan e o sobrenadante cuidadosamente descartado. Para solubilizar os cristais, 200 µL de dimetilsulfóxido foi adicionado e a placa foi gentilmente homogeneizada por 15 minutos. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 570 nm no leitor de placas SpectraMax Microplate Reader. A viabilidade celular dos tratamentos foi comparada com o controle com o tratamento com o tampão (cuja viabilidade nesse caso foi considerada 100%).

3.8 Análise estatística

Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram mostrados como média ± desvio padrão (DP). Análises estatísticas foram auxiliadas pelo programa Prism 5 (GraphPad Software).

4. RESULTADOS

4.1 Amplificação dos fragmentos para construção do vetor de expressão.

Os fragmentos foram individualmente amplificados numa série de reações de PCR descritos na metodologia. Inicialmente obteve-se o plasmídeo pJAG-s1 (4569 pb) linearizado com as regiões de anelamento para as sequências de sinalização da proteína α -amilase (denominado pJAG_alfa) ou fosfatase ácida (denominado pJAG_PHO1) (Figura 6). Os primers desenhados, além de adicionarem regiões que anelam com a sequência sinalizadora e com o gene *ASP3*, removem a sequência sinalizadora α MF já contida no plasmídeo pJAG-s1 (Anexo V). Dessa forma, o plasmídeo passa de 4833 pb para 4569 pb.

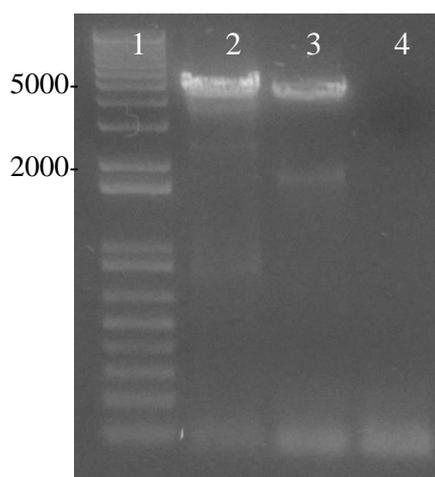


Figura 6: Obtenção do vetor pJAG com pontas para anelamento com as sequências sinalizadoras e o gene *ASP3*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1: Padrão de massa 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™). 2-3: amplificação pJAG_alfa e pJAG_PHO1 respectivamente. 4: controle negativo da reação (sem adição de molde de DNA).

Posteriormente, as sequências sinalizadoras foram amplificadas como descrito na metodologia e denominadas alfa (Figura 7A) e *PHO1* (Figura 7B). Foram testadas duas concentrações do material genômico para a *PHO1* (uma sem diluição e a outra diluída 10x) para conseguir amplificar corretamente.

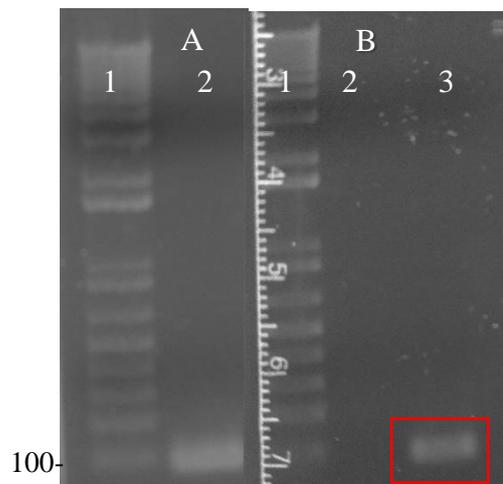


Figura 7: Obtenção das sequências sinalizadoras para secreção de proteína. (A) Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, **1:** Padrão de massa molecular 1 kb plus DNA ladder. **2:** amplificação alfa. **(B)** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **1:** Padrão de massa 1kb plus DNA ladder. **2:** amplificação *PHO1* usando o material genômico sem diluição. **3ª** raia: amplificação *PHO1* usando o material genômico 10x diluído.

O gene *ASP3* foi amplificado do plasmídeo pUC-57 sintetizado pela GenScript® com os iniciadores específicos para cada sequência, denominados *ASP3_alfa* e *ASP3_PHO1* (Figura 8). Os iniciadores foram desenhados tanto para anelar com a sequência sinalizadora, quanto para remover a sequência sinalizadora endógena do gene *ASP3*, que corresponde aos aminoácidos 1 a 25 (KIM *et al.* 1988).

Para fundir a sequência sinalizadora com o gene, os produtos de PCR foram purificados do gel e uma segunda reação de PCR foi feita como descrita na metodologia. Essa amplificação foi denominada *ASP3+alfa* e *ASP3+PHO1* (Figura 8), sendo o tamanho esperado, uma amplificação ligeiramente maior que o gene sem a sequência.

Por fim, a reação de PCR de fusão do vetor pJAG_alfa com o gene *ASP3+alfa* e pJAG_ *PHO1* com *ASP3+PHO1* foi realizada, porém os produtos dessa reação são de difícil visualização no gel de agarose. O tamanho previsto do vetor construído é 5615 pb para a construção pJAG+alfa+*ASP3* e 5621 pb para a construção pJAG+*PHO1*+*ASP3*. Cada construção após a fusão por PCR foi diretamente transformada em *E. coli* DH5 α eletrocompetente.

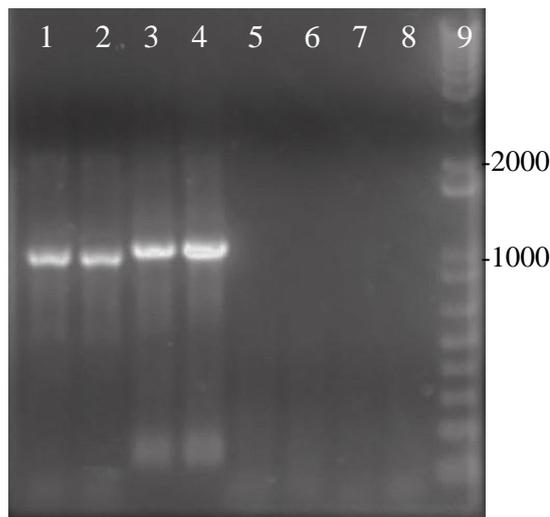


Figura 8: Obtenção do gene ASP3 e sua fusão com as sequências sinalizadoras. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, **1-2:** gene *ASP3_alfa* (com pontas prontas para fusão com a sequência sinalizadora de secreção alfa amilase) e *ASP3_PHO1* (com pontas prontas para fusão com a sequência sinalizadora de secreção da fosfatase ácida), respectivamente; **3-4:** fusão *ASP3+alfa* e *ASP3+PHO1* respectivamente, note um aumento na massa do material genético. **5-6:** controle negativo da reação da *ASP3_alfa* e *ASP3_PHO1* respectivamente; **7-8:** controle negativo da reação de fusão da *ASP3+alfa* e *ASP3+PHO1*; **9:** Padrão de massa 1kb plus DNA ladder.

Aleatoriamente, dez transformantes de cada construção foram selecionados e triados usando PCR de colônia. O tamanho esperado da amplificação é de 1280 pb (1014 do gene + 60 da sequência sinalizadora alfa + 206 de amplificação extra pelos iniciadores flanqueadores ao sítio de clonagem do vetor: iniciadores pJAGintFW e pJAG-s1RV, utilizados para o sequenciamento) para a construção pJAG+alfa+ASP3 e 1286 pb (1014 do gene + 66 da sequência sinalizadora PHO + 206 de amplificação extra pelos iniciadores flanqueadores) para a construção pJAG+PHO1+ASP3. Apenas duas colônias (Figura 9A) da construção pJAG+alfa+ASP3 resultaram em sinal positivo, e nove colônias (Figura 9B) da construção pJAG+PHO1+ASP3 resultaram em sinal positivo. Apenas a colônia da raia 11 (Figura 9B) não apresentou o sinal desejado. O controle positivo da reação de PCR é o molde pJAG-s1 sem modificações, apresentando amplificação prevista de 500 pb (região flanqueadora do pJAG-s1 (200pb) + α MF (300pb)).

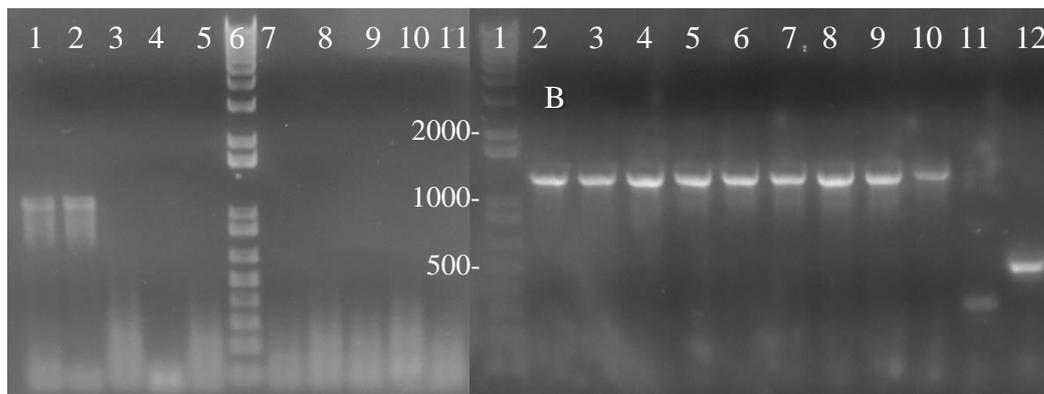


Figura 9: Obtenção final dos vetores de expressão. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **(A)** 1-5, 7-11: PCR de colônia da construção pJAG+alfa+ASP3; 6: padrão de massa 1kb plus DNA ladder. **(B)** 1: padrão de massa molecular 1kb plus DNA ladder; 2-11: PCR de colônia da construção pJAG+PHO1+ASP3; 12: controle positivo da reação de PCR.

Para avaliar a inserção correta e sem mutação do gene com as sequências sinalizadoras no vetor pJAG-s1, foi realizado o sequenciamento o DNA plasmidial extraído das duas colônias com sinal positivo da construção pJAG+alfa+ASP3 e das nove colônias com sinal positivo da construção pJAG+PHO1+ASP3. Apenas 1 das colônias com sinal positivo da pJAG+alfa+ASP3 apresentou a sequência correta (Figura 10), a segunda colônia apresentou uma mutação de adição trocando o quadro aberto de leitura, o que inviabiliza a produção da proteína. Não foi possível verificar a sequência correta de 1 das 9 colônias, pois o cromatograma do sequenciamento teve sinal fraco. 8 colônias da construção pJAG+PHO1+ASP3 apresentaram o gene fusionado à sequência sinal da forma correta e não apresentaram mutação. Os iniciadores foram desenhados para remover a sequência α MF (Anexo V) presente no pJAG-s1; como vemos no sequenciamento (Figura 10A e 10B), não há presença da sequência α MF, que teoricamente estaria na porção anterior ao ATG; comparando com a sequência no Anexo V, vemos que a sequência codificadora da α MF foi retirada.

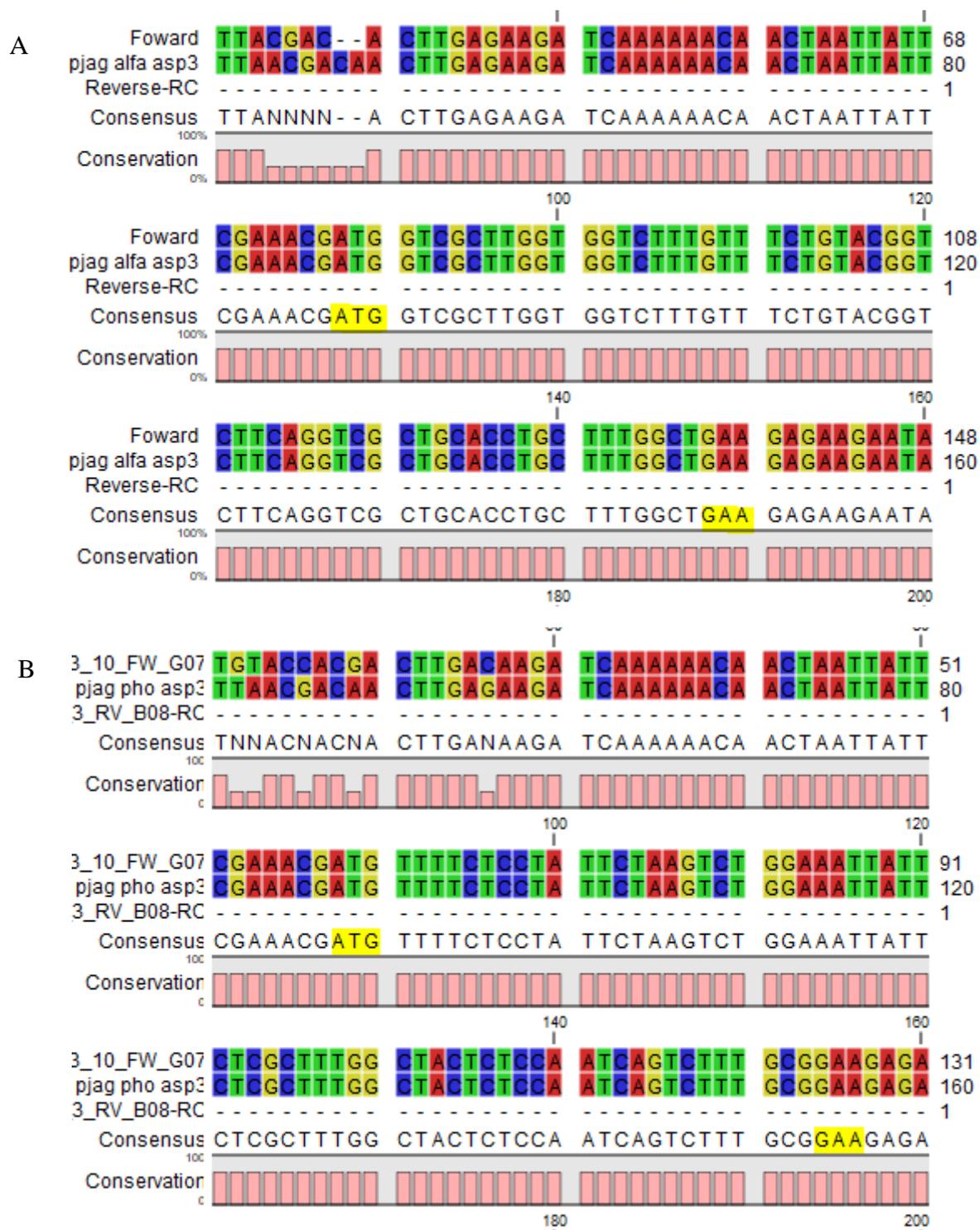


Figura 10: Sequenciamento de uma amostra com sinal positivo da construção pJAG+alfa+ASP3 (A) e da construção pJAG+PHO1+ASP3 (B). O ATG grifado é o início da tradução da sequência (correspondente às sequências sinais) e o GAA é o início do gene ASP3 sem a sequência endógena de secreção.

4.2 Transformação em *P. pastoris* GlycoSwitch pep4- sub2-

Um clone de cada plasmídeo de expressão construído corretamente foi incubado em LB e o plasmídeo extraído, linearizado e inserido na *P. pastoris* GlycoSwitch pep4- sub2- da forma descrita na metodologia.

Seis colônias aleatórias da transformação de *P. pastoris* com a construção pJAG+alfa+ASP3 foram selecionadas do centro da placa e crescidas em YPD com G418 1 mg/mL e o DNA genômico extraído e triado para avaliar a incorporação do vetor no material genômico (Figura 11).

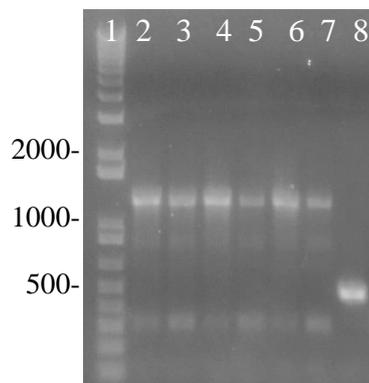


Figura 11: Obtenção do clone de *P. pastoris* com o gene ASP3+alpha inserido no genoma. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **1:** padrão de massa 1 kb plus DNA ladder. **2-3:** triagem da colônia 1, material genômico diluído 10x e 100x respectivamente. **4-5:** triagem da colônia 2, material genômico diluído 10x e 100x respectivamente. **6-7:** triagem da colônia 3, material genômico diluído 10x e 100x respectivamente. **8:** controle positivo da reação de PCR com plasmídeo vazio não integrado como molde de DNA.

As três colônias de levedura foram incubadas para a indução da proteína, uma delas não cresceu e foi descartada. As outras duas tiveram a atividade extracelular analisada por hidroxilamina.

As colônias transformadas da construção pJAG+PHO1+ASP3 foram incubadas com diferentes concentrações de G418 entre 0,8, 1, 2, 3, 4 e 5 mg/mL. Todas as colônias cresceram nas diferentes concentrações de antibiótico. Foi selecionada uma colônia aleatoriamente para analisar por PCR o material genético (Figura 12). O sinal da reação foi positivo, portanto, esse clone foi escolhido para a indução.

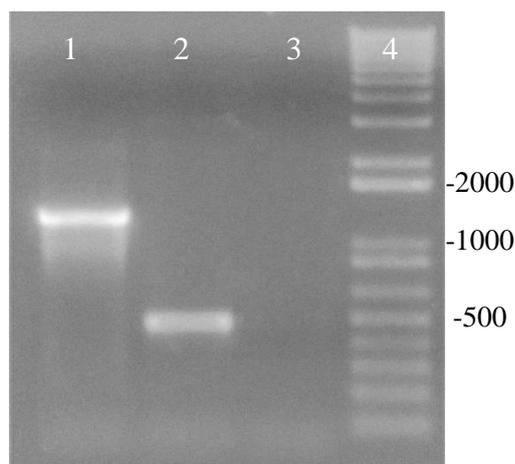


Figura 12: Obtenção do clone de *P. pastoris* com o gene *ASP3+PHO1* inserido no genoma. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **1:** triagem da colônia; **2:** controle da reação (vetor vazio). **3:** controle negativo. **4:** padrão de massa 1 kb plus DNA ladder.

4.3 Indução e análise do tempo e concentração de metanol

Os clones 1 e 3 com a construção pJAG+alfa+ASP3 e o clone 29 com a construção pJAG+PHO1+ASP3 foram incubadas com BMGY até chegarem à uma $DO_{600} \sim 20$. Em seguida a indução foi realizada. O meio extracelular foi analisado quanto à atividade asparaginásica pelo método de hidroxilamina e quanto à concentração de proteína dosada pelo método de Bradford.

Os dados da figura 13 mostram que conforme a indução ocorre, há uma perda de atividade da enzima. Para os próximos passos, era necessário escolher um dos clones contendo a sequência de sinalização da α -amilase, dessa forma, os cultivos com maior atividade (cultivo com 1,5% de metanol para o clone 1 e 1% de metanol para o clone 3) foram analisados referente à significância estatística (Figura 14). Para uma indução de 48 horas, não há diferença estatística significativa, e como o intuito era diminuir o tempo de indução, qualquer um dos clones poderia ser usado nos estudos, apesar do clone 1 apresentar uma maior atividade específica significativa no cultivo de 72 horas ($p < 0,01$). Foi escolhida o clone 3 por necessitar de uma menor quantidade de metanol (mais seguro) para a mesma atividade que o clone 1. Para o clone contendo a sequência de sinalização PHO1, foi escolhida a indução com 1,5% de metanol por 48h por apresentar maior estabilidade em comparação à indução com 0,5% de metanol.

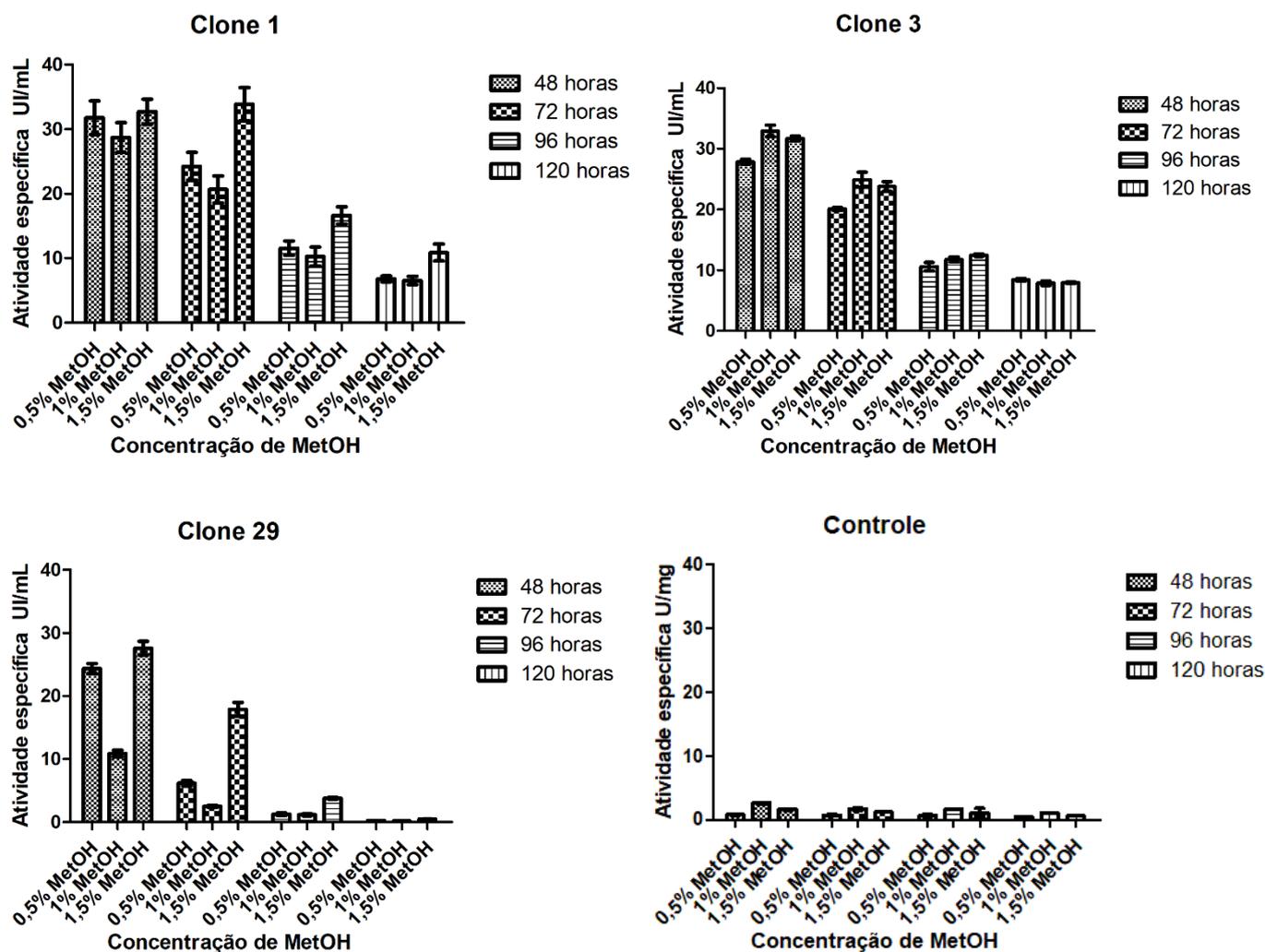


Figura 13: Atividade específica aparente medida do meio extracelular dos clones 1, 3, 29 e controle (*P. pastoris GlycoSwitch pep4- sub2-* com o vetor pJAG-s1 sem inserto) em diferentes tempos com diferentes concentrações de metanol.

O objetivo desse trabalho é obter e caracterizar a enzima L-asparaginase II de *S. cerevisiae* com glicosilação humanizada, por esse motivo não foi feito um estudo muito profundo do melhor clone que produz mais asparaginase, apenas a que produz de forma suficiente para dar continuidade ao projeto.

Atividade asparaginásica no sobrenadante

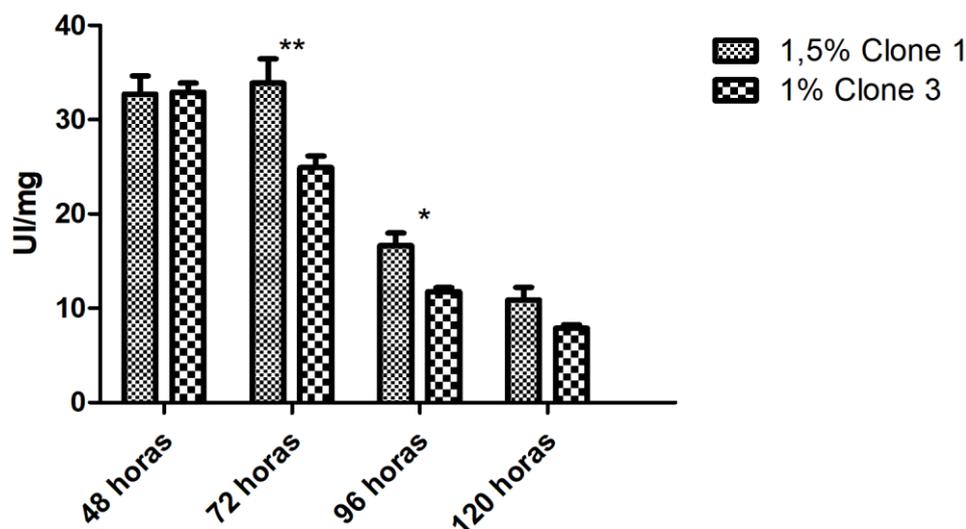


Figura 14: Atividade asparaginásica no sobrenadante dos clones 1 e 3 (ASP3+alfa) nas concentrações de metanol 1,5% e 1% respectivamente, por um período de até 120 horas. Eixo Y é a atividade específica medida no sobrenadante. Não há diferença estatística na indução de até 48 horas. Apesar do clone 1 apresentar maior atividade específica significativa em 72 horas de cultivo, o intuito é diminuir o tempo de indução, portanto os dois clones em 48 horas são estatisticamente iguais. As barras no gráfico representam média±DP (n=3). Análise estatística feita por *two-way ANOVA*, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4 Purificação

Para obter maior quantidade de proteína para análises bioquímicas, o cultivo foi aumentado de 5 mL para 500 mL. A DO_{600} no momento da troca de meio (BMGY para BMMY) foi de 31 para o clone 3 e 31,2 para o clone 29. No momento da coleta do meio extracelular, a DO_{600} era de 41,2 para o clone 3 e 41,6 para o clone 29. O crescimento durante a indução é previsto pelo protocolo de indução.

Esses 500 mL de meio extracelular do cultivo após a indução foram purificados de acordo com protocolo descrito na metodologia.

A troca de tampão por ultrafiltração se fez necessária para reduzir a concentração de sulfato de amônio e fosfato de potássio no meio, pois eles interferem na etapa que envolve a coluna de troca aniônica HiTrap™ DEAE FF.

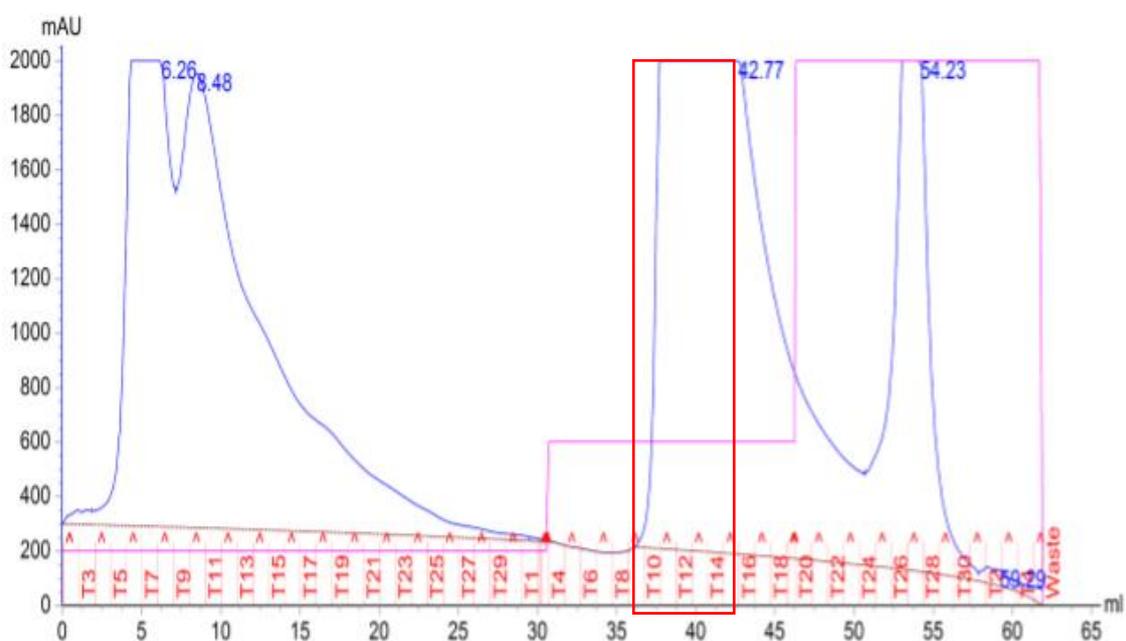


Figura 15: Cromatograma da purificação da amostra do clone 3 pela coluna cromatográfica HiTrap™ DEAE FF. As frações destacadas pelo retângulo apresentam atividade asparaginásica. O eixo Y é a absorvância em UV, e o eixo X é o volume de eluição da coluna. Os picos estão cortados por terem alcançado a absorvância máxima do equipamento.

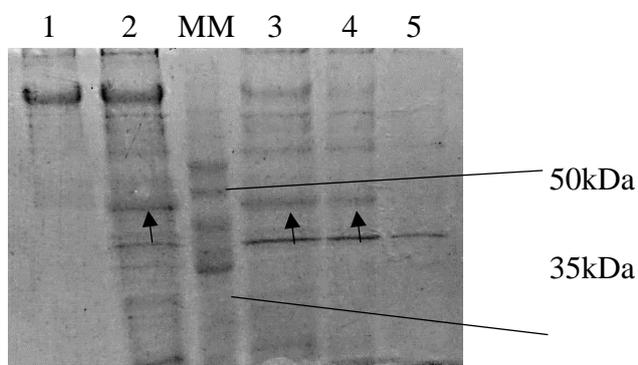


Figura 16: Análise por SDS-PAGE das frações da troca aniônica com atividade asparaginásica do clone 3. MM: padrão de massa molecular de proteínas Recombinant Molecular Weight Marker M0671 da Sigma®. 1-5: Frações com atividade asparaginásica, as flechas representam a banda referente ao monômero da ScASNase II. As frações com atividade asparaginásica continuam com uma alta contaminação por proteínas.

4.4.1 Purificação da enzima do clone 3

As frações representadas no retângulo (Figura 15) tinham atividade asparaginásica, e ao verificar essas amostras por SDS-PAGE (Figura 16), permaneciam com alto grau de impurezas. Portanto, as frações apontadas nas setas (Figura 16) foram juntadas e concentradas para a etapa de purificação por exclusão molecular (Figura 17). Essa etapa foi capaz de purificar a enzima em um grau aceitável para os testes bioquímicos preliminares, pelo que revela o SDS-PAGE (Figura 18).

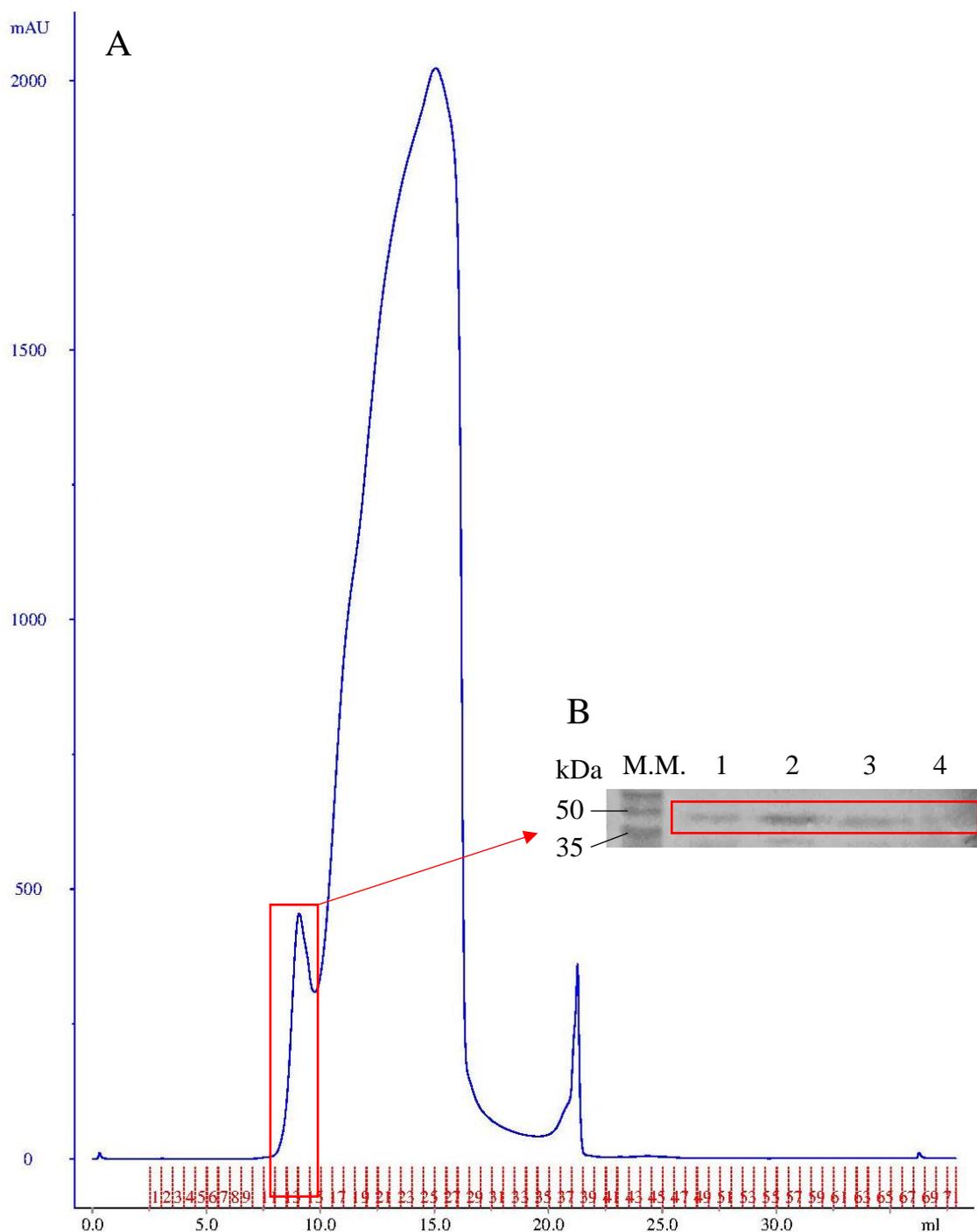


Figura 17: Cromatograma da exclusão molecular pela coluna Superdex™ 200 Increase 10/300 GL da amostra do clone 3 e SDS-PAGE das frações com atividade asparaginásica da exclusão molecular. (A) O retângulo vermelho contém as frações com atividade asparaginásica. O eixo Y é a absorbância em UV (mAU) e o eixo X é o volume de eluição em mL. **(B)** MM: padrão de massa molecular de proteínas Recombinant Molecular Weight Marker M0671 da Sigma®. **1-4:** Frações com atividade asparaginásica, o retângulo vermelho representa a banda referente ao monômero da ScASNasell. As frações com atividade asparaginásica estão com um grau aceitável de pureza para os testes bioquímicos.

4.4.2 Purificação da enzima do clone 29

Após a troca aniônica pela coluna HiTrap™ DEAE FF (Figura 18), as frações com atividade asparaginásica foram reveladas por SDS-PAGE (Figura 19). Com apenas um passo cromatográfico foi possível purificar essa enzima de proteínas contaminantes. Porém, a solução se manteve com uma coloração marrom; dessa forma, ainda assim foi aplicada a cromatografia por exclusão molecular. As frações com atividade asparaginásica foram concentradas e aplicadas na coluna Superdex™ 200 Increase 10/300 GL (Figura 20). Nesse ponto, não foi feito um SDS-PAGE por não ser necessário, pois as frações aplicadas já apresentavam um alto grau de pureza.

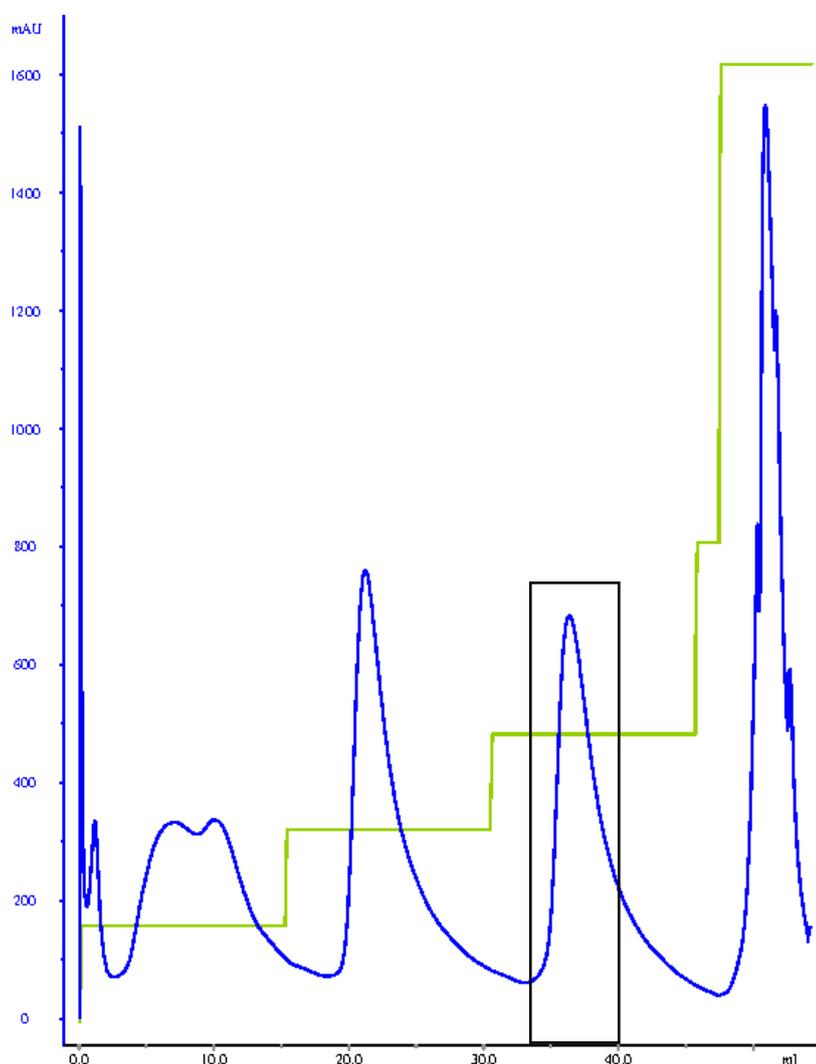


Figura 18: Cromatograma da troca aniônica pela coluna HiTrap™ DEAE FF da amostra do clone 29. O retângulo preto representa as frações com atividade asparaginásica. O eixo Y é a absorbância em UV (mAU) e a reta verde é a % de gradiente de NaCl, 30% representa 300 mM de NaCl.

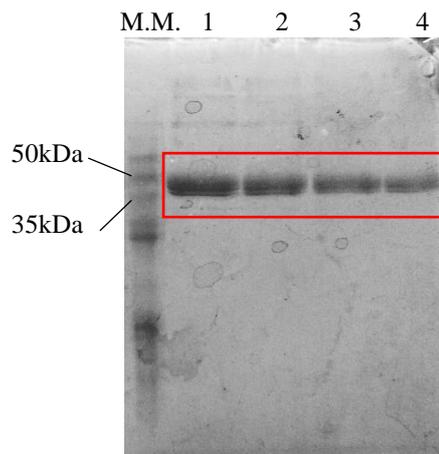


Figura 19: Análise por SDS-PAGE das frações com atividade asparaginásica da cromatografia por troca aniônica HiTrap™ DEAE FF. MM: padrão de massa molecular de proteínas Recombinant Molecular Weight Marker M0671 da Sigma®. **1-4:** Frações com atividade asparaginásica, o retângulo representa a banda referente ao monômero da ScASNasell. Com um passo cromatográfico, a ScASNasell do clone 29 foi purificada de outras proteínas contaminantes.

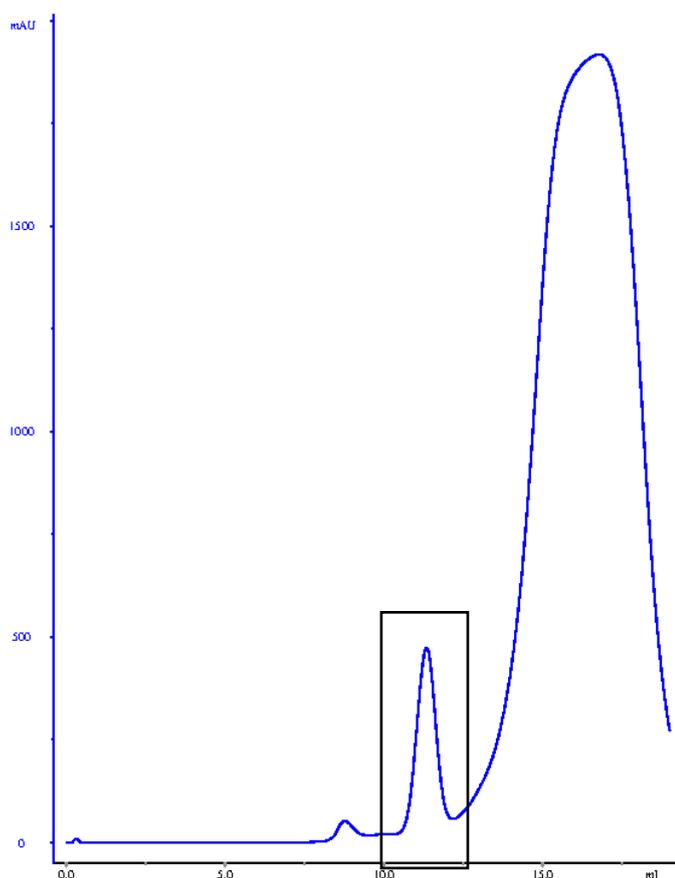


Figura 20: Cromatograma da exclusão molecular pela coluna Superdex™ 200 Increase 10/300 GL da amostra do clone 29. As frações com atividade asparaginásica estão representadas pelo retângulo preto. O eixo Y é a absorvância em UV (mAU) e o eixo X é o volume de eluição em mL.

4.5 Testes bioquímicos

A atividade específica da enzima do clone 3 foi de 123,87 UI/mg e do clone 29 foi de 311,15 UI/mg no pH 8,6 (Figura 21A e 21B). Nessas mesmas condições, a enzima comercial (Leuginase®) nativa de *E. coli* apresentou atividade específica de 133,21 UI/mg (Figura 21C). Comparando as enzimas obtidas com a comercial, a clone 3 produz uma enzima aproximadamente 7% menos ativa, enquanto que a clone 29 produz uma enzima aproximadamente 133% mais ativa.

A partir desse ponto, os testes bioquímicos foram realizados apenas para a ScASNaseII proveniente do clone 29, pois essa enzima apresentava maior atividade e rendimento na purificação comparada com a proveniente do clone 3.

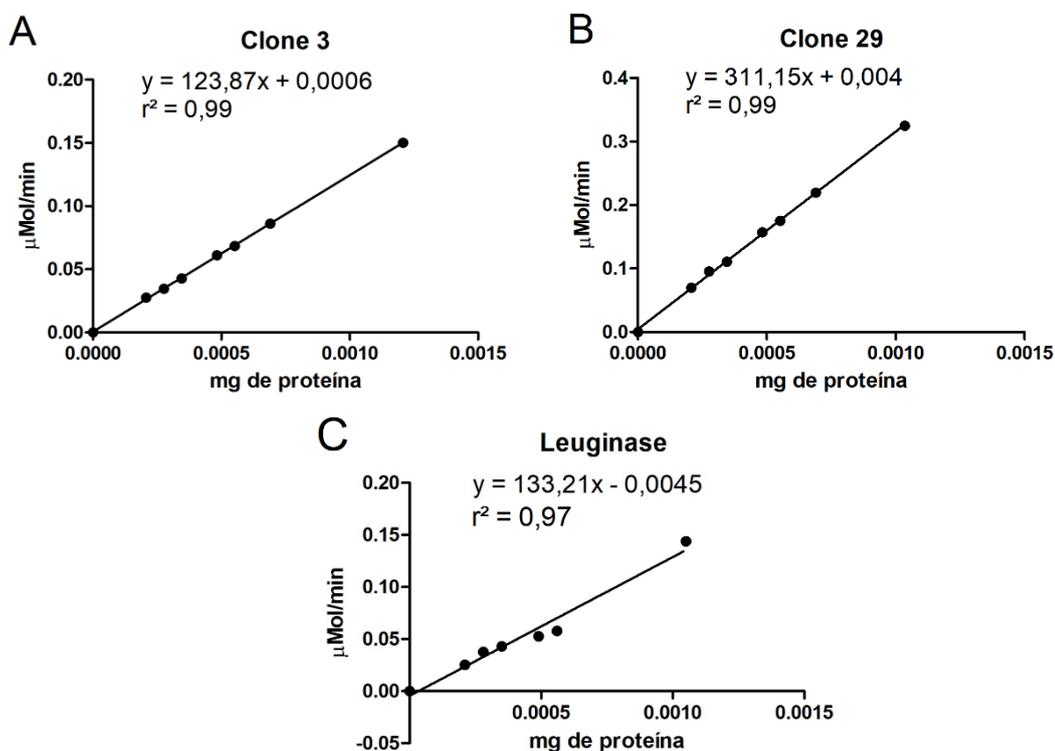


Figura 21: Atividade específica das enzimas purificadas do clone 3 e do clone 29 pelo método da hidroxiaminólise, em comparação com a Leuginase® nas mesmas condições. (A) Atividade específica da ScASNaseII purificada do clone 3. (B) Atividade específica da ScASNaseII purificada do clone 29. (C) Atividade específica da ScASNaseII da Leuginase®. Atividade específica medida pelo método da hidroxiaminólise no pH 8,6. A ScASNaseII do clone 29 apresenta uma atividade consideravelmente maior em comparação ao clone 3 e a Leuginase®. Pontos nos gráficos representam média \pm DP (n=3).

4.6 Testes bioquímicos da ScASNasell do clone 29

4.6.1 Atividade específica e pH ótimo

Devido à instabilidade da hidroxilamina em meio básico (constatado posteriormente), a atividade específica da ScASNasell foi medida novamente em pH fisiológico (pH 7,4). Nesse pH, a atividade específica fica em 218,2 UI/mg (Figura 22A). A atividade glutaminásica medida por esse mesmo método resultou em um valor de 6,78 UI/mg (Figura 22B), o que representa 3,1% da atividade asparaginásica da ScASNasell.

A atividade asparaginásica também foi medida pelo método de Nessler por ser indicado pelo FDA (ADMINISTRATION, 2013). Por esse método, a atividade asparaginásica da ScASNasell medida foi de 77,06 UI/mg (Figura 22C). Para fins de comparação, a atividade asparaginásica da Leuginase® (enzima de *E. coli* comercial no momento da análise) e da EcASNasell (obtida de forma recombinante internamente no laboratório) foram medidas também. Os valores obtidos foram 177.6 e 80.18 UI/mg, respectivamente (Figura 22D e 23E).

A atividade específica em diferentes pHs foi medida em diferentes tampões (pH 4 a 11) e com adição de 500 mM de NaCl para eliminar o efeito eletroestático que pode interferir na atividade. Dessa forma, os dados obtidos estão representados em uma curva de pH x atividade específica (Figura 22F). O pH ótimo obtido foi 6, com atividade específica de 81,81 UI/mg.

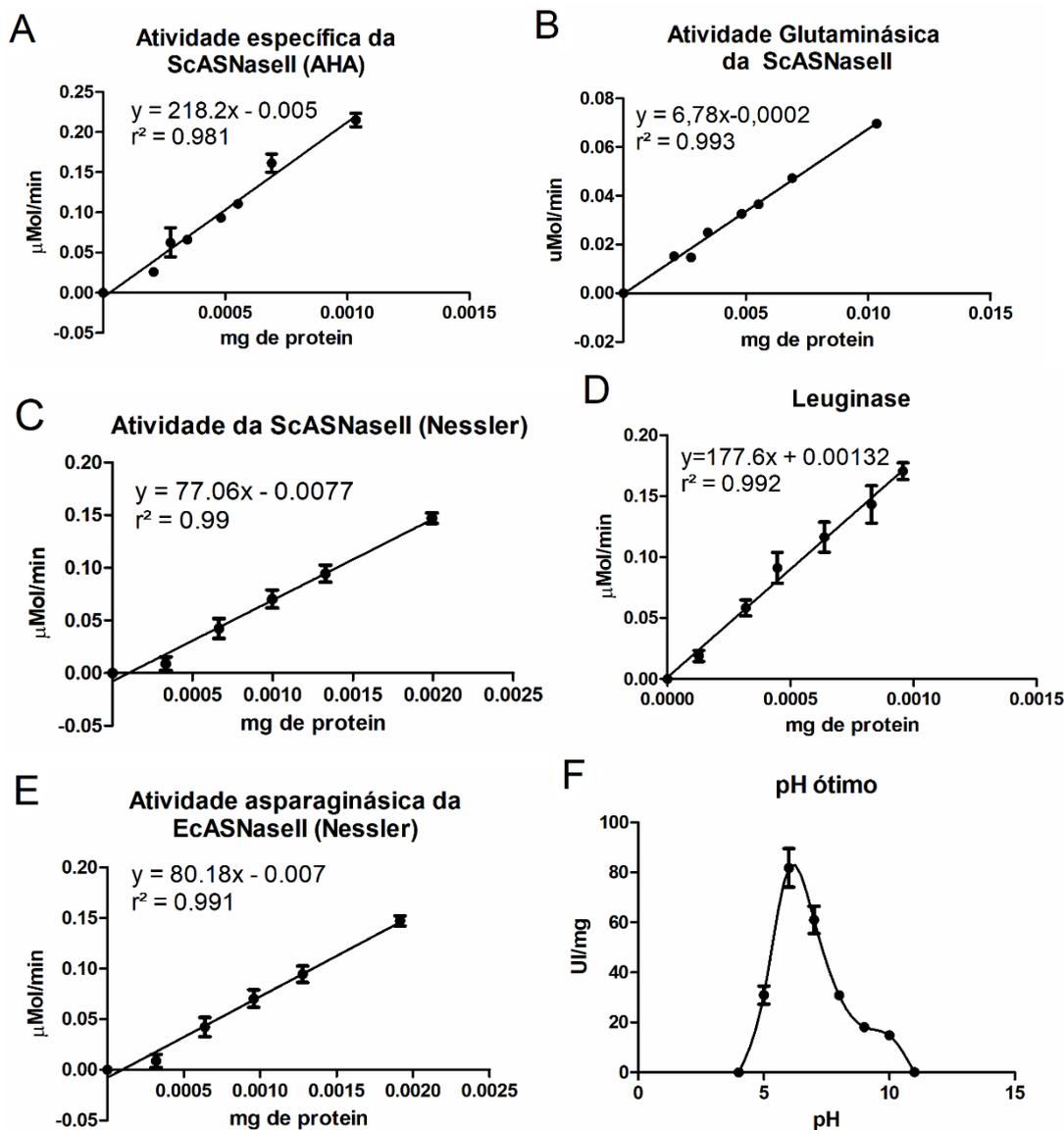


Figura 22: Parâmetros bioquímicos da ScASNaseII, EcASNaseII e Leuginase® (A) Atividade específica da ScASNaseII para hidrólise da Asn, gráfico da velocidade inicial de hidrólise por miligrama de ScASNaseII, medida pelo método da hidroxilaminólise. **(B)** Atividade específica da ScASNaseII para hidrólise da glutamina medida pelo método da hidroxilaminólise. **(C)** Atividade específica da ScASNaseII para hidrólise de Asn: medida pelo reagente de Nessler. **(D)** Atividade específica da Leuginase® para hidrólise de Asn, medida pelo reagente de Nessler. **(E)** Atividade específica da EcASNaseII para hidrólise da Asn, medida pelo reagente de Nessler. **(F)** Efeito de diferentes pHs na atividade específica da ScASNaseII para hidrólise de Asn: tampões citrato pH 4 e 5; fosfato de potássio 6, 7 e 8; Tris-HCl pH 9; bicarbonato de sódio pH 10 e 11. A enzima apresentou atividade mensurável na faixa de pH 5 a 10. Em adição aos tampões, 500 mM de NaCl foram usados para eliminar a diferença eletroestática. Todos os pontos no gráfico representam média \pm DP (n=3).

4.6.2 Estabilidade no soro humano

ScASNasell foi incubada à 37°C com 10% de soro humano e a estabilidade foi medida com a atividade específica nos pontos de 2, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação. A enzima comercial Leuginase® também foi incubada nas mesmas condições para fim de comparação das estabilidades. Os dados obtidos estão representados em porcentagem de atividade, sendo o primeiro valor obtido (0 horas, antes da incubação) 100%. (Figura 23). A ScASNasell manteve 98,24%±2.36 da atividade específica quando incubada com 10% de soro humano por 120 horas à 37°C. A Leuginase® manteve apenas 60,45%±3,15 da atividade inicial nas mesmas condições. No controle (50 mM Tris-HCl pH 7.4), a ScASNasell manteve 90,45%±2.54 da atividade inicial, enquanto a Leuginase® manteve apenas 40,52%±4,25 da atividade específica inicial.

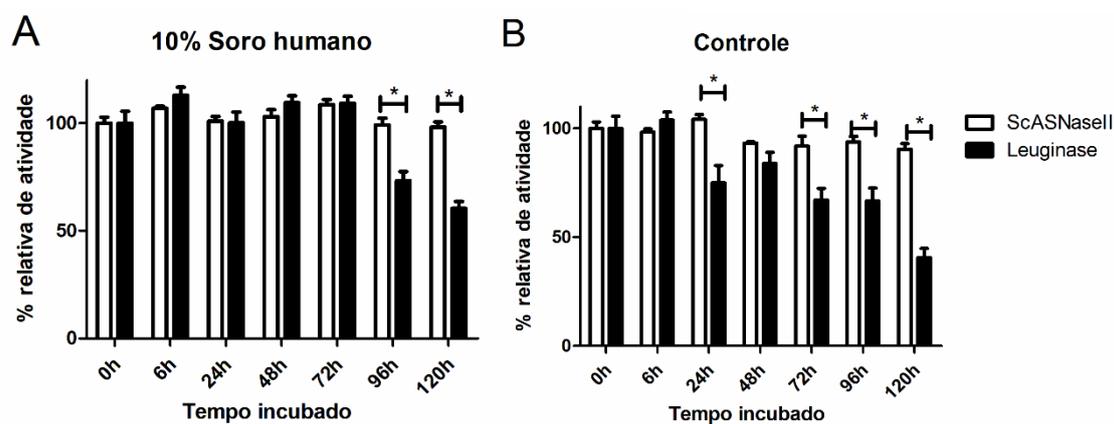
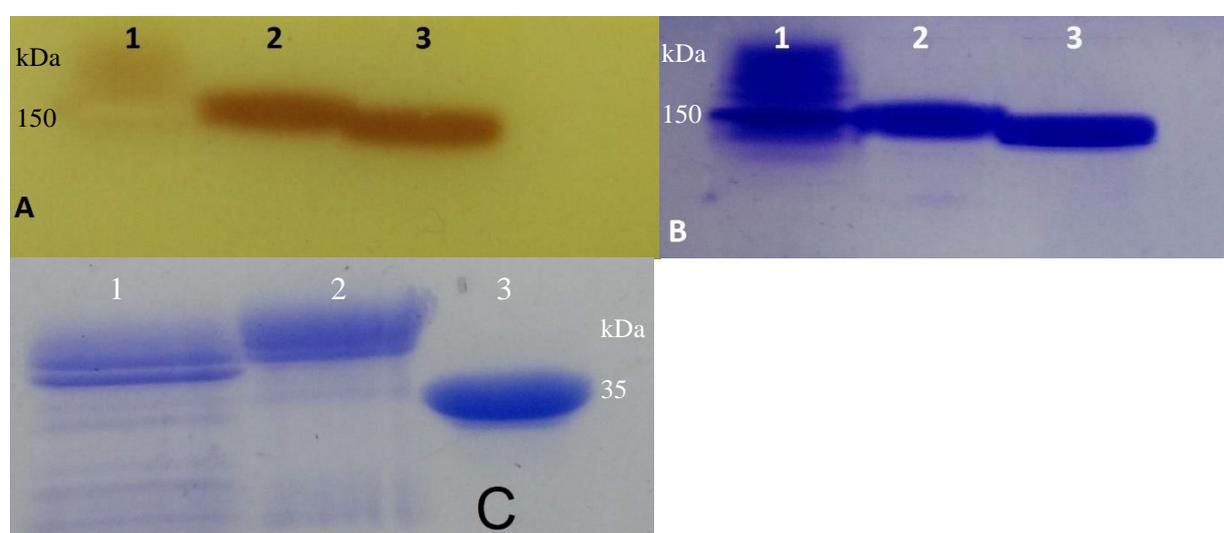


Figura 23: Estabilidade da ScASNasell em comparação com Leuginase® em (A) 10% soro humano e (B) 50 mM Tris-HCl pH 7,4 (controle) a 37°C por até 120 horas de incubação. Eixo Y é a porcentagem de atividade relativa à atividade obtida no primeiro ponto (0 hora, 100%) e os valores subsequentes são calculados como porcentagem do primeiro dado obtido. A ScASNasell manteve 98,24%±2.36 da atividade específica após 120 horas de incubação à 37°C com 10% soro humano, enquanto que a Leuginase® manteve apenas 60,45%±3,15 da atividade inicial nas mesmas condições. No controle (50 mM Tris-HCl pH 7.4), a ScASNasell manteve 90,45%±2.54 da atividade inicial, enquanto a Leuginase® manteve apenas 40,52%±4,25 da atividade específica inicial. A atividade específica foi analisada pelo reagente de Nessler. As barras representam média±DP (n=3). Análise estatística medida por ANOVA two-way, *p<0,001.

4.6.3. Homogeneidade da glicosilação e efeito sobre a atividade específica

O zimograma, o gel nativo azul e o SDS-PAGE (Figura 24A, 24B e 24C respectivamente) revelam N-glicosilação homogênea, pois as bordas da proteína no gel estão bem definidas. Para comparação, a Leuginase® também foi aplicada no gel. A intensidade vermelha da banda no zimograma (Figura 24A) representa a quantidade de ácido β -hidroxiaspártico que reagiu com o ferro. Esse gel corrobora com os dados mostrados acima, que a ScASNasell tem maior atividade de hidroxiaminólise que a Leuginase®. A presença de glicosilação não interferiu na atividade específica da ScASNasell (Figura 24D).



Atividade da ScASNasell com e sem PNGase F

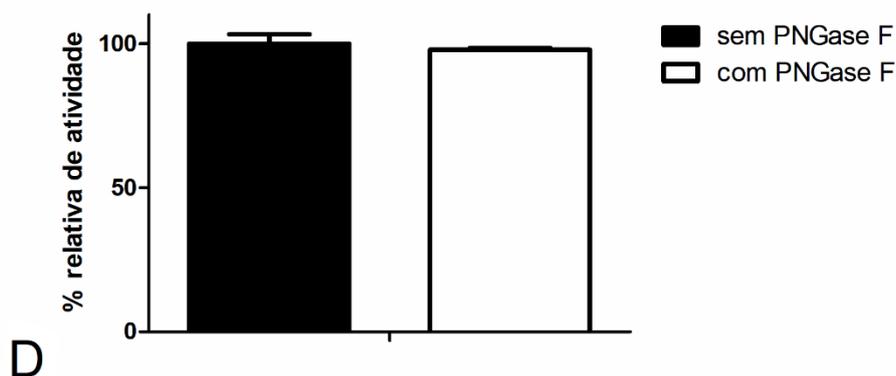


Figura 24: Atividade da ScASNasell, Gel Nativo e SDS-PAGE com e sem tratamento pela PNGase F. (A) Zimograma e **(B)** Gel Nativo azul. Em ordem: 1- Leuginase®; 2- ScASNasell sem adição de PNGase F; 3- ScASNasell com adição de PNGase F. Uma pequena mudança na migração da ScASNasell pode ser percebida, e a borda bem definida da banda define uma glicosilação homogênea. **(C)** SDS-PAGE da 1- ScASNase com adição de PNGase F, 2- ScASNasell sem adição de PNGase F e 3- Leuginase®. **(D)** Atividade específica da hidrólise da Asn pela ScASNasell depois do tratamento com PNGase F ou sem tratamento; atividade medida pelo reagente de Nessler. Eixo Y é atividade relativa em porcentagem, 100% significa a atividade antes dos dois tratamentos. As barras no gráfico representam media \pm DP (n=3).

4.6.4. Cinética enzimática

Os parâmetros cinéticos foram determinados pelo ensaio acoplado com NADH. Uma concentração fixa de ScASNasell foi incubada com diferentes concentrações de Asn. A velocidade inicial de hidrólise da Asn em função da concentração de Asn está representada no gráfico (Figura 25). Os parâmetros cinéticos foram analisados pelo software Prism 5 (GraphPad Software), e estão descritos na tabela 2. Com um K_m de $120,5 \pm 6,7 \mu\text{M}$ para Asn, a ScASNasell tem menor afinidade para Asn que a EcASNasell (COSTA et al., 2016). O número de renovação (k_{cat}) da ScASNasell foi $46,73 \pm 0,59 \text{ s}^{-1}$, e a eficiência catalítica foi $3,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros cinéticos da hidrólise de Asn da ScASNasell e EcASNasell.

	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) 1)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 1)
EcASNasell				
(COSTA et al., 2016)	23 ± 5	$0,032 \pm 0,00061$	134 ± 2	$5,8 \times 10^6$
ScASNasell	$120,5 \pm 6,7$	$0,051 \pm 0,00066$	$46,73 \pm 0,59$	$3,8 \times 10^5$

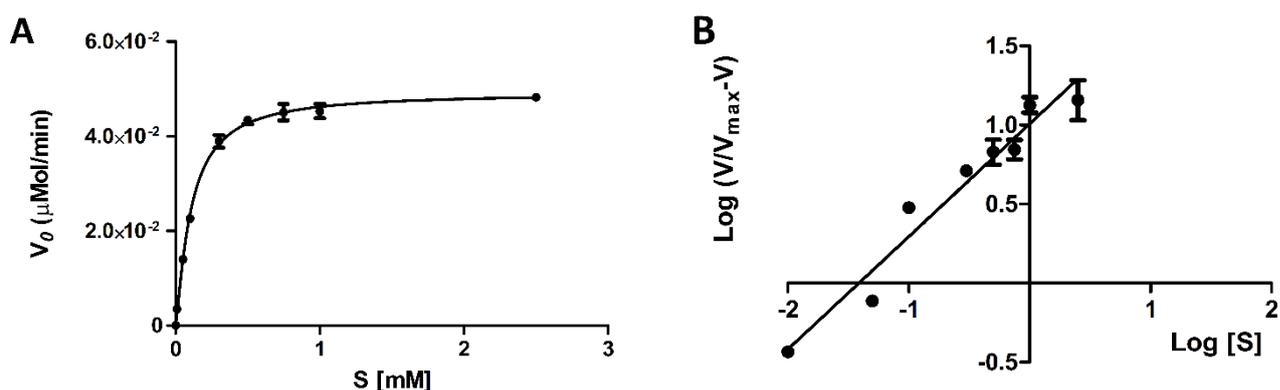


Figura 25: Perfil cinético da ScASNasell. (A) Perfil Michaelis-Menten da cinética da ScASNasell para hidrólise da Asn. **(B)** Lineweaver-Burke. Pontos no gráfico representam média \pm DP ($n=3$).

4.6.5. Citotoxicidade contra MOLT-4

O efeito citotóxico da ScASNasell foi medido incubando a linhagem celular de leucemia linfóide aguda MOLT-4 sensível à ASNase em uma faixa de concentração de 0 a 1 UI/mL. Um controle foi feito nas mesmas condições com adição da EcASNasell obtida no laboratório. Os dados da ScASNasell foram comparados com o controle para avaliar o efeito citotóxico. Depois de 72 horas de incubação, a viabilidade celular foi medida com MTT (Figura 26). A ScASNasell matou 50% das células viáveis na concentração de 0,9 UI/mL, enquanto que a EcASNasell obteve o mesmo resultado na concentração de 0,03 UI/mL.

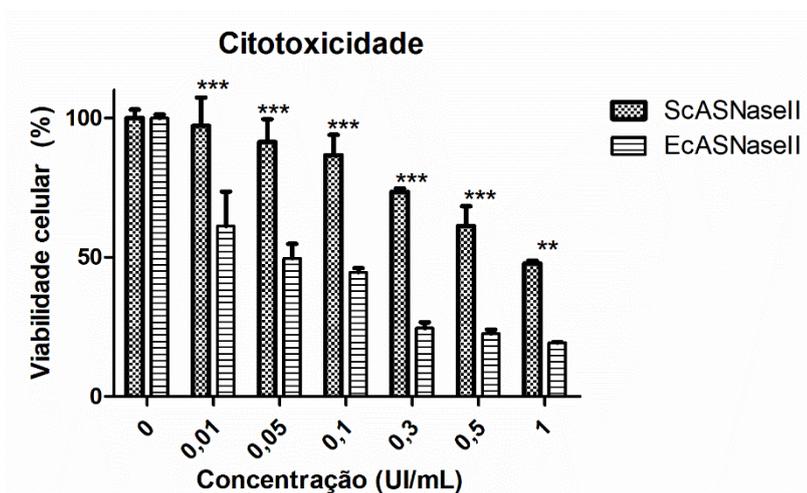


Figura 26: Viabilidade da linhagem celular de LLA MOLT-4 com tratamento com ScASNasell e EcASNasell em diferentes concentrações. Eixo X é a concentração de enzima aplicada no tratamento em UI/mL, eixo Y é a viabilidade celular em porcentagem do controle. IC₅₀ da ScASNasell = 0,9UI/mL e da EcASNasell = 0,03 UI/mL. As barras no gráfico representam média±DP (n=3). Análise estatística medida por *two-way* ANOVA, ***p<0,001; **p<0,01

5. DISCUSSÃO

A enzima ASNase tem sido usada como primeira linha de tratamento da LLA por sua capacidade de hidrolisar a Asn da corrente sanguínea, resultando na apoptose das células leucêmicas. Várias fontes de ASNase foram encontradas e estão sob estudos como um potencial biofármaco para tratar LLA (SOUZA et al., 2017; SHAKAMBARI; ASHOKKUMAR; VARALAKSHMI, 2018). Porém, em adição aos parâmetros bioquímicos, a complexidade do processo de obtenção da enzima é crucial para viabilização industrial.

Como proteína recombinante, há vários sistemas de expressão para atingir a forma proteica desejada, e pequenas alterações nesse sistema alteram o processo e o produto final como um todo. Como visto nesse trabalho, modificando apenas a sequência de secreção, conseguimos obter a enzima secretada no meio extracelular. Não há relatos precedentes para essa enzima secretada. Aplicando praticamente a mesma sequência primária da enzima e o mesmo sistema de expressão (com exceção de modificações genéticas e de outra sequência de sinalização), nós obtivemos a enzima no meio extracelular e com apenas um passo cromatográfico conseguimos purificá-la. A combinação da sequência de sinalização *PHO1* (clone 29) da *P. pastoris* e da cepa *P. pastoris Glycoswitch knockout* para os genes *pep4* e *sub2* permitiu a secreção da ScASNaseII para o meio extracelular e com uma alta atividade enzimática e melhores parâmetros cinéticos. Estudos anteriores (DUNLOP et al., 1978; DE CASTRO GIRÃO et al., 2016) obtiveram a ScASNaseII no periplasma, uma região Inter membranas. Essa diferença no local de obtenção da enzima pode ser crucial em um eventual *scale up* industrial, uma vez que a extração proteica do periplasma sofre de vários problemas como: perda de rendimento e atividade, degradação proteolítica, toxicidade dos agentes de extração e o monitoramento da remoção deles, dificuldade na implementação industrial e contaminação com proteína periplasmáticas (LEGOUX; MALDONADO; SALOME, 1997). A secreção da enzima no meio extracelular facilita a obtenção em escala industrial, uma vez que não precisa do rompimento celular.

O método de construção dos plasmídeos se demonstrou eficiente, possibilitando a construção de um vetor de expressão com mais alternativas em relação à metodologia dos plasmídeos comerciais. Diversas sequências puderam ser utilizadas, deletadas e fusionadas. Porém, a CPEC ainda é uma técnica que precisa ser otimizada para as sequências e genes utilizados. Foram encontrados alguns protocolos sobre a técnica, e não há um consenso da concentração dos componentes da reação, podendo variar desde uma proporção inserto vetor de 1:1 a uma proporção de 1:250 (QUAN; TIAN, 2011; BRYSKIN; MATSUMURA, 2010; SPELTZ; REGAN, 2013).

Inicialmente a construção com a sequência *PHO1* (clone 29) se demonstrou a menos promissora em pequena escala (Figura 13), por apresentar menor atividade específica no meio extracelular e menor estabilidade durante a indução. Porém, quando cultivada em volumes maiores (500 mL), ela se demonstrou mais fácil de ser obtida após as etapas de purificação, com maior produção, uma etapa a menos para obter fração pura e uma maior atividade específica. Dessa forma, os parâmetros bioquímicos, cinéticos e a citotoxicidade foram analisados apenas para a enzima ScASNaseII proveniente do clone 29.

A análise inicial da atividade específica da ScASNaseII tinha revelado um valor de 311,15 UI/mg pelo método da hidroxilaminólise. Porém, essa atividade foi medida em pH básico 8,6 e a hidroxilamina, um dos componentes da reação, é instável em pH básico (WEHNER et al., 1992). Portanto, uma nova medida foi realizada com pH fisiológico (7,4). Essa medida resultou em uma atividade específica de 218,2 UI/mg, a mesma atividade obtida em trabalhos prévios (DE CASTRO GIRÃO et al., 2016).

Para comparação, a atividade glutaminásica também foi medida pelo método da hidroxilaminólise, pois o método do reagente de Nessler não foi capaz de detectar a hidrólise da glutamina pela ação da ScASNaseII. Dessa forma, a atividade glutaminásica é 3,1% da atividade asparaginásica da ScASNaseII. Esse é um aspecto importante da ScASNaseII, de forma que a atividade glutaminásica pode ser a causa principal de hiperamonemia. As ASNases terapêuticas geralmente tem baixa afinidade para glutamina (SHAKAMBARI; ASHOKKUMAR; VARALAKSHMI, 2018; DARVISHI; FARAJI; SHAMSI, 2019). Porém, a concentração de glutamina no sangue é elevada, na

ordem milimolar de grandeza (RIFAI et al., 2010). Dessa forma, as ASNases mantem alta atividade de hidrólise da glutamina quando aplicado na corrente sanguínea. Porém a atividade glutaminásica não é só prejudicial, ela também é importante para a citotoxicidade das ASNases para linhagens celulares de LLA que apresentam alta expressão do gene *ASNS* (PARMENTIER et al., 2015).

Para fins terapêuticos, a atividade de hidrólise da Asn é o que deve ser medido. O método da hidroxilamina, que mede a hidroxilaminólise da Asn, é uma reação forçada por adição de excesso de hidroxilamina (DUNLOP; MEYER; ROON, 1980a). Isso não ocorre na corrente sanguínea. Esse método foi utilizado inicialmente para averiguar a presença de atividade asparaginásica no cultivo da *P. pastoris*, pois o meio continha 1% de sulfato de amônio, o que inviabiliza o teste pelo reagente de Nessler. Dessa forma, como é um biofármaco aplicado na corrente sanguínea, optamos por caracterizá-la pelo método do reagente Nessler, por medir a hidrólise da Asn e por ser recomendada pela FDA (ADMINISTRATION, 2013).

A atividade asparaginásica da ScASNaseII pelo método de reagente de Nessler foi a mesma que a atividade da EcASNaseII obtida internamente no laboratório (77,06 e 80,18 UI/mg respectivamente). Porém, foi menor que a atividade da Leuginase® (177,6 UI/mg). Embora a comparação com a enzima comercial seja necessária e apresente dados importantes, os biofármacos contêm aditivos na formulação que podem aumentar a atividade asparaginásica e a estabilidade da enzima. Isso já foi estudado em nosso grupo (WLODARCZYK et al., 2019), e esses aditivos podem dobrar a atividade enzimática. O pH ótimo da ScASNaseII medido pelo reagente de Nessler foi 6, diferente do relatado na literatura (DE CASTRO GIRÃO et al., 2016) de dois picos de atividade nos pH 7,2 e 9. O pH ótimo relatado na literatura foi medido pelo método da hidroxilaminólise, que como descrito acima possui um dos componentes instável em pH elevado; dessa forma, esse método pode não ser hábil para medir pH ótimo. Como mostrado nesse trabalho, a instabilidade da hidroxilamina em pH básico favorece a reação, o que não ocorre quando medido da mesma forma com o reagente de Nessler.

A ScASNasell manteve $98,2\% \pm 2,4$ de atividade mesmo depois de 120 horas de incubação com 10% de soro humano (obtido de forma comercial). A Leuginase® apresentou apenas $60,5\% \pm 3,2$ de sua atividade inicial após a mesma incubação. A estabilidade da ScASNasell também é maior em relação à Leuginase® quando incubada apenas com 50 mM Tris-HCl pH 7.4; a ScASNasell manteve $90,5\% \pm 2,5$ da atividade inicial, enquanto a Leuginase® manteve apenas $40,5\% \pm 4,3$. Isso é uma grande vantagem para a ScASNasell, pois dessa forma doses em uma frequência menor são necessárias para atingir o mesmo objetivo. Além do mais, a Leuginase® por ser um biofármaco formulado contém aditivos para estabilização, e a ScASNasell no teste não. Portanto, essa estabilidade poderia aumentar consideravelmente com aditivos.

O processo de glicosilação não interferiu na atividade da ScASNasell, isso significa que a cepa *P. pastoris Glycoswitch* utilizada como sistema de expressão nesse trabalho produziu um perfil de N-glicosilação que não interfere no sítio ativo da enzima. Na literatura isso não foi observado (DE CASTRO GIRÃO et al., 2016), o qual reportam maior atividade asparaginásica para ScASNasell depois de tratada com PNGase F. Isso pode ser devido ao fato de ter sido utilizada uma cepa de *P. pastoris* sem alterações genéticas no processo de glicosilação, e o perfil de glicosilação da *P. pastoris* sem modificação ainda adiciona alta quantidade de manose (KANG et al., 1998; THE; FONG; MOHAMED, 2011). O SDS-PAGE da ScASNasell com e sem PNGase F (Figura 24C) revelou duas bandas com N-glicosilação homogênea, de forma que com o tratamento com PNGase F, as duas bandas tiveram uma redução de tamanho e mantiveram as bordas bem definidas. Também é possível verificar que a banda superior apresenta um pequeno borrão que não sumiu com o tratamento com a PNGase F. Esse borrão possivelmente é o processo de O-glicosilação que na cepa utilizada não há modificações genéticas para humanização desse tipo de glicosilação.

O perfil cinético da ScASNasell foi caracterizado somente pelo trabalho de Dunlop, a qual sugeriu a ScASNasell como uma enzima com perfil cinético de Michaelis-Menten, com um K_m de 250 a 300 μM . Porém, eles obtiveram esse resultado depois de uma série de passos de purificação da enzima periplasmática endógena, com quantidade elevada e heterogênea de manose nos sítios de N-glicosilação, e ainda assim a enzima não estava pura. Esse é o

primeiro trabalho que reporta o perfil cinético da ScASNasell recombinante. Nossos dados revelam um K_m para Asn de 120,5 μM . Essa diferença se deve ao fato de a enzima desse trabalho estar pura e com uma glicosilação homogênea, como mostra o gel azul nativo e o zimograma.

Pelos nossos dados, a ScASNasell tem menor afinidade para Asn do que a EcASNasell e Erwinase (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Esse resultado pode ser explicado por dois fatores: (1) a ScASNasell difere de um aminoácido na sequência de reconhecimento da Asn (em verde, Figura 2) em relação à EcASNasell e Erwinase; (2) é possível que o sítio passível de N-glicosilação próximo ao sítio de reconhecimento da Asn esteja impedindo estericamente o reconhecimento da Asn. Esse último reforça a diferença entre a afinidade da ScASNasell obtida nesse trabalho com a enzima obtida por Dunlop em 78, pois eles obtiveram com uma alta quantidade de manose.

A afinidade para Asn é intrinsicamente relacionada ao efeito citotóxico da ASNase *in vivo* (ALI et al., 2016). Um k_m (afinidade para Asn) na ordem micromolar de grandeza é desejável, de forma que a concentração de Asn no sangue varia de 1 a 32 μM (RIFAI et al., 2010). Nós detectamos menor afinidade da ScASNasell para Asn comparado com a EcASNasell.

A única análise de citotoxicidade da ScASNasell na literatura foi medida apenas contra a linhagem de células de leucemia mieloide aguda (LMA) K562. O valor de IC_{50} da ScASNasell contra K562 foi de 5 UI/mL (DE CASTRO GIRÃO et al., 2016), o que torna necessária uma aplicação de altas quantidades de enzima para atingir o efeito antileucêmico. Nossos dados demonstram um IC_{50} de 0,9 UI/mL contra a linhagem celular de leucemia linfóide aguda MOLT-4 (ASLANIAN; FLETCHER; KILBERG, 2001; BERTUCCIO et al., 2017). Esse valor sugere uma aplicação da ScASNasell mais favorável para LLA do que LMA.

6. CONCLUSÕES

- Foi obtida a ScASNasell no meio extracelular;
- O protocolo de purificação foi capaz de obter a enzima com alto grau de pureza;
- A atividade específica da ScASNasell foi a mesma em comparação com a EcASNasell recombinante obtida e purificada no laboratório;
- A ScASNasell apresentou uma maior estabilidade significativa em comparação com o medicamento disponível no mercado no momento do teste;
- A ScASNasell tem atividade citotóxica contra células de leucemia linfóide aguda.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido à atividade citotóxica e a estabilidade da enzima no soro humano, testes *in vivo* para essa enzima em camundongo (leucêmico ou modelo xenográfico de LLA) dariam resultados interessantes com relação à aplicação dessa enzima como um biofármaco.

Algumas melhorias podem ser feitas para a ScASNasell. Primeiramente, a afinidade da ScASNasell para a Asn pode ser aumentada com mutação. No sítio de ligação da Asn (aminoácido verde na figura 2), a ScASNasell tem uma Asn, enquanto que a EcASNasell tem uma glutamina e a Erwinase tem um ácido glutâmico. Essa diferença nos aminoácidos pode ser um fator para a menor afinidade da ScASNasell para Asn em comparação com as outras enzimas. Outro fator pode ser o sítio passível de N-glicosilação próximo ao sítio de ligação da Asn. Uma glicosilação nessa região pode prejudicar o reconhecimento da Asn. Os dados desse trabalho reforçam essa ideia, de forma que a enzima obtida por Dunlop em 78 foi caracterizada contendo altas quantidades de manose. No nosso trabalho os N-glicanos produzidos pela *P. pastoris Glycoswitch* não interferiam na atividade e a análise pela migração no gel mostrou uma pequena redução na massa molecular dos monômeros (Figura 24C). Essa redução no tamanho do N-glicano pode ter sido o responsável pelo aumento da afinidade da nossa ScASNasell em comparação com a obtida por Dunlop.

Portanto, com um único ciclo de mutação, é possível alterar o aminoácido asparagina no sítio de ligação, trocando-a por uma glutamina (a mesma que a EcASNasell), e alterar a asparagina do sítio passível de N-glicosilação, trocando-a também por uma glutamina pela semelhança entre esses aminoácidos. Como a glicosilação é um fator importante para o dobramento correto e solubilidade da ScASNasell, seria necessário verificar se alterando esse sítio passível de N-glicosilação interfere no dobramento correto.

Após essa mutação, os testes de atividade específica, cinética enzimática e citotoxicidade revelariam se essas trocas de aminoácidos são benéficas para a enzima. E caso sejam benéficos (aumente a afinidade para Asn e a citotoxicidade contra MOLT-4), testes *in vivo* com modelo de camundongo leucêmico (ou modelo xenográfico de LLA) poderão ser feitos para avaliar a atividade antileucêmica da ScASNasell mutada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMINISTRATION, F. and D. Guidance for Industry Acrylamide in Foods. **FDA Food Guidances**, n. March 2016, p. 1–37, 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/FoodGuidances>>.
- AEBI, M. N-linked protein glycosylation in the ER. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 11, p. 2430–2437, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583305>>. Acesso em: 23 maio. 2019.
- 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.
- ALI, U. et al. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 199–210, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.023>>.
- ASLANIAN, A. M.; FLETCHER, B. S.; KILBERG, M. S. L -asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. v. 328, p. 321–328, 2001.

- BAGHBAN, R. et al. New Developments in *Pichia pastoris* Expression System, Review and Update. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 451–467, 2018.
- BAGHBAN, R. et al. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365–384, 25 maio 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30805909>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- BATOOL, T. et al. A comprehensive review on L-Asparaginase and its applications. **ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 11, n. 19, p. 11713–11723, 2015.
- BELVISO, S. et al. The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. p. 1–14, 2017.
- BERTUCCIO, S. N. et al. Identification of a cytogenetic and molecular subgroup of acute myeloid leukemias showing sensitivity to L-Asparaginase. **Oncotarget**, v. 8, n. 66, 15 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/18565>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- BOISSEL, N. et al. Should Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Be Treated as Old Children or Young Adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 Trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 5, p. 774–780, 1 mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610173>>. Acesso em: 6 maio. 2019.
- BOISSEL, N.; BARUCHEL, A. Acute lymphoblastic leukemia in adolescent and young adults: treat as adults or as children? **Blood**, v. 132, n. 4, p. 351–361, 26 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29895662>>. Acesso em: 6 maio. 2019.
- BON, E. P. et al. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. GLN3/URE2 regulation of a periplasmic enzyme. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 63–65, p. 203–12, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9170245>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

- BONTHRON, T. D.; JASKOLSKI, M. Why a “benign” mutation kills enzyme activity. Structure-based analysis of the A176V mutant of *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase I. **Acta biochimica Polonica**, v. 3, n. 44, p. 491–504, 1997.
- BOREK, D. et al. Crystal structure of active site mutant of antileukemic L-asparaginase reveals conserved zinc-binding site. **The FEBS journal**, v. 281, n. 18, p. 4097–4111, 2014.
- BOREK, D.; JASKÓLSKI, M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. **Acta biochimica Polonica**, v. 48, n. 4, p. 893–902, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11996000>>. Acesso em: 15 maio. 2019.
- BOYD, J. W. et al. Purification and Properties of L-Asparaginase from *Serratia marcescens*1 The purification and properties of a tumor inhibitory L-asparaginase from *SeO*-The rate of ammonia production from L-asparaginase may be calculated from the rate of NADH oxidation 578. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://jb.asm.org/>>. Acesso em: 15 maio. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Leucemia linfóide aguda em adultos: condutas do INCA-MS. Revista Brasileira de Cancerologia, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 309-312, jul./set. 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Leucemias Agudas na Infância e Adolescência: condutas do INCA-MS. Revista Brasileira de Cancerologia, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p. 245-257, abr./mai./jun. 2001.
- BROOME, J. D. EVIDENCE THAT THE L-ASPARAGINASE OF GUINEA PIG SERUM IS RESPONSIBLE FOR ITS ANTILYMPHOMA EFFECTS. **Journal of Experimental Medicine**, v. 118, n. 1, p. 121–148, 1963.
- BRUMANO, L. P. et al. Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. January, p. 1–22, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2018.00212/full>>.
- BRYKSIN, A. V.; MATSUMURA, I. Overlap extension PCR cloning: A simple and reliable way to create recombinant plasmids. **BioTechniques**, v. 48, n. 6, p. 463–465, 2010.

- CAMPBELL, H. A. et al. Two L-Asparaginases from *Escherichia coli* B. Their Separation, Purification, and Antitumor Activity *. **Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 721–730, mar. 1967.
- CECCONELLO, D. K. et al. Monitoring asparaginase activity in middle-income countries. n. C, p. 1149–1150, 2018.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 1 jan. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- CHEN, S. H. et al. A genome-wide approach identifies that the aspartate metabolism pathway contributes to asparaginase sensitivity. **Leukemia**, v. 25, n. 1, p. 66–74, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.256>>.
- COSTA, I. M. et al. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: An allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–11, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep36239>>.
- COSTA, I. M. et al. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: An allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, v. 6, p. 2017–2018, 2016b.
- CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 12, p. 3376–85, dez. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3915774>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- DARVISHI, F.; FARAJI, N.; SHAMSI, F. Production and structural modeling of a novel asparaginase in *Yarrowia lipolytica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 955–961, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.162>>.
- DE CASTRO GIRÃO, L. F. et al. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukemic drug: Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 118–125, 2016.

- DE POURCQ, K.; DE SCHUTTER, K.; CALLEWAERT, N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1617–1631, 2010.
- DEAN, N. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1426, n. 2, p. 309–22, 6 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878803>>. Acesso em: 27 maio. 2019.
- DELL, A. et al. Similarities and Differences in the Glycosylation Mechanisms in Prokaryotes and Eukaryotes. **International Journal of Microbiology**, v. 2010, p. 1–14, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2010/148178/>>. Acesso em: 23 maio. 2019.
- DOLOWY, W. C. et al. Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase: Study of mice with lymphoma and normal monkeys and report on a child with leukemia. **Cancer**, v. 19, n. 12, p. 1813–1819, 1 dez. 1966. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%28196612%2919%3A12%3C1813%3A%3AAID-CNCR2820191208%3E3.0.CO%3B2-E>>. Acesso em: 15 maio. 2019.
- DORES, G. M. et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. **Blood**, v. 119, n. 1, p. 34–43, 5 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22086414>>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- DUNLOP, P. C. et al. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 4, p. 1297–1304, 1978.
- DUNLOP, P. C.; MEYER, G. M.; ROON, R. J. Reactions of asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. A mechanistic analysis of hydrolysis and hydroxylaminolysis. **The Journal of biological chemistry**, v. 255, n. 4, p. 1542–6, 25 fev. 1980a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6986375>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

- DUNLOP, P. C.; MEYER, G. M.; ROON, R. J. Nitrogen catabolite repression of asparaginase II in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 143, n. 1, p. 422–6, jul. 1980b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6995441>>. Acesso em: 16 maio. 2019.
- EHSANIPOUR, E. A. et al. Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. **Cancer Research**, v. 73, n. 10, p. 2998–3006, 2013.
- EL-NAGGA, N. E.-A.; EL-EWASY, S. M.; EL-SHWEIHY, N. M. Microbial L-asparaginase as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 182–199, 1 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=ijp.2014.182.199>>. Acesso em: 6 maio. 2019.
- EMADI, A.; ZOKAEE, H.; SAUSVILLE, E. A. Asparaginase in the treatment of non - ALL hematologic malignancies. p. 875–883, 2014.
- FERRARA, M. A. et al. Kinetics of asparaginase II fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* ure2dal80 mutant: effect of nitrogen nutrition and pH. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113–116, p. 299–305, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15054214>>. Acesso em: 16 maio. 2019.
- FERRARA, M. A. et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1457–1463, 2006.
- FERRARA, M. A. et al. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 3, p. 71–76, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.05.001>>.

- GOLUB, T. R. et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 11, p. 4917–21, 23 maio 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7761424>>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. S52–S57, ago. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572008000500008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- HASSLACHER, M. et al. High-Level Intracellular Expression of Hydroxynitrile Lyase from the Tropical Rubber Tree *Hevea brasiliensis* in Microbial Hosts. **Protein Expression and Purification**, v. 11, n. 1, p. 61–71, out. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9325140>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- HAYASHI, Y.; SEZAKI, M.; TAKIZAWA, H. Development of the hematopoietic system: Role of inflammatory factors. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 8, n. 4, p. e341, 27 jul. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30916895>>. Acesso em: 14 jun. 2019.
- HEFAZI, M.; LITZOW, M. R. Recent Advances in the Biology and Treatment of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. p. 265–274, 2018.
- HERSCOVICS, A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1473, n. 1, p. 96–107, 6 dez. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580131>>. Acesso em: 23 maio. 2019.
- HOELZER, D. Personalized medicine in adult acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 100, n. 7, p. 855–8, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26130512>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

- HU, Y. L. et al. Survey of Intracellular Protein Extraction Methods from *Pichia pastoris*. **World Journal of Engineering and Technology**, v. 3, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/wjethhttp://dx.doi.org/10.4236/wjet.2015.34C001http://dx.doi.org/10.4236/wjet.2015.34C001>>. Acesso em: 22 jun. 2019.
- HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Redefining ALL classification: Toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. **Blood**, v. 125, n. 26, p. 3977–3987, 2015.
- HUSAIN, I. et al. Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from *Enterobacter cloacae*: In-Vitro Evaluation of Cytotoxic Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148877, 18 fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0148877>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–1955, 1 jun. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673612621874>>. Acesso em: 14 jun. 2019.
- INEZ, M.; GADELHA, P. Correspondence: Monitoring asparaginase activity. **Lancet Oncology**, v. 19, n. 11, p. e575, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30782-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30782-4)>.
- JACOBS, P. P. et al. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 58–70, 2009.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **ChemBioChem**, v. 19, n. 1, p. 7–21, 4 jan. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.201700460>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- KAMERUD, J. Q.; ROON, R. J. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: selection of four mutations that cause derepressed enzyme synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 165, n. 1, p. 293–6, jan. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3510190>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

- KANG, H. A. et al. Glycosylation of human α 1-antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts. **Yeast**, v. 14, n. 4, p. 371–381, 1998.
- KATO, M. et al. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 2, p. 295–298, 1 jul. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.12836>>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- KATO, M.; MANABE, A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatrics International**, v. 60, n. 1, p. 4–12, 2018.
- KIDD, J. G. REGRESSION OF TRANSPLANTED LYMPHOMAS INDUCED IN VIVO BY MEANS OF NORMAL GUINEA PIG SERUM. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 583–606, 1953.
- KIM, K. W. et al. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 24, p. 11948–53, 25 ago. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3042786>>. Acesso em: 14 abr. 2019.
- KIM, K. W.; ROON, R. J. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: positive selection of two mutations that prevent enzyme synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 157, n. 3, p. 958–61, mar. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6365897>>. Acesso em: 16 maio. 2019.
- KLOOS, R. Q. H. et al. A cost-effectiveness analysis of *Erwinia* asparaginase therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 66, n. 1, p. 1–7, 2019.
- KORNFELD, R.; KORNFELD, S. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 631–664, jun. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896128>>. Acesso em: 23 maio. 2019.

- KREJCI, O. et al. Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukemic cells. **Leukemia**, v. 18, n. 3, p. 434–441, 2004.
- KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D.; SUBRAMANYA, S. A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 720–737, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2015.1022505>>.
- KURIEN, B. T.; SCOFIELD, H. R. **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] © Springer Science+Business Media, LLC 2012, 2012.
- LATOUSAKIS, D.; JUGE, N. How Sweet Are Our Gut Beneficial Bacteria? A Focus on Protein Glycosylation in Lactobacillus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 136, 3 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29301365>>. Acesso em: 23 maio. 2019.
- LEGOUX, R.; MALDONADO, P.; SALOME, M. Method for the extraction of periplasmic proteins from prokaryotic microorganism in the presence of arginine. **United States Patent**, v. 96, n. 5700665, p. 62–66, 1997.
- LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82–99, 2017.
- LOPES, W. et al. Expression, purification, and characterization of asparaginase II from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 159, n. July 2018, p. 21–26, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592818303796>>.
- LUDWIG, W. D. et al. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. **Blood**, v. 92, n. 6, p. 1898–909, 15 set. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731046>>. Acesso em: 6 maio. 2019.
- MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249–270, 2005.
- MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 105, n. 2, p. 450–453, 1964.

- MICHALOWSKI, M. B.; DAUDT, L. E.; GOLDANI, M. Z. Authors' reply: Monitoring asparaginase activity. **Lancet Oncology**, v. 19, n. 11, p. e576, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30783-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30783-6)>.
- MOORMAN, A. V. et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 102, n. 8, p. 2756–2762, 15 out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829593>>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. v. 65, p. 55–63, 1983.
- MUFFLY, L. et al. Patterns of care and outcomes in adolescent and young adult acute lymphoblastic leukemia: a population-based study. **Blood advances**, v. 2, n. 8, p. 895–903, 2018.
- MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, n. 2, p. 97–113, 1998.
- NACHMAN, J. B. et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1112–1115, 15 ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473063>>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, n. 3, p. 208–221, 2007.
- OLIVEIRA, E. M.; CARVAJAL, E.; BON, E. P. L-asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Activity profile during growth using an ure2 mutant P40-3C and a P40-3C + URE2p strain. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 77–79, p. 311–6, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399275>>. Acesso em: 16 maio. 2019.
- OLIVEIRA, E. M. M. et al. The role of the GATA factors Gln3p, Nil1p, Dal80p and the Ure2p on ASP3 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, n. 1, p. 31–37, 15 jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489124>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

- PARMENTIER, J. H. et al. Glutaminase Activity Determines Cytotoxicity of L-Asparaginases on Most Leukemia Cell Lines. **Leukemia Research**, v. 39, n. 7, p. 757–762, 2015.
- PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 15 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824725>>. Acesso em: 11 abr. 2019.
- PINI, P. et al. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of *E. coli* L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine**, v. 30, p. 158–166, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.005>>.
- PUI, C. H.; LIU, Y.; RELLING, M. V. How to solve the problem of hypersensitivity to asparaginase? **Pediatric Blood and Cancer**, v. 65, n. 3, p. 19–20, 2018.
- QUAN, J.; TIAN, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, v. 6, n. 2, p. 242–251, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.181>>.
- RAU, R. E. et al. Outcome of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia / lymphoblastic lymphoma with hypersensitivity to pegaspargase treated with PEGylated Erwinia asparaginase , pegcrisantaspase : A report from the Children ' s Oncology Group. n. September 2017, p. 1–7, 2018.
- RIFAI, K. et al. Changes in Plasma Amino Acids During Extracorporeal Liver Support by Fractionated Plasma Separation and Adsorption. **Artificial Organs**, v. 34, n. 2, p. 166–170, 2010.
- RIGOUIN, C. et al. Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10758-4>>.
- ROBERTS, K. G.; MULLIGHAN, C. G. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 6, p. 344–357, 17 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25781572>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

- RODRIGUES, D. et al. Fed-Batch Production of *Saccharomyces cerevisiae* L-Asparaginase II by Recombinant *Pichia pastoris* MUTs Strain. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. February, 2019.
- ROON, R. J. et al. Derepression of asparaginase II during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ammonium ion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 219, n. 1, p. 101–109, 1 nov. 1982. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986182901382?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 maio. 2019.
- ROTOLO, B. M. et al. Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 15, n. 6, p. 281–292, 2005.
- SALAMIN, K. et al. Secretion of an endogenous subtilisin by *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4269–4276, 2010.
- SANTOS, J. H. P. M. et al. Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* host. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 2, p. 416–424, 2017.
- SAVITSKIY, V. P.; SHMAN, T. V.; POTAPNEV, M. P. Spontaneous Apoptosis and Proliferative Activity In Vitro of Leukemic Cells From Children With ALL: Relationship With In Vitro Susceptibility To Anticancer Drugs. **Experimental Oncology**, v. 25, n. 3, p. 233–235, 2003.
- SCHENK, B.; FERNANDEZ, F.; WAECHTER, C. J. The ins(ide) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, p. 61R-70R, maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425794>>. Acesso em: 23 maio. 2019.
- SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 4, p. 363–372, 24 set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15480623>>. Acesso em: 28 maio. 2019.

- SCHORE, R. J. et al. Anti-Pegaspargase, Anti-Calaspargase Pegol , and Anti-Polyethelene Glycol Antibody Incidence in High Risk Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Receiving Pegaspargase or Calaspargase Pegol and Associated Anaphylactic or Hypersensitivity Reaction Rates: R.... **Blood**, v. 128, n. 22, 2016.
- SHAKAMBARI, G.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. L-asparaginase - a promising biocatalyst for industrial and clinical applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. October 2018, p. 213–224, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.018>>.
- SHEHADUL ISLAM, M.; ARYASOMAYAJULA, A.; SELVAGANAPATHY, P. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. **Micromachines**, v. 8, n. 3, p. 83, 8 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-666X/8/3/83>>. Acesso em: 22 jun. 2019.
- SHRIMAL, S.; CHEREPANOVA, N. A.; GILMORE, R. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 41, p. 71–78, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25460543>>. Acesso em: 23 maio. 2019.
- SILVEIRA, M. C. et al. Nitrogen regulation of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. Role of the URE2 gene. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 84–86, p. 247–54, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849793>>. Acesso em: 16 maio. 2019.
- SOUZA, P. M. et al. Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 120, n. November, p. 194–202, 2017.
- SPELTZ, E. B.; REGAN, L. White and green screening with circular polymerase extension cloning for easy and reliable cloning. **Protein Science**, v. 22, n. 6, p. 859–864, 2013.
- STOCK, W. et al. AYA ALL - CCG vs CALGB. **Young**, v. 112, n. 5, p. 1646–1654, 2008.

- SUGIMOTO, K. et al. A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines. **Cancer Science**, v. 106, n. 11, p. 1534–1543, 2015.
- SULD, H. M.; HERBUT, P. A. GUINEA PIG SERUM AND LIVER ASPARAGINASES. PURIFICATION AND ANTITUMOR ACTIVITY. **The Journal of biological chemistry**, v. 240, p. 2234–41, maio 1965. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14299653>>. Acesso em: 15 maio. 2019.
- TAKAHASHI, H. et al. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. **Oncogene**, v. 36, n. 30, p. 4267–4276, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2017.59>>.
- TARDITO, S. et al. The inhibition of glutamine synthetase sensitizes human sarcoma cells to L-asparaginase. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 60, n. 5, p. 751–758, 2007.
- THE, S. H.; FONG, M. Y.; MOHAMED, Z. Expression and analysis of the glycosylation properties of recombinant human erythropoietin expressed in *Pichia pastoris*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 464–470, 2011.
- TOWER, D. B.; PETERS, E. L.; CURTIS, W. C. Guinea pig serum L-asparaginase. Properties, purification, and application to determination of asparagine in biological samples. **The Journal of biological chemistry**, v. 238, p. 983–93, mar. 1963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13993876>>. Acesso em: 15 maio. 2019.
- VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
- VERVECKEN, W. et al. In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2639–2646, 2004.
- VERVECKEN, W. et al. Modification of the N-glycosylation pathway to produce homogeneous, human-like glycans using GlycoSwitch plasmids. **Methods in Molecular Biology**, v. 389, p. 119–138, 2007.

- VOGL, T.; GLIEDER, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385–404, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678412008679>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- WANG, B. et al. Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. **Leukemia**, v. 17, n. 8, p. 1583–1588, 2003.
- WEHNER, A. et al. Site-specific mutagenesis of *Escherichia coli* asparaginase II. v. 480, n. 3992, p. 475–480, 1992.
- WERTEN, M. W. T. et al. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 15, n. 11, p. 1087–1096, ago. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10455232>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- WLODARCZYK, S. R. et al. Effect of osmolytes on the activity of anti-cancer enzyme L-Asparaginase II from *Erwinia chrysanthemi*. **Process Biochemistry**, n. March, p. 0–1, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511318319524>>.
- YANG, Q. et al. Analysis of pre-existing IgG and IgM antibodies against polyethylene glycol (PEG) in the general population. 2016.
- ZIELINSKA, D. F. et al. Precision Mapping of an In Vivo N-Glycoproteome Reveals Rigid Topological and Sequence Constraints. **Cell**, v. 141, n. 5, p. 897–907, 28 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510933>>.

ANEXO I

Iniciadores para fusionar a sequência α -amilase no gene Asparaginase II de *S. cerevisiae* no vetor pJAG.

Três iniciadores são repetidos pela sequência sinalizadora não interferir na região que esses iniciadores identificam, portanto são 13 diferentes.

As cores representam as regiões que formam dupla fita e facilitam a visualização:

Vermelho identifica a *Asparaginase II*

Verde identifica a sequência *PHO1*

Azul identifica o plasmídeo pJAG

Bege identifica a sequência *alfa-amilase*

(1) Iniciador *alfa-amilase_foward*

ATG GTC GCT TGG TGG TCT TTG TTT C 59,9

(2) Iniciador *alfa-amilase_reverse*

CTA TTC TTC TCT TCA GCC AAA GCA GGT GC 61

(3) Iniciador *ASP3_amyl_Foward*

CA CCT GCT TTG GCTGA AGA GAA GAA TAG 61

(4) Iniciador Reverse *ASP3*

TTA ACC ACC GTA GAC TCC GGA GAA AAC 59,9

(5) Iniciador *pJAG_amyl_extensão_Foward*

GA GTC TAC GGT GGT TAA TCA AGA GGA TGT CAG 60,8

(6) Iniciador *pJAG_amyl_extensão_reverse*

GA CCA AGC GAC CAT CGT TTC GAA TAA TTA GTT G 60,7

(7) Iniciador *ASP3_amyl_extensão_foward*

C AAC TAA TTA TTC GAA ACG ATG GTC GCT TGG TG 60,8

(8) Iniciador *ASP3_amyl_extensão_reverse*

CTG ACA TCC TCT TGA TTA ACC ACC GTA GAC TC 60,8

Iniciadores para fusionar a sequência *PHO1* no gene Asparaginase II de *S. cerevisiae* no vetor pJAG.

NOME Tm (°C)

(9) Iniciador *PHO1_Foward*

ATG TTT TCT CCT ATT CTA AGT CTG GAA ATT ATT CTC GC 59,4

(10) Iniciador *PHO1_Reverse*

CTA TTC TTC TCT TC C GCA AAG ACT GAT TGG AG 59,9

(11) Iniciador *ASP3_PHO1_Foward*

CT CCA ATC AGT CTT TGC G GA AGA GAA GAA TAG 59,9

Iniciador *ASP3_Reverse*

TTA ACC ACC GTA GAC TCC GGA GAA AAC 59,9 (repetido)

Iniciador *pJAG_PHO1_extensão_Foward*

GA GTC TAC GGT GGT TAA TCA AGA GGA TGT CAG 60,8 (repetido)

(12) Iniciador *pJAG_PHO1_extensão_Reverse*

C CAG ACT TAG AAT AGG AGA AAA CAT CGT TTC GAA TAA TTA GTTG 60,6

(13) Iniciador *ASP3_PHO1_extensão_Foward*

CAA CTA ATT ATT CGA AAC G ATG TTT TCT CCT ATT CTA AGT CTG G 60,6

Iniciador *ASP3_PHO1_extensão_reverse*

CTG ACA TCC TCT TGA TTA ACC ACC GTA GAC TC 60,8 (repetido)

ANEXO II**CATATG**

AGAAGTTTGAATACCTTGTTCCTTTCCTTGTTCGTTGCCATGTCATCTGGTGCTCATTGCTTAAAATTAGAGAA
 GAGAAGAATAGTTCTTTGCC TTCTATTAAGATTTT TGAACAGGT GGAACCATTGCTTCTAAAGGTTCTACTTCC
 GCCACTACAGCAGGATACTCCGTTGGTTTGACAGTCAACGATCTTATTGAAGCCGTTCCCTTCTTTGGCTGAGAAG
 GCCAACTTGGACTATCTTCAAGTTTCCAATGTCGGTTCAAACAGT TTGAACTACACTCATTGATCCCACTTTAT
 CACGGAATCTCTGAAGCATTGGCTTCCGATGACTACGCCGAGCAGTTGTCACTCATGGTACAGATACCATGGAA
 GAGACAGCTTTCTTTTGGATTTGACCATTAAATCTGAGAAGCCAGTTTGTATCGCTGGAGCCATGAGACCTGCA
 ACTGCTACATCAGCCGATGGTCCAATGAAC TTGTATCAAGCAGTTAGTATTGCTGCCTCAGAAAAGAGTTTGGGT
 AGAGGAACATGATTACACTTAATGACAGAATCGCTTCAGGTTTTTGGACCACTAAGATGAACGCAAAACAGTTTG
 GATACTTTCAGAGCTGACGAACAGGGATACCTTGGTTATTTTCC AACGATGACGTTGAGTTCTACTATCACCT
 GTCAAGCCTAACGGTTGGCAATTTTTCGATATCTCAAATTTGACTGACCCAAGTGAAATCCCTGAGGTTATTATC
 TTGTACTCTTATCAGGGTTTGAACC CAGAACTTATTGTTAAGGCTGTCAAAGATTTGGGAGCCAAAGGTATCGTT
 CTTGCAGGTT CAGGAGCTGGTAGTTGGACC GCTACTGGATCAATTGTCAATGAACAATTGTACGAAGAGTATGGT
 ATTCCAATCGTTCACTCTAGAAGAACCGCTGATGGAACGTCCCACTGATGACGCCCTGAGTACGCAATTGGA
 TCTGGTTATTTGAATCCACAAAAGTCCAGAATCTTGCTTCAGTTGTGCCTTTACTCTGGATATGGTATGGATCAG
 ATTAGATCCGTTTTCTCCGAGTCTACGGTGGTCTTGAAGTTTTGTTCCAGGGTCCACACCATCACCACCATCAT
 CATCATCATCACTAA

GGATCC

Sequência do gene *ASP3* com codons otimizados para *P. pastoris*
 fornecido pela GenScript ®

ANEXO III**Sequência sinalizadora do gene *PHO1***

ATGTTTTCTCCTATTCTAAGTCTGGAAATTATTCTCGCTTTGGCTACTCTCC
AATCAGTCTTTGCG

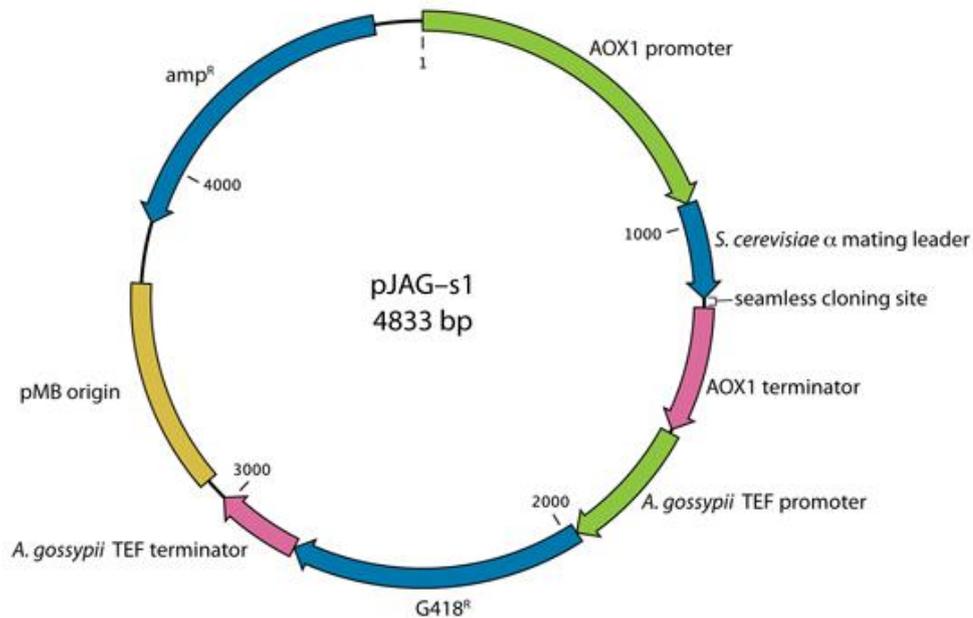
ANEXO IV**Sequência sinalizadora do gene α -amilase**

ATGGTCGCTTGGTGGTCTTTGTTTCTGTACGGTCTTCAGGTCGCTGCACCT
GCTTTGGCT

ANEXO V**Sequência sinalizadora α -mating factor**

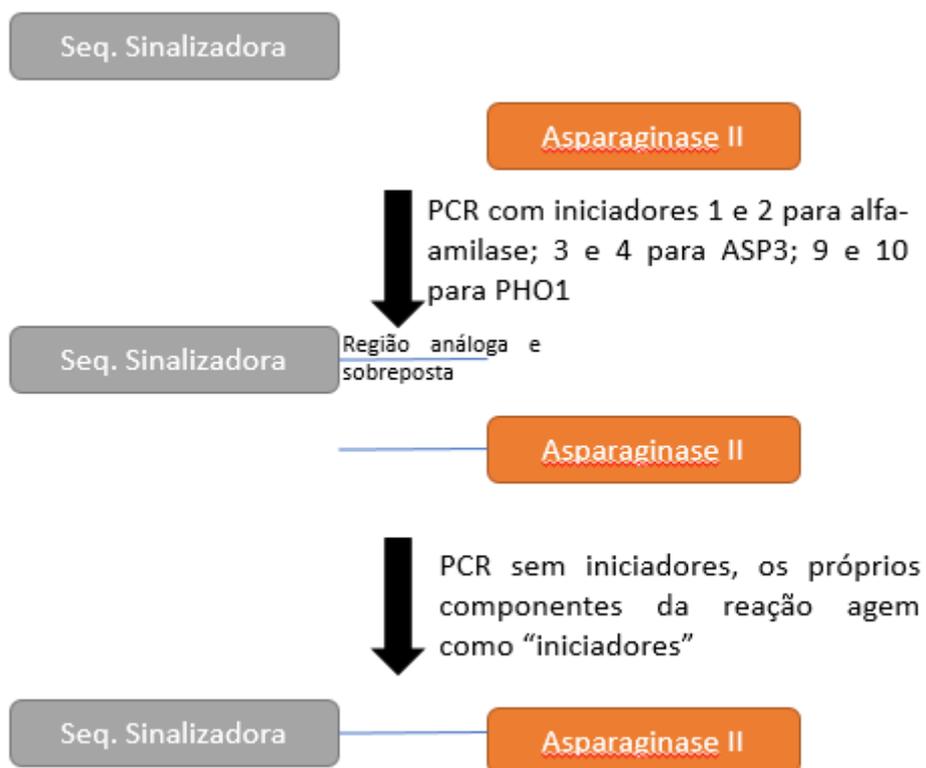
ATGAGATTCCCATCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTTCGCTGCTTCTTCTGCTT
TGGCTGCTCCAGTTAACTACTACTGAGGACGAGACTGCTCAAATTCCAG
CTGAGGCTGTTATTGGTTACTTGGACTTGGAGGGTGACTIONCGACGTTGCT
GTTTTGCCATTCTCTAACTCTACTAACAACGGTTTGTTGTTTCATTAACACTA
CTATTGCTTCTATTGCTGCTAAGGAGGAGGGTGTTCCTTTGGACAAGAGAG
AGGCTGAGGCT

ANEXO VI



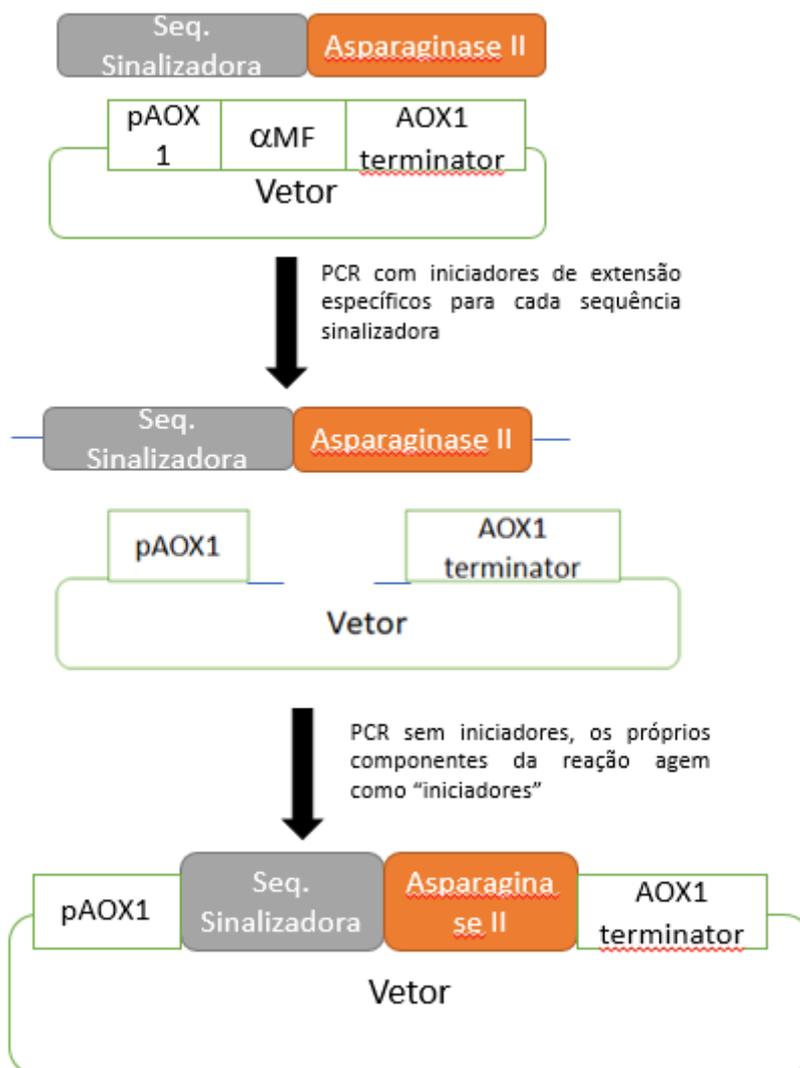
Mapa conceitual do plasmídeo pJAG-s1. Esse plasmídeo contém a sequência sinalizadora do α MF de *S. cerevisiae*, porém ela não estará incorporada no plasmídeo final pois o protocolo a ser utilizado “expulsará” essa sequência. Retirado do site (<https://www.biogrammatix.com/products/pichia-pastoris-pjag-s1-expression-vector>) da ©Biogrammatix, acessado em: 05/07/2017.

ANEXO VII



Esquema da fusão da asparaginase II com as sequências sinalizadoras. A linha azul representa a região amplificada que se sobrepõe na sequência sinal e na *ASP3*, formando um dímero para a segunda reação de PCR, unindo-as. A linha azul é desenhada para ser uma parte do gene e da sequência sinal, não há adição de bases extras.

ANEXO VIII



Esquema da fusão do inserto (asparaginase II com as sequências sinalizadoras) com o vetor pJAG-s1. A linha azul representa a região amplificada na sequência sinal e na *ASP3* que se sobrepõe com a região amplificada no vetor, formando um dímero para a segunda reação de PCR, unindo-as. A linha azul é desenhada para ser uma parte do gene e da sequência sinal, não há adição de bases extras. Na primeira reação de PCR, os iniciadores foram desenhados para não amplificar a região do α MF, pois não será utilizado.

ANEXO IX



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança



Of.CIBio/0122018/FCF

São Paulo, 06 de junho de 2018.

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada no dia 06 de junho p.p., o Projeto "*Expressão da L-asparaginase II de Saccharomyces cerevisiae recombinante extracelular com glicosilação humanizada*" foi aprovado com a seguinte recomendação: "Recomenda-se que em propostas futuras a pesquisadora inclua, no projeto, um item sobre os aspectos de biossegurança de OGM".

Atenciosamente,


Prof. Dr. JOÃO CARLOS MONTEIRO DE CARVALHO
Presidente da CIBio

Ílma. Sra.
Profa. Dra. GISELE MONTEIRO DE SOUZA
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF-USP
NESTA

ANEXO X

21/06/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 8020852/1 - Henrique Pellin Biasoto

Email:	henrique.biasoto@usp.br
Data de Nascimento:	28/02/1993
Cédula de Identidade:	RG - 44.166.389-8 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

Curso:	Mestrado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula:	15/08/2017
Início da Contagem de Prazo:	15/08/2017
Data Limite para o Depósito:	15/08/2019
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Gisele Monteiro - 15/08/2017 até o presente. Email: smgisele@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 15/08/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 15/10/2018
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 15/08/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 21/06/2019 17:37:28

21/08/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 8020852/1 - Henrique Pellin Biasoto

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ICB5751-3/1	As Origens da Biologia Molecular (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	19/02/2018	16/04/2018	120	8	100	A	N	Concluída
FBT5773-8/1	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	05/03/2018	15/05/2018	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5100-3/2	A Formação do Professor Universitário (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	06/03/2018	04/06/2018	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
BTC5743-3/9	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	07/03/2018	19/06/2018	30	2	86	B	N	Concluída
QBQ5759-9/3	Tópicos Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular I (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	15/03/2018	27/06/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5776-5/8	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	23/04/2018	06/05/2018	30	2	100	A	N	Concluída
BIO5741-6/3	Ensaio Pedagógico para o Ensino de Biologia (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	06/08/2018	29/10/2018	30	2	90	A	N	Concluída
PSC5064-4/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	14/08/2018	24/09/2018	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
BTC5751-4/8	Seminários em Biotecnologia II (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	15/08/2018	27/11/2018	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5925-6/6	Prática de Ensino de Química (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	21/08/2018	03/12/2018	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5754-1/2	Da Clonagem à Análise de Proteínas - Métodos e Estratégias (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	27/08/2018	02/09/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/7	Aprimoramento Pedagógico	02/10/2018	29/10/2018	60	4	100	A	N	Concluída
VCM5748-2/1	Preparação Pedagógica em Medicina Veterinária (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	30/10/2018	13/11/2018	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 21/08/2019 17:37:28