

Seleção de fungos isolados da região Amazônica produtores de L-Asparaginase

Celina S. Morais¹, Ivanete F. Souza², Priscila P. Ribas²

¹Fundação Centro de Análise, Pesquisa e Inovação Tecnológica –FUCAPI –Manaus – AM –Brasil

²Laboratório de Microbiologia Geral-Centro de Biotecnologia da Amazônia –CBA - Distrito Industrial-Manaus –AM –Brasil

²Laboratório de Fermentação-Centro de Biotecnologia da Amazônia-CBA-Distrito Industrial-Manaus –AM –Brasil

celainycsm@gmail.com, Ivanete@hotmail.com, priscila.pauly@mail.com

Abstract. *L-Asparaginase is an ante-leukemic enzyme, used as the main drug in the treatment of leukemia, especially acute lymphoid leukemia-ALL in children. In Brazil, there is no production of the drug for clinical application for leukemia treatment, depending on the importation, but health experts have disputed the efficacy and safety of this drug. Given the fact, the objective of this research was to select fungal isolates from the Amazon region with potential for the production of the enzyme L-Asparaginase. For this, 60 isolates were tested in solid medium, of which 54 showed alteration in the yellow to reddish color of the culture medium, indicating the production of L-Asparaginase enzyme.*

Resumo. *A L-Asparaginase é uma enzima antileucêmica, utilizada como principal fármaco no tratamento de leucemias, em destaque a leucemia linfóide aguda-LLA em crianças. No Brasil, não há produção do fármaco para aplicação clínica para o tratamento de leucemia, dependendo da importação, porém especialistas da saúde tem contestado a eficácia e segurança desse fármaco. Diante do fato, o objetivo desta pesquisa foi selecionar isolados fúngicos da região amazônica com potencial para a produção da enzima L-Asparaginase. Para isso, foram testados 60 isolados em meio sólido, dos quais 54 apresentaram alteração na coloração amarela para avermelhada do meio de cultura, indicando a produção da enzima L-Asparaginase.*

1. Introdução

A produção de enzimas por fontes microbianas têm sido uma alternativa viável devido à sustentabilidade no modo de obtenção, além de proporcionar elevadas concentrações em um curto intervalo de tempo, visto que essas enzimas necessitam de um curto espaço de tempo para ser sintetizadas, podendo estas ser de origem intra ou extracelular. Além disso, são substâncias consideradas mais estáveis que as de origem animal, vegetal e humana (ANBU et al., 2015). A enzima L-Asparaginase é fundamental para a indústria farmacêutica, representando 40% de todas as enzimas comercializadas para fins médicos (VIMAL & KUMAR, 2017).

A L-Asparaginase é um fármaco antileucêmico de primeira linha, de origem bacteriana, utilizada para o tratamento principalmente da leucemia linfóide aguda (LLA), uma vez que este tipo de câncer é dependente da disponibilidade de asparagina extracelular. LLA é uma doença crônica que atinge adultos e principalmente crianças na maioria dos casos nos meninos. A L-Asparaginase administrada no tratamento de leucemias apresenta baixa toxicidade, porém pode provocar hipersensibilidade ao paciente e os efeitos colaterais mais relatados pelos pacientes são edema, febre e erupções na pele, considerados efeitos leves, mas também o paciente pode sofrer com reações graves anafilaxia, pancreatite, diabetes e anormalidades na coagulação (HIJYA & SLUIS, 2016). Em razão disso, surge a necessidade de investigar a produção de L-Asparaginase por diferentes fontes, a fim de proporcionar o bem-estar dos pacientes e reduzir os custos de produção dessa enzima tão importante (AL RABAYAH et al., 2016; VIDYA et al., 2017).

Utilizada no Brasil em protocolos de Oncologia do Serviço de Saúde-SUS para tratamento de LLA, L-Asparaginase era fornecida pelo laboratório Bagó do Brasil, pela empresa Lundbeck da Dinamarca, no mesmo ano o laboratório Bagó suspendeu a produção por motivos técnicos, o que gerou grande preocupação em relação à manutenção de estoque do medicamento. Na tentativa de elucidar este impasse, nos anos de 2013 e 2017 o medicamento passou a ser importado pela empresa Medac da Alemanha, porém a empresa anunciou o fim da produção mundial do medicamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Levando o Brasil a importar o fármaco da empresa chinesa Xantley, gerando desconfiança por parte de muitos especialistas da Saúde

quanto à eficiência e segurança farmacológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Por outro lado, o Brasil dispõe de uma grande fonte Biodiversidade do mundo, sendo os fungos uma importante parcela ainda pouco explorada. Os fungos são fontes alternativas de pesquisas para a produção convencional de L-Asparaginase, em que apresentam facilidade de cultivo em grandes quantidades e em um curto intervalo de tempo (SARQUIS et al., 2004). Existem trabalhos que citam algumas leveduras e fungos como potenciais produtores desta enzima. A literatura cita gêneros de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* como potenciais produtores da enzima L-Asparaginase (PALLEM et al.,2011; KUMAR et al.,2013; NIHARIKA YADAV & SARKAR,2014; IMADA et al.,1973; SARQUIS et al.,2004).

Este trabalho tem por objetivo realizar a prospecção de fungos isolados da região amazônica com potencial para a produção da enzima L-Asparaginase. Para tanto, se fazem necessários testes de seleção que identifiquem a produção desta enzima. É válido destacar que as pesquisas sobre prospecção de fungos na região Amazônica ainda não reportam estudos sobre a obtenção e aplicação da enzima L-Asparaginase para o tratamento da Leucemia. Tornando este estudo preliminar como pioneiro no advento de prospecção e seleção de fungos produtores. E posteriormente, na aplicação de testes de atividade enzimáticas antileucêmicas.

1.1 Estruturas da enzima

A L-Asparaginase (EC 3.5.1.1 L-Asparagina aminno-hidrolase) é responsável pela conversão do aminoácido L-Asparagina em ácido aspártico e amônia, comumente encontrada nos micro-organismos, animais e plantas, sendo ausente em humanos (HUANG et al.,2014; KARAMITROS et al.,2014).

Existem duas formas estruturais da enzima L-Asparaginase derivadas da bactéria *Escherichia coli*, as do tipo I e II, as quais se diferem geneticamente e bioquimicamente. Quando a enzima L-Asparaginase é localizada no espaço do citoplasma é denominada de tipo I, enquanto que a enzima encontrada no espaço periplasmático é denominada de tipo II, e somente o tipo II possui atividade antineoplásica (EMADI et al., 2014).

Bioquimicamente a enzima é constituída de quatro subunidades homotetramérica, apresenta um sítio ativo em cada uma delas, variando a massa molar

em torno de 133-145 KDA, apresentando resíduos de aminoácidos entre 300-350. As enzimas derivadas das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* se diferenciam nos pontos isoelétricos e em suas características farmacocinéticas, não apresentam hipersensibilidade cruzada, o que permite a troca de uma pela outra nos casos de pacientes que sofrem algum tipo de reação (MULLER & BOOS, 1998; RIZZARI et al., 2013).

1.2 Mecanismos de ação

Alguns tipos de células neoplásicas necessitam de altos níveis de L-Asparagina em sua nutrição para promover seu crescimento, sendo necessária a obtenção desse aminoácido presente no meio extracelular a fim de satisfazer a demanda, visto que, ao chegar à corrente sanguínea a L-Asparaginase estimula a redução das reservas do aminoácido L-Asparagina presente no plasma, impedindo as células de obter o aminoácido extracelular. Como consequência ocorre à destruição das células tumorais por sua incapacidade de completar a síntese proteica, ou seja, de sintetizar suas próprias proteínas (TALLURI et al., 2014; NARTA et al., 2017).

Os fármacos existentes no mercado de L-Asparaginas administrados no tratamento de leucemia linfocítica aguda são derivados das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, as quais apresentam baixa toxicidade ao paciente comparada com outras fontes de enzimas e suas especificidades imunológicas se diferem (EINSFELDT, 2014), proporcionando uma alternativa aos pacientes que possuem hipersensibilidade ao fármaco.

2. Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia Geral e no Laboratório de Fermentação do Centro de Biotecnologia da Amazônia-CBA. Para seleção quanto à produção de L-Asparaginase, foram utilizados 60 isolados fúngicos cedidos da Coleção de Cultura do Laboratório de Biologia Geral do CBA.

Foi realizado um *screening* dos isolados fúngicos baseado em resultados preliminares obtidos no Laboratório de Microbiologia Geral sobre a produção de enzimas de interesse industrial.

2.1 Reativação dos fungos

Para esse trabalho foram utilizados 60 isolados, os quais foram previamente inoculados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos em estufa BOD durante sete dias em uma temperatura de 28 ± 2 °C. A Figura 1 apresenta os fungos reativados em meio BDA.



Figura 1: Fungos em meio BDA após sete dias de incubação.

2.2 Seleção de fungos quanto à produção de L-Asparaginase em meio sólido

Para o teste em meio sólido, foram testados 60 isolados em meio ágar Czapek Dox's Modificado (SAXENA & SINHA, 1981), (glicose 2 g L^{-1} , asparagina 10 g L^{-1} , K_2PO_4 $1,52 \text{ g L}^{-1}$, KCl $0,52 \text{ g L}^{-1}$, MgSO_4 $0,52 \text{ g L}^{-1}$, NaNO_3 $0,001 \text{ g L}^{-1}$, FeSO_4 $0,001 \text{ g L}^{-1}$ e ZnSO_4 $0,001 \text{ g L}^{-1}$). Discos de 5 mm foram retirados das bordas das colônias e inoculados no centro das placas de Petri contendo o meio ágar CDM, suplementado com vermelho fenol (0,009%), pH 6,2. As placas foram incubadas em estufa BOD a 30 ± 2 °C durante cinco dias. Placas com meio sem L-Asparagina foram utilizadas como controle. Os 60 isolados foram testados em triplicata contendo uma placa controle para cada triplicata.

Para a avaliação positiva ou negativa foi realizada avaliação macroscópica em todos os fungos, observando a presença de halo ao redor das colônias, observando

também a ocorrência na mudança da coloração amarela no meio de cultura para coloração vermelha, indicado que esses isolados apresentam capacidade de produção da enzima L-Asparaginase. Os que não apresentaram mudança na coloração amarela para vermelho no meio de cultura indicam a incapacidade de produção da L-Asparaginase pelas espécies testadas.

3. Resultados e Discussão

O ensaio realizado a partir do teste do halo em ágar CDM suplementado com vermelho fenol mostrou que dos 60 isolados testados, 54 apresentaram halo vermelho ao redor da colônia (Tabela 1). A coloração vermelha ao redor da colônia ocorre devido à presença do vermelho fenol adicionado durante o preparo no meio de cultura sólida, indicativo para enzima L-Asparaginase, como mostra na (Figura 2). O vermelho de fenol é um indicador de pH o qual muda de uma coloração amarela em condições ácidas, para uma coloração vermelha em condições básicas/alcalinas. O surgimento do halo vermelho ao redor da colônia indica alteração do pH, podendo ter sido gerado a partir do acúmulo de amônia no meio (GULATI et al.,1997; THEANTANA et al.,2007).

Tabela 1: Identificação dos fungos que apresentaram halo vermelho ao redor das colônias.

Origem dos isolados	Código	Atividade Microbiana	Origem dos isolados	Código	Atividade Microbiana
Açaí	2620	+	Quassia	2667	+
	2621	+		22227	+
	2663	+	Taperebá	2305	+
Andiroba	2887	+		21001	-
	22251	+	Timbó	22249	+
	22255	+		22256	+
	22263	+	Tucumã	22247	+
	29266	+	*	2505	+
Bacurí	2675	+	*	2755	+
	22253	+	*	22245	+
Buriti	2609	+	*	2759	-
Citronela	2433	+	*	2761	-
Copaíba	2689	+	*	2907	-
	2722	+	*	2756	+
	2726	+	*	2757	+

	2443	+	*	2825	+
	2746	+	*	2826	+
Guaraná	2625	+	*	2842	+
	2626	+	*	2905	+
	2632	+	*	2916	+
	2637	+	*	2918	+
	22261	+	*	2922	+
	22257	-	*	2940	+
Ipê amarelo	2654	+	*	2955	+
Mendoncia hoffmannseggiana	2353	+	*	2968	+
Piper	2800	+	*	2079	+
	2801	+	*	22231	+
	2830	+	*	22243	+
	22250	+			
	22254	+			
	22264	-			
Psychotria barbiflora	2287	+			
Origem desconhecida *					

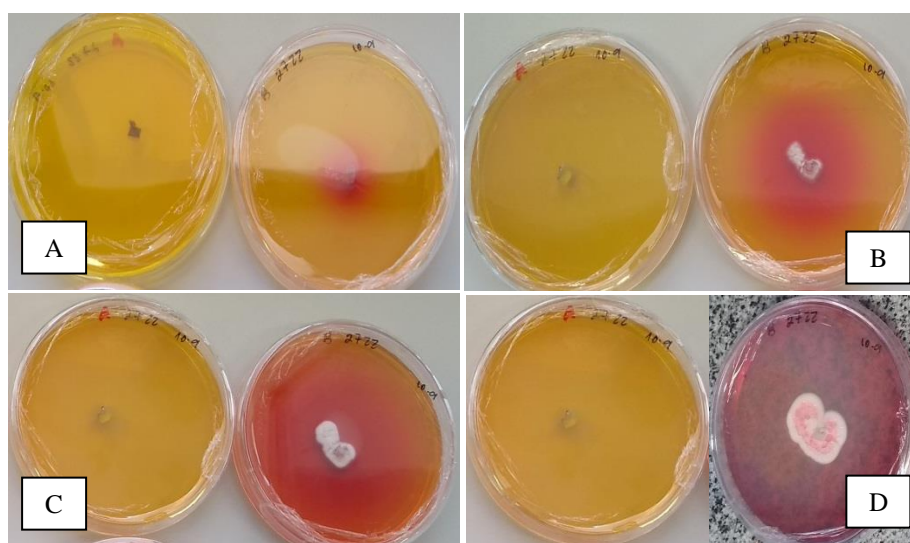


Figura 2: Formação do halo vermelho ao redor da colônia possível produção de L-Asparaginase pela espécie fúngica testada. As Figuras de (A) a (D) possuem uma placa controle à esquerda e uma placa teste à direita em triplicata. (A) 24 horas de incubação; (B) 48 horas de incubação; (C) 72 horas de incubação; (D) 96 horas de incubação.

Marília (2014) estudando a seleção de fungos endofíticos de cactácea quanto à capacidade de produzir L-Asparaginase, relata que das 44 linhagens de fungos testados 30 apresentaram halo de degradação com índice enzimático variando de 1,04 a 8,09.

Renata (2015) avaliando a produção de L-Asparaginase por fungos isolados do bioma do cerrado, descreve que das 40 cepas isoladas testadas em meio sólido acrescido de vermelho fenol 22 apresentaram halo de coloração vermelha ao redor da colônia.

O resultado obtido neste trabalho permitiu concluir que dos 60 isolados fúngicos testados em meio sólido, cinquenta e quatro apresentaram halo de coloração vermelha em meio contendo L-Asparagina, sais e vermelho de fenol indicativo para produção da enzima L-Asparaginase.

4. Conclusão

Confrontando os resultados obtidos neste estudo de prospecção de fungos produtores da enzima L-Asparaginase com a literatura foi possível verificar a relevância do mesmo, visando colaborar com as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de fármaco produzido no Brasil. A seleção dos fungos mais promissores através da triagem inicial pode indicar o uso destes isolados em testes mais elaborados. Contudo, na região Amazônica ainda não existem pesquisas que denotem a aplicação desta enzima no tratamento da leucemia. Desta forma, este estudo visou contribuir para os avanços nesta área. De modo que foi possível identificar um número bastante expressivo de fungos que produzem a enzima L-Asparaginase, ou seja, dos 60 fungos testados, 54 apresentaram atividade. Neste sentido, se faz necessário realizar ensaios mais elaborados que confirmem as espécies dos fungos isolados e de modo adicional ensaios enzimáticos que comprovem atividade antileucêmica desta enzima.

5. Referências

- ANBU, P.; SUBASH C.B. GOPINATH, BIDUR PRASAD CHAULAGAIN, THEAN-HOCK TANKG, AND MARIMUTHU CITARTAN. "Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine (2014), BioMed Research International, vol. 2015, Article ID 816419, 3 pages, (2015). Doi: 10.1155/2015/816419.
- AL RABAYAH; JADDOUH, S.; AMIREH, A. Cost minimization analysis of Peg-L-Asparaginase versus E.Coli L-Asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients: A Jordanian perspective. Value in Health, v. 19, n. 7, p. A721-A722, (2016).

- EINSFELDT, K., (2014), Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- EMADI, ASHKAN, HANIA; SAUSVILLE, EDWARD A. Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*, V. 73, 875-833, (2014).
- GULATI, R; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-Asparaginase producing micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, v.24, n. 1, p. 23-26, (1997).
- HIIYA, N.; SLUIS, I. M. V. D. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, v. 57, n. 4, p. 748-757, (2016).
- HUNG, L., LIU, Y., SUN, Y., YAN, Q. E JIANG, Z. (2014) Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. *Appl Environ Microbiol* 80,1561-1569.
- IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, v. 76, n. 1, p. 85-89, (1973).
- KARAMITOS. C. S. e LABROU , N. E. (2014). Extracellular expression of L-asparaginase from *E. chrysanthemi* in *E.coli*. *Sustain Chem Process* 2, 1-16.
- KUMAR, R.; DEVI, R. A.; NAIR, A.; BALAKRISHNAN, K. Stimulatory Effect Hydrolysed Okara Fortified with L-Asparagine on Fungal L-Asparaginase Production by *Aspergillus Terreus* MTCC 1782. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v. 4, n. 2, p. 1458-1468, (2013).
- MARILIA, G. D. S. S. Seleção de fungos endofíticos de cactácea quanto à capacidade de produzir L-Asparaginase. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos, (2014).
- MINISTERIO DE SAÚDE. Ministério da Saúde enviou medicamento para teste de qualidade. (2017).
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 61, p. 208-221, (2007).
- NIHARIKA YADAV, C.; SARKAR, S. Production of L-Asparaginase By *Fusarium Oxysporum* . Using Submerged Fermentation. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, v. 3, n.6,p.32-40, (2014).

- PALLEM, C.; NAGARJUN, V.; SRIKANTH, M. Productio of a tumor inhibitory enzyme, L-asparaginase throught solid state fermentation using *Furasium oxysporum*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v. 7, n. 2, p. 189-192, (2011).
- RENATA, P. C. D. M. Avaliação da produção de L-Asparaginase por fungos isolados do bioma do cerrado. Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, (2015).
- RIZZARI, C. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leucemia. *Curr Opin Oncol*, v. 25, n. 1, S1-S9,(2013).
- SARQUIS, M. I.; OLIVEIRA, E. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99,n. 5, p. 489-492, (2014).
- SAXENA, R.K., SINHA, U. 1981. L-Asparaginase and glutaminase activities in the cultures filtrates of *Aspergillus nidulans*. *Current Science* 50:281-219.
- TALLURI, V.; BHAVANA, M.; MAHESH KUMAR, M.; RAJAGOPAL, S. Lasparaginase: An ultimate anti-neoplastic enzyme. *International Letters of Natural Sciences*, v.10, n., p. 23-25, (2014).
- THEANTANA, T.; HYDE, K.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic isolated from thai medicinal plants. *KMITL Sci. Tech, J.* , v. 7, n. S1, p. 13-18, (2017).
- VIDYA, J. et al. Therapeutic enzymes: L-Asparaginase BT- Current developments biotechnology and bioengineering. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. T. (Eds.). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. 1. Ed. Elsevier, (2017). P. 249-265.
- VIMAL, A.; KUMAR, A. In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 98, p. 9-17, mar. (2017).