



## **Implicações clínicas e inovações nanobiotecnológicas da enzima L-asparaginase no tratamento da leucemia linfocítica aguda**

Guilherme Ferreira Fernandes<sup>1\*</sup>, Gabrielle Nascimento Santana<sup>2</sup>, Ellen de Oliveira Nabuco<sup>3</sup> e Genival Gomes da Silva Junior<sup>4</sup>

<sup>1\*</sup> Acadêmico do 6º período do Curso de Biomedicina, Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná – São Lucas JPR, Ji-Paraná, RO, Brasil. E-mail: [guiobiomedjipa@gmail.com](mailto:guiobiomedjipa@gmail.com)

<sup>2</sup> Acadêmica do 6º período do Curso de Farmácia, Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná – São Lucas JPR, Ji-Paraná, RO, Brasil. E-mail: [gabysantanajr@gmail.com](mailto:gabysantanajr@gmail.com)

<sup>3</sup> Acadêmica do 6º período do Curso de Biomedicina, Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná – São Lucas JPR, Ji-Paraná, RO, Brasil. E-mail: [ellenoliveira8888@gmail.com](mailto:ellenoliveira8888@gmail.com)

<sup>4</sup> Professor orientador, Mestre em educação escolar pela UNIR (2021), Especialista em docência do ensino superior pela FAFIRE (2016), Licenciatura em Química (2015). Docente no Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná – São Lucas JPR, RO, Brasil. E-mail: [genival.junior@saolucasjiparana.edu.br](mailto:genival.junior@saolucasjiparana.edu.br)

### **1. Introdução**

A leucemia linfocítica aguda (LLA) corresponde à uma desordem hematológica, evidenciada pela produção excessiva de linfócitos imaturos na medula óssea, os quais invadem o sangue periférico e se espalham para as regiões extramedulares. Estima-se que a LLA corresponda a 25% de todos os cânceres infantis e a 80% de todas as leucemias (DÍAZ-BARRIGA et al., 2021).

Dentre os fármacos mais utilizados no tratamento da LLA encontra-se a L-asparaginase (L-ASNase), uma enzima homotetramérica com propriedades antineoplásicas (DÍAZ-BARRIGA et al., 2021), a qual tem integrado os protocolos de quimioterapia combinada de LLA por quase 3 décadas. Contudo, nota-se grande discussão acerca de sua relação com a ocorrência de eventos adversos em pacientes que recebem a medicação (NARTA; KANWAR; AZMI, 2006).

A busca por novas proteoformas de L-ASNase tem sido constante desde sua instituição como biofármaco (COSTA-SILVA et al., 2020). Sendo assim, o presente estudo tem por intento elucidar acerca do mecanismo de ação da L-asparaginase, suas implicações clínicas e as inovações nanobiotecnológicas desta enzima no tratamento da leucemia linfocítica aguda.

### **2. Materiais e métodos**

O presente estudo trata-se de uma revisão bibliográfica integrativa, de abordagem qualitativa, embasada na literatura científica disposta em artigos científicos disponíveis em língua inglesa. As plataformas utilizadas para a pesquisa foram: PubMed, Nature, SciELO e Science Direct, sendo selecionados tanto estudos pagos, como os de livre acesso, pesquisados a partir de descritores em inglês, tais como: “L-asparaginase”, “Acute Lymphoblastic Leukemia”, “L-Asparagine”, “Asparaginase”, “Nanomedicine” e “Cancer”. Tais termos foram devidamente validados pelos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), sendo ainda acrescidos com o conectivo “and” durante as pesquisas.

Foi realizada a análise preliminar de 48 trabalhos sendo, porém, selecionados apenas 13 dentre estes. Os critérios de inclusão consistiram em artigos científicos originais e completos relacionados ao presente tema e publicados nos últimos anos. Já os resumos e quaisquer outros trabalhos sem relação com a temática foram excluídos.

### 3. Resultados e discussões

Segundo Egler, Ahuja e Matloub et al. (2016), os avanços na terapia da LLA promoveram uma melhora substancial na sobrevida, em 5 anos, para os pacientes com idade <20 anos, de 54% entre 1975 e 1977 e 90% entre 2004 e 2010. Tal fato, corrobora com a instituição progressiva de protocolos clínicos pautados na utilização da L-ASNase a partir da década de 1960 (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Díaz-Barriga et al. (2021), por sua vez, mencionam que a ASNase é responsável por catalisar a desaminação hidrolítica do aminoácido L-asparagina, formando ácido aspártico e amônia. Este aminoácido, segundo Pokrovskaya et al. (2022), é vital nos processos metabólicos de células normais e leucêmicas. Contudo, estas últimas são incapazes de sintetizá-lo vide à ausência, ou baixa expressão da enzima L-asparagina sintetase, passando, assim, a depender da asparagina presente no soro (POKROVSKAYA et al., 2022).

A administração de ASNase, segundo Battistel et al. (2021), promove a clivagem da asparagina sérica, logo, o esgotamento desse aminoácido faz com que a taxa de produção de DNA, RNA e proteínas declinem, induzindo a morte das células neoplásicas (BATTISTEL et al., 2021).

Ceconello et al. (2020), relatam que a L-ASNase está associada à inúmeros efeitos adversos, os quais são evidenciados pelo alto índice de reações de hipersensibilidade. Tal achado vai ao encontro do estudo de Panosyan et al. (2004), que indica a origem bacteriana da enzima como principal responsável pela antigenicidade indesejada, culminando, ainda, na formação de anticorpos anti-ASNase (CECONELLO et al., 2020; PANOSYAN et al., 2004).

Nesta lógica, Narta, Kanwar e Azmi (2006), reportam que a imunogenicidade das L-ASNases pode acarretar em manifestações alérgicas e reações adversas devida a inibição da síntese proteica. Bueno et al (2020), citam alguns eventos, como edema, eritema, desordens respiratórias e na coagulação, pancreatite, broncoespasmos, neuro e hepatotoxicidade, redução da pressão sanguínea, hipercalemia e choque anafilático (BUENO et al., 2020).

De acordo com Battistel et al. (2020), os homens são os mais acometidos pelas reações alérgicas. A frequência destes eventos, para os autores, oscila entre 3 a 45% havendo, ainda, diferenças no perfil imunogênico de cada formulação, onde 13% a 30% concerniram às enzimas nativas e 10% às formas conjugadas com polietilenoglicol (PEG). Esse achado, conforme Beckett e Gervais (2019), podem ser explicados pelo fato dos epítomos da L-ASNase serem camuflados com o PEG (BATTISTEL et al., 2020).

Ainda convém ressaltar o estudo realizado pelo Grupo de Oncologia Pediátrica sobre a LLA de células B, citado por Panosyan et al. (2004), o qual mostra inviabilização da terapia completa de L-ASNase em 25% dos pacientes, devido à alta frequência de reações alérgicas (PANOSYAN et al., 2004). Paralelamente, Asselin e Rizzari (2015), destacam que a depleção plena e sustentada do aminoácido é crucial para o sucesso terapêutico a longo prazo (ASSELIN; RIZZARI, 2015).

O tempo de meia-vida das L-ASNases nativas são naturalmente baixos (18-24 horas) (NARTA; KANWAR; AZMI, 2006). Nesse sentido, Egler, Ahuja e Matloub et al. (2016), salientam que a produção de anticorpos, potencializa a redução da meia-vida sérica e atividade da enzima. Em vista disso, Panosyan et al. (2004), apontam estudos que indicam maior rapidez no *clearance* de pacientes com alta titulação de anticorpos anti-ASNases (PANOSYAN, 2004).

Pokrovskaya et al. (2022), ainda expõem que além da imunogenicidade e da instabilidade química da proteína, também pode ocorrer degradação e maior taxa de eliminação desta pelas proteases lisossomais humanas, como a catepsina B e a asparagina endopeptidase (POKROVSKAYA et al., 2022).

As estratégias de mitigação destes entraves baseiam-se na nanobiotecnologia sendo que, a atual alternativa aprovada para uso clínico, tange às L-ASNases conjugadas com

nanopartículas de PEG (CECCONELLO, 2020). Segundo Ducan (2006), a conjugação covalente de polímeros sintéticos a proteínas é capaz de promover maior resistência no plasma, reduzir a imunogenicidade e pode, inclusive, elevar o efeito terapêutico (DUCAN, 2006).

Ademais, Narta, Kanwar e Azmi (2006), estimam que a meia-vida média para as L-ASNases conjugadas seja de aproximadamente 357 horas. Contudo, para Asselin e Rizzari (2015), esse valor pode ser reduzido em pacientes com hipersensibilidade prévia. Além disso, Beckett e Gervais, (2019), enfatizam que a conjugação, por si só, é insuficiente para eliminar a imunogenicidade, tendo em vista o fenômeno de hipersensibilidade silenciosa mesmo em pacientes tratados com L-ASNase peguilada, além de casos de reatividade em situações de oscilações térmicas sofridas pelo biofármaco (BECKETT; GERVAIS, 2019).

Nesse sentido, Pokrovskaya et al. (2022), citam outras tentativas de modificações químicas a fim de reduzir a imunogenicidade e melhorar a estabilidade térmica e proteolítica da enzima. Os autores citam o acoplamento da L-ASNase ao dextrano, um composto capaz de aumentar o raio hidrodinâmico da proteína e diminuir sua taxa de filtração renal, porém este possui efeito inferior ao PEG (POKROVSKAYA et al., 2022; ZAMAN, et al., 2019).

Vale ainda frisar que estudos pautados na imobilização enzimática, tal como os descritos por Vina, Karsakevich e Bekers (2001), relatam a síntese de glicoconjugados de ASNase de *Erwinia carotovora*, a partir da ligação covalente ao polissacarídeo levano. A utilização do levano de alto peso molecular, neste trabalho, foi capaz de diminuir a atividade enzimática, aumentar o Km, pH ótimo da enzima e elevar a estabilidade térmica em temperaturas de 40°C a 50°C (VINA; KARSAKEVICH; BEKERS, 2001). Já Balcão et al. (2001), por sua vez, propõem a imobilização covalente da enzima em suporte de agarose ativado, procedido de *crosslinking* com aldeídos de alto peso molecular, promovendo, também, o aumento da estabilidade térmica e redução da atividade enzimática (BALCÃO et al., 2001).

Além destas, outras formas de apresentação da ASNase são ambicionadas, tal como a nanoencapsulação. Para Bueno et al. (2020), esta estratégia pode ser efetiva na proteção contra proteases e anticorpos. Os autores evidenciaram no estudo em questão, a síntese de um promissor polimerossomo. A estrutura foi capaz de suportar 800 moléculas de L-ASNases em cada vesícula, sem que estas perdessem sua atividade (BUENO et al., 2020).

Pesquisas mais recentes, como o estudo pioneiro de Díaz-Barriga et al. (2021), trazem a utilização de encapsulação da ASNases de *Escherichia coli* em partículas semelhantes a vírus, baseadas em bacteriófagos P22. Os autores evidenciaram ação citotóxica da ASNase-P22 em linhagens celulares MOLT-4, de forma dependente da concentração. Esses nanoreatores foram funcionais na temperatura de 37°C e no soro humano por 24 horas, quando estabilizados com glicerol a 10%, porém a eficiência enzimática e a termoestabilidade foram menores quando comparada a formulação comercial Leunase® (DÍAZ-BARRIGA et al., 2021). A tabela 1 indica outros exemplos de nanoencapsulação estudados para a ASNase.

Tabela 1 - Estratégias de encapsulação estudadas para a ASNase.

<i>Sistema</i>	<i>Agente químico</i>	<i>Método</i>	<i>Recuperação de atividade enzimática</i>	<i>Referência</i>
Nanopartícula	Quitossana e tripolifosfato de sódio	Gelatinização ionotrópica	59,1% - 70,8%	(BAHREINI et al., 2014)
Micropartícula	Sericina da seda	Crosslinkin com glutaraldeído	Retenção de 62% de atividade	(ZHANG et al., 2004)
Lipossomos	Fosfolipídeos de soja e colesterol	Evaporação reversa	66,47%	(WAN et al., 2016)

---

Nanopartícula com enzima peguilada	Poli (ácido láctico-co-glicólico)	Dupla emulsificação	65,1% peguilada 77,88% livre	(SURIVAS UDEV et al., 2011)
Nanoesfera oca	Alginato-graft-poli(etilenoglicol), $\alpha$ -ciclodextrina	Autoagregação	37%-38%	(HA et al., 2010)

---

Fonte: Adaptado de Apolinário, (2018).

Pokrovskaya et al. (2022), ainda frisam que atualmente há um novo biofármaco de L-ASNase sendo testado em ensaios clínicos, a Eryaspase, a qual corresponde a moléculas de L-asparaginase inseridas em hemácias compatíveis com os grupos sanguíneos dos pacientes. A encapsulação nos eritrócitos, assim como em lipossomos, evita o reconhecimento imunológico e degradação pelas proteases. Além do maior tempo de meia-vida na corrente sanguínea, também foi relatado a não formação de imunoglobulinas após a administração do fármaco (POKROVSKAYA et al., 2022).

#### 4. Considerações finais

Tendo em vista os aspectos supracitados, pode-se dizer que a enzima L-asparaginase é um biofármaco de grande relevância na esfera médica. Contudo, suas implicações clínicas, sobretudo do ponto de vista imunológico, postergam ou inviabilizam o tratamento dos pacientes com LLA. Sendo assim, as inovações nanobiomédicas e nanofarmacológicas aplicadas a esta terapêutica, tem se constituído como principal recurso para a mitigação dos efeitos colaterais causados pela proteína. Nesse sentido, é primordial a continuidade e intensificação dos estudos clínicos voltados a pesquisa de novas nanopartículas e formas de conjugação, bem como a compreensão dos aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos destes compostos, a fim de alcançar o escopo esperado.

#### 5. Referências

ASSELIN, B; RIZZARI, C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, n. 8, p. 2273–2280. 2015. Disponível em:<doi:10.3109/10428194.2014.1003056> Acesso em: 12 out. 2022.

BALCÃO, V. M et al. Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 3, p. 537–542. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11386876/>> Acesso em: 16 out. 2022.

BATTISTEL, A. P et al. Allergic reactions to asparaginase: Retrospective cohort study in pediatric patients with acute lymphoid leukemia. Hematology, **Transfusion and Cell Therapy**, v. 43, n. 1, p. 9-14. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32014473/>> Acesso em: 12 out. 2022.

BECKETT, A; GERVAIS, D. What makes a good new therapeutic l-asparaginase? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 152. 2019. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31552479/>> Acesso em: 16 out. 2022.

BUENO, C. Z et al. L-Asparaginase Encapsulation into Asymmetric Permeable Polymersomes. **ACS Macro Letters**, v. 9, n. 10, p. 1471-1477, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35653665/>> Acesso em: 16 out. 2022.

CECCONELLO, D. K et al. Asparaginase: an old drug with new questions. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 42, n. 3, p. 275-282. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.07.010>> Acesso em: 13 out. 2022.

COSTA-SILVA, T. A et al. Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. **Blood Reviews**, v. 43, n. 100651. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100651>> Acesso em: 11 out. 2022.

DÍAZ-BARRIGA, C et al. Asparaginase-Phage P22 Nanoreactors: Toward a Biobetter Development for Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 604. 2021. Disponível em: <[doi:10.3390/pharmaceutics13050604](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050604)> Acesso em: 11 out. 2022.

DUNCAN, R. (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 9, p. 688–701. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrc1958>> Acesso em: 16 out. 2022.

EGLER, R. A; AHUJA, S. P; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62–71. 2016. Disponível em <<https://doi.org/10.4103/0976-500X.184769>> Acesso em: 12 out. 2022.

PANOSYAN, E. H et al. Asparaginase Antibody and Asparaginase Activity in Children With Higher-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 26, n. 4, p. 217–226. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15087948/>> Acesso em: 13 out. 2022.

POKROVSKAYA, M. V et al. Molecular Analysis of L-Asparaginases for Clarification of the Mechanism of Action and Optimization of Pharmacological Functions. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 599. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030599>> Acesso em: 15 out. 2022.

VINA, I; KARSAKEVICH, A; BEKERS, M. Stabilization of anti-leukemic enzyme L - asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. **Journal of molecular catalysis B enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 551–558, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381117700000436>> Acesso em: 16 out. 2022.