

Biodiversidad microbiana en la producción del biofármaco L-asparaginasa: una revisión sobre su potencial terapéutico

Microbial biodiversity in the biopharmaceutical production of L-asparaginase: a review of its therapeutic potential

Omar Santiago Pillaca-Pullo¹ 
omar.pillaca@uwiener.edu.pe

Artículo recibido: 9/05/2022
Revisado por pares
Artículo aceptado: 22/09/2022
Artículo publicado: 15/10/2022

Autor de correspondencia
Omar Santiago Pillaca-Pullo,
omar.pillaca@uwiener.edu.pe



©El autor, 2022. Publicado por la Universidad Norbert Wiener (Lima, Perú)

Citar como: Pillaca-Pullo O. Biodiversidad microbiana en la producción del biofármaco L-asparaginasa: Una revisión sobre su potencial terapéutico. Revista de Investigación (de la Universidad Norbert Wiener). 2022; 11(2): r0005. doi:<https://doi.org/10.37768/unw.rinv.11.02.r0005>

Resumen

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia común en pediatría. En el Perú se reportan alrededor de 400 casos nuevos al año en infantes. Los esquemas terapéuticos para tratar la LLA incluyen la enzima L-asparaginasa, de origen bacteriano, como biofármaco de primera línea. Sin embargo, la L-asparaginasa posee limitaciones que afectan su uso terapéutico y que son producto de su origen procariótico. En ese sentido, se realizó una búsqueda de artículos electrónicos usando bases de datos como Scopus, Web of Science, PubMed, Google Académico y SciELO. Se seleccionaron artículos originales y revisiones relacionadas con biodiversidad microbiana como fuente de enzima L-asparaginasa con características novedosas, como altos valores de tiempo de vida media, velocidad enzimática y afinidad por el sustrato; y su potencial aplicación en la terapéutica por el bajo riesgo de producir alergia y actividad eficiente en el cuerpo humano. Los hallazgos mostraron una amplia variedad de ambientes naturales con condiciones de proveer organismos nuevos o poco estudiados con capacidad de producir L-asparaginasa. Se concluye que la investigación en biodiversidad microbiana es una gran oportunidad de descubrir innumerables alternativas de L-asparaginasa con gran valor comercial que podrían superar las limitaciones encontradas en las formulaciones actuales.

Palabras claves: L-asparaginasa, biodiversidad microbiana, biofármaco

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is an aggressive type of blood cancer and the most common neoplasm in pediatrics. In Peru, around 400 new cases are reported per year in infants. The therapeutic schemes to treat ALL include the bacterial-derived L-asparaginase enzyme as a first-line biopharmaceutical. However, L-asparaginase has limitations that affected its therapeutic use due to its prokaryotic origin. Thus, a search of electronic articles was carried out using databases such as Scopus, Web of Science, PubMed, Google Scholar, and SciELO. We selected original articles and reviews related to microbial biodiversity as a source of L-asparaginase enzyme with novel characteristics and its potential application in therapeutics. The findings showed a wide variety of natural environments with conditions to provide new or poorly studied organisms with the ability to produce L-asparaginases. It is concluded that research in microbial biodiversity is a great opportunity to discover innumerable alternatives of L-asparaginase with characteristics of great commercial value that could exceed the limitations found in current formulations.

Keywords: L-asparaginase, microbial biodiversity, biopharmaceutical

¹ Centro de Investigación en Biodiversidad para la Salud, Universidad Privada Norbert Wiener. Lima, Perú.

INTRODUCCIÓN

L-asparaginasa (L-asparagina amido hidrolasa E.C. 3.5.1.1) cataliza la hidrólisis de L-asparagina en L-ácido aspártico y amonio^(1,2). Es una enzima usada principalmente como agente quimioterápico para el manejo de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y linfomas no Hodgkin, aunque también se usa en el tratamiento de carcinoma pancreático, leucemia aguda mielomonocítica, leucemia aguda mielocítica, leucemia crónica linfocítica, retículo sarcoma, linfosarcoma y melanoma sarcoma⁽³⁾. Ha contribuido con éxito a aumentar las tasas de supervivencia hasta el 90%⁽⁴⁻⁶⁾, por lo cual se ha configurado como un medicamento indispensable en la terapéutica oncológica⁽⁷⁾.

En 1978, fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) el primer biofármaco de L-asparaginasa para el tratamiento de LLA⁽⁸⁾ y, actualmente, se encuentra en la Lista de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud^(7,9) y en el Petitorio Nacional Único de Medicamentos Esenciales del Perú. Se estima que su demanda en el mercado terapéutico alcance los 420 millones de dólares en 2025⁽¹⁰⁾, ya que su demanda mundial representa el 40% del total de enzimas y la tercera parte de los agentes antileucémicos⁽¹¹⁾. Por otra parte, su uso también ha destacado en la industria alimentaria para prevenir la formación de acrilamida (neurotoxina potencialmente carcinogénica) durante el procesamiento de alimentos a altas temperaturas^(6,12).

A pesar de ello, el tratamiento de LLA con L-asparaginasa se asocia con el desarrollo de efectos adversos y neutralización del biofármaco por el sistema inmune del paciente bajo diversos mecanismos que reducen su eficiencia⁽⁸⁾. Las características ideales de la L-asparaginasa como biofármaco exitoso incluyen una alta eficiencia, así como ausencia de efectos colaterales y alto tiempo de vida media que permita reducir las frecuencias de administración⁽⁵⁾. En ese sentido, la búsqueda de nuevas fuentes de L-asparaginasa abre la posibilidad de incrementar el número de candidatos potenciales, lo que a largo plazo garantizaría la oferta del biofármaco en el mercado y su disponibilidad ante posibles sucesos inesperados de desabastecimiento en los países importadores.

Esta revisión narrativa tiene como objetivo abordar la relevancia de la biodiversidad microbiana como una fuente interminable de organismos productores de L-asparaginasa novedosas y con características que permitirán superar las limitaciones presentadas por las formulaciones actuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación se realizó la búsqueda bibliográfica de artículos electrónicos de revistas indexadas en los buscadores de Scopus, Web of Science, PubMed, Google Académico y SciELO, hasta el año 2022. Se seleccionaron artículos originales, revisiones sistemáticas y revisiones narrativas. Los criterios de inclusión se basaron en la relación directa con el objetivo de la investigación, es decir, la biodiversidad microbiana como fuente de enzima L-asparaginasa con características novedosas para su aplicación en la terapéutica. Los criterios de exclusión fueron cartas al editor, tesis, periódicos, conferencias, noticias, comentarios y editoriales. Se identificaron 200 trabajos, de los cuales solo 47 cumplían con los criterios de inclusión y fueron analizados sin restricción de idioma.

Mecanismo de acción y formas comerciales terapéuticas

El mecanismo de reacción de L-asparaginasa involucra la formación de un intermediario β -acil con la enzima y la simultánea liberación de amonio; la posterior incorporación de una molécula de agua lleva a la liberación de L-aspartato y enzima libre regenerada (fig. 1). La actividad antineoplásica se consigue gracias a la hidrólisis de las reservas del aminoácido L-asparagina en la sangre hasta concentraciones pequeñas de 3 μ M⁽⁸⁾. En vista que el aminoácido es crucial para la síntesis de ADN, ARN y proteínas, su agotamiento provoca el arresto del ciclo celular en la fase G1 y la posterior muerte de las células leucémicas susceptibles (apoptosis dependiente p53)^(4,6,12). Las células sanas no requieren L-asparagina externa gracias a la actividad de la enzima L-asparagina sintetasa (EC 6.3.5.4) y su capacidad para sintetizar el aminoácido⁽¹³⁾; por lo tanto, el mecanismo antitumoral de la L-asparaginasa es altamente selectivo para células tumorales⁽¹⁴⁾.

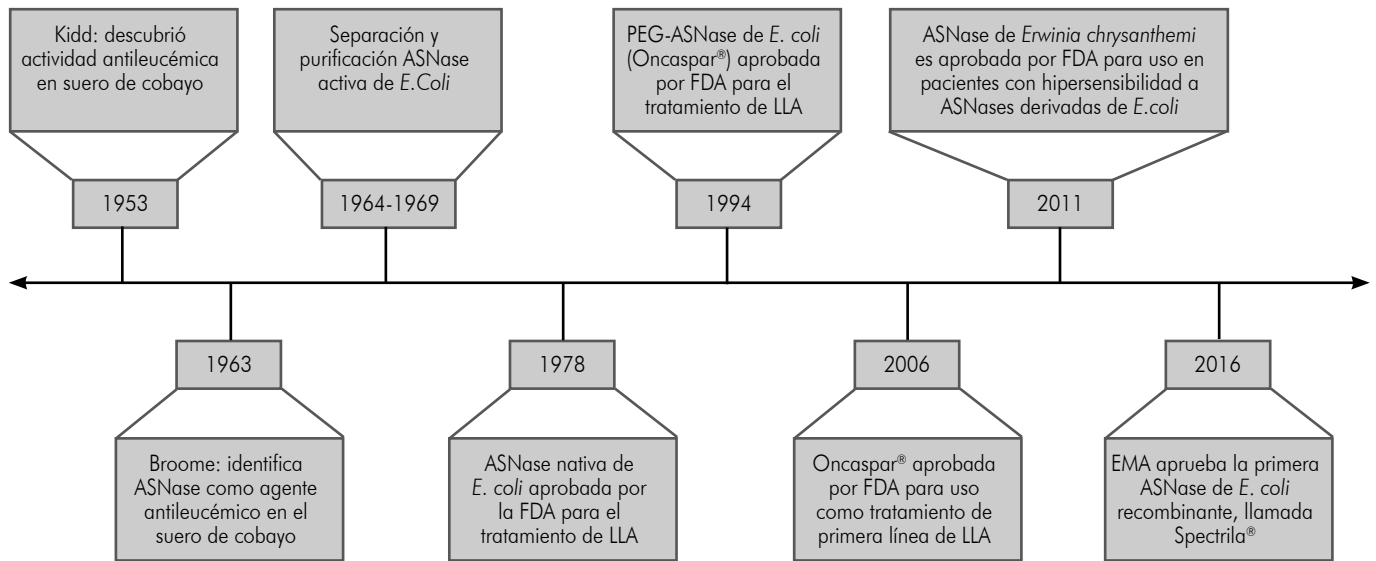


Figura 1. Resumen de los avances en investigación y uso de L-asparaginasa (ASNasa) en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (LLA). FDA: USA Food and Drug Administration. EMA: European Medicines Agency. Adaptado de Torres *et al.* (45).

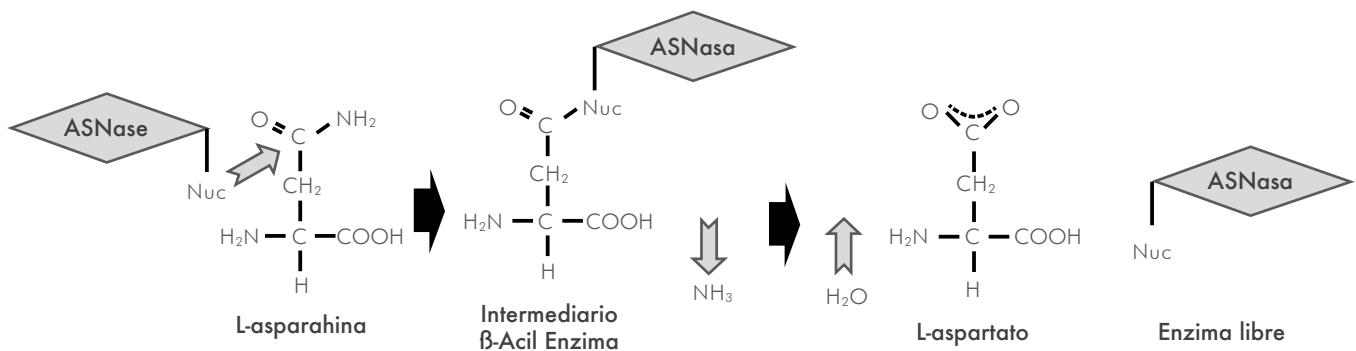


Figura 2. Mecanismo de reacción de la enzima L-asparaginasa (ASNasa).

Actualmente, las formas comerciales de la enzima son de origen bacteriano, tanto de *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi* (renombrada *Dickeya chrysanthemi* en 2005 por el Laboratorio de Evolución Genómica de la Universidad de Wisconsin) (15-17). Sin embargo, las L-asparaginases bacterianas suelen ser dianas de anticuerpos y proteasas (1). Una vez administrada en el cuerpo humano, los linfoblastos leucémicos pueden degradarla mediante proteasas lisosomales (catepsina B y asparagina endopeptidasa), lo que potencia el procesamiento de antígenos y desencadena hipersensibilidad (4). Los síntomas más comunes incluyen anafilaxia, dolor, edema de Quincke, urticaria, eritema, rash y prurito, por lo cual son la causa principal para interrumpir el tratamiento (4, 18). L-asparaginasa nativa de *E. coli* provoca respuesta inmunitaria en

los pacientes, principalmente por su gran tamaño y origen procarionta (4), por lo que alcanza altas tasas de hipersensibilidad (30-75%) y de desarrollo de anticuerpos anti-EcAII (70%) (7, 18). Aunque la producción de anticuerpos no siempre está asociada con hipersensibilidad, sí puede provocar la rápida inactivación del biofármaco y acortar su vida media, lo que genera resistencia al tratamiento, reduce su actividad y desencadena la “inactivación silenciosa” en aproximadamente el 30% de los pacientes (18).

Por otra parte, L-asparaginasa también puede presentar actividad dual para hidrólisis de L-asparagina y L-glutamina, debido a la similitud estructural entre ambos aminoácidos (9, 12). Algunos reportes que indican que la actividad

L-glutaminasa es necesaria o indispensable para potenciar el efecto antitumoral, principalmente asociada con células que expresan la enzima L-asparagina sintetasa (4). Sin embargo, dicha actividad no es necesaria frente a células cancerosas negativas de L-asparagina sintetasa, por lo que se ha intentado descubrir L-asparaginasa libre de actividad L-glutaminasa (4, 9, 19). Los efectos secundarios recurrentes, como disfunción hepática, hiperglucemia, broncoespasmo, pancreatitis, leucopenia, convulsiones neurológicas y anomalías de la coagulación que conducen a trombosis o hemorragia intracraneal, están relacionados con la actividad L-glutaminasa presente en las enzimas comercializadas actualmente (4, 7, 17).

Existen tres principales tipos de L-asparaginasa aprobadas por la FDA y manufacturadas para uso terapéutico (tabla 1): a) forma nativa de *E. coli*, considerada como el *gold estándar* en el tratamiento y cuya vida media es de 30 horas; b) forma nativa de *E. coli* bioconjugada con polietilenglicol (pegilada), modificación que incrementa la vida media hasta 6 días, con reducción de los efectos adversos e inmunogenicidad; y c) forma nativa aislada de *Erwinia chrysanthemi*, cuya vida media es de 14 horas, posee un costo elevado y se usa en casos de reacción inmunológica producida por L-asparaginasa de *E. coli* (9, 11, 14). La forma nativa de *E. coli* fue la primera enzima antileucémica utilizada

Tabla 1. Tipos de L-asparaginasa comercializadas para uso terapéutico (11, 47)

Tipo de enzima	Marca comercial
Nativa de <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kidrolase® - EUSA Pharma • Elspar® - Ovation Pharmaceuticals • Crasnitin® - Bayer AG • Leunase® - Sanofi-Aventis • Paronal® - Christiaens, Breda • Asparaginase Medac® - Kyowa Hakko
Nativa de <i>E. coli</i> pegilada (pegaspargasa)	<ul style="list-style-type: none"> • Oncaspar® - Enzon Pharmaceuticals Inc
Nativa de <i>Erwinia chrysanthemi</i> (crisantaspasa)	<ul style="list-style-type: none"> • Erwinase® - EUSA Pharma
Forma recombinante producida en <i>E. coli</i> *	<ul style="list-style-type: none"> • Spectrila® - Wacker Biotech

* Forma recombinante aprobada en Europa (EMA - European Medicine Agency)

Observación: Algunas de estas formulaciones ya no están disponibles en el mercado y ahora solo son citadas en la literatura.

Tabla 2. Biodiversidad microbiana con capacidad de producir L-asparaginasa

Microorganismo	Especie	Referencia
Bacterias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>A. glutaminosificans</i> ,	(17) (6) (4)
	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	(12)
	<i>Azotobacter vinelandii</i>	(11)
	<i>Aerobacter</i> sp.	(3)
	<i>Bacillus antitudinis</i> , <i>B. aryabhatai</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. sonorensis</i> , <i>B. weihenstephanensis</i>	(10)
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ,	
	<i>Cyclobacterium</i> sp.	
	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i>	
	<i>Erwinia carotovora</i>	
	<i>Erythrobacter</i> sp.	
	<i>Gracilibacillus</i> sp.	
	<i>Halomonas elongate</i>	
	<i>Helicobacter pylori</i>	
	<i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>L. casei</i>	
	<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
	<i>Photobacterium</i> sp.	
	<i>Proteus vulgaris</i> .	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. oitidis</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. fluorescens</i> ,	
	<i>Marinomonas</i> sp.	
	<i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i> ,	(25)
	<i>Micrococcus</i> sp.	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	<i>Nocardiosis alba</i>	
	<i>Oceanimonas</i> sp.	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		
<i>Rhizobium etli</i> ,		
<i>Salinicoccus albus</i> , <i>S. alkaliphilus</i> , <i>S. iranensis</i> , <i>S. roseus</i> , <i>S. salsiraiiae</i> ,		
<i>Serratia marcescens</i> ,		
<i>Shewanella</i> sp.		
<i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. capitis</i> , <i>S. roseus</i> ,		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
<i>Thermus thermophilus</i> ,		
<i>Vibrio succinogenes</i>		
<i>Wolinella succinogenes</i> ,		
<i>Xanthomonas</i> sp.,		
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .		
Arqueas	<i>Pyrobaculum caldifontis</i> ,	(11)
	<i>Pyrococcus yayanosii</i> , <i>P. furiosus</i> , <i>P. horikoshii</i> ,	(25)
	<i>Thermococcus gammatolerans</i> , <i>T. kodakaraensis</i> , <i>T. kodaka</i> , <i>T. zilligii</i>	

Levaduras	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. utilis</i> , ⁽³³⁾
	<i>Issatchenkia orientalis</i> , ⁽¹²⁾
	<i>Leucosporidium scottii</i> , <i>L. muscorum</i> , ⁽¹¹⁾
	<i>Pichia polymorpha</i> ,
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> ,
	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. rubra</i> , ⁽²⁵⁾
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,
	<i>Sarocladium sp.</i> ,
	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Hongos	<i>Aspergillus alliaceus</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. tubingensis</i> , ⁽¹⁾
	<i>Basidiomycetes sp.</i> , ⁽¹⁷⁾ ⁽⁶⁾
	<i>Bipolaris sp.</i> , ⁽¹⁶⁾
	<i>Cladosporium sp.</i> ,
	<i>Colletotrichum sp.</i> ,
	<i>Dothiodesomyces sp.</i> ,
	<i>Eupenicillium sp.</i> ,
	<i>Flammulina velutipes</i> ,
	<i>Fusarium sp.</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i>
	<i>Helminthosporium sp.</i> ,
	<i>Macrophoma sp.</i> ,
	<i>Mucor hiemalis</i> ,
	<i>Nigrospora sp.</i> ,
	<i>Paecilomyces sp.</i> , ^(3,10,12,25)
	<i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>P. simplicissimum</i>
	<i>Phaeotrichoconis sp.</i> ,
	<i>Phoma sp.</i> ,
	<i>Pithomyces sp.</i> ,
	<i>Rhizomucor miehei</i> ,
	<i>Sarocladium strictum</i> ,
	<i>Taxomyces andreanae</i> ,
<i>Talaromyces pinophilus</i> ,	
<i>Trichoderma viride</i> ,	
<i>Trichosporon asahii</i>	
Actinobacterias	<i>Micromonospora sp.</i> ,
	<i>Nocardioopsis sp.</i> ,
	<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>R. erythropoli</i> ,
	<i>Streptomyces albidoflavus</i> , <i>S. alkaliphilus</i> , <i>S. aurantiacus</i> , <i>S. ansiochromogenes</i> , <i>S. brollosae</i> , <i>S. colinus</i> , <i>S. enissocaeasilis</i> , <i>S. fradiae</i> , <i>S. ginsengisoli</i> , <i>S. griseus</i> , <i>S. gulbargensis</i> , <i>S. karnatakensis</i> , <i>S. labedae</i> , <i>S. longsporusflavus</i> , <i>S. noursei</i> , <i>S. parvulus</i> , <i>S. rochei</i> , <i>S. thermoluteus</i> , <i>S. venezuelae</i> , ^(3,11,12,25)
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>

Algas	<i>Alternaria sp.</i>
	<i>Chaetomium sp.</i>
	<i>Chlamydomonas sp.</i>
	<i>Chlorella vulgaris</i>
	<i>Cladosporium sp.</i>
	<i>Colletotrichum sp.</i>
	<i>Curvularia sp.</i>
	<i>Nigrospora sp.</i>
	<i>Paecilomyces sp.</i>
	<i>Phaeotrichoconis sp.</i>
	<i>Phoma sp.</i>
	<i>Pithomyces sp.</i>
	<i>Spirulina máxima</i>
<i>Vaucheria uncinata</i>	

clínicamente ⁽¹¹⁾ y forma parte del principal esquema de tratamiento en el Perú, mientras que la versión pegilada no fue aprobada por el Instituto de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (IETSI) debido a la ausencia de fundamentos suficientes que justifiquen la seguridad de su aplicación ⁽²⁰⁾.

Importancia de la biodiversidad microbiana en la bioprospección de L-asparaginasa

Los microorganismos juegan un papel fundamental en la evolución de las formas de vida superiores ⁽²¹⁾. Sin embargo, su biodiversidad e importancia científica han sido poco exploradas históricamente, por lo que, incluso hasta el día de hoy, ignoramos el comportamiento de sus dinámicas y diversidad poblacionales ⁽²¹⁻²³⁾. La biodiversidad microbiana está compuesta por eubacterias, arqueas, protistas, hongos unicelulares y virus de todas las formas (bacteriófagos, arqueófagos y virus de eucariotas), además que posee una amplia distribución y capacidad de desarrollarse en casi todas las regiones de la tierra ^(21, 23). Sin embargo, la biodiversidad microbiana no es igual en todas partes, por lo que siempre existe la posibilidad de encontrar un número nuevo de aplicaciones industriales tan grande como la variedad de entornos a los que se enfrentan los microorganismos, los cuales son consecuencia de una serie de procesos de adaptación a los diversos ambientes ^(21, 23, 24). Por esta razón, la bioprospección (búsqueda sistemática de fuentes novedosas de biomoléculas) se ha convertido en la principal estrategia de obtención de enzimas con

nuevos perfiles catalíticos que puedan satisfacer la demanda farmacéutica u otras (7, 24). Además, constituye una oportunidad para realizar el descubrimiento de nuevos microorganismos y biomoléculas (22, 24).

En ese sentido, microorganismos productores de L-asparaginasa han sido descubiertos en condiciones ambientales normales y extremas; aislados de suelo, agua, ríos, sedimentos del fondo marino e, incluso, en huesos de ballena (4, 7, 25). Si bien los organismos terrestres han sido las principales fuentes de enzimas, nuevos entornos deben ser explorados a fin de descubrir fuentes novedosas. Tres diferentes entornos cuya biodiversidad microbiana amerita ser considerada en la investigación son: a) El ambiente marino, aún poco caracterizado, que es uno de los hábitats más ricos y extensos del planeta (representa el 70% de la superficie), lo que proporcionando un gran espacio con diferentes entornos que posibilitan el desarrollo de infinidad de microorganismos productores de enzimas con estructuras novedosas, pesos moleculares más bajos y alta especificidad por el sustrato (3); b) El continente antártico, que presenta condiciones altamente rigurosas como limitación de nutrientes, valores de pH extremos, bajas temperaturas y altas concentraciones de sal, lo cual expone a los microorganismos a un estrés constante, por lo que la supervivencia depende de la adaptación fisiológica a nivel enzimático (7, 26); y c) Los ambientes hipersalinos, que son ambientes extremos que contienen concentraciones de sal superiores a las del agua de mar (3,5 % de sales disueltas totales), pero son ecosistemas con una alta densidad microbiana (procariotas y eucariotas), con capacidad interna para equilibrar la presión osmótica del medio ambiente y resistir los efectos desnaturalizantes de sales (27). Las bacterias halófilas y halotolerantes han demostrado gran potencial en la producción de enzimas con características novedosas, al modificar su estructura para tolerar el alto contenido de sales y la baja actividad de agua; además, podrían contener L-asparaginasas con nuevas propiedades inmunológicas para pacientes hipersensibles, aunque hay pocos estudios acerca de la producción de enzimas farmacéuticas (27, 28).

Con base en lo mencionado, estos ambientes presentan altas posibilidades de generar enzimas

con amplias características: estabilidad térmica, adaptabilidad a temperaturas, pH y salinidad extremos, además de nuevas propiedades químicas/estereoquímicas y de afinidad por L-asparagina. Los estudios de bioprospección deben sustentarse adecuadamente con las tecnologías disponibles en la actualidad, con el fin de ser altamente efectivos. Los enfoques filogenéticos moleculares, en combinación con métodos clásicos de cultivo, aislamiento y análisis fenotípico, están estimulando el descubrimiento de multitud de nuevos microorganismos (21). Sin embargo, aún falta mejorar nuestra comprensión de la importancia de la biodiversidad microbiana y las formas en que podemos manipular o gestionar esta diversidad (22). En ese sentido, el desarrollo de herramientas moleculares permite caracterizar la diversidad de microorganismos no cultivables presentes en ambientes naturales (22, 29). La metagenómica, la secuenciación de próxima generación y los análisis *in-silico* son poderosas herramientas para acceder la abundante biodiversidad de muestras de los ecosistemas nativos, que sumados a la bioinformática y los análisis estadísticos nos permiten manejar la gran cantidad de datos obtenidos, lo que permite el descubrimiento de nuevas enzimas (24, 29).

L-asparaginasas de fuentes microbianas

L-asparaginasa ha sido aislada de fuentes animales, vegetales y microbianas (17), aunque los microorganismos (bacterias, arqueas, hongos, levaduras, actinomicetos, algas) representan la fuente más interesante por las diversas características enzimáticas que pueden presentar (6, 11, 30). Se pueden distinguir dos tipos de L-asparaginasa microbiana, de acuerdo con su ubicación celular: tipo I, que son citosólicas, expresadas constitutivamente y con baja afinidad por la L-asparagina; y tipo II, que se localizan en el espacio periplasmático (espacio entre membrana celular y pared celular), con expresión inducida durante la anaerobiosis y alta afinidad por la L-asparagina (4, 17). Según su fuente de origen, puede presentarse en estructuras proteicas terciarias o cuaternarias en forma mono, di, tetra y hexamérica (3, 10, 25).

Como se mencionó anteriormente, las enzimas de origen bacteriano poseen limitaciones en cuanto a efectos adversos y actividad L-glutaminasa que

afectan su rendimiento en el tratamiento, por lo que el descubrimiento de fuentes novedosas de L-asparaginasa parte de la búsqueda de microorganismos de diferentes ambientes (6). La L-asparaginasa de microorganismos eucariotas (levaduras y hongos) debería presentar menos efectos adversos que los producidos por las enzimas de origen bacteriano (1, 12, 19). Su cercanía evolutiva con los humanos, principalmente en términos de modificaciones postraduccionales permite esperar que las enzimas posean menor probabilidad de producir hipersensibilidad (11, 12, 31). En ese sentido, las levaduras despiertan gran interés debido a su mejor compatibilidad y estabilidad en el suero, además de poseer un pH óptimo cercano al fisiológico (7, 32, 33). Por lo tanto, las enzimas destacan notablemente como potenciales biofármacos gracias a sus características bioquímicas (menor probabilidad de reacciones adversas y diferentes niveles de actividad de L-glutaminasa) (4, 9). Por ejemplo, levaduras como *Leucosporidium scottii* (32, 33) y *L. muscorum* (9) producen L-asparaginasa libre de actividad L-glutaminasa, lo cual las convierte en candidatas potenciales para el tratamiento de ALL (3).

La ventaja en el uso de microorganismos para la producción de L-asparaginasa se relaciona con su viabilidad a gran escala, realizada tanto en cultivos en sustrato sólido como por cultivos sumergidos (3), aunque la producción se realiza preferentemente en cultivos sumergidos (3, 12). Los rendimientos productivos de L-asparaginasa varían significativamente según el microorganismo usado, el tamaño de inóculo y la composición del medio de cultivo (fuentes de carbono y nitrógeno), y son influidos por los parámetros de cultivo, como temperatura, pH del medio, tiempo de cultivo, agitación y tasa de transferencia de oxígeno (3, 11, 25). En vista que cada microorganismo posee sus propias condiciones de máxima producción, la optimización del proceso amerita ser desarrollada para alcanzar rendimientos productivos económicamente rentables de la enzima (11, 25).

Por otra parte, para determinar las propiedades cinéticas y termodinámicas, la conformación estructural, la actividad fisiológica y la estabilidad, se requiere una enzima purificada y concentrada (10). Sin embargo, la mayoría de L-asparaginasa microbianas, salvo contadas excepciones, son

comúnmente intracelulares (3, 11, 12, 16), lo que supone el reto de implementar más etapas de purificación de la enzima, y vuelve el proceso de producción más complejo y costoso (11, 25). Por tanto, la búsqueda de nuevas fuentes de L-asparaginasa debe considerar la capacidad de secreción al medio extracelular, ya que así es más probable alcanzar concentraciones altas de la enzima con baja o nula presencia de endotoxina en el medio de cultivo, y consigue que la purificación sea más simple y económica (3, 11). Por ejemplo, las bacterias grampositivas, por carecer de espacio periplasmático, son capaces de secretar enzimas siendo más ventajosas que las gramnegativas en términos de purificación (11). Por tanto, los criterios a considerar en la selección de microorganismos candidatos para la producción de L-asparaginasa se relacionan tanto con la eficiencia de producción como con la localización de la enzima y su facilidad de recuperación o purificación.

Innovación en el desarrollo de L-asparaginasa

La biotecnología está permitiendo a los científicos cambiar y manipular microorganismos (24). Una variedad de L-asparaginasa recombinantes que exhiben alta funcionalidad y eficiencia también fue producida gracias a la ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante (10, 25). Este tipo de estrategias se puede justificar por diversas razones: a) cuando los requerimientos nutricionales del microorganismo nativo son complejos y costosos; b) la enzima posee características bioquímicas interesantes, pero es expresada en concentraciones muy bajas; o c) la purificación de la enzima requiere muchas etapas, por lo que resulta muy costosa y, además, los rendimientos finales obtenidos son bajos.

Hospederos procariontes, como *E. coli*, y eucariotas, como *Pichia pastoris*, han sido utilizados en la expresión de L-asparaginasa de diferentes organismos. Por ejemplo, *E. coli* ha expresado L-asparaginasa de *Erwinia carotovora* y *E. chrysanthemi* (34, 35) y de otros microorganismos, como bacterias grampositivas, hongos y plantas, con lo que alcanza elevados rendimientos (36-38). Si bien el sistema de expresión de *E. coli* posee altas tasas de crecimiento, genoma altamente conocido y bajos costos de producción, sus desventajas son la acumulación de lipopolisacárido en su membrana

externa, lo cual aumenta su inmunogenicidad y acumulación citoplásmica o periplasmática⁽¹⁵⁾; aunque la suplementación del medio de cultivo con glicina y n-dodecano ha demostrado ser una buena estrategia para permeabilizar la membrana externa de *E. coli*, y consigue altos niveles de secreción (~89%) de la L-asparaginasa desde el espacio periplasmático⁽³⁹⁾. Otro sistema de expresión bacteriano emergente es *Bacillus subtilis*, una bacteria grampositiva, no patógena, libre de endo y exotoxinas, que se ha utilizado en la producción extracelular de L-asparaginasa de *Pectobacterium carotovorum*⁽⁴⁰⁾. Sin embargo, su genoma (totalmente secuenciado) y los vectores específicos aún requieren ser estudiados a profundidad para maximizar el uso de *B. subtilis* como sistema de expresión⁽¹⁵⁾.

Por su parte, el sistema de expresión de origen eucariota, como *P. pastoris*, se ha utilizado con éxito para la producción de más de 500 proteínas recombinantes de diversos orígenes⁽⁴¹⁾, y presenta la posibilidad de modificaciones postraduccionales en las proteínas y capacidad de secreción extracelular, lo que facilita considerablemente la purificación de L-asparaginasa⁽⁴²⁾. Ha permitido la producción de L-asparaginasa de *Saccharomyces cerevisiae*^(41, 43). Además, el desarrollo de herramientas de glicoingeniería ha permitido crear oportunidades para productos farmacéuticos innovadores⁽⁴⁴⁾. Actualmente, existen versiones disponibles *P. pastoris* tipo Glycoswitch® que son capaces de producir glicosilación homogénea y humanizada en las proteínas recombinantes, lo que es ventajoso para enmascarar epítomos inmunogénicos propios de las proteínas bacterianas funcionando de manera similar la pegilación^(15, 42). Este representa un sistema óptimo y beneficioso para la producción de biofármacos aplicados a la salud humana^(42, 44). De hecho, el sistema ha sido reportado en la producción exitosa L-asparaginasa extracelular y glicosilada de *E. chrysanthemi*^(15, 44).

Las L-asparaginasa nativas, incluso muchas recombinantes, pueden presentar varias limitaciones como menor actividad enzimática y rango estrecho de los parámetros cinéticos (especificidad por el sustrato, estabilidad térmica y vida media en condiciones fisiológicas)⁽¹¹⁾. La

efectividad terapéutica y la vida media dependen de la formación de anticuerpos, proteasas plasmáticas, actividad de la asparagina sintetasa y la fuente microbiana⁽¹⁾. Sin embargo, estas limitaciones propias de los tratamientos convencionales pueden ser superadas mediante la innovación en los sistemas de administración como conjugados poliméricos, encapsulados en liposomas o nanopartículas⁽¹⁴⁾. Las modificaciones como la conjugación con polietilenglicol (pegilación) o fragmento de anticuerpo de región variable (ScFv), encapsulación dentro eritrocitos y atrapamiento en liposomas o nanopartículas da lugar a la L-asparaginasa con propiedades bioquímica y farmacológica mejoradas, como reducción drástica de la inmunogenicidad, incremento de la estabilidad (pH y temperatura) y de la vida media, gracias a la mejora en la resistencia a la proteólisis y formulaciones de liberación controlada^(11, 12, 14). En ese sentido, el desarrollo de formulaciones de L-asparaginasa pegilada es una aplicación clínica exitosa^(1, 5, 14). Por ejemplo, se han reportado pegilaciones exitosas de L-asparaginasa de *E. chrysanthemi*⁽⁴⁵⁾ y *E. coli*⁽⁴⁶⁾. Además, nuevas enzimas producidas por microorganismos de ambientes fríos con cinéticas, interesantes desde el punto de vista clínico, podrían mejorar su termoestabilidad a través de la pegilación⁽⁹⁾.

CONCLUSIONES

Con base en la información disponible, la biodiversidad microbiana ha mostrado ser trascendental en la búsqueda de L-asparaginasa con características nuevas que permitan superar las limitaciones presentadas por las formas tradicionales disponibles en el mercado farmacéutico. En ese sentido, es importante llevar a cabo nuevos y más completos estudios sobre biodiversidad microbiana en ambientes naturales poco explorados, muchos de los cuales se encuentran en el Perú. Asimismo, se deben intensificar los estudios de bioprospección en combinación con las tecnologías de biología molecular, con la finalidad de incrementar la eficiencia del proceso de búsqueda. Incluso, ciertas limitaciones de L-asparaginasa con alto potencial pueden ser superadas mediante la aplicación de herramientas de ingeniería genética o nanotecnología.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Omar Santiago Pillaca-Pullo es el responsable de la redacción, revisión y aprobación de la versión final del trabajo.

FINANCIAMIENTO

La investigación no tuvo financiamiento.

POTENCIALES CONFLICTOS DE INTERESES

No existe ningún conflicto de intereses por parte del autor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Loureiro CB, Borges KS, Andrade AF, Tone LG, Said S. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. *Adv Microbiol.* 2012; 2: 138-45.
2. Dunlop PC, Meyer GM, Ban D, Roon RJ. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1978; 253(4): 1297-304.
3. Izadpanah F, Homaei A, Fernandes P, Javadpour S. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiol Res.* 2018; 208: 99-112.
4. Fonseca MHG, Fiúza T da S, Morais SB de, Souza T de ACB de, Trevizani R. Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomed Pharmacother.* 2021; 139.
5. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2011; 117(2): 238-49.
6. Singh Y, Gundampati RK, Jagannadham M V., Srivastava SK. Extracellular L-asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: Purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity in vitro. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013; 171(7): 1759-74.
7. Lima IGO, Bispo JRS, Agostinho AYH, Queiroz ACD, Moreira MSA, Passarini MRZ, et al. Antarctic environments as a source of bacterial and fungal therapeutic enzymes. *An Acad Bras Cienc.* 2022; 94: e20210452.
8. Shrivastava A, Khan AA, Khurshid M, Kalam MA, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016; 100: 1-10.
9. Freire RKB, Mendonça CMN, Ferraro RB, Moguel IS, Tonso A, Lourenço FR, et al. Glutaminase-free L-asparaginase production by *Leucosporidium muscorum* isolated from Antarctic marine-sediment. *Prep Biochem Biotechnol.* 2021; 51(3): 277-88.
10. Muneer F, Siddique MH, Azeem F, Rasul I, Muzammil S, Zubair M, et al. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. *Arch Microbiol.* 2020;202(5):967-81.
11. Chand S, Mahajan R V., Prasad JP, Sahoo DK, Mihooliya KN, Dhar MS, et al. A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. *Biotechnol Appl Biochem.* 2020; 67(4): 619-47.
12. Cachumba JJM, Antunes FAF, Peres GFD, Brumano LP, Santos JC Dos, Da Silva SS. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian J Microbiol.* 2016; 47: 77-85.

13. Kotzia GA, Labrou NE. L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. *J Biotechnol.* 2007; 127(4): 657-69.
14. Girão LFC, Carvalheiro MC, Ferreira-Silva M, da Rocha SLG, Perales J, Martins MBF, et al. Asparaginases with *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase II expressed in *Pichia pastoris*: Formulation design and in vitro studies of a potential antileukemic drug. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(20).
15. Effer B, Kleingesinds EK, Lima GM, Costa IM, Sánchez-Moguel I, Pessoa A, et al. Glycosylation of Erwinase results in active protein less recognized by antibodies. *Biochem Eng J.* 2020; 163.
16. Narayana KJP, Kumar KG, Vijayalakshmi M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian J Microbiol.* 2008; 48(3): 331-6.
17. Lee SJ, Lee Y, Park GH, Umasuthan N, Heo SJ, de Zoysa M, et al. A newly identified glutaminase-free L-Asparaginase (L-ASPG86) from the marine bacterium *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens*. *J Microbiol Biotechnol.* 2016; 26(6): 1115-23.
18. Panosyan EH, Seibel NL, Martin-Aragon S, Gaynon PS, Avramis IA, Sather H, et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: children's cancer group study CCG-1961. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004; 26(4): 217-26.
19. Kumar S, Venkata Dasu V, Pakshirajan K. Purification and characterization of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Bioresour Technol.* 2011; 102(2): 2077-82.
20. IETSI-EsSalud. Eficacia y seguridad de L-asparaginasa *Erwinia* y L-asparaginasa *E. coli* pegilada en el tratamiento de pacientes con leucemia linfoblástica aguda que presentan hipersensibilidad a L-asparaginasa *E. coli* nativa. Dictam Prelim Evaluación Tecnol Sanit N.º 016-SDEPFYOTS-DETS IETSI-2017. 2017.
21. Dunlap P V. Microbial diversity. *Encycl Biodivers* Second Ed. 2001; 4: 280-91.
22. Morris CE, Bardin M, Berge O, Frey-Klett P, Fromin N, Girardin H, et al. Microbial biodiversity: Approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66(4): 592-616.
23. Thaler DS. Is global microbial biodiversity increasing, decreasing, or staying the same? *Front Ecol Evol.* 2021; 9.
24. Tripathi CKM, Tripathi D, Praveen V, Bihari V. Microbial diversity - Biotechnological and industrial perspectives. *Indian J Exp Biol.* 2007; 45(4): 326-32.
25. Jia R, Wan X, Geng X, Xue D, Xie Z, Chen C. Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: Current research status and future perspectives. *Microorganisms.* 2021; 9(1659): 1-21.
26. Nascimento TCES, Molino JVD, Donado PRS, Montalvo GSA, dos Santos WL, Gomes JEG, et al. Antarctic fungus proteases generate bioactive peptides from caseinate. *Food Res Int.* 2021; 139: 109944.
27. Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. L-asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo salt lake. *Indian J Microbiol.* 2011; 51(3): 307-11.
28. Shirazian P, Asad S, Amoozegar MA. The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase. *EXCLI J.* 2016; 15: 268-79.
29. Chandran H, Meena M, Sharma K. Microbial biodiversity and bioremediation assessment through omics approaches. *Front Environ Chem.* 2020; 1:1-22.
30. Costa-Silva TA, Flores-Santos JC, Freire RKB, Vitolo M, Pessoa-Jr A. Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. *Prep Biochem Biotechnol.* 2018; 48(8): 707-17.
31. Ashok A, Doriya K, Rao JV, Qureshi A, Tiwari AK, Kumar DS. Microbes Producing L-asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of Antarctic soil and moss. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 1-10.
32. Moguel IS, Yamakawa CK, Pessoa A, Mussatto SI. L-asparaginase Production by *Leucosporidium scottii* in a bench-scale bioreactor with co-production of lipids. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8: 1-11.
33. Correa HT, Vieira WF, Pinheiro TMA, Cardoso VL, Silveira E, Sette LD, et al. L-asparaginase and biosurfactants produced by extremophile yeasts from Antarctic environments. *Ind Biotechnol.* 2020; 16(2): 107-16.

34. Roth G, Nunes JES, Rosado LA, Bizarro C V., Volpato G, Nunes CP, et al. Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. Brazilian J Chem Eng. 2013; 30(2): 245-56.
35. Pourhossein M, Korbekandi H. Cloning, expression, purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*. Adv Biomed Res. 2014; 3(1): 82.
36. Hong SJ, Lee YH, Khan AR, Ullah I, Lee C, Park CK, et al. Cloning, expression, and characterization of thermophilic L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. J Basic Microbiol. 2014; 54(6): 500-8.
37. Oza VP, Parmar PP, Patel DH, Subramanian RB. Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production. Biotech. 2011; 1(1): 21-6.
38. Pokrovskaya M V., Aleksandrova SS, Pokrovsky VS, Omeljanjuk NM, Borisova AA, Anisimova NY, et al. Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. Protein Expr Purif. 2012; 82(1): 150-4.
39. Flores-Santos JC, Moguel IS, Monteiro G, Pessoa A, Vitolo M. Improvement in extracellular secretion of recombinant L-asparaginase II by *Escherichia coli* BL21 (DE3) using glycine and n-dodecane. Brazilian J Microbiol. 2021; 52(3): 1247-55.
40. Chityala S, Venkata Dasu V, Ahmad J, Prakasham RS. High yield expression of novel glutaminase free L-asparaginase II of *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 in *Bacillus subtilis* WB800N. Bioprocess Biosyst Eng. 2015; 38(11): 2271-84.
41. Pillaca-Pullo O, Rodrigues D, Sánchez-Moguel I, Lopes A, Pimenta M, Basi T, et al. Recombinant l-asparaginase production using *Pichia pastoris* (MUTs strain): establishment of conditions for growth and induction phases. J Chem Technol Biotechnol. 2020; 96(1): 283-92.
42. Effer B, Lima GM, Cabarca S, Pessoa A, Farías JG, Monteiro G. L-Asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in glycoswitch[®]: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression. Prep Biochem Biotechnol. 2019; 49(7): 679-85.
43. Rodrigues D, Pillaca-Pullo O, Torres-Obreque K, Flores-Santos J, Sánchez-Moguel I, Pimenta M V., et al. Fed-batch production of *Saccharomyces cerevisiae* L-Asparaginase II by recombinant *Pichia pastoris* MUTs strain. Front Bioeng Biotechnol. 2019; 7: 7-16.
44. de Almeida Parizotto L, Krebs Kleingesinds E, Manfrinato Pedrotti da Rosa L, Effer B, Meira Lima G, Herkenhoff ME, et al. Increased glycosylated L-asparaginase production through selection of *Pichia pastoris* platform and oxygen-methanol control in fed-batches. Biochem Eng J. 2021; 173: 108083.
45. Torres-Obreque K, Meneguetti GP, Custódio D, Monteiro G, Pessoa-Junior A, de Oliveira Rangel-Yagui C. Production of a novel N-terminal PEGylated crisantaspase. Biotechnol Appl Biochem. 2019; 66(3): 281-9.
46. Meneguetti GP, Madalena P, Mariana K, Obreque T, Marcello C, Barbosa V, et al. Novel site-specific PEGylated L-asparaginase. PLoS One. 2019; 14(2): 1-19.
47. Brumano LP, da Silva FVS, Costa-Silva TA, Apolinário AC, Santos JHPM, Kleingesinds EK, et al. Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. Front Bioeng Biotechnol. 2019; 6: 1-22.