



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE DA  
ASPARAGINASE EM CRIANÇAS EM TRATAMENTO  
PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
DAIANE KELLER CECCONELLO

Porto Alegre, Brasil

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE DA  
ASPARAGINASE EM CRIANÇAS EM TRATAMENTO  
PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

DAIANE KELLER CECCONELLO

**Professora orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana Bohns Michalowski**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre, Brasil 2020

### CIP - Catalogação na Publicação

Cecconello, Daiane Keller  
ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE DA ASPARAGINASE  
EM CRIANÇAS EM TRATAMENTO PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA  
/ Daiane Keller Cecconello. -- 2020.  
74 f.

Orientadora: Mariana Bohns Michalowski.

Coorientadora: Liane Esteves Daudt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,  
Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Asparaginase. 2. Leucemia Linfoblástica aguda.  
3. Atividade enzimática. 4. Medicamento. 5.  
Monitoramento terapêutico. I. Michalowski, Mariana  
Bohns, orient. II. Daudt, Liane Esteves, coorient.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO**  
**ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

Março, 2020

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

**Titulares:**

Prof. Dra. Lilian Maria Cristofani (Professora Livre Docente, Departamento de Pediatria, Universidade de São Paulo /USP).

Prof. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS).

Prof. Dra. Ursula da Silveira Matte (Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS).

**Suplente:**

Prof. Dr. Lauro José Gregianin (Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, professora Mariana Bohns Michalowski, por dispor um voto de confiança a mim, pelos ensinamentos ao longo desses dois anos, por ter me propiciado a oportunidade de trabalhar com um projeto enriquecedor e que colaborou de maneira tão promissora para a ciência, e principalmente, por ter feito jus ao significado da palavra orientar. Agradeço à minha coorientadora, professora Liane Esteves Daudt que muito contribuiu para o aperfeiçoamento deste trabalho de maneira singular.

Agradeço aos meus pais, que sempre me deram apoio em toda a minha trajetória acadêmica, sempre me incentivando a ser a minha melhor versão. Ao meu irmão, por sempre estar presente. Ao meu namorado Bruno, que soube ter paciência e companheirismo nesse percurso, acreditando sempre no meu potencial. Às minhas amigas pelo estímulo e por sempre confiarem em mim. Obrigada por estarem comigo!

Meus agradecimentos às pessoas do laboratório de Pediatria Translacional, por terem colaborado em diversas situações, em especial a Isabel, Ciliana e Monique, que participaram de várias etapas do processo me auxiliando nos momentos que mais necessitei.

E aos integrantes da banca, por terem encontrado um espaço em suas agendas para enriquecerem o trabalho com suas considerações indispensáveis e fundamentais.

Muito obrigada!

## RESUMO

**Introdução/ objetivos:** A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia mais frequente na infância. Embora dados internacionais descrevam taxas de cura próximas a 90%, no Brasil essas taxas não ultrapassam 70%. Um dos principais fármacos utilizados no tratamento destes pacientes é a Asparaginase (ASNase). Atualmente três formas diferentes são disponíveis: *E.coli* derivada, *Erwinia* derivada e Peguilada. A atividade desta medicação pode ser influenciada por diferentes fatores como produção de anticorpos e/ou farmacocinética diferente entre as formulações. Assim, medir os níveis de atividade da ASNase permite ajustar a terapia dos pacientes de forma personalizada. Nosso objetivo foi implementar o teste laboratorial para medir a atividade da ASNase, comparando os resultados encontrados a fim de otimizar a terapia em todos os pacientes de um hospital regional do Brasil. **Material e métodos:** foram coletadas amostras de 43 crianças com LLA em tratamento conforme o protocolo BFM em um hospital universitário no sul do Brasil. 19 pacientes receberam ASNase derivada de *E.coli*, denominada Aginasa ou Leuginase e 26 receberam ASNase peguilada, sendo que 2 destes receberam ASNase derivada de *E.coli* inicialmente. **Resultados:** Foram analisadas 262 amostras de plasma de 19 pacientes que receberam ASNase *E. coli* que foram coletadas 24h e 48h após cada infusão. Em 14 das 74 amostras (18,9%), a atividade da Aginasa foi inferior a 0,1 UI / mL, enquanto as 56 amostras restantes apresentaram atividades  $\geq 0,1$  UI / mL. No caso da Leuginase, 183 de 188 amostras (97,3%) não atingiram 0,1 UI / mL, enquanto as 5 amostras restantes tiveram atividades  $\geq 0,1$  UI / mL. Dos 26 pacientes que receberam PEG ASNase, 84 amostras foram analisadas que foram coletadas 7 e 14 dias após a infusão. Apenas 1 das 84 amostras (1,19%), teve atividade inferior a 0,1 UI / mL, enquanto as 83 amostras restantes apresentaram atividades  $\geq 0,1$  UI / mL. **Conclusões:** Nosso estudo mostra uma clara diferença de níveis de atividade alcançados pela Aginasa e Leuginase quando usadas em doses comparáveis. Os níveis de atividade da Leuginase estão abaixo dos valores desejáveis na maior parte dos pacientes nas doses usadas. Já os resultados obtidos com Aginasa alcançaram níveis satisfatórios, semelhantes aos descritos na literatura internacional. Em relação aos pacientes que receberam PEG ASNase, a quase totalidade obteve atividade adequada. Isto foi observado mesmo naqueles pacientes que previamente não tinham alcançado atividade com a Leuginase. Esses resultados destacam a importância de verificar o nível de atividade da ASNase em pacientes em tratamento com LLA. Nossos resultados devem ser úteis para projetar melhores tratamentos e elucidar as mudanças no comportamento clínico dos pacientes, além de permitir eventuais ajustes de dose e regimes de tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** asparaginase, leucemia linfóide aguda, monitoramento, atividade, hipersensibilidade clínica, inativação silenciosa.

## ABSTRACT

**Background / objectives:** Acute lymphoid leukemia (ALL) is the most common neoplasm in childhood. Although there are international protocols that reach cure rates of 90%, in Brazil these rates are close to 70%. One of the main drugs used is asparaginase (ASNase). Currently three different forms are available: *E.coli* derived, *Erwinia* derived and Pegylated. The activity of this medication can be influenced by different factors such as antibody production and pharmacokinetics between formulations. Thus, measuring ASNase activity levels allows patients to adjust their therapy in a personalized way. Our goal was to implement the laboratory test to measure ASNase activity, comparing the results found in order to optimize therapy in all patients at a regional hospital in Brazil. **Material and methods:** samples were collected from 43 children with ALL who were undergoing treatment to the BFM protocol at a university hospital in southern Brazil. 19 patients received ASNase derived from *E. coli*, referred to as Aginasa or Leuginase and 26 received pegylated ASNase, 2 of which received *E.coli* derived ASNase initially. **Results:** 262 plasma samples from 19 patients who received ASNase *E coli* were analyzed and were collected 24h and 48h after each infusion. In 14 of the 74 samples (18,9%), the activity of Aginasa was less than 0.1 IU / mL, while the remaining 56 samples showed activities  $\geq 0.1$  IU / mL. In the case of Leuginase, 183 of 188 samples (97,3%) did not reach 0.1 IU / mL, while the remaining 5 samples showed activities  $\geq 0.1$  IU / mL. Of the 26 patients who received PEG ASNase, 84 samples were analyzed, which were collected before, 7 and 14 days after the infusion. Only 1 of the 84 samples (1,19%) showed activity below 0.1 IU / mL, while the remaining 83 samples showed activity  $\geq 0.1$  IU / mL. **Conclusions:** our study shows a clear difference in the levels of activity achieved by Aginasa and Leuginase when used in comparable doses. Leuginase activity levels are below desirable values in most patients at the doses used. The results obtained with Aginasa reached satisfactory levels like those described in the international literature. In relation to patients who received PEG ASNase, almost all of them obtained adequate activity. This was observed even in those who had not obtained adequate activity with Leuginase. These results highlight the importance of verifying the level of ASNase activity in patients undergoing ALL. Our results should be useful for designing better treatments and elucidating changes in patients' clinical behavior, in addition to allowing possible dose adjustments and treatment regimens.

**KEY-WORDS:** asparaginase, acute lymphoid leukemia, monitoring, enzymatic activity, clinical hypersensitivity, silent inactivation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Mecanismo de ação da asparaginase em células normais e tumorais.....14**
- Figura 2- Esquemas de pacientes que utilizaram *E.coli* e PEG ASNase.....23**



## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1- Taxas de hipersensibilidade de acordo com a formulação de ASNase.....17**

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

<b>ASNase</b>	Asparaginase
<b>ASN</b>	Asparagina
<b>ASP</b>	Aspartato
<b>LLA</b>	Leucemia linfóide aguda
<b>AHA</b>	Ácido aspártico B-hidroxiato
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>IV</b>	Via intravenosa
<b>IM</b>	Via intramuscular
<b>CTCAE</b>	Critérios comuns de terminologia para eventos adversos
<b>BFM</b>	Protocolo Berlin-Frankfurt-Münster

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
2.1 MECANISMO DE AÇÃO DA ASPARAGINASE .....	13
2.2 TIPOS DE ASPARAGINASE.....	15
2.3 EFEITOS ADVERSOS.....	16
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	22
4.1 OBJETIVO GERAL.....	22
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
5.1 ANÁLISES LABORATORIAIS .....	24
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	26
<b>7 ARTIGO I</b> .....	30
<b>8 ARTIGO II</b> .....	38
<b>9 ARTIGO III</b> .....	40
<b>10 ARTIGO IV</b> .....	52
<b>11 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

As leucemias linfóides agudas (LLA) são as neoplasias mais frequentes na infância. Ao longo dos últimos anos observaram-se grandes melhorias no tratamento através do desenvolvimento de protocolos multicêntricos. Em países desenvolvidos as taxas de sobrevida livre de eventos a longo prazo em crianças estão atualmente em torno de 80% e as taxas de sobrevida global estão próximas ou acima de 90% (PIETERS *et al.*, 2012). Já no Brasil, as taxas de cura desta mesma patologia estão próximas a 70%.

Esta diferença no resultado final de nossa população quando usados os mesmos protocolos de tratamento pode se dever a diversos fatores, entre eles fatores genéticos, ambientais, mas também cuidados de suporte. Dentre esses cuidados de suporte se inclui a monitorização de um medicamento utilizado nos tratamentos de LLA, que é a Asparaginase (ASNase), e é um destes aspectos não avaliados dentro de nossa realidade.

A ASNase é enzima derivada de bactéria que possui função antileucêmica. Atualmente existem três formas diferentes disponíveis da enzima, duas formas nativas que são derivadas ou da *Escherichia coli* ou da *Erwinia chrysanthemia* e uma terceira formulação, que é a conjugação da *E. coli* ASNase com o polietilenoglicol, denominada PEG ASNase. Geralmente, a enzima derivada de *E. coli* vem sendo utilizada como terapia de primeira linha e a preparação derivada de *Erwinia* é reservada para pacientes que desenvolvem reações de hipersensibilidade à forma anterior. Como as preparações derivadas de bactérias são altamente imunogênicas, a PEG ASNase foi desenvolvida a fim de reduzir este risco potencial, resultando em taxas reduzidas de formação de anticorpos e incidência de alergia (AVRAMIS AND TIWARI, 2006; PIETERS *et al.*, 2012).

Em relação à monitorização da atividade da ASNase, esta já é consenso no mundo, uma vez que o principal efeito adverso da medicação são as reações de hipersensibilidade e

inativação (VAN DER SLUIS, 2016). Elas são observadas em até 60% dos pacientes em algum momento da terapia. Além disso, uma grande preocupação é que os anticorpos produzidos em resposta à ASNase nem sempre conduzem a uma reação de hipersensibilidade clínica, mas sim, podem provocar uma inativação rápida da ASNase, resultando numa depleção de asparagina subótima. Isso é comumente referido como "hipersensibilidade silenciosa" ou "inativação silenciosa" e pode ocorrer em aproximadamente 30% dos pacientes (PIETERS *et al.*, 2012; VAN DER SLUIS, 2016).

A mensuração dos níveis de atividade de ASNase é fundamental para prever reações alérgicas futuras e para alertar sobre a possibilidade de hipersensibilidade silenciosa e subsequente mudança de medicação melhorando o prognóstico dos indivíduos (PIETERS *et al.*, 2012; VAN DER SLUIS, 2016). Através deste projeto estabelecemos o monitoramento de atividade da ASNase em nossa realidade através da implementação da técnica que permite personalizar o tratamento de pacientes portadores de leucemias linfóides de acordo com boas práticas de manejo internacionais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os índices de sobrevida das leucemias linfóides agudas (LLA) melhoraram muito nas últimas décadas devido ao desenvolvimento de tratamentos eficazes. Um dos fármacos que possui grande influência nessa melhora é a ASNase. Há cerca de 50 anos foi descoberta a primeira propriedade inibidora de tumor devido à ASNase, com a observação de que os ratos portadores de linfoma tratados com soro de cobaia apresentavam regressão tumoral rápida e muitas vezes completa (KIDD, 1953). Nos anos 60, se descobriu que a atividade de ASNase no soro de cobaia era a responsável por estes efeitos anti-linfoma (BROOME, 1961). Em 1963, Yellin e Wriston mostraram que a ASNase era um agente inibidor tumoral ao conseguirem isolar essa enzima, e que a *Escherichia Coli* poderia produzi-la. A partir deste momento se passou a desenvolver a ASNase como fármaco para utilização em pacientes (MASHBURN AND WRISTON, 1963).

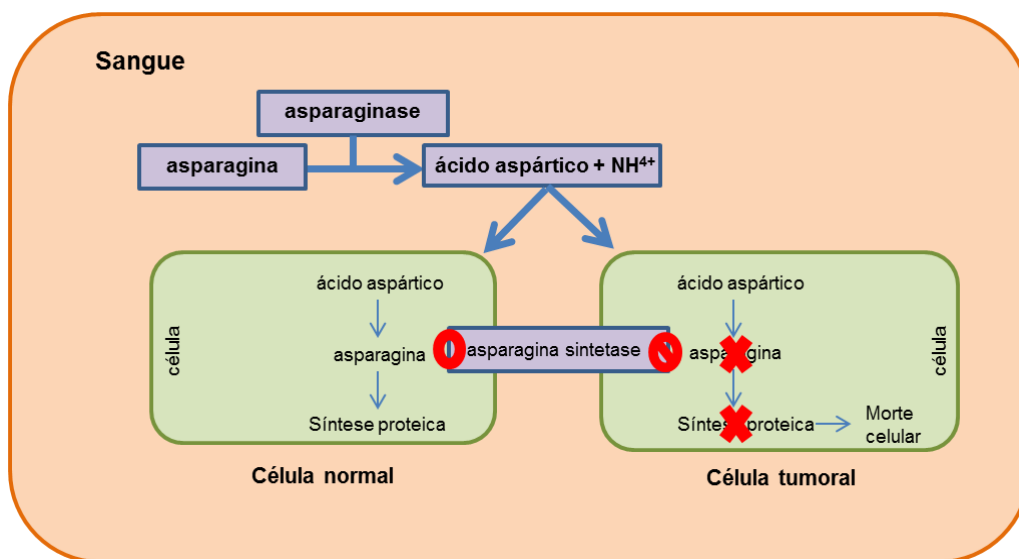
Atualmente, vários dados clínicos apoiam o uso da ASNase como terapia nas LLA's, mostrando o seu benefício no tratamento intensivo. Ela é hoje considerada componente universal das terapias, sendo utilizada em todos os regimes de tratamento pediátrico, tanto na indução quanto intensificação de remissão (SILVERMAN *et al.*, 2001; AVRAMIS AND TIWARI, 2006).

### 2.1 MECANISMO DE AÇÃO DA ASPARAGINASE

Embora a asparagina não seja um aminoácido essencial, células leucêmicas que não possuem este aminoácido dependem de fontes extracelulares de asparagina para a síntese de proteínas. Sob condições fisiológicas normais, as concentrações plasmáticas de asparagina variam de 40 a 80 mM (SALZER *et al.*, 2018), sendo derivadas de nutrientes

ingeridos e da biossíntese no fígado através da catálise de ácido aspártico e amônia pela enzima asparagina-sintetase (AVRAMIS AND TIWARI, 2006; SALZER *et al.*, 2018).

**Figura 1 - Mecanismo de ação da asparaginase em células normais e tumorais**



O efeito anti leucêmico da ASNase se dá devido à conversão de moléculas de asparagina circulantes em ácido aspártico e amoníaco no espaço extracelular, causando baixos níveis de asparagina intracelular e consequente diminuição na síntese de RNA, DNA e proteínas, resultando na morte de células neoplásicas. Isto acontece porque estas células não possuem ou possuem baixos níveis de asparagina-sintetase e são, portanto, dependentes de uma fonte exógena de asparagina para sobrevivência (SCHREY *et al.*, 2010; RIZZARI *et al.*, 2013). Já as células normais por sua vez são preservadas devido à capacidade de sintetizar a asparagina intracelularmente, pois possuem a enzima asparagina-sintetase. Esta enzima é a responsável pela formação de asparagina a partir de ácido aspártico e amônia (figura 1) (AVRAMIS AND TIWARI, 2006; SCHREY *et al.*, 2010; RIZZARI *et al.*, 2013).

## 2.2 TIPOS DE ASPARAGINASE

As enzimas são os catalisadores específicos para um determinado substrato, sendo assim muito eficientes. Porém, quando usadas como fármacos, têm desvantagens como limitada biodistribuição e eliminação rápida da circulação além de serem imunogênicas, devendo ser purificadas para eliminar reações tóxicas e minimizar as reações imunes (AVRAMIS AND TIWARI, 2006).

As formas nativas da ASNase são derivadas das bactérias *E. coli* ou da *Erwinia chrysanthema*. Geralmente, a enzima derivada de *E. coli* tem sido utilizada como terapia de primeira linha e a preparação derivada de *Erwinia*, denominada Erwinase, é reservada para pacientes que desenvolvem reações de hipersensibilidade à primeira (RIZZARI *et al.*, 2013; VAN DER SLUIS, 2016; SALZER *et al.*, 2018). Como as preparações são derivadas de bactérias, elas são altamente imunogênicas (PETERSEN *et al.*, 2014).

Para ajudar a reduzir o potencial imunogênico, foi criada uma terceira formulação: a PEG ASNase. Trata-se da conjugação da *E. coli* ASNase com o polietilenoglicol. Esta formulação resultou em taxas reduzidas de formação de anticorpos, menor incidência de alergia e meia-vida mais prolongada no soro. Devido a isso, ela tem sido utilizada como a preparação inicial de ASNase em alguns regimes de tratamento e vem sendo utilizada como primeira linha em muitos países do mundo e em alguns serviços do Brasil (PETERSEN *et al.*, 2014; FERNANDEZ *et al.*, 2014). Hoje, considera-se que os regimes de ASNase que atinjam um valor de atividade igual ou superior a 0,1 UI / mL sejam suficientes para esgotar a asparagina (SCHREY *et al.*, 2010; FERNANDEZ *et al.*, 2014).

A PEG ASNase tem uma meia-vida de cerca de 7 dias após a administração, e níveis de atividade >0,1 UI / mL foram relatados por aproximadamente 3-4 semanas após uma dose única de IV. Já a asparaginase de *E. coli* nativa e de *Erwinia* têm meia-vida de 1,3



e 0,65 dias, respectivamente (FERNANDEZ *et al.*, 2014). Devido à meia-vida mais curta da *Erwinase*, é necessária uma dose mais elevada e uma frequência maior de aplicações para assegurar uma atividade enzimática sérica adequada e uma depleção completa da asparagina no soro (FERNANDEZ *et al.*, 2014; SALZER *et al.*, 2018).

A ASNase pode ser administrada por via intravenosa (IV) ou intramuscular (IM). A via IV resulta em concentrações plasmáticas máximas mais elevadas, enquanto que a administração IM resulta em um aumento mais lento da atividade de ASNase, devido à absorção mais lenta (FERNANDEZ *et al.*, 2014; SALZER *et al.*, 2018). A administração IV é preferível em alguns casos, por ser contínua, porque a infusão do medicamento pode ser interrompida no caso de reação anafilática, o que não é possível com a administração IM. A via de administração pode ocasionar um diferente perfil de sintomas clínicos. Por exemplo, via IM apresenta maior incidência de reações cutâneas importantes em comparação com a IV. Além disto, administração pela via IM é dolorosa e pode requerer múltiplas punções no caso de doses mais altas (BURKE, 2014; ASSELIN AND RIZZARI, 2015;). Resultados recentemente publicados da farmacocinética com a administração IV de *Erwinase* destacam sua rápida depuração, o que faz com que sua via de administração seja IM (SALZER *et al.*, 2018). No caso da ASNase derivada da *E. coli*, sua administração pode ser tanto IV como IM. Já a PEG ASNase é administrada pelas duas vias, porém têm como via de administração preferencial a via IM, pois estudos mostraram que essa medicação pode apresentar maior potencial imunogênico quando utilizada por via IV (PETERSEN *et al.*, 2014).

### 2.3 EFEITOS ADVERSOS

As taxas de reações de hipersensibilidade clínica na literatura variam, como constam na tabela 1. Para a hipersensibilidade clínica à ASNase *E. Coli-derivada* foram

relatadas taxas que atingem até 75% dos pacientes com LLA, embora mais frequentemente variem entre 30 e 60%. Em pacientes que utilizam PEG ASNase as taxas de hipersensibilidade clínica ficam em torno de 3 a 24%, e geralmente as reações são mais comuns quando os pacientes foram expostos previamente a ASNase *E.coli-derivada*. Por fim, nos pacientes que utilizam *Erwinase*, essas taxas ficam em torno de 3 a 37% dos pacientes (HIJIYA AND VAN DER SLUIS, 2016).

**Tabela 1- Taxas de hipersensibilidade de acordo com a formulação de ASNase**

<b>Tipo</b>	<b>Taxas (mínima e máxima%)</b>
<i>E.coli</i> ASNase	30 e 60%
PEG ASNase	3 e 24%
<i>Erwinase</i>	3 e 37%

Os sintomas de hipersensibilidade clínica podem variar desde urticária, eritema, erupção cutânea, prurido até anafilaxia e risco de morte (WOO *et al.*, 2000). Outros efeitos adversos associados ao uso destas medicações incluem anormalidades da hemostasia (como trombose e hemorragia do sistema nervoso central (SNC) e tromboses venosas periféricas), hiperglicemia, anormalidades do metabolismo lipídico e pancreatite, que ocorrem em 4% a 18% dos pacientes pediátricos (PIETERS *et al.*, 2012; BARBA *et al.*, 2017).

A gravidade das reações é classificada de acordo com os Critérios comuns de terminologia para eventos adversos (CTCAE), conforme os graus 1 a 5, como consta na figura anexada ao artigo I (CECCONELLO *et al.*, 2019) A hipersensibilidade clínica ocorre quase que exclusivamente em fases de tratamento após a indução, geralmente quando houve um intervalo de semanas ou meses sem a administração da ASNase. Existem várias explicações possíveis para a raridade das reações alérgicas durante a indução, como o atraso na resposta imunológica eficaz devido ao tempo necessário para a ativação do complemento e a produção subsequente de anticorpos. Além disso, os sintomas associados à alergia podem

ser mascarados pelo tratamento intensivo com corticosteróides que ocorre durante essa fase (AVRAMIS AND TIWARI, 2006; BARBA *et al.*, 2017).

Os anticorpos produzidos em resposta à ASNase nem sempre conduzem a hipersensibilidade com sintomas clínicos, mas provocam uma inativação rápida da ASNase, resultando numa depleção de asparagina subótima. Isso é comumente referido como "hipersensibilidade silenciosa" ou "inativação silenciosa" e pode ocorrer em aproximadamente 30% dos pacientes (PANOSYAN *et al.*, 2004).

O risco de desenvolvimento de alergia clínica e inativação silenciosa pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo o esquema de administração (são mais comuns na fase de re-indução já que o risco de reação pode aumentar com uma nova exposição à ASNase após um intervalo de tempo sem o uso da mesma), a preparação da formulação, a via de administração, a linha de tratamento (isto é, protocolos de recaída) e a utilização concomitante de outros agentes quimioterápicos incluindo corticosteróides e anti-histamínicos (RAETZ AND SALZER, 2010; ASSELIN AND RIZZARI, 2015). Portanto, o pré-tratamento com esteróides e anti-histamínicos pode atenuar as reações de hipersensibilidade clínicas, porém, hoje discute-se sua função na formação de anticorpos neutralizantes (FERNANDEZ *et al.*, 2014).

As reações de hipersensibilidade induzidas por ASNase possuem um *clearance* mais rápido do fármaco em comparação com os pacientes que não tiveram reações, resultando em menor exposição dos pacientes ao fármaco. Os pacientes que desenvolvem anticorpos neutralizantes para a ASNase, mesmo na ausência de uma reação clínica, podem ter concentrações séricas sub-terapêuticas devido a essa destruição acelerada de ASNase, o que acarreta risco de taxas menores de sobrevida e maior chance de recaída da doença. Fica claro então a importância da monitorização da atividade da ASNase, com ajustes e eventual troca de medicação, atenuando, assim, os efeitos adversos da hipersensibilidade silenciosa

(WOO *et al.*, 2000; LANVERS *et al.*, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2014).

Até pouco tempo a ASNase derivada de *E.coli* era utilizada como terapia de primeira linha, porém com o desenvolvimento da PEG ASNase começou a haver uma migração do componente de primeira linha. Nos Estados Unidos, o fabricante da formulação derivada de *E. coli* de ASNase interrompeu a produção em 2012, e a PEG ASNase agora é usada como tratamento de primeira linha. Devido à sua fonte bacteriana distinta, a ASNase derivada da *Erwinia* não mostra reatividade cruzada com anticorpos gerados a partir de ASNase derivada de *E. Coli*. Essa falta de reatividade cruzada é a base para a aprovação da ASNase derivada da *Erwinia* como substituto para o tratamento de pacientes com LLA que desenvolverem hipersensibilidade à *E. coli* (SALZER *et al.*, 2018).

Então, a avaliação de rotina de anticorpos, medição de níveis de ASNase ou de asparagina é importante para prever reações alérgicas futuras ou para alertar a possibilidade de hipersensibilidade silenciosa. Há algumas maneiras para fazer essas determinações, porém algumas são mais indicadas que as outras. Não se aconselha a determinação da concentração de asparagina no soro, pois tecnicamente é difícil, porque a enzima ainda age *ex vivo* se a amostra de sangue não for mantida em gelo e processada imediatamente. Também não se recomenda a detecção de anticorpos contra ASNase, apesar de ser uma técnica sensível, é inespecífica, já que nem todos os anticorpos possuem atividade neutralizante. Muitos pacientes parecem desenvolver anticorpos anti-ASNase sem quaisquer sinais de alergia ou inativação clínica da enzima. Portanto, a medição da atividade enzimática da ASNase é a forma mais indicada de monitoramento, pois correlaciona o nível de depleção da asparagina, é tecnicamente viável, reprodutível e confiável, além de apresentar a melhor correlação com a eficácia clínica. O monitoramento da atividade da ASNase permite detectar a inativação silenciosa e individualizar a dose para atingir a faixa terapêutica. Vários protocolos de tratamento europeus já recomendam o monitoramento da atividade da ASNase no contexto de

cuidados clínicos de rotina (PANOSYAN *et al.*, 2004; BARBA *et al.*, 2017).

Conforme o Consenso europeu publicado em 2016, se propõe as seguintes recomendações com base na gravidade da reação alérgica clinicamente evidente e via de administração. No contexto de reações de grau 2 da CTCAE ou superiores, recomenda-se que haja a troca de preparação de ASNase, sem necessidade definida de testar os níveis. No contexto de reações de grau 1, ou quando ocorrer uma reação de significância questionável, se recomenda o monitoramento em tempo real dos níveis séricos de atividade da ASNase. Presumindo o uso de PEG ASNase IV, é recomendado verificar um nível dentro de 7 dias da administração da dose, se o nível de atividade for indetectável, deve ser trocada para uma preparação derivada de *Erwinia*. Se o nível for detectável, deve-se verificar novamente em 14 dias e uma dose subsequente de PEG ASNase pode ser cuidadosamente administrada. Para ASNase derivada de *E.coli* se recomenda verificar o nível de atividade de ASNase *E.coli* em 72 h após a primeira dose, porém vários estudos já determinaram que a verificação em 24 e 48h já é suficiente. Os níveis de atividade devem ser verificados e devem estar acima de 0,1 UI / mL (VAN DER SLUIS, 2016; BARBA *et al.*, 2017; SALZER *et al.*, 2018). Todo este esquema está descrito na figura 1 do artigo I, página 30 (CECCONELLO, *et al.*, 2019). Com ASNase IM, com qualquer reação questionável, se recomenda verificar o nível sérico de ASNase, pois a dose completa será administrada e o nível será informativo, pois pode haver confusão clínica em relação à irritação local versus reação alérgica clínica. Quando houver inativação silenciosa comprovada, deve haver a mudança de formulação para outra sem reatividade cruzada (BARBA *et al.*, 2017).

Porém, quando se trata de triagem para inativação silenciosa, ela deve ser considerada em todos os pacientes submetidos a terapia para LLA com ASNase. Isto pode ser particularmente importante na sequência na terapia ou na definição do tratamento da leucemia recidivada (VAN DER SLUIS, 2016; SALZER *et al.*, 2018).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Considerando as taxas mais baixas de cura em casos de leucemia linfóide aguda no Brasil quando comparadas com países desenvolvidos, a compreensão das razões que ocasionam tais diferenças é essencial. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o monitoramento da atividade da medicação e a frequência de inativação do mesmo, além de comparar as diversas apresentações administradas. Já foi postulado por vários estudos que para se obter um tratamento eficaz é necessário o monitoramento da medicação em questão de forma rotineira. A realização deste projeto pode ser de importância para melhoria na assistência de pacientes com LLA, pois permitirá acesso à efetividade das medicações, análise esta que não é realizada hoje de forma rotineira em nenhum hospital nacional.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Implementar o teste laboratorial para análise da atividade da ASNase em pacientes com leucemia linfóide aguda.

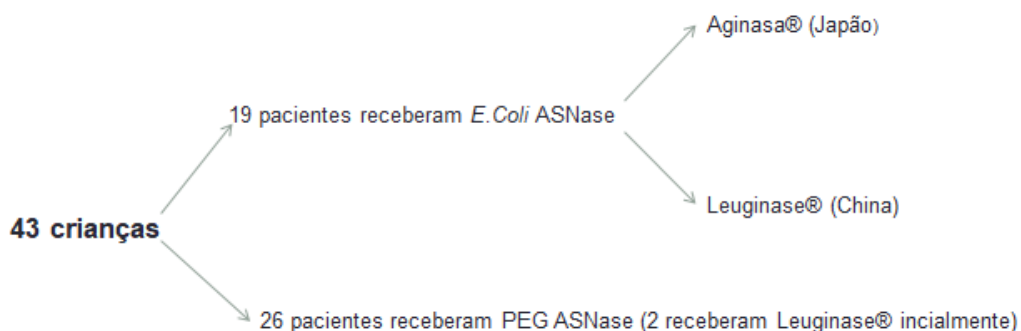
### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Implementar teste de atividade da asparaginase;
- b) Comparar nossos resultados com centro de referência para análise de qualidade da técnica;
- c) Analisar as atividades das medicações usadas em nossa realidade e sugerir fluxo de condutas conforme resultados obtidos;

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo observacional (coorte com controle histórico) realizado em pacientes em tratamento para LLA em um hospital universitário localizado no sul do Brasil. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição (CAAE 69093817.4.0000.5327). Foram coletadas amostras de 43 crianças (mínimo 4 meses e máximo 19 anos) que são tratadas com o protocolo BFM 2009, onde 19 pacientes receberam ASNase (Leuginase ou Aginasa) entre abril de 2017 e dezembro de 2017 e 26 pacientes receberam PEG ASNase, sendo que 2 destes receberam Leuginase inicialmente, como consta na figura 2. As amostras continham no mínimo 2 mL de sangue em EDTA e foram coletadas antes de cada infusão de ASNase nativa, 24h e 48h após, já nos pacientes que receberam PEG ASNase foram coletadas amostras 7 e 14 dias após a infusão. Estas amostras foram devidamente transportadas e centrifugadas em 3670 rpm por 10 min dentro de 2 horas e o plasma foi aliquoteado em tubos previamente identificados que foram imediatamente armazenados a -80 °C até a análise. Todos os procedimentos e protocolos foram aprovados pelo comitê de ética local e nacional.

**Figura 2 - Esquema de pacientes que utilizaram *E.coli* e PEG ASNase**





As primeiras análises foram testadas no Hospital Boldrini, Campinas, para exercício da técnica e levantamento dos pontos críticos do protocolo. Importante enfatizar que eles desenvolviam a técnica apenas a nível experimental e exclusivamente em animais. Após estabelecimento da técnica em nosso laboratório e análises de nossas amostras, enviamos 30 amostras de pacientes que receberam Leuginase ou Aginasa para a Universidade de Munster, Alemanha, (centro de referência europeu para análise atividade da asparaginase) para comparação de resultados.

## 5.1 ANÁLISES LABORATORIAIS

O método de análise para a determinação da atividade enzimática é baseado em uma técnica descrita por Lanvers et al. (2002), que utiliza o ácido aspártico B-hidroxamato (AHA) como substrato para a quantificação de ASNase derivada de *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi* e PEG ASNase em plasma humano. Resumidamente, as amostras de plasma contendo ASNase foram incubadas a uma temperatura específica durante um intervalo de tempo definido com uma quantidade em excesso do substrato AHA.

Para a determinação da atividade das nossas amostras de Leuginase e Aginasa, utilizamos para a quantificação da ASNase concentrações entre 0,0025 IU / mL a 0,1 IU / mL, foram diluídos 20 ul de amostra com 180 ul de uma solução de AHA (2 mM) dissolvida em tampão Tris, pH 7,3 (0,015 M) suplementado com 0.015% (p/v) BSA, e houve incubação a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 60 ul de ácido tricloroacético (TCA 24,5% (p/v)), as amostras foram centrifugadas por 5 min em 2500 rpm. Então 50 ul do líquido sobrenadante foi adicionado a uma nova placa para reagir com 200 ul do reagente Oxin, que consistiu em 1 parte de 2% de 8-hidroxiquinolina dissolvido em etanol absoluto (p/v) e 3 partes de solução de carbonato de sódio 1 M. Após 1 minuto a 95°C para

aquecimento, houve o resfriamento a temperatura ambiente por 10 minutos e realizada a leitura.

Já para análise da atividade da PEG ASNase foram utilizadas concentrações de quantificação entre 0,1 IU / mL a 1,0 IU / mL, e o tempo de incubação foi de 10 min na presença de 20 ul de amostra com 180 ul de solução de AHA (10 mM de tampão Tris/BSA, pH 7,3) e após isso, 20 ul do líquido sobrenadante foi transferido para uma nova placa com 40 ul de água estéril, onde se adicionou 200 ul do reagente Oxin. Houve aquecimento por 1 minuto a 95°C e resfriamento a temperatura ambiente por 10 minutos e então feita a leitura.

As leituras foram realizadas em 690 nm com o software SpectraMax M3 (Molecular devices). Os padrões e amostras foram analisados em duplicata e o controle foi lido em triplicata.

## 6 REFERÊNCIAS

ALBERSTEN, B.K. *et al.* Asparaginase treatment in infants with acute lymphoblastic leukemia; pharmacokinetics and asparaginase hypersensitivity in Interfant-06. **Leuk Lymphoma**, v. 60, n. 6, p. 1-7, 2019.

ASSELIN, B.; RIZZARI, C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. **Leuk Lymphoma**, v. 56, n. 8, p. 2273-80, 2015.

ASSELIN, B. *et al.* Measurement of serum L-asparagine in the presence of Lasparaginase requires the presence of an L-asparaginase inhibitor. **Cancer Res**, v. 51, n. 24, p. 6568–6573, 1991.

AVRAMIS, V.I.; TIWARI, P.N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Int J Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 241–254, 2006.

BARBA, P. *et al.* Asparaginase use for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Med Clin**, v. 148, n. 5, p. 225–231, 2017.

BOSS, J. *et al.* Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. **Eur J Cancer**, v. 32, n. 9, p. 1544–1550, 1996.

BROOME, J.D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, v. 171, n. 1, p. 1114–1136, 1961.

BURKE, M.J. How to manage asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. **Future Oncol**, v. 10, n.16, p. 2615-17, 2014.

CECCONELLO, D.K. *et al.* Asparaginase: an old drug with new questions. **Hematol Transf Cell Therap**, v. 1379, n 19, p. 30142-7, 2019.

DOUER, D. *et al.* Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2744–2750, 2007.

FERNANDEZ, C.A. *et al.* Successful challenges using native E. coli E. coli asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated E. coli asparaginase. **Cancer Chemother Pharmac**, v. 73, n. 6, p. 1307–1313, 2014.

GENTILI, D. *et al.* Determination of L-asparagine in biological samples in the presence of L-asparaginase. **J Chromatogr B Biomed Appl**, v. 657, n. 1, p. 47-52, 1994.

GRIGORYAN, R.S. *et al.* Changes of amino acid serum levels in pediatric patients with higher-risk acute lymphoblastic leukemia (CCG-1961). **In Vivo**, v. 18, n.2, p.107–112, 2004.

HIJIYA, N.; VAN DER SLUIS, I.M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 57, n. 4, p. 748–757, 2016.

KIDD, J.G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit sérum. **J Exp Med**, v. 98, n. 6, p. 565-582, 1953.

LANVERS, C. *et al.* Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. **Anal Bioanal Chem**, v. 309, n. 1, p. 117–126, 2002.

MAGRI, A. *et al.* A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Anal Bioanal Chem**, v. 410, n. 27, p. 6985-6990, 2018.

MASHBURN, L.T.; WRISTON, J.C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase, from *Escherichia Coli*. **Arch Biochem Biophys**, v.12, n. 1, p. 50–56, 1963.

PANOSYAN, E.H. *et al.* Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk of acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 26, n. 4, p. 217–226, 2004.

PETERSEN, W.C. *et al.* Comparison of allergic reactions to intravenous and intramuscular pegaspargase in children with acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 31, n. 4, p. 311–317, 2014.

PIETERS, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2012.

RAETZ, E.A.; SALZER, W.L. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatric Hematol Oncol**, v. 32, n. 7, p. 554-63, 2010.

RIZZARI, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Oncol**, v. 25, n. 1, p. S1-S9, 2013.

SALZER, W. *et al.* Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 59, n. 8, p. 1797–1806, 2018.

SCHREY, D. *et al.* Therapeutic drug monitoring of asparaginase in the ALL-BFM 2000 protocol between 2000 and 2007. **Pediatr Blood Cancer**, v. 54, n. 7, p. 952-58, 2010.

SCHORE, R.J. *et al.* Plasma asparaginase activity and asparagine depletion in acute lymphoblastic leukemia patients treated with pegaspargase on Children's Oncology Group AALL07P4. **Leuk Lymphoma**, v. 60, n. 7, p. 1-9, 2019.

SHRIVASTAVAA, A.*et al.* Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent Conflict of interest: authors declare no conflict of interest. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 100, n.1, p. 1–1, 2016.

SILVERMAN, L.B. *et al.* Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. **Blood**, v. 97, n. 5, p. 1211–1218, 2001.

VAN DER SLUIS, I.M. *et al.* Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. **Haematologica**, v. 101, n. 3, p. 279–285, 2016.

VYAS, C. *et al.* Experience with generic pegylated L-asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia and monitoring of serum asparaginase activity. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 35, n. 5, p. 1-10, 2018.

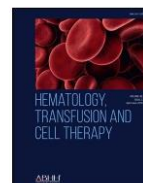
ZENATTI, P.P.*et al.* Low bioavailability and high immunogenicity of a new brand of *E. coli* L-asparaginase with active host contaminating proteins. **EBioMedicine**, v. 30, n. 2, p. 158-166, 2018.

WOO, M.H. *et al.* Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 7, p. 1525–1532, 2000.



HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY

www.htct.com.br



## Review article

## Asparaginase: an old drug with new questions

**Daiane Keller Ceconello**<sup>a,b</sup>, **Mariana Rodrigues de Magalhães**<sup>b</sup>, **Isabel Cristina Ribas Werlang**<sup>a,b</sup>, **Maria Lucia de Martino Lee**<sup>c</sup>, **Mariana Bohns Michalowski**<sup>a,b,\*</sup>, **Liane Esteves Daudt**<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Hospital Santa Marcelina, São Paulo, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 March 2019

Accepted 20 July 2019

Available online xxx

## Keywords:

Asparaginase

Hypersensitivity

Silent inactivation

Acute lymphoblastic leukemia

## ABSTRACT

The long-term outcome of acute lymphoblastic leukemia has improved dramatically due to the development of more effective treatment strategies. L-asparaginase (ASNase) is one of the main drugs used and causes death of leukemic cells by systematically depleting the non-essential amino acid asparagine. Three main types of ASNase have been used so far: native ASNase derived from *Escherichia coli*, an enzyme isolated from *Erwinia chrysanthemi* and a pegylated form of the native *E. coli* ASNase, the ASNase PEG. Hypersensitivity reactions are the main complication related to this drug. Although clinical allergies may be important, a major concern is that antibodies produced in response to ASNase may cause rapid inactivation of ASNase, leading to a worse prognosis. This reaction is commonly referred to as silent hypersensitivity or silent inactivation. We are able to analyze hypersensitivity and inactivation processes by the measurement of the ASNase activity. The ability to individualize the ASNase therapy in patients, adjusting the dose or switching patients with silent inactivation to an alternate ASNase preparation may help improve outcomes in those patients. This review article aims to describe the pathophysiology of the inactivation process, how to diagnose it and finally how to manage it.

© 2019 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Abbreviations:** ALL, acute lymphoblastic leukemia; ASNase, asparaginase; ASN, asparagine; ASP, aspartate; IM, intramuscular; IV, intravenous; PEG-ASNase, pegylated asparaginase; TDM, Therapeutic drug monitoring.

\* Corresponding author at: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Oncologia Pediátrica, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Bairro Santa Cecília, Porto Alegre, CEP 90035-903 RS, Brazil.

E-mail address: [mmichalowski@hcpa.edu.br](mailto:mmichalowski@hcpa.edu.br) (M.B. Michalowski).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.07.010>

2531-1379/© 2019 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: Ceconello DK, et al. Asparaginase: an old drug with new questions. Hematol Transfus Cell Ther. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.07.010>

## Introduction

During the last decades, the long-term outcome of acute lymphoblastic leukemia (ALL) has improved dramatically due to the development of effective treatments and well-designed protocols according to malignant cells origin. Long-term event-free survival in children is currently around 80%, and overall survival is close to, or in excess of, 90% in 5 years in high-income countries.<sup>1</sup> Among the drugs used as the cornerstone of combination protocols in the treatment of leukemias is the bacterial enzyme L-asparaginase (ASNase).<sup>1,2</sup>

In 1953, tumor-inhibitory properties of ASNase were first described by Kidd, with the observation that guinea-pig serum treated lymphoma-bearing mice (particularly 6C3HED) underwent rapid and often complete tumor regression.<sup>3,4</sup> These properties were later attributed to the ASNase activity.<sup>2,5</sup> In 1963, Mashburn and Wriston found that the *E. coli* enzyme had anti-tumor activity.<sup>5</sup>

Although it may be considered an old drug, we are still learning about its mechanism and the necessary care when prescribing it. Actually, pharmacokinetic properties of ASNase are dependent on several different factors, including the bacterial source.<sup>7,8</sup> Three main types of ASNase have been used so far: native ASNase derived from *Escherichia coli*, an enzyme isolated from *Erwinia chrysanthemi*, referred to as *Erwinia* ASNase and a pegylated form of the native *E. coli* ASNase.<sup>2,9,10</sup> The enzyme derived from *E. coli* is indicated in most first-line therapy, while the *Erwinia*-derived ASNase is reserved for patients who develop hypersensitivity reactions to the previous form.<sup>10-12</sup>

Since ASNase preparations are derived from bacteria, they are highly immunogenic. For this reason, a third formulation, the PEG ASNase, which is a polyethylene glycol conjugated ASNase, has been developed in order to reduce the immunogenicity, as well as the number of infusions. It is well known that the pegylated form results in reduced rates of antibody formation, a lower incidence of allergy, and a prolonged serum half-life.<sup>12</sup> Due to its pharmacological characteristics, it has been used as the initial preparation of ASNase in some ALL treatment regimens.<sup>1</sup> Actually, the PEG-ASNase has a half-life of about 1 week, while native *E. coli* ASNase and *Erwinia* ASNase have a half-life of 1.3 and 0.65 days, respectively.<sup>13</sup> Due to the shorter half-life of *Erwinia* ASNase, a higher dose and frequency of applications are required to ensure adequate serum enzyme activity.<sup>14</sup>

The administration route of ASNase derived from *E. coli* can be both intravenous (IV) or intramuscular (IM). However, PEG-ASNase and *Erwinia* ASNase preferentially have IM administration, a some studies have shown that these medications may present a greater immunogenic potential when IV. It is important to mention that the IV administration is less painful and may be more convenient in specific settings.<sup>12,15</sup>

ASNase is associated with different adverse reactions, but the major limitation in delivering the intended up-front ASNase therapy is the high rate of hypersensitivity reactions (30%–70% of patients receiving *E. coli* derived ASNase).<sup>16,17</sup> Other side effects are hypoalbuminemia, anaphylaxis, pancreatitis, hyperglycemia, hyperlipidemia, urticaria, bron-

**Table 1 – CTCAE criteria for toxicity in hypersensitivity reactions.**

Grade	Reaction
1	Transient erythema or rash fever <38C; intervention not indicated
2	Intervention or interruption of the infusion are indicated; responds quickly to symptomatic treatment (e.g.: antihistamines, NSAID's, opioids, etc.); prophylactic drugs indicated <24h
3	Extended (e.g., do not respond quickly to symptomatic medication and/or a brief interruption of the infusion); recurrence of symptoms after initial improvement; hospitalization indicated by clinical sequelae (e.g., renal failure, pulmonary infiltrates)
4	Life threatening episodes: urgent intervention indicated
5	Death

Source: Barba et al.<sup>14</sup>.

chospasm, angioedema and coagulation abnormalities that may lead to intracranial thrombosis or hemorrhage.<sup>9,10</sup>

More recently, in 2004, Panosyan et al. have described that patients with clinical hypersensitivity have a faster clearance when compared to patients who do not have this reaction.<sup>16</sup> In addition, antibodies produced in response to ASNase do not always lead to clinical hypersensitivity, but could instead cause rapid inactivation of ASNase, resulting in suboptimal asparagine depletion and sub-therapeutic serum concentrations, leading to decreased survival and a greater chance of the relapse of the disease.<sup>10,16</sup>

This review article aims to describe the update of the major advances of the pathophysiology, clinical management of ASNase and its modern clinical application in ALL acquired overtimes.

## Pathophysiology of the hypersensitivity and inactivation process

Upon further study, it was observed that ASNase causes the death of leukemic cells by systematically depleting the non-essential amino acid asparagine. These cells are particularly sensitive because they have low levels of asparagine-synthetase. The ASNase owes its antileukemic effect to the rapid and almost complete conversion of circulating Asn concentrations to aspartic acid and ammonia. For these reasons, serum Asn deamination selectively eliminates leukemia cells, resulting in reduced protein synthesis and, ultimately, leukemic cell death, preserving normal cells, as the latter have the ability to synthesize it intracellularly.<sup>1,2,11</sup>

Clinical hypersensitivity is one of the most common reasons for the discontinuation of the ASNase therapy.<sup>18</sup> It is characterized by an allergic reaction with signs and symptoms consistent with an immune response to a known antigen.<sup>10</sup> Although the specific mechanism responsible for the ASNase-induced hypersensitivity is unknown, most cases manifest a combination of symptoms that can vary from mild to severe.<sup>19,20</sup> The severity of the reaction is classified according to the Common Toxicity Criteria for Adverse Events (CTCAE) (Table 1) where mild-to-moderate reactions are characterized by flushing, fever, chills and dyspnea while severe reactions



can include bronchospasm and anaphylaxis.<sup>21</sup> A number of less prevalent adverse events, including hyperglycemia, vomiting, pancreatitis, nausea, abdominal pain and diarrhea may also occur.<sup>10</sup>

Patients developing a clinical allergy, as well as some patients without any clinical signs of hypersensitivity reactions, can have reduced ASNase activity levels due to the presence of a neutralizing antibody.<sup>8,22,23</sup> The development of anti-asparaginase neutralizing antibodies in the absence of clinical symptoms has been termed "silent inactivation".<sup>14</sup> The pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences of the neutralizing antibodies produced on silent inactivation remain unclear.<sup>24</sup> These antibodies alter the pharmacokinetics and bioavailability of the drug.<sup>21</sup> Patients who develop hypersensitivity have high titers of immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin E (IgE) antibodies to asparaginase leading to decreased activity, which may represent a mechanism of resistance to chemotherapy.<sup>24,25</sup> In fact, ASNase activity levels are inversely correlated with anti-ASNase antibody levels.<sup>10,26</sup> Due to this fact, patients who experience a severe hypersensitivity reaction are likely to exhibit significantly reduced ASNase activity and higher serum asparagine levels shortly after dose administration.<sup>10</sup> Fig. 2 shows the mechanism of action of ASNase in leading to death of the tumor cell and immediately below the process of silent inactivation where it leads to the reduction or failure of ASNase activity due to the antibodies produced.

According to Burke et al., the risk of the development of clinical allergy and silent inactivation may be influenced by several factors, including the formulation preparation, the route of administration, the schedule of administration, the protocol of treatment and the concurrent use of other chemotherapeutic agents, including corticosteroids.<sup>10</sup> Hypersensitivity reactions are more likely to appear with increasing numbers of administrations within the same cycle but may appear in discontinuous administration regimens.<sup>27</sup> These reactions are more common in the first doses of asparaginase and after a break in treatment. The risk of antibody formation increases with repeated exposure to ASNase, especially in the consolidation and re-induction phases of the treatment. However, prolonged exposure to ASNase, with no treatment gaps, has been associated with low antibody levels.<sup>20</sup> Salzer et al. discuss the fact that immunosuppression induced by corticosteroids and concomitant chemotherapy may have prevented the development of antibodies or less synthesis of them.<sup>24</sup> However, premedication with steroids or antihistamines is known to reduce allergy symptoms, but may not prevent the development of antibodies.<sup>14</sup>

Dominiki et al. reported that to estimate the intensity of the ASNase treatment, the ASNase activity (U/mL) serves as a sensitive parameter.<sup>11</sup> The activity of ASNase  $\geq 0.1$  IU/mL is considered to be effective for the complete depletion of asparagine.<sup>13,17</sup> There should always be a change in the preparation when the ASNase activity is less than the desired limit of 0.1 IU/mL. For patients receiving multiple doses of *E. coli* ASNase and *Erwinia* ASNase, a desirable activity level of  $\geq 0.1$  IU/mL is considered before each dose. In the case of PEG-ASNase, activity levels should be checked after 7 and 14 days and should be  $\geq 0.1$  IU/mL.<sup>17</sup> Silent inactivation can also hap-

pen, and its identification requires the real time measurement of either anti-ASNase antibodies or serum ASNase activity levels.<sup>13</sup>

#### Methods of analysis of hypersensitivity and inactivation processes

Currently, there are three main ways of analyzing the hypersensitivity and inactivation processes measurement of the ASNase activity, measurement of the serum asparagine levels and evaluation of the development of anti-ASNase antibodies.<sup>10,28,29</sup> Of the existing methods of analysis, Anti-ASNase antibodies and asparagine measurements are not frequently used, since they are not directly useful in the clinical decision.<sup>10</sup>

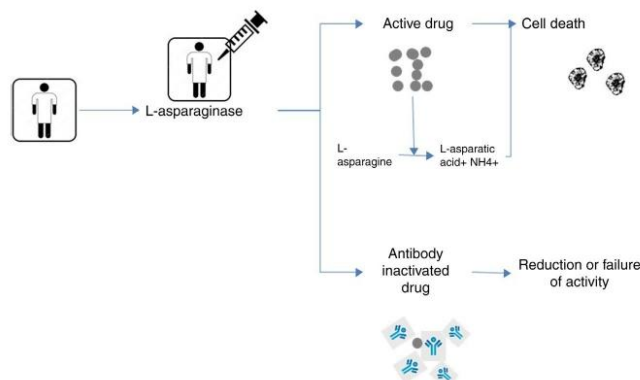
Since the aim of ASNase therapy is asparagine depletion, the measurement of asparagine itself appears to be the most effective method of evaluating ASNase.<sup>17</sup> However, accurate dosing of serum asparagine can be difficult due to the continuous hydrolysis of asparagine by the enzyme.<sup>29</sup> For this reason, measuring asparagine levels is a difficult strategy.<sup>17</sup> Assays measuring asparagine concentrations during asparaginase therapy have significant technical limitations. The measurement of asparagine in patients undergoing asparaginase therapy can be difficult due to the continued hydrolyzation of asparagine by the enzyme.<sup>14</sup>

In this context, the ASNase activity is often easier to measure and has been shown to strongly correlate with asparagine concentrations, besides being reproducible and reliable.<sup>17,28,29</sup> The catalytic activity of ASNase is influenced by pH, molarity, and buffer additives.<sup>30</sup> However, there are some disadvantages in measuring the activity of ASNase as it does not represent the catalytic activity in human serum because the serum factors that can modulate the activity of different ASNase preparations are probably masked by the dilution of the sample. The drug monitoring of ASNase activity does not describe the enzyme activity *in vivo*, but is equivalent to serum concentrations of the functional enzyme.<sup>30</sup>

On the other hand, there are some authors who suggest that the measurement of antibody levels could be used to predict which patients might benefit most from switching ASNase formulations. Willer et al. showed in a recent study that patients with high antibodies to native *E. coli* ASNase showed a significant reduction in ASNase activity during second-line treatment with PEG-ASNase, highlighting the cross reactivity between these two enzymes, while patients with moderate native *E. coli* antibody levels still showed ASNase activity  $>0.1$  IU/mL, when exposed to PEG-ASNase.<sup>26</sup>

The therapeutic drug monitoring may further optimize ASNase treatment, as greater levels of ASNase activity have been associated with improved outcomes.<sup>31</sup> Through these techniques, practitioners can evaluate whether an individual patient needs to switch ASNase due to subclinical hypersensitivity or silent inactivation.<sup>16,32</sup>

For the reasons stated above, the method more frequently used to adapt treatment is ASNase activity measurement. In 2013, Vrooman et al. defined silent inactivation as two consecutive measurements of through ASNase activity  $<0.1$  IU/mL.<sup>32</sup> More recently, Van der Sluis et al. stated that silent inactivation



**Fig. 2 – Shows the pathophysiology of the mechanism of action of ASase. The figure above shows the normal functioning of ASase degrading asparagine and leading to cell death. And the figure below shows the silent inactivation situation where antibody production leads to low or loss of ASase activity.**

can be identified by the assessment of serum ASase activity, preferably measured in 2 independent samples.<sup>17</sup>

#### Management in cases of hypersensitivity or inactivation

All patients who receive any ASase preparation should be observed for at least 1 h following the administration to monitor any adverse reaction. Due to the longer half-life of PEG-ASase, hypersensitivity reactions may appear many hours after the administration of the drug.<sup>33,34</sup>

It is described that failure to receive the complete course of ASase treatment due to hypersensitivity, other toxicities, or intolerable side effects, has been associated with inferior outcomes in ALL, compared with those who receive the majority of the intended dose of ASase.<sup>31</sup> In an international consensus, worldwide authorities agreed that when patients develop a clinical allergy, the preparation has to be switched, while if there is any doubt, the activity should be measured.

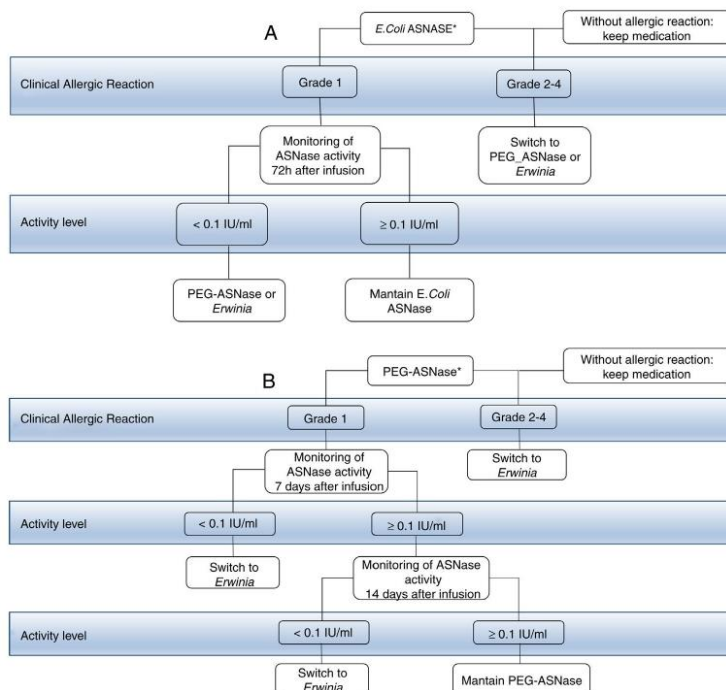
The consensus recommends that patients who develop grade 1 allergic reactions after intravenous administration monitor the activity of ASase in real time to identify silent inactivation, if it occurs. In patients with grade 2–4 allergic reactions, according to the CTCAE criteria, after intravenous or intramuscular administration, the ASase preparation change is indicated, without the need for activity tests. It is recommended that when the patient develops any questionable reaction with intramuscular administration, the activity of ASase should be checked.<sup>17</sup> They define that screening for silent inactivation should be considered for all patients undergoing asparaginase ALL therapy. Monitoring of activity in *E. coli* ASase should be performed after the first dose and after each reintroduction and the PEG ASase should be done within 7 days. If the level is detectable, but less than 0.1 IU/mL, the activity should be checked again on day 14, as described in Fig. 1, that shows the change of treatment options when any hypersensitivity reaction occurs or when there is silent inactivation. Patients who develop some hypersensi-

tivity reaction to the *E. coli* native preparation should have it replaced by PEG ASase or *Erwinia*. The choice of a second-line agent depends on the protocol specifications and availability. Patients who initially received PEG-ASase may only be switched to *Erwinia*.<sup>17</sup>

The development of anti-ASase antibodies is most commonly observed with native *E. coli* ASase.<sup>16</sup> Clinical hypersensitivity to native *E. coli* ASase has been reported in up to 75% of patients with ALL.<sup>20</sup> It appears to be less prevalent with PEG-ASase, with rates from 3 to 24%, as reported in clinical trials.<sup>30,31,35</sup> Hypersensitivity reactions to PEG-ASase are more common when patients have been previously exposed to native *E. coli* ASase.<sup>20</sup> In such cases, substitution is indicated for a different preparation which may prolong ASase therapy and possibly improve patient outcomes.<sup>36</sup> Neutralizing antibodies produced against the preparation of native *E. coli* have shown a cross-reaction with PEG-ASase, but not with *Erwinia* ASase.<sup>22</sup> Successful ASase substitutions require that there be no or little cross-reactivity with the offending preparations.<sup>13</sup> For these reasons, *Erwinase* is generally used as a second- or third-line treatment to replace *E. coli* ASase when severe allergic reactions occur because there is virtually no cross-reaction between the two products.<sup>18,33,37</sup> These data lead to a strategy that allows the majority of patients to complete their prescribed treatment regimen even when they experienced hypersensitivity to native *E. coli* asparaginase or PEG-asparaginase.<sup>38</sup>

In a recent report on cognitive function tests (COG), 55 patients who developed hypersensitivity to PEG-ASase were switched to *Erwinia chrysanthemi*. The goal of this study was to evaluate both 48- and 72 h asparaginase activity levels to determine if the current dose resulted in sufficient asparaginase activity. Results showed that asparaginase *Erwinia chrysanthemi* was well tolerated and, importantly, maintained asparaginase activity >0.1 IU/ml at both 48 and 72 h post-injection in all patients tested.<sup>24</sup> In patients who switch to ASase *Erwinia chrysanthemi*, outcomes were simi-





**Fig. 1** – Taken according to the initial drug used. In patients who develop grade 2 to 4 allergic reactions, the preparation is switched without activity monitoring. In patients who present grade 1 reactions or questionable reactions, the monitoring of the activity that varies according to the initial drug used is indicated. (A) the starting drug is *E. coli* ASNase, monitoring should be done after the first dose and after each reintroduction, which usually takes 72 h. If it has activity <0.1 IU/ml, it is suggested to switch to another formulation, PEG-ASNase or *Erwinia*. But if it has activity  $\geq 0.1$  IU/ml they maintain the infusions of *E. coli* ASNase. (B) the starting drug is PEG-ASNase, monitoring is indicated at day 7 after infusion. If the patient exhibits activity <0.1 IU/ml, switch for *Erwinia* is suggested. If the activity is  $\geq 0.1$  IU/ml, it is monitored again on day 14, if the patient has activity <0.1 IU/ml, it is suggested to change to *Erwinia* and if it has activity  $\geq 0.1$  IU/ml maintain the infusions of PEG-ASNase.

lar to patients who never develop clinical hypersensitivity.<sup>10</sup> Rates of clinical hypersensitivity in patients receiving *Erwinia* ASNase have been reported to be 3–37% of patients.<sup>20,35</sup>

As already mentioned, it is important to notice that the use of pre-medication, such as steroids and antihistamines or decreasing the infusion rate, should be avoided, as these measures reduce allergic symptoms, but do not prevent inactivation of ASNase by antibodies.<sup>10,17,18</sup>

### Clinical application

Several studies showed the historical importance of the use of asparaginase in ALL treatment, as shown in Table 2. In the 70s, the Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) 77-01 study compared patients treated with or without ASNase therapy, as part of a multiagent chemotherapy regimen. Patients in the arm that included native *E. coli* ASNase during intensification therapy

showed greater overall survival rates in the 9.4-year follow-up, compared with patients who did not receive ASNase.<sup>39</sup>

The randomized study carried out by the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP) determined the efficacy of a BFM-type chemotherapy regimen with or without the prolonged use of high-dose native *E. coli* asparaginase during continuation therapy. Children given asparaginase had a significantly increased 10-year disease-free survival (87.5% vs. 78.7%).<sup>40</sup>

Data of Amylon et al. showed that high-dose native *E. coli* asparaginase during consolidation significantly improved complete continuous remission in pediatric patients with ALL and lymphoblastic lymphoma, compared with patients treated with lower-dose asparaginase regimen.<sup>41</sup> Through these previously described studies, the importance and benefits of asparaginase treatment became clear.<sup>32</sup>

There are many advantages in performing the monitoring of ASNase activity.<sup>17</sup> Among them, we may describe the pos-

**Table 2 – Importance of the use of asparaginase comparing different therapeutic protocols.**

Study	Overall survival	Regimen
1-DFCI 77-01. <sup>39</sup>	71 ± 9% vs. 31 ± 11	ASNase vs. Non-ASNase regimen
2-Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP). <sup>40</sup>	93.7% vs. 88.6%	With prolonged vs. without prolonged use of ASNase
3-Amylon et al. <sup>41</sup>	71.3% vs. 57.8%	High-dose ASNase vs. lower-dose ASNase regimen

Source: Sallan et al.<sup>39</sup>; Rizzari et al.<sup>40</sup>; Amylon et al.<sup>41</sup>.

sibility of optimizing dosing schedules of different ASNase preparations, identifying patients with pseudo-allergic reactions who can continue their therapy and identifying patients with silent inactivation.<sup>42</sup> This strategy allows for an improvement in care, with which patients will be able to adapt their treatment according to international protocols to improve results.<sup>18,26</sup>

Some studies showed the importance of therapeutic monitoring, by correlating the levels of anti-asparaginase antibodies with their activity or only measuring activity. The study conducted by Avramis et al.<sup>30</sup> determined the correlation between antibody levels and the proportion of samples with asparaginase activity for asparagine depletion ( $\geq 0.1$  IU/mL) at each stage of therapy in patients receiving either native *E. coli* or PEG-ASNase. The majority of the children (89–93% depending on the stage of therapy) with low antibody levels had asparaginase activity  $\geq 0.1$  IU/mL. Only 50–64% of children with high antibody levels had asparaginase activity  $\geq 0.1$  IU/mL. In the study conducted by Vrooman et al.,<sup>32</sup> patients treated with native *E. coli* were randomized into two groups, one with individualized dosing, and the other with fixed dosing. Patients in the individualized group with ASNase activity levels  $< 0.1$  IU/mL despite dose adjustment were considered to have silent inactivation and were switched to another ASNase preparation. In the group with the fixed dosage, only the preparation was changed when clinical hypersensitivity occurred. Patients in the first group had significantly greater event-free survival at five years than patients in the second group (90% vs. 82%, respectively). This improvement in survival was probably due to the detection of silent inactivation in 10% of the patients in the first group and the change to another ASNase.

A study published by Schrey et al.<sup>43</sup> reported results of therapeutic monitoring of asparaginase activity in 127 patients. First-line therapy included native *E. coli*, which resulted in ASNase activity  $< 0.1$  IU/mL in 7% of patients in induction and 29% in reinduction. Second-line treatment for patients with clinical allergy or silent inactivation was PEG-ASNase, which resulted in asparaginase activity  $< 0.1$  IU/mL in 17% of patients of these patients.

In our recent study on a sample of Brazilian patients, has we were able to clearly show the importance of measuring drug activity in patients with ALL in our reality. We analysed 262 serum samples taken 24 h and 48 h after infusions of an asparaginase preparation. We were able to detect a large group of patients whose asparaginase activity was lower than 0.1 IU/mL. This data highlighted the importance of monitoring asparaginase activity in middle income countries. This kind of analysis can help policy makers to establish the appropriate

strategies to provide access to efficient treatment for all patients.<sup>44</sup>

## Conclusions

ASNase has historically been a critical component of multi-agent chemotherapy for the treatment of ALL. Intensified ASNase use is associated with significant improvements in outcomes for patients with ALL.

The possibility of switching ASNase formulations in ALL patients with clinical hypersensitivity allows for the completion of the scheduled ASNase treatment and has been shown to significantly improve survival. The monitoring of ASNase activity in patients can be used to identify ASNase levels considered inadequate for asparagine depletion, as well as to identify silent inactivation in patients who may not display clinical hypersensitivity. The ability to individualize the ASNase therapy in patients, adjusting the dose, or switching patients with silent inactivation to an alternate ASNase preparation, may help improve the outcomes in those patients.

There are few studies in our reality that evaluate the asparaginase activity in the various formulations available. The identification of silent inactivation is probably an effective and easily available strategy to improve outcome of children and adolescents with ALL.

## REFERENCES

- Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. *Cancer*. 2012;117(2):238–49.
- Avramis VI, Tiwari PN. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):241–54.
- Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. *J Exp Med*. 1953;98:565–84.
- Kidd JG. Regression of Transplanted Lymphomas Induced in vivo by Means of Normal Guinea Pig Serum. II. Studies on the Nature of the Active Serum Constituent: Histological Mechanism of the Regression: Tests for Effects of Guinea Pig Serum on Lymphoma in Vitro. *J Exp Med*. 1953;98:583–611.
- Broome JD. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is Responsible for Its Antilymphoma Effects. *Nature*. 1961;171:1114–36.



6. Mashburn LT, Wriston JC. Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1963;12(1):50-6.
7. Pession A, Valsecchi MG, Masera G, Kamps WA, Magyarosy E, Rizzari C, et al. Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):7161-7.
8. Muller HJ, Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1998;28(2):97-113.
9. Barba P, Dapena JL, Montesinos P, Rives S. Asparaginase use for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2017;148(5):225-31.
10. Burke MJ. How to manage asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Future Oncol*. 2014;10(16):2615-27.
11. Schrey D, Borghorst S, Lanvers-Kaminsky C, Hempel G, Gerss J, Möncke A, et al. Therapeutic drug monitoring of asparaginase in the ALL-BFM 2000 protocol between 2000 and 2007. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54:952-8.
12. Petersen WC, Clark D, Seen SL, Cash WT, Gillespie SE, McCracken CE, et al. Comparison of allergic reactions to intravenous and intramuscular pegaspargase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2014;31(4):311-7.
13. Fernandez CA, Stewart E, Panetta JC, Wilkinson MR, Morrison AR, Finkelman FD, et al. Successful challenges using native *E. coli* asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated *E. coli* asparaginase. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2014;73(6):1307-13.
14. Salzer W, Bostrom B, Messinger Y, Perissinotti AJ, Marini B. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(8):1797-806.
15. Alrazzak M, Beaupin LK, Kinyoun P, Barth M. The incidence of hypersensitivity reactions to pegylated Asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia: a city-wide experience. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2016;38(1):e16-20.
16. 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 CCC-1961. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(4):217-26.
17. van der Sluis IM, Vrooman LM, Pieters R, Baruchel A, Escherich G, Goulden N, et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica*. 2016;101(3):279-85.
18. Yen HJ, Chang WH, Liu HC, Yeh TC, Hung GY, Wu KH, et al. Outcomes Following Discontinuation of *E. coli* L-Asparaginase Upon Severe Allergic Reactions in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Blood Cancer*. 2016;63:665-70.
19. Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, et al. Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2000;18(7):1525-32.
20. Hijjiya N, Van der Sluis IM. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Lymphoma*. 2015;8194:1-31.
21. Shinnick SE, Browning ML, Koontz SE. Managing hypersensitivity to asparaginase in pediatrics, adolescents, and young adults. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2013;30(2):63-77.
22. Zalewska-Szewczyk B, Gach A, Wyka K, Bodalski J, Młynarski W. The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different l-asparaginase preparations. *Clin Exp Med*. 2009;9(2):113-6.
23. Moerloose B, Suci S, Bertrand Y, Mazingue F, Robert A, Uyttebroeck A, et al. Improved outcome with pulses of vincristine and corticosteroids in continuation therapy of children with average risk acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoblastic non-Hodgkin lymphoma (NHL): report of the EORTC randomized phase 3 trial 58951. *Blood*. 2010;116(1):36-44.
24. Sallan SE, Gelber RD, Kimball V, Donnelly M, Cohen HJ. More is better! update of Dana-Farber cancer institute/children's hospital childhood acute lymphoblastic leukemia trials. *Haematol Blood Transfus*. 1990;33:459-66.
25. Rau RE, Dreyer Z, Choi MR, Liang W, Skowronski R, Allamneni KP, et al. Outcome of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma with hypersensitivity to pegaspargase treated with PEGylated Erwinia asparaginase, peg crisant asparaginase: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(3):1-7.
26. Willer A, Gerss J, König T, Franke D, Kühnel HJ, Henze G, et al. Anti-*Escherichia coli* asparaginase antibody levels determine the activity of second-line treatment with pegylated *E. coli* asparaginase: a retrospective analysis within the ALL-BFM trials. *Blood*. 2013;118(22):5774-82.
27. Mondelaers V, Suci S, Moerloose B, Ferster A, Mazingue F5, Plat G, et al. Prolonged versus standard native *E. coli* asparaginase therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: final results of the EORTC-CLG randomized phase III trial 58951. *Haematologica*. 2017;102(10):1727-38.
28. Avramis VI, Panosyan EH. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(4):367-93.
29. Asselin BL, Lorenson MY, Whittin JC, Coppola DJ, Kende AS, Blakley RL, et al. Measurement of serum L-asparaginase in the presence of L-asparaginase requires the presence of an L-asparaginase inhibitor. *Cancer Res*. 1991;51(24):6568-73.
30. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood*. 2002;99:1986-94.
31. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*. 2001;97(5):1211-8.
32. Vrooman LM, Stevenson KE, Supko JG, O'Brien J, Dahlberg SE, Asselin BL, et al. Postinduction Dexamethasone and Individualized Dosing of *Escherichia coli* L-Asparaginase Each Improve Outcome of Children and Adolescents With Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From a Randomized Study—Dana-Farber Cancer Institut. *J Clin Oncol*. 2013;31(9):1202-10.
33. Asselin BL. The three asparaginases—comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. *Adv Exp Med Biol*. 1999;457:621-9.
34. Hunger S. COG Pharmacy Committee. Parental and oral chemotherapy administration guidelines used by the Children's Oncology Group (Version 6). In: *Archives of the Children's Oncology Group*; 2010.
35. Vrooman LM, Supko JG, Neuberger DS, Asselin BL, Athale UH, Clavell L, et al. Erwinia asparaginase after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54:199-205.
36. Boos J, Werber G, Ahlke E, Schulze-Westhoff P, Nowak-Göttl U, Würthwein C, et al. Monitoring of asparaginase activity and

- asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *European Journal of Cancer Part A*. 1996;32(9):1544–50.
37. Vrooman LM, Kirov II, Dreyer ZE, Kelly M, Hijiya N, Brown P, et al. Activity and Toxicity of Intravenous Erwinia Asparaginase Following Allergy to E. coli-Derived Asparaginase in Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Blood Cancer*. 2016;63:228–33.
  38. Rizzari C, Conter V, Sary J, Colombini A, Moericke A, Schrappe M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2013;25 Suppl. 1:S1–9.
  39. Sallan SE, Gelber RD, Kimball V, Donnelly M, Cohen HJ. More is better! update of Dana-Farber cancer institute/children's hospital childhood acute lymphoblastic leukemia trials. *Haematol Blood Transfus*. 1990;33:459–66.
  40. Rizzari C, Valsecchi MG, Aricò M, Conter V, Testi A, Barisone E, et al. Effect of protracted highdose L-asparaginase given as a second exposure in a Berlin-Frankfurt-Munster-based treatment: results of the randomized 9102 intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia study—a report from the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. *J Clin Oncol*. 2001;19:1297–303.
  41. Amylon MD, Shuster J, Pullen J, Berard C, Link MP, Wharam M, et al. Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*. 1999;13:335–42.
  42. Lanvers-Kaminsky C, Rüffer A, Würthwein G, Gerss J, Zucchetti M, Ballerini A, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Asparaginase Activity - Method Comparison of MAATM and AHA Test Used in the International AIEOP-BFM ALL 2009 Trial. *Ther Drug Monit*. 2018;40(1):93–102.
  43. Schrey D1, Speitel K, Lanvers-Kaminsky C, Gerss J, Möricke A, Boos J. Five-year single-center study of asparaginase therapy within the ALL-BFM 2000 trial. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57:378–84.
  44. Ceconello DK, Werlang IC, Alegretti AP, Hahn MC, de Magalhães MR, Battistel AP, et al. Monitoring asparaginase activity in middle-income countries. *Lancet Oncol*. 2018;2045(18):30584–9.



## Monitoring asparaginase activity in middle-income countries



Acute lymphoblastic leukaemia is the most frequent neoplasia in childhood with more than 85% of treated patients cured in high-income countries.<sup>1</sup> One of the key drugs in its treatment is L-asparaginase (ASNase). The activity of ASNase can be affected by different factors such as antibody production and different pharmacokinetics among formulations. Serum asparaginase (Asn) deamination selectively eliminates leukaemia cells preserving normal cells, since normal cells have the ability to synthesise Asn intracellularly.<sup>2,3</sup> In order to ensure therapeutic benefit, it is necessary to measure ASNase activity, since different formulations and silent inactivation might exist (values below 0.1 IU/mL).<sup>4</sup> In 1996, Boos and colleagues<sup>5</sup> described that different ASNase preparations could have different half-lives and different initial concentrations, probably because of distinct *Escherichia coli* strains. Thus, it is important to be aware of the drug preparation and the substantial variability in interpatient response.

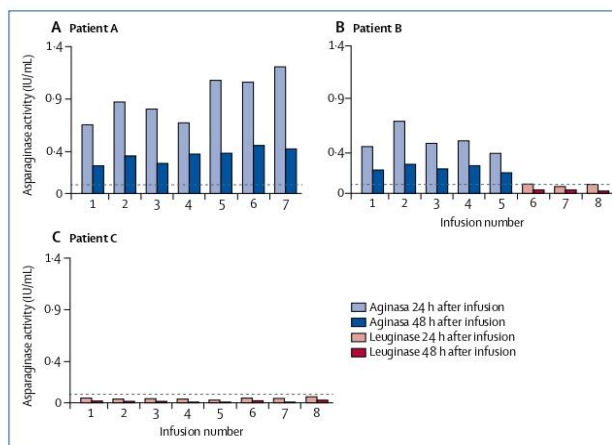
Since 2015, the Brazilian Sistema Único de Saúde (SUS, the Brazilian Health System) have provided ASNase for all oncological centres in the country. Aginasa (Medac, Kyowa, Japan) was distributed until early 2017, replaced afterwards by leuginase (Beijing SL Pharmaceutical, China). Subsequently, Zenatti and colleagues<sup>6</sup> showed that leuginase presented host-cell contaminating proteins and had lower plasma bioavailability in animals than did aginasa. These two facts happened when we were establishing a monitoring programme in our institution, to measure the pharmacokinetic differences between ASNase formulations.

Our initial aim was to implement the laboratory test to measure ASNase activity to improve supportive care in patients with acute lymphoblastic leukaemia in a reference centre in Southern Brazil. Samples were collected from 19 children and adults in our university hospital, between April, 2017, and December, 2017. ASNase activity in blood samples—taken before, 24h after, and 48h after each infusion—was measured as described previously and validated in a different centre in Brazil.<sup>5</sup> We analysed 262 serum samples taken 24h and 48 h after infusions. At the same dose and schedule, 60 (81%) of 74 samples of patients who received aginasa had an activity level of 0.1 IU/mL or more, but only five (3%) of 188 samples of patients

who received leuginase showed ASNase activity of 0.1 IU/mL or more ( $\chi^2$  test,  $p < 0.001$ ). We then compared only samples collected 48 h after any intravenous infusion during induction and we observed a significant decrease in ASNase activity ( $\chi^2$  test,  $p < 0.001$ ) in samples from patients treated with leuginase, when compared with samples from patients who received aginasa. When we looked only at the first ASNase infusion, the median activity 48 h after infusion was 0.197 IU/mL in the aginasa group ( $n=7$ ) compared with 0.03 IU/mL in the leuginase group ( $n=5$ ;  $p=0.004$ ). The figure shows ASNase concentrations during induction in three patients.

Importantly, in the 12-month follow-up, six patients died, five with active disease in the group that used only leuginase ( $n=10$ ), four of them in first-line therapy. The mean time between diagnosis and death was 8 months. Our results highlight the importance of evaluating drug activity levels in patients during treatment of acute lymphoblastic leukaemia. Several reports<sup>2-4</sup> from European groups have indicated that monitoring ASNase activity is part of an adequate treatment, because different methods of administration, formulation, dose,

Lancet Oncol 2018  
Published Online  
August 2, 2018  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30584-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30584-9)



**Figure: ASNase concentrations during induction in three patients**  
(A) Patient A received only aginasa and presented high activity in all samples. (B) Patient B received five infusions of aginasa and three infusions of leuginase, with a clear difference between the activity of the two drugs. (C) Patient C received only leuginase and never achieved the ideal activity, even after the first infusion, meaning that the low ASNase activity cannot be attributed to anti-asparaginase antibodies. The dotted line represents 0.1 IU/mL, ie, the silent inactivation level.


**Comment**

and immune responses could generate a substantial variability in ASNase activity, as well as in interpatient response. Since the monitoring of the biological activity of ASNase is not performed in Brazil, our study emphasises the relevance of following the international expert recommendations. Overall, these findings presented a worrisome scenario in which, despite our public health system following the best available protocol, patients might be at high risk of an undesired outcome. Our results can help policy makers to establish adequate strategies to provide efficient treatment for patients with acute lymphoblastic leukaemia.

These data are local but universal. Since many low-income and middle-income countries do not regularly monitor the quality and efficiency of antineoplastic drugs we wonder what is the expected impact on health.

*Daiane Keller Cecconello, Isabel Cristina Ribas Werlang, Ana Paula Alegretti, Monique Cabral Hahn, Mariana Rodrigues de Magalhães, Ana Paula Battistel, Priscila Pini Zenatti, Jose Andres Yunes, Caroline Cabreira-Cagliari, Cíliana Rechenmacher, Marcelo Zubaran Goldani, Liane Esteves Daudt, \*Mariana Bohns Michalowski*

Department of Pediatrics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2350, Brazil (DKC, MCH, CC-C, CR, ZG, LED, MBM); Translational Pediatrics Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil (ICRW, MCH, CC-C, CR, ZG, MBM); Department of Pediatrics (MRdM, LED, MBM), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (APA, APB), Porto Alegre, Brazil; Centro Infantil Boldrini, Campinas, Brazil (PPZ, JAY); and Medical Genetics Department, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil (PPZ, JAY)

mmichalowski@hcpa.edu.br

We declare no competing interests.

- 1 Tai EW, Ward KC, Bonaventure A, Siegel DA, Coleman MP. Survival among children diagnosed with acute lymphoblastic leukemia in the United States, by race and age, 2001 to 2009: findings from the CONCORD-2 study. *Cancer* 2017; **123** (suppl 24): 5178-89.
- 2 Mondelaers V, Suciu S, Moerlose B, et al. Prolonged versus standard native *E. coli* asparaginase therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: Final results of the EORTC-CLG randomized phase III trial 58951. *Haematologica* 2017; **102**: 1727-38.
- 3 Muller HJ, Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998; **28**: 97-113.
- 4 Boos J, Werber G, Schulze-Westhoff P, et al. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer* 1996; **32**: 1544-50.
- 5 Lanvers C, Pinheiro JPV, Hempel G, et al. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. *Anal Biochem* 2002; **309**: 117-26.
- 6 Zenatti PP, Migita NA, Cury NM, et al. Low bioavailability and high immunogenicity of a new brand of *E. coli* L-asparaginase with active host contaminating proteins. *EBioMedicine* 2018; **30**: 158-66.



## **9 ARTIGO III**

**Em submissão para revista Analytical and Bioanalytical Chemistry**

### **IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE MEDIDA DA ATIVIDADE DA ASPARAGINASE EM UM HOSPITAL DO BRASIL**

**Autores:**

**Daiane Keller Cecconello<sup>1,2,3</sup>, Ciliana Rechenmacher<sup>1,2,3</sup>, Isabel Werlang<sup>2,3</sup>, Ana Paula Alegretti<sup>3</sup>, Liane Esteves Daudt<sup>1,2,3</sup>, Mariana Bohns Michalowski<sup>1,2,3</sup>.**

**Afiliação:**

**<sup>1</sup> Programa de pós graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil**

**<sup>2</sup> Laboratório de pediatria translacional, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil**

**<sup>3</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil**

Palavras chave= asparaginase, leucemia linfóide aguda, atividade enzimática, monitoramento, implementar.

Corresponding author: Prof<sup>a</sup> Mariana Bohns Michalowski

e-mail: mmichalowski@hcpa.edu.br

Link CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3623764715432223>

## INTRODUÇÃO

As leucemias linfoides agudas (LLA) são as neoplasias mais frequentes na infância. No decorrer dos anos observaram-se melhorias nos tratamentos através de protocolos multicêntricos. Enquanto países desenvolvidos apresentam taxas de sobrevida livre de eventos em torno de 80% e taxas de sobrevida global em 90%, no Brasil estas taxas não ultrapassam 70% (PIETERS *et al.*, 2012). Esta diferença se deve a diversos fatores entre eles cuidados de suporte como monitorização de medicamentos usados nos protocolos. Dentro deste contexto, a avaliação da atividade da Asparaginase (ASNase) é um dos aspectos não avaliados dentro de nossa realidade (AVRAMIS AND TIWARI, 2006).

A ASNase é uma enzima derivada de bactérias que possui função antileucêmica e é hoje considerada componente universal das terapias para estas patologias (SCHREY *et al.*, 2010; RIZZARI *et al.*, 2013). Foram desenvolvidas três formas diferentes: uma delas é derivada de *E.Coli*, outra é de *Erwinia chrysantema* e a uma terceira formulação criada a fim de reduzir o potencial imunogênico, que é a PEG ASNase, uma conjugação de *E. Coli* com polietilenoglicol (SCHREY *et al.*, 2010; FERNANDEZ *et al.*, 2014; PETERSEN *et al.*, 2014). Entre os efeitos adversos observados em relação à ASNase, as reações de hipersensibilidade clínica acontecem devido à produção de anticorpos anti-ASNase. Estes anticorpos podem também provocar uma inativação rápida da enzima sem sinais clínicos denominada inativação silenciosa. Este fenômeno pode gerar concentrações de ASNase sub terapêuticas acarretando em maior chance de recaída da doença. Devido a esses fatos, o monitoramento da ASNase é importante para prever reações alérgicas futuras ou alertar quanto à inativação silenciosa (LANVERS *et al.*, 2002; PIETERS *et al.*, 2012; FERNANDEZ *et al.*, 2014; VAN DER SLUIS, 2016).

O método mais sensível, reprodutível e com uso clínico estabelecido é a avaliação da atividade da ASNase. Ele relaciona o nível de depleção da asparagina, além de apresentar a melhor correlação com a eficácia clínica, sendo, portanto, o método indicado para uso regular na assistência. Nele se postula que regimes com atividade de ASNase  $\geq 0.1$  UI/mL são efetivos e estão relacionados a melhor prognóstico (PANOSYAN *et al.*, 2004; VAN DER SLUIS, 2016; BARBA *et al.*, 2017; SALZER *et al.*, 2018).

Considerando as diferenças nas taxas de cura em casos de LLA no Brasil quando comparadas com países desenvolvidos, a compreensão das razões que ocasionam tais diferenças são essenciais. Já foi postulado por vários estudos que para se obter um tratamento eficaz é necessário o monitoramento da medicação (LANVERS *et al.*, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2014; CECCONELLO *et al.*, 2019). Através deste trabalho fomos capazes de implementar a técnica de atividade da ASNase com segurança, qualidade e reprodutibilidade em nossa realidade, melhorando assim a qualidade assistencial de nossos pacientes.

## **METODOLOGIA**

### **Pacientes e amostras**

Foram coletadas 262 amostras de 19 crianças tratadas com o protocolo BFM 2009 em um hospital universitário do Sul do país, que receberam ASNase derivada de *E.coli* entre abril de 2017 e dezembro de 2017. As amostras continham no mínimo 2 mL de sangue em EDTA e foram coletadas antes 24h e 48h após cada infusão de ASNase,. Estas amostras foram centrifugadas em 3670 rpm por 10 min dentro de 2 horas armazenadas a -80 °C até a análise.

### **Análise comparativa de resultados**

17 análises foram realizadas no Hospital Boldrini, Campinas, para exercício da técnica e levantamento dos pontos críticos do protocolo. Posteriormente, 30 amostras foram enviadas para a Universidade de Munster, Alemanha, centro de referência europeu na análise da atividade da ASNase.

O método de análise dos três centros utilizada para a determinação da atividade enzimática é baseado em uma técnica descrita por Lanvers *et al.* (2002), que utiliza o ácido aspártico B-hidroxamato (AHA) como substrato para a quantificação de ASNase derivada de *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi* e PEG ASNase em plasma humano. Para a determinação da atividade utilizamos para a curva padrão concentrações de ASNase entre 0,0025 IU / mL a 0,1 IU / mL, foram diluídos 20 ul de plasma com 180 ul de uma solução de AHA 2 mM dissolvida em tampão Tris, pH 7,3 (0,015 M) suplementado com 0.015% (p/v) BSA, houve incubação por 30 min a 37°C e após isso 50 ul do líquido sobrenadante foi adicionado a uma nova placa para reagir com 200 ul do reagente Oxin, que consistiu em 1 parte de 2% de 8-hidroquinolina dissolvido em etanol absoluto (p/v) e 3 partes de solução de carbonato de sódio 1 M. Após 1 minuto a 95°C para aquecimento, houve o resfriamento a temperatura ambiente por 10 minutos. As leituras foram realizadas em 690 nm com o software SpectraMax M3 (Molecular devices), e os padrões e amostras foram analisados em duplicata e o controle foi lido em triplicata.

## RESULTADOS

262 amostras foram avaliadas em nosso centro as quais foram enquadradas de acordo com o nível de atividade acima ou abaixo de 0.1 IU/mL (CECCONELLO *et al.*, 2018). 17 primeiras análises foram comparadas com o Hospital Boldrini em Campinas. Os resultados

foram reproduzidos como consta no quadro 1 e apresentaram um CCI (Coeficiente de correlação intraclass) de 0,954.

**Quadro 1- Resultados comparativos de atividade (UI/mL) de *E.coli* ASNase entre o Hospital Boldrini (Campinas/SP) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre/RS)**

Amostra	Hospital Boldrini	HCPA
8 A1	-0,004	-0,002
17 A1	-0,004	-0,002
17 C1	0,025	0,030
17 C2	0,017	0,018
17 C3	0,018	0,022
17 C4	0,016	0,017
17 C5	0,005	0,007
17 C6	-0,004	-0,001
17 C7	-0,004	-0,002
19 A1	-0,004	-0,003
19 C1	0,004	0,006
19 C2	0,011	0,014
19 C3	0,014	0,014
19 C5	0,011	0,011
19 C6	0,012	0,013
19 C7	0,008	0,008
19 C8	-0,003	-0,001

(UI=Unidades internacionais; Coeficiente de correlação intraclass= 0,954.)

Trinta amostras de pacientes expostos à ASNase derivada de *E.coli* foram enviadas à Universidade de Munster. Os resultados constam no quadro 2, onde é apresentado um comparativo com os resultados obtidos em nossa instituição, com um CCI de 0,960, mostrando equivalência.

**Quadro 2- Resultados comparativos da atividade (UI/mL) de *E.coli* ASNase entre a Universidade de Munster (Alemanha) e HCPA (Brasil)**

Amostra	Alemanha U/mL	Brasil U/mL
8C1	0,21	0,17
7C2	0,31	0,25
7C1	0,28	0,22
7B1	0,61	0,58
8B2	0,64	0,66
8C2	0,26	0,26
7B7	0,09	0,10
7C5	0,02	0,02
7B3	0,10	0,14
6B6	0,28	0,36
6C5	0,22	0,29
6B5	0,60	0,77
8C3	0,02	0,03
9C8	0,01	0,02
9B9	0,74	0,92
10B2	0,07	0,08
10B8	0,09	0,08
12A1	0,00	0,01
12B2	0,09	0,08
12C5	0,02	0,02
14C3	0,02	0,02
14C5	0,03	0,03
14B9	0,11	0,17
15B1	0,07	0,08
16C1	0,05	0,05
16B3	0,12	0,16
17C2	0,02	0,01
17B5	0,07	0,02
18B2	0,14	0,22
20B1	0,24	0,39

(UI=Unidades internacionais; Coeficiente de correlação intraclasse= 0,960.)

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A ASNase é um componente importante no tratamento de crianças com LLA. Entretanto, complicações podem surgir devido a certos efeitos colaterais da enzima (SHRIVASTAVAA *et al.*, 2016). Níveis adequados de atividade de ASNase resultam em depleção de asparagina e são de importância crítica para os pacientes em tratamento (ASSELIN *et al.*, 1991; SHRIVASTAVAA *et al.*, 2016). A medida precisa da asparagina sérica em pacientes pode ser difícil devido à hidrólise contínua pela enzima, pois o metabolismo *ex vivo* pode ocorrer após a coleta de sangue, fornecendo uma falsa leitura (GENTILI *et al.*, 1994). Albersten *et al* em 2019 recomendam monitorar os níveis de atividade enzimática da ASNase e medir os níveis de anticorpos. No entanto, a mensuração de anticorpos pareceu não ter importância clínica para o paciente individual, pois não obtiveram associação clara entre título de anticorpos e o nível de atividade da enzima. Já a medição dos níveis de atividade da ASNase, como citada por vários estudos, pode ser usada

como um substituto para a padronização da depleção de asparagina durante a terapia (GRIGORYAN *et al.*, 2004; PANOSYAN *et al.*, 2004; DOUER *et al.*, 2007).

Para medir a extensão da conversão do substrato, vários métodos de quantificação foram desenvolvidos com base na determinação de aspartato ou amônia ( $\text{NH}_3$ ) produzida. A  $\text{NH}_3$  liberada pode ser medida por métodos que envolvem reações com reagentes colorimétricos, como Nessler ou o indofenol, seguido de uma determinação espectrofotométrica (MAGRI *et al.*, 2018). Esses métodos detectam quantidades de ASNase no plasma humano como 20 U/L (LANVERS *et al.*, 2002). O método Nessler exibe boa reprodutibilidade, mas requer cuidado, pois além de possuir alto nível de detecção, envolve o uso de reagentes altamente tóxicos. Além disso, temperatura da reação e tempo de equilíbrio afetam o desenvolvimento da cor da solução, contribuindo assim para a variabilidade dos resultados para este método (MAGRI *et al.*, 2018).

Uma vez que a depleção de asparagina ainda era observada em concentrações de ASNase de 20 U/L, são necessários métodos mais sensíveis para determinar a atividade da ASNase no plasma humano e detectar inativação silenciosa (LANVERS *et al.*, 2002). Os métodos para determinar aspartato incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ensaios de eletroforese e determinação por um ensaio colorimétrico de complexação com hidroxilamina. Lanvers et al já descreveram o desenvolvimento do método da indooxina para a quantificação de três preparações diferentes da ASNase no plasma humano, técnica a qual utilizamos neste trabalho e é utilizada por centros de referência na análise de atividade de ASNase, que se baseia na hidrólise do b-hidroxamato aspártico (AHA) que libera a hidroxilamina a qual reage com 8-hidroxiquinolina a pH alcalino. Esse método resulta em um corante intensamente verde, facilmente detectável entre 690 e 710 nm. Este método possui limite de detecção tão baixo quanto  $1 \times 10^{-5}$  U/L no plasma humano, porém possui um intervalo de pH de trabalho limitado devido à instabilidade da hidroxilamina acima da

neutralidade (LANVERS *et al.*, 2002; MAGRI *et al.*, 2018). Já os métodos baseados em HPLC superam as desvantagens dos métodos colorimétricos apresentando excelente reprodutibilidade, precisão e linearidade quando comparados, porém possuem a desvantagem de implicar em maiores despesas tornando eles inviáveis para uma rotina (MAGRI *et al.*, 2018). Portanto, se conclui que nosso método de escolha é o mais apropriado para a análise de maneira rotineira.

A padronização da quantificação da ASNase por um método simples, confiável, rápido e robusto é uma ferramenta muito vantajosa para superar as desvantagens da grande disparidade de métodos existentes para determinar a atividade enzimática na literatura. Com uma escassez de protocolos padronizados e diretrizes de controle de qualidade farmacêutica, os protocolos padrões para medir a atividade das preparações de ASNase são pouco relatados. (GRIGORYAN *et al.*, 2004; MAGRI *et al.*, 2018).

O coeficiente de correlação intraclassa (CCI) avalia a concordância e possui capacidade de aferir resultados idênticos, sendo uma das ferramentas estatísticas mais utilizadas para a mensuração da confiabilidade de medidas, e quando apresenta  $CCI \geq 0,75$  representa excelência na reprodutibilidade dos dados. Nossos resultados garantiram a concordância ao apresentarem CCI de 0,954 e 0,960 quando comparados ao Hospital Boldrini e ao centro de referência na Alemanha, respectivamente (PRIETO, 1997).

O presente estudo foi capaz de implementar o teste de atividade da ASNase em pacientes com LLA, tornando possível o monitoramento da medicação de maneira assistencial. Nossos resultados quando comparados com centros de referência internacionais apresentaram excelente concordância. É importante ressaltar que nenhum laboratório realizava até o presente momento o monitoramento da atividade biológica dessa enzima em



pacientes no Brasil, apesar de já existir um consenso com recomendações de especialistas para seu uso.

Até onde sabemos, nosso estudo foi pioneiro em nosso país na avaliação da atividade de ASNase em humanos. Como já citado, os resultados foram obtidos em dois centros oncológicos diferentes e independentes no Brasil e em um centro no exterior usando um protocolo bem estabelecido. Vários relatos de grupos europeus têm indicado a importância de monitorar a atividade da ASNase para prescrever um tratamento adequado, já que diferentes métodos de administração, formulação, dose e respostas imunes podem gerar uma variabilidade substancial nos níveis de atividade de ASNase, bem como a resposta interpessoal (PIETERS *et al.*, 2012; LANVERS *et al.*, 2002; ASSELIN *et al.*, 1991). Nosso estudo destaca a importância de seguir as recomendações de especialistas internacionais para seu manejo cuidadoso. O estabelecimento da técnica traz a possibilidade de ampliarmos a disponibilidade desta análise para crianças de outros centros.

## REFERÊNCIAS

ALBERSTEN, B.K. *et al.* Asparaginase treatment in infants with acute lymphoblastic leukemia; pharmacokinetics and asparaginase hypersensitivity in Interfant-06. **Leuk Lymphoma**. 60(6): 1-7, 2019.

ASSELIN, B. *et al.* Measurement of serum L-asparagine in the presence of Lasparaginase requires the presence of an L-asparaginase inhibitor. **Cancer Res**. 51(24): 6568–6573, 1991.

AVRAMIS, V.I. and TIWARI, P.N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Int J Nanomedicine**. 1 (3): 241–254, 2006.

BARBA, P. *et al.* Asparaginase use for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Med Clin**. 148(5): 225–231, 2017.

CECCONELLO, D.K. *et al.* Asparaginase: an old drug with new questions. **Hematol Transf Cell Therap**. 1379(19): 30142-7, 2019.

CECCONELLO, D.K. *et al.* Monitoring asparaginase activity in middle-income countries. **Lancet Oncol**. 2045 (18): 30584-30589, 2018.

FERNANDEZ, C.A. *et al.* Successful challenges using native E. coli E. coli asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated E. coli asparaginase. **Cancer Chemother Pharmac**. 73(6): 1307–1313, 2014.

GENTILI, D. *et al.* Determination of L-asparagine in biological samples in the presence of L-asparaginase. **J Chromatogr B Biomed Appl**. 657(1): 47-52, 1994.

GRIGORYAN, R.S. *et al.* Changes of amino acid serum levels in pediatric patients with higher-risk acute lymphoblastic leukemia (CCG-1961). **In Vivo**. 18(2):107–112, 2004.

HIJIYA, N. and VAN DER SLUIS, I.M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 57(4): 748–757, 2016.

LANVERS, C. *et al.* Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. **Anal Bioanal Chem**. 309(1): 117–126, 2002.

MAGRI, A. *et al.* A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Anal Bioanal Chem**. 410(27): 6985-6990, 2018.

PANOSYAN, E.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**. 26(4): 217–226, 2004.

PETERSEN, W.C. *et al.* Comparison of allergic reactions to intravenous and intramuscular pegaspargase in children with acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**. 31(4): 311–317, 2014.

PIETERS, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. **Cancer**. 117(2): 238–249, 2012.

PRIETO, L. *et al.* The evaluation of agreement on continuous variables by the intraclass correlation coefficient. **J Epidemiol Community Health**. 51(5):579-81, 1997.

RIZZARI, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Oncol**. 25(1):S1-S9, 2013.

SALZER, W. *et al.* Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**. 59 (8): 1797–1806, 2018.

SCHREY, D. *et al.* Therapeutic Drug Monitoring of Asparaginase in the ALL-BFM 2000 Protocol Between 2000 and 2007. **Pediatr Blood Cancer.** 54(7): 952-58, 2010.

SHRIVASTAVAA, A.*et al.* Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent Conflict of interest: authors declare no conflict of interest. **Crit Rev Oncol Hematol.** 100: 1–1, 2016.

VAN DER SLUIS, I.M. *et al.* Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. **Haematologica.** 101(3): 279–285, 2016.

WOO, M.H. *et al.* Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol.** 18(7): 1525–1532, 2000.

**10 ARTIGO IV****Será submetido para a revista Leukemia****AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEG ASPARAGINASE: CUIDADO  
PERSONALIZADO EM ONCOLOGIA PEDIÁTRICA****Autores:****Daiane Keller Cecconello<sup>1,2,3</sup>, Ciliana Rechenmacher<sup>1,2,3</sup>, Ana Paula Alegretti<sup>3</sup>, Liane Esteves Daudt<sup>1,2,3</sup>, Mariana Bohns Michalowski<sup>1,2,3</sup>.****Afiliação:****<sup>1</sup> Programa de pós graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil****<sup>2</sup> Laboratório de pediatria translacional, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil****<sup>3</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil****Palavras chave= PEG asparaginase, leucemia, atividade enzimática, monitoramento.****Corresponding author: Prof<sup>a</sup> Mariana Bohns Michalowski****e-mail: mmichalowski@hcpa.edu.br****Link CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3623764715432223>**

## INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia maligna infantil mais comum e representa aproximadamente 25% dos diagnósticos de câncer entre crianças com menos de 15 anos (EGLER, *et al.*, 2016; SCHORE, *et al.*, 2019). Com os atuais regimes quimioterápicos com múltiplos agentes, os resultados a longo prazo para crianças com LLA melhoraram bastante, apresentando taxas de sobrevida livre de eventos em torno de 80% e taxas de sobrevida global próximas ou superiores a 90%, quando comparadas a década de 1960 que apresentavam taxas menores que 30% (PIETERS, *et al.*, 2012; BURKE, 2014).

Um dos medicamentos utilizados como elemento central no tratamento da LLA em crianças e adultos é a Asparaginase (ASNase) (SALZER, *et al.*, 2018; SCHORE, *et al.*, 2019). É uma enzima derivada de bactérias que catalisa a hidrólise da asparagina (Asn), um aminoácido não essencial, em ácido aspártico e amônia, que são necessárias para os linfoblastos, que são deficientes em asparagina sintetase, enzima que produz asparagina (SALZER, *et al.*, 2018; SCHORE, *et al.*, 2019). Uma oferta exógena reduzida, juntamente com uma deficiência relativa da síntese endógena de asparagina, causam a depleção celular prolongada, produzindo síntese reduzida proteínas e, levando à apoptose dos blastos leucêmicos (BURKE, 2014; SALZER, *et al.*, 2018; PUI, *et al.*, 2018).

Uma de suas formas é a PEG ASNase, que por ser uma enzima derivada de *E. coli* conjugada com polietilenoglicol, tem sua imunogenicidade reduzida e aumento da duração de sua ação, com um tempo de meia-vida de cerca de 7 dias após a administração (SALZER, *et al.*, 2018; PUI, *et al.*, 2018). Pode ser administrada por via intravenosa (IV) e intramuscular (IM), porém têm como via de administração preferencial a IM, pois alguns estudos mostraram que ela pode apresentar maior potencial imunogênico quando utilizada por via IV (ZALEWSKA-SZEWCZYK, *et al.*, 2009; PUI, *et al.*, 2018).

Pacientes tratados com ASNase podem desenvolver reações imunes como hipersensibilidade clínica e hipersensibilidade subclínica, comumente denominada "inativação silenciosa". A hipersensibilidade clínica é caracterizada como uma reação alérgica caracterizada por uma variedade de sintomas, desde reações leves no local da injeção IM até reações sistêmicas graves com características como urticária, broncoespasmo e anafilaxia (BURKE, 2014; VAN DER SLUIS, *et al.*, 2016). Em pacientes que utilizam PEG ASNase as taxas ficam em torno de 3 a 24%. Geralmente as reações são mais comuns quando os pacientes foram expostos previamente a ASNase *E.coli*, e em regimes de pós-indução quando a ASNase não é administrada há semanas ou meses (PIETERS, *et al.*, 2012; BURKE, 2014; HIJIYA, *et al.*, 2016). Já hipersensibilidade subclínica pode ter a ocorrência de anticorpos anti-ASNase causando rápida inativação da enzima, resultando em depleção subótima de asparagina. Essa neutralização da enzima acarreta em risco de taxas menores de sobrevivência e maior chance de recaída da doença, podendo ocorrer em aproximadamente 30% dos pacientes (PIETERS, *et al.*, 2012; BURKE, 2014).

O monitoramento terapêutico de medicamentos é importante devido a ampla variabilidade inter-paciente em relação aos níveis mínimos de atividade de ASNase no plasma, o desenvolvimento de hipersensibilidade subclínica e as diferenças nas propriedades farmacocinéticas entre as diferentes preparações (EGLER, *et al.*, 2016). Trata-se de uma ferramenta eficaz para identificar rapidamente pacientes com hipersensibilidade subclínica e posterior manejo de tratamento (BURKE, 2014). Hoje é postulado por órgãos internacionais como o US Food and Drug Administration (FDA) que níveis mínimos de atividade de ASNase de 0,1 UI / mL são importantes para garantir a depleção completa de asparagina no plasma (SALZER, *et al.*, 2018; SCHORE, *et al.*, 2019). Recomendações de consenso publicadas recentemente fornecem diretrizes para o monitoramento da atividade de ASNase. Essas recomendações afirmam que a atividade deve ser avaliada em todos os pacientes que

recebem a medicação e definem a inativação silenciosa como atividade de PEG ASNase  $<0,1$  UI / mL no dia 7 e / ou abaixo do limite inferior de quantificação no dia 14 (SALZER, *et al.*, 2018; CECCONELLO, *et al.*, 2019).

Desde 2018 nosso grupo vem monitorando a atividade da PEG ASNase em crianças em tratamento de uma leucemia linfóide aguda em nosso hospital (CECCONELLO, *et al.*, 2018). Este estudo é a primeira descrição dos resultados obtidos com a implementação da avaliação sistemática da atividade deste fármaco na população brasileira. Ele torna claro que esta metodologia é aplicável em nossa realidade e traz a base para estudos multicêntricos prospectivos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Participaram do estudo 26 pacientes com LLA em tratamento em um hospital da região Sul do Brasil, os quais possuíam idade média de 11 anos, sendo que 2 destes pacientes, utilizaram Leuginase inicialmente. Destes pacientes, 84 amostras foram analisadas 7 e 14 dias após cada infusão do medicamento. O protocolo utilizado pelos pacientes foi o BFM 2009. Todos os procedimentos e protocolos foram aprovados pelo comitê de ética local e nacional.

Para análise de atividade da asparaginase utilizamos uma técnica descrita por Lanvers *et al* 2002 (LANVERS, *et al.*, 2002) que utiliza o ácido aspártico B-hidroxamato (AHA) como substrato para a quantificação de PEG em plasma humano. Portanto, uma amostra com no mínimo 2 ml de sangue foi coletada 7 e 14 dias após cada infusão com PEG ASNase. O plasma foi separado e congelado em  $-80^{\circ}$  C até o teste. Para fins de calibração, a enzima foi diluída com plasma fresco para concentrações finais variando de 0,1 a 1 U/mL.

### **Atividade da Asparaginase**



A atividade da PEG ASNase foi medida como descrito anteriormente (LANVERS, *et al.*, 2002). Resumidamente, para a determinação da atividade da PEG ASNase, 20  $\mu$ L de plasma foram misturados com 180  $\mu$ L de ácido aspártico B-hidroxiato 10 mM (AHA) dissolvida em tampão Tris / BSA. Após a incubação a 37 ° C por 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 60  $\mu$ L de ácido tricloroacético (24,5%, p / v), e as amostras foram centrifugadas por 5 min a 2500 rpm. Vinte microlitros do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa, onde os poços estavam preenchidos com 40  $\mu$ L de água estéril, e então foram adicionados 200  $\mu$ L de um reagente de solução-oxin de 8-hidroxiquinolina (1 vol. de 8-hidroxiquinolina a 2% em etanol e 3 vol. de solução de carbonato de sódio 1 M). Após aquecimento a 95 ° C por 1 min e resfriamento da placa por exatamente 10 min, a absorbância foi medida a 690 nm em um equipamento SpectraMax M3.

## RESULTADOS

Analizamos a atividade de 26 pacientes nos dia 7 e 14 após receberem infusões. Foram avaliadas 84 amostras, onde apenas 1 (1,19%) apresentou atividade <0.1 U/mL, já o restante, as outras 83 amostras (98,8%) alcançaram um nível de atividade  $\geq$ 0.1 U/mL, como consta na tabela 1. A média de todas as infusões foi de 0,622 U/mL.

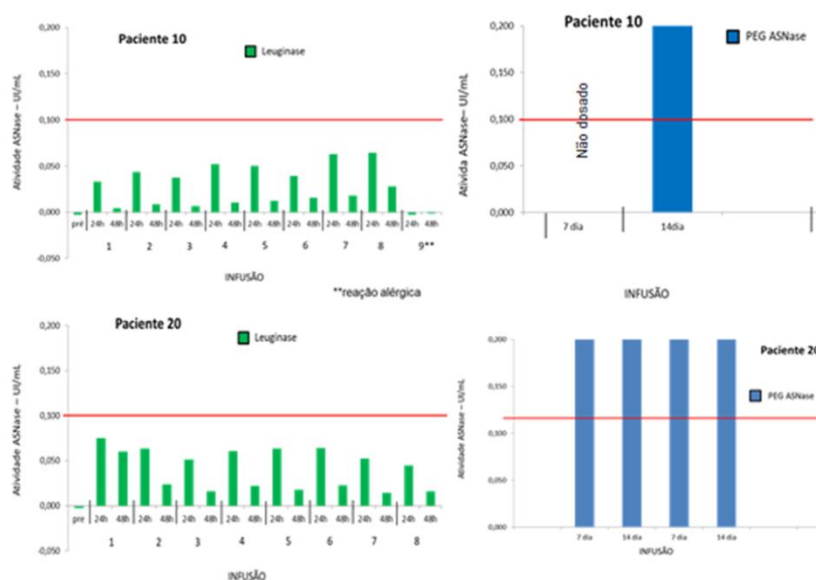
**Tabela 1-** Distribuição enzimática avaliadas nos dias 7 e 14 após a infusão (n=26)

Atividade ASNase	7 dia % de amostras/infusão (n)	14 dia % de amostras/infusão (n)
$\leq$ 0.1 IU/ml	1,96% (1)	-
> 0.1 IU/ml	98,04% (50)	100% (33)
Total	100% (51)	100% (33)

Valores distribuídos conforme a % de amostras e o número de infusões em 7 e 14 dias.

A figura 1 apresenta dois pacientes que haviam utilizado anteriormente Leuginase, derivada de *E.coli* ASNase no tratamento e que não tinham alcançado atividade em nenhuma infusão do tratamento, após a substituição para PEG ASNase as infusões alcançaram níveis de atividade  $>0.1$  U/mL.

**Figura 1- Comparação de níveis de atividade ASNase em dois pacientes, que inicialmente receberam Leuginase e passaram a utilizar PEG ASNase**



Comparação de níveis de atividade ASNase em dois pacientes, que inicialmente receberam Leuginase (em verde) e não atingiram atividade de  $0.1$  U/mL em nenhuma infusão. Em azul as dosagens de PEG ASNase, demonstrando que atingiram atividade igual ou superior a  $0.1$  U/mL em todas as infusões. No paciente 10 não foi feita a análise no dia 7, pois o paciente não estava presente no hospital para a coleta.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nosso estudo buscou descrever as taxas de inativação de ASNase em pacientes em nossa realidade mesmo quando previamente expostos a outras formulações. Das 84 amostras avaliadas de PEG ASNase apenas 1 apresentou atividade inferior a  $0.1$  U/mL no D7, porém

na outra infusão atingiu o nível  $>0.1$  UI/mL. Dois pacientes que utilizaram Leuginase anteriormente e não haviam atingido nível mínimo de atividade, passaram a apresentar atividade  $>0.1$  UI/mL após a troca para PEG ASNase, sendo que um deles havia manifestado reação alérgica clínica na última infusão de Leuginase.

Nossos resultados são compatíveis com o que é previamente descrito na literatura. Um total de 97 pacientes diagnosticados com LLA e que participavam do protocolo NOPHO LLA2008 foram avaliados. Neste protocolo, os pacientes foram randomizados para 8 ou 15 doses de PEG ASNase em intervalos de 2 ou 6 semanas com um total de 30 semanas de tratamento. A atividade de PEG ASNase acima de  $0.1$  UI / ml foi atingida em 612 de 652 (94%) amostras obtidas  $14 \pm 2$  dias após a administração. A atividade média de PEG ASNase foi de  $0,338$  UI /mL. Seis pacientes apresentaram atividade abaixo de  $0,05$  UI /mL em todas as amostras. Um total de 25 pacientes (26%) desenvolveu anticorpos anti-PEG ASNase, mas não houve correlação entre anticorpos e baixos níveis de atividade de ASNase. Portanto, pode-se observar que a PEG ASNase atingiu atividade farmacológica na grande maioria dos pacientes (SCHORE, *et al.*, 2019; SALZER, *et al.*, 2018).

Um estudo observacional prospectivo feito por Vyas et al, comparou pacientes que receberam PEG ASNase genérica ou *E.coli* ASNase de maneira não randomizada. A justificativa foi o fato de que em países em desenvolvimento há uma maior dificuldade para acessibilidade de PEG ASNase. Todos os pacientes atingiram níveis terapêuticos durante a fase de indução. A incidência de toxicidade atribuível à ASNase foi semelhante nos dois tratamentos. Hipersensibilidade clínica e inativação silenciosa não foram observadas durante a indução, porém na re-indução ocorreram em 13% dos pacientes que receberam ASNase *E.coli* derivada e 5% daqueles que receberam PEG ASNase (VYAS, *et al.*, 2018).

O uso de corticoesteróides de forma concomitante ao tratamento com PEG ASNase e sua influência nas taxas de reações alérgicas e inativação silenciosa ainda não está bem

definido. Em um estudo retrospectivo de pacientes que receberam PEG ASNase antes e após a pré-medicação universal observou-se que a pré-medicação reduziu a necessidade de substituição para *Erwinase*, assim como as taxas de reações clínicas. Além disto, neste estudo foram descritas baixas taxas de inativação silenciosa, causando uma economia financeira substancial (COOPER, *et al.*, 2019).

Já mencionamos as possíveis administrações de PEG ASNase, um estudo feito nos Estados Unidos conclui que pacientes tiveram uma maior incidência e início mais rápido de reações alérgicas em pacientes que receberam PEG ASNase IV em comparação com IM (PETERSEN, *et al.*, 2014). Outro artigo que sustentou esta tese foi o de Hasan et al, que concluiu que as taxas de hipersensibilidade foram maiores para IV quando comparadas a IM, respectivamente (HASAN *et al.*, 2017).

Nosso estudo é o primeiro a avaliar a atividade da PEG ASNase na população brasileira. Trata-se de um dado importante visto que podem existir eventuais diferenças de comportamento farmacogenético em relação às populações descritas primariamente no mundo. Além disto, o estabelecimento da técnica traz a possibilidade de ampliarmos a disponibilidade desta análise para crianças de outros centros, qualificando assim a assistência de saúde em nosso país. Estes dados ainda estão em fase de análise em nosso grupo a fim de verificarmos outras associações e gerarmos um maior conhecimento.

## REFERÊNCIAS

BURKE, M.J. How to manage asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. **Future Oncol.** 10(16):2615-17, 2014.

CECCONELLO, D.K. *et al.* Asparaginase: an old drug with new questions. **Hematol Transf Cell Therap.** 1379(19): 30142-7, 2019.

CECCONELLO, D.K. *et al.* Monitoring asparaginase activity in middle-income countries. **Lancet Oncol.** 2015 (18): 30584-30589, 2018.

COOPER, S.L. *et al.* Universal premedication and therapeutic drug monitoring for asparaginase-based therapy prevents infusion-associated acute adverse events and drug substitutions. **Pediatr Blood Cancer.** 66(8) :e27797, 2019.

EGLER, R.A. *et al.* L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **J Pharmacol Pharmacother.** 7(2):62-71, 2016.

HASAN, H. *et al.* Comparison of hypersensitivity rates to intravenous and intramuscular PEG-asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis and systematic review. **Pediatr Blood Cancer.** 64(1): 81-88, 2017.

HENRIKSEN, T.L. *et al.* Prolonged first-line PEG-asparaginase treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL2008 protocol-Pharmacokinetics and antibody formation. **Pediatr Blood Cancer.** 64(12), 2017.

HIJIYA, N. and VAN DER SLUIS, I.M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma.** 57(4): 748–757, 2016.

LANVERS, C. *et al.* Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. **Anal Biochem.** 309(1):117–12, 2002.

PETERSEN, W.C. *et al.* Comparison of allergic reactions to intravenous and intramuscular pegaspargase in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Hematol Oncol.** 31(4): 311–317, 2014.

PIETERS, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer.** 117(2): 238–249, 2012.

PUI, C-H. *et al.* How to solve the problem of hypersensitivity to asparaginase? **Pediatr Blood Cancer.** 65(3): 2018.

SALZER, W. *et al.* Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma.** 59 (8): 1797–1806, 2018.

SCHORE, R.J.*et al.* Plasma asparaginase activity and asparagine depletion in acute lymphoblastic leukemia patients treated with pegaspargase on Children’s Oncology Group AALL07P4. **Leuk Lymphoma.** 60(7): 1-9, 2019.

VAN DER SLUIS, I.M. *et al.* Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. **Haematologica.** 101(3): 279–285, 2016.

VYAS, C. *et al.* Experience with generic pegylated L-asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia and monitoring of serum asparaginase activity. **Pediatr Hematol Oncol.** 35(5): 331-340, 2018.

ZALEWSKA-SZEWCZYK, B. *et al.* The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different L-asparaginase preparations. **Clin Exp Med.** 9(2) :113–116, 2009.

ZENATTI, P.P.*et al.* Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of *E. coli*-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine.** 30: 158-166, 2018.

## 11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos até o presente momento são altamente promissores, pois com os nossos dados laboratoriais sugerimos a diferença de atividade entre preparações distintas de ASNase. Tivemos a oportunidade de auxiliar na escolha correta de medicações, adequando os tratamentos de alguns pacientes. Após os resultados obtidos em nosso laboratório, iniciamos um estudo de monitoramento de coorte multicêntrico retrospectivo e prospectivo que compara a evolução de crianças que fizeram uso das duas formulações (Leuginase e Aginasa) de ASNase durante a indução.

Nosso grupo pretende entender, dentro de mais longo prazo e com número maior de pacientes, as variações farmacogenéticas que podem influenciar o padrão de hipersensibilidade e/ou efeitos adversos ligados à ASNase.

Os resultados deste trabalho também foram apresentados de forma parcial à comunidade científica em eventos nacional e internacional. Este trabalho trouxe benefício à sociedade e ao SUS, permitindo a definição da tecnologia mais adequada à nossa realidade. Além disso, permitiu acesso à efetividade das medicações, pois esta análise não era realizada de forma rotineira em nenhum hospital nacional, mesmo já sendo consenso internacional, portanto agora já há possibilidade de implantação.

Foi possível verificar o benefício clínico ao se caracterizar a atividade da ASNase. Nossos achados apresentaram um cenário preocupante em que, apesar de fornecer o melhor protocolo disponível no sistema público de saúde, os pacientes podem apresentar alto risco para um desfecho indesejado. Esses resultados podem ajudar a estabelecer estratégias adequadas a fim de proporcionar acesso a tratamento eficiente para todos os pacientes e administrar o tratamento adequado para aqueles pacientes já tratados com o fármaco em questão que não atingiram o limite mínimo de atividade.