



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

RAQUEL CAMINHA DANTAS

**EXPRESSÃO *IN VITRO* DA ENZIMA L-ASPARAGINASE II DE *Escherichia coli* EM
CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

FORTALEZA

2019

RAQUEL CAMINHA DANTAS

EXPRESSÃO *IN VITRO* DA ENZIMA L-ASPARAGINASE II DE *ESCHERICHIA COLI*
EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador pedagógico: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

Orientador técnico-científico: Prof. Dr. Kaio César Simiano Tavares.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D215e Dantas, Raquel Caminha.
Expressão in vitro da enzima l-asparaginase II de Escherichia coli em células de mamíferos / Raquel Caminha Dantas. – 2019.
42 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Kaio César Simiano Tavares.

1. L-asparaginase. 2. Glicosilação. 3. Biofármaco. I. Título.

CDD 661

RAQUEL CAMINHA DANTAS

EXPRESSÃO *IN VITRO* DA ENZIMA L-ASPARAGINASE II DE *ESCHERICHIA COLI*
EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Molecular.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Kaio César Simiano Tavares
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dr. André Saraiva Leão Marcelo Antunes
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.

Aos meus pais, Mary e Ednaldo.

AGRADECIMENTOS

Aos professores participantes da banca examinadora André Coelho , Kaio Tavares e André Antunes pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões e por todo ensinamento durante os anos de graduação e estágio. Aos amigos do LBMD, todos que fizeram parte dessa grande família junto comigo, em especial à Louhanna, André Marrocos, Matheus e Joyce pela grande colaboração nos experimentos e trocas de experiência, à Emanuely que tanto me ajudou e me ensinou nessa jornada, além das risadas, aos professores Saul e Leonardo por tantos outros ensinamentos no laboratório e no sítio.

Aos professores do curso de Biotecnologia pelo ensinamento teórico prático, mas principalmente pelo compartilhamento de vivências e experiências que vão além dos livros. Agradeço também aos projetos de extensão, em especial à LiNAbiotec, da qual fiz parte e me orgulho em dizer que nossa luta pela regulamentação tem um bocado de mim, e de tantos estudantes, investido no nosso projeto de lei, mesmo sem o conhecimento jurídico necessário conseguimos fazê-lo ir adiante, por uma Biotecnologia unida, forte e atuante. Agradeço ainda à coordenação do curso e principalmente o secretário Gilmar, que tanto tira dúvidas e auxilia a todos nós em todos os momentos.

Aos colegas de todas as turmas, especialmente ao Pietro, um irmão de outra mãe, que tanto me tira a paciência, mas que também tanto me ensina com seus constantes questionamentos, à Sara, uma irmãzinha mais nova, que apesar da pouca idade me ajuda muito a resgatar um pouco da juventude que perdi, mas que também tem experiências de vida que muito me acrescentam e à Melissa, meu borrãozinho favorito.

Finalmente, um agradecimento especial a toda minha família, seja a de laços sanguíneos ou a que escolhemos ao longo da vida, que sempre se faz presente, principalmente nos momentos de maiores dificuldades, vocês são incríveis pra mim. Minha mãe, que tanto me aguenta abusada no estresse, mas nunca sai do meu lado, e meu pai, que mesmo fisicamente distante está sempre presente me incentivando de todas as formas.

“Não há saber mais ou saber menos: há
saberes diferentes.”

Paulo Freire

RESUMO

A L-asparaginase II é uma amidohidrolase que catalisa a hidrólise da asparagina em aspartato e amônia e por isso é aplicada ao tratamento de Leucemia Linfóide Aguda (LLA). Uma vez que as células tumorais são deficientes na produção da enzima asparagina sintetase, não produzem asparagina suficiente, utilizando assim a que está presente no meio. No entanto, atualmente, essa enzima é purificada ou produzida de forma recombinante pela bactéria *Escherichia coli*, o que pode estar potencialmente ligado ao número elevado de respostas imunes nos pacientes que se submetem ao tratamento e por vezes levam à sua descontinuação. Essas respostas imunes podem estar associadas a origem bacteriana da proteína, que possui epítomos que podem desencadear reações de hipersensibilidade nos pacientes. As células de mamíferos, ao contrário das bacterianas, possuem a capacidade de realizar modificações pós-traducionais como glicosilações, as quais podem estar associadas a uma conformação proteica mais adequada e também potencialmente mascarar epítomos alergênicos. O presente trabalho teve por objetivo a expressão de L-asparaginase utilizando células humanas, visando determinar a sua viabilidade, ocorrência de modificações pós-traducionais e a comparação entre a enzima produzida em bactérias e a produzida em células humanas. Por meio da tecnologia do DNA recombinante, foi realizada com sucesso a expressão *in vitro* de L-Asparaginase em uma linhagem de células embrionárias de rim humano (HEK-293), onde foi possível observar duas diferentes glicoformas. A enzima expressa em células humanas teve atividade máxima no pH 8 e temperatura 60 °C, enquanto que a L-Asparaginase expressa em *E. coli* apresentou pH 8,5 e temperatura 60 °C ótimos. Adicionalmente, a construção de DNA gerada nesse trabalho tem aplicabilidade para outros sistemas de expressão, possibilitando a futura comparação das estruturas proteicas geradas por diferentes plataformas de produção de biofármacos.

Palavras-chave: L-asparaginase. Glicosilação. Biofármaco.

ABSTRACT

L-Asparaginase II is an amidohydrolase used in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia's treatment (ALL) which catalyzes the hydrolysis of asparagine in aspartate and ammonia. Since tumor cells lack the enzyme asparagine synthetase, they are not able to synthesize asparagine, thus depending on the amino acid from extracellular sources. However, the therapeutic L-Asparaginase is currently purified or produced in *Escherichia coli*, what could be potentially linked to the high number of immune responses in patients who undergo treatment and sometimes lead to its discontinuation. These immune responses may be associated with the bacterial origin of the protein, which has epitopes that can trigger hypersensitivity reactions in patients. Mammalian cells, unlike bacterial ones, have the ability to perform post-translational modifications as glycosylations, which may be associated with a more adequate protein conformation and also potentially masking of allergenic epitopes. The aim of this work was to express L-asparaginase in human cells, determine its viability, the occurrence of post-translational modifications and the comparison between the enzyme produced in bacteria and that produced in human cells. Through recombinant DNA technology, the *in vitro* expression of L-Asparaginase in a human embryonic kidney cell line (HEK-293) was successfully performed, with the production of two different glycoforms. The enzyme expressed in human cells had maximum activity at pH 8 and temperature 60° C, while L-Asparaginase expressed in *E. coli* had pH 8.5 and optimal temperature 60°C. The DNA construct generated in this work has applicability to other expression systems, making possible the future comparison of the recombinant protein generated by different biopharmaceutical production platforms.

Keywords: L-Asparaginase. Glycosylation. Biopharmaceuticals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Reação de conversão de L-asparagina em ácido aspártico e amônia	14
Figura 2	– Nutrição tumoral a partir do substrato L-ASP e morte tumoral após injeção de ASNase	15
Figura 3	– Sistemas de expressão usados industrialmente para a produção de proteínas glicosiladas	19
Figura 4	– Notícia veiculada sobre o desabastecimento e as polêmicas sobre novas aquisições para L-ASNase	21
Figura 5	– Mapa do vetor pADTrack-CMV com adição do gene para ASNase	26
Figura 6	– Gel de agarose mostrando a presença do gene ASNase na colônia transformada	32
Figura 7	– Projeção do software SnapGene e gel de agarose para identificação de orientação da inserção do gene	33
Figura 8	– Expressão <i>in vitro</i> de ASNase em HEK-293 para grupo teste e controles	33
Figura 9	– Transfecção de células HEK-293 para produção da linhagem	34
Figura 10	– Análise da expressão proteica por Western blotting	35
Figura 11	– Gel de poliacrilamida para análise de glicosilações	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de atividade enzimática para diferentes pH	37
Gráfico 2 – Curva de atividade enzimática para diferentes temperaturas	37
Gráfico 3 – Curva de atividade enzimática para ASNase em HEK em diferentes temperaturas	38
Gráfico 4 – Curva de atividade enzimática para ASNase em <i>E. coli</i> em diferentes pH ...	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de diferentes sistemas de produção de proteínas recombinantes	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Associação Médica Brasileira
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASNase	Asparaginase
ASNS	Asparagina sintetase
CFM	Conselho Federal de Medicina
DNA	Ácido Dessoxirribonucleico
EMA	European Medicines Agency
EPO	Eritropoetina
FDA	Food and Drug Administration
g	Força gravitacional
GFP	Green Fluorescence Protein
GLN	L-glutamina
IFN- β	Interferon beta
kDa	Quilo Daltons
L-ASP	L-aspartato
LBMD	Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
MPF	Ministério Público Federal
MS	Ministério da Saúde
NEB	New England Biolab
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenoglicol

LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Dólar
%	Porcentagem
™	Trade Mark
©	Copyright
®	Marca Registrada
μ	micro

SUMÁRIO

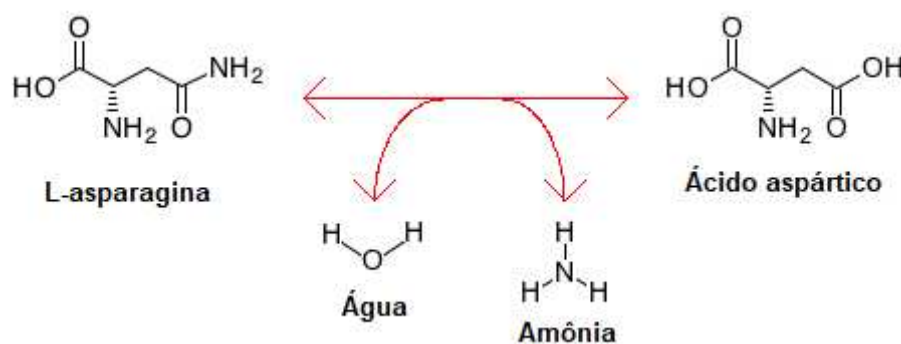
1	INTRODUÇÃO	14
1.1	L-asparaginase	14
1.2	Leucemia Linfoide Aguda	15
1.3	Glicosilação	17
1.4	Plataforma de células de mamífero	18
1.5	Crise de desabastecimento	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Síntese do vetor de clonagem	24
3.2	Clonagem no vetor de expressão	24
3.3	Preparo de vetor para integração do genoma à célula	25
3.4	Cultivo de células embrionárias de rim humano	26
3.5	Transfecção de HEK-293	27
3.6	Western-Blot	28
3.7	Remoção de Glicosilações	29
3.8	Atividade enzimática a diferentes pH e temperatura	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Síntese do vetor de clonagem e montagem do vetor de expressão	32
4.2	Trasnsfecção de HEK-293	33
4.3	Análise da expressão por Western blotting	34
4.4	Análise da presença de Glicosilações	35
4.5	Atividade enzimática para diferentes pH e temperatura	36
5	CONCLUSÃO	39
6	PERSPECTIVAS	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 L-asparaginase

Identificada inicialmente em 1953 como agente antileucêmico, a partir do soro de porquinhos-da-índia aplicados em camundongos e ratos com linfomas, a L-asparaginase (ASNase), ou L-asparagina amidohidrolase (EC 3.5.1.1), é uma hidrolase que participa do metabolismo químico de conversão do aminoácido L-asparagina (L-ASP) em ácido aspártico, ou aspartato, e amônia, como ilustrado na figura 1 (SALZER *et al.*, 2014; SZYMANSKA *et al.*, 2012). Embora há mais de quarenta anos sendo utilizada clinicamente, o mecanismo de ação da ASNase ainda não foi completamente elucidado (KAMINSKY, 2017).

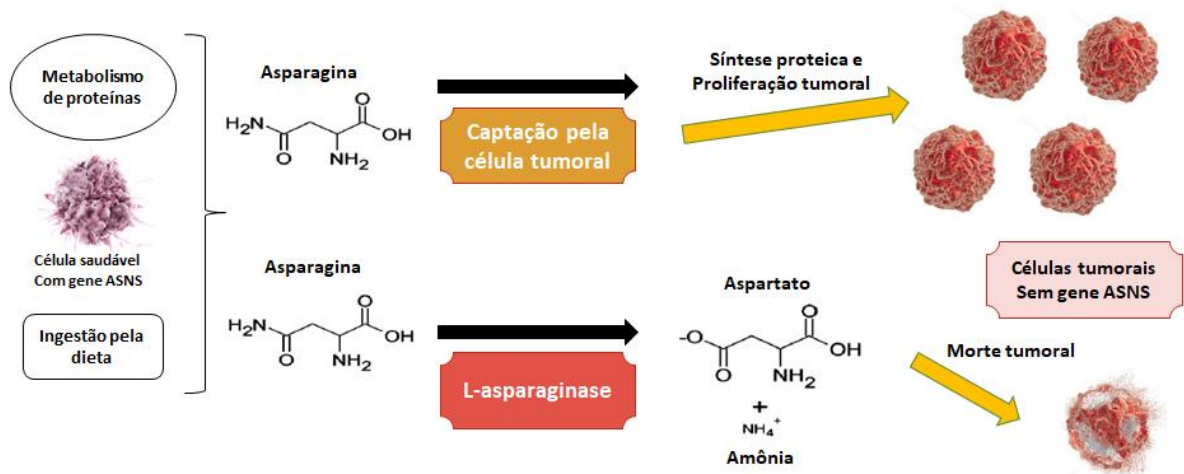
Figura 1 – Reação de conversão de L-asparagina em ácido aspártico e amônia



Fonte: Adaptado de https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn:R00485.

Células saudáveis podem sintetizar o aminoácido através da enzima L-ASP sintetase (ASNS), todavia células tumorais não possuem ou possuem baixos níveis de ASNS, dependendo, portanto, de L-ASP exógena para a constituição proteica e proliferação celular. Dessa forma, o substrato L-ASP, adquirido por meio da nutrição para o crescimento de células tumorais, pode ser reduzido pela injeção de ASNase, retardando assim o crescimento tumoral, conforme esquema mostrado na figura 2 (TANFOUS *et al.*, 2014).

Figura 2 – Nutrição tumoral a partir do substrato L-ASP e morte tumoral após injeção de ASNase.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em menor grau, a ASNase possui ainda uma atividade de hidrólise sobre a L-glutamina (GLN), metabolizando-a a ácido L-glutâmico. Estudos mostram que a ASNase derivada de *E. coli* apresenta esta afinidade em menor grau quando comparada à enzima produzida por *E. chrysanthemii* (KAMINSKY, 2017).

Há duas isoformas enzimáticas produzidas por *Escherichia coli*, a L-asparaginase tipo I, que apresenta conformação funcional homodimérica e expressão constitutiva no citoplasma, e a L-asparaginase tipo II, de conformação funcional homotetramérica e expressão no periplasma em situação de estresse nutricional. Essa diferença conformacional permite que a L-asparaginase tipo II tenha uma maior afinidade ao substrato, o que a torna um alvo importante para o tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (BOREK; JASKÓLSKI, 2001; YUN *et al.*, 2007). A ASNase está presente em outras bactérias, como *Serratia marcescens* e *Erwinia chrysanthemii*, também em outros organismos eucarióticos, como *Saccharomyces cerevisiae*, além de ser expressa por algumas plantas e animais (ZALEWSKA *et al.*, 2009; DIVINO, 2015).

1.2 Leucemia Linfóide Aguda

Leucemias são doenças causadas pela proliferação desordenada de um tipo de células sanguíneas, os leucócitos, ocasionada por algum tipo de mutação. De acordo com a origem e o tipo de leucócitos afetados, as leucemias podem ser classificadas geralmente em dois grandes grupos, linfóides ou mielogênicas, e as mutações acumuladas por essas células interferem na sua função de proteção contra infecções. Também definidas como agudas ou crônicas, sendo a

doença aguda caracterizada pela rápida proliferação de células não completamente diferenciadas que carregam a mutação (HALL; GUYTON, 2011).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), fatores ambientais como a exposição a radiações ionizantes e ao benzeno são comprovadamente fatores de risco relacionados ao desenvolvimento desse tipo de câncer. Outros fatores como tabagismo, exposição ao formaldeído, exposição à agrotóxicos, histórico familiar e idade podem também ser correlacionados à doença, havendo uma alta taxa de mortalidade. Em números do ano de 2015, as leucemias levaram a óbito 6837 pessoas, 3692 homens e 3145 mulheres (INCA, 2019).

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) faz parte de um grupo heterogêneo de neoplasias linfóides que pode ter três classificações distintas, a depender do tipo de células que são afetadas: precursores de células B, células B maduras ou células T (SALZER *et al.*, 2014). É também o tipo de câncer mais comum em crianças, cerca de 25% dos diagnósticos abaixo de quinze anos, apresentando 85% dos casos afetando linhagens de células B e 15% em linhagens de células T (EMA, 2016; ZHANG *et al.*, 2012).

O tratamento para a LLA abrange três fases: indução, consolidação/intensificação e manutenção/continuação, por um período de cerca de dois a três anos e meio, com a utilização da ASNase principalmente na fase de indução, juntamente com outros medicamentos (SALZER *et al.*, 2014).

Produzida principalmente através da tecnologia do DNA recombinante em células procariontes, atualmente, 3 preparações de L-asparaginase são utilizadas como medicamento para pacientes com LLA, a L-asparaginase nativa de *Escherichia coli* ou Elspar[®], uma versão menos imunogênica dessa mesma enzima, com a inclusão de polietileno-glicol (PEG-asparaginase) ou Oncaspar[®], e a L-asparaginase produzida em *Erwinia chrysanthemi* ou Erwinase[®], usadas tanto no tratamento inicial como em casos de reincidência da doença. No entanto a repetição da administração do medicamento leva a respostas imunológicas de maior intensidade (PIETERS *et al.*, 2011; RAMYA *et al.*, 2012; ZALEWSKA *et al.*, 2009; DIVINO, 2015).

Apesar da ampla utilização terapêutica da L-asparaginase recombinante produzida na plataforma procarionte, cerca de 20% a 40% dos pacientes tratados com a enzima de origem bacteriana desenvolvem efeitos colaterais, como reações alérgicas, pancreatites e eventos relacionados à formação de trombos, o que leva, em muitos casos, à descontinuação do tratamento (SALZER *et al.*, 2014; TANFOUS *et al.*, 2014). Em adição, as reações de hipersensibilidade são frequentemente associadas à destruição, através de anticorpos, da L-

asparaginase recombinante e consequente perda de seu efeito terapêutico (PIETERS *et al.*, 2011).

Os dados percentuais sobre as reações imunes apresentam variações entre os autores, mas cerca de 10% a 30% dos pacientes apresentam reações quando utilizada a enzima de origem nativa de *E. coli*. Quando é usada a PEG-asparaginase, esses valores variam de 3% a 24% em casos clínicos, com hipersensibilidade aumentada para aqueles que fizeram uso da forma nativa anteriormente. Já para a enzima obtida de *E. chrysanthemi* são reportados casos em cerca de 3% a 37% dos pacientes (HIJIYA; VAN DER SLUIS, 2015).

Essas reações imunes à L-asparaginase de origem bacteriana ou de origem recombinante produzidas em sistemas procariontes podem ser justificadas por vários fatores, entre eles destaca-se a ausência de glicosilação, a qual pode ser associada a epítomos bacterianos, interferindo no seu reconhecimento pelo sistema imune do paciente. Essa associação tem uma influência substancial nas propriedades físicas de glicoproteínas e são um dos atributos de qualidade mais importantes para a avaliação de segurança de um biofármaco (AVRAMIS, 2012; BUTLER; SPEARMAN, 2014).

1.3 Glicosilação

Modificações pós-traducionais são alterações realizadas pelas células de organismos eucariontes, por meio de enzimas, após a tradução de uma proteína, adicionando novos grupamentos químicos, resultando em proteínas maduras e funcionais (KURIAKOSE; CHIRMULE; NAIR, 2016; WATSON *et al.*, 2006). Quando são feitas adições de carboidratos, essas modificações passam a ser chamadas de glicosilações e ocorrem na maioria das vezes no retículo endoplasmático das células, podendo ser N-glicosilações ou O-glicosilações (NELSON; COX, 2014).

Alguns estudos demonstram a relação entre glicosilações e aumento na estabilidade de proteínas recombinantes, tempo de meia-vida na circulação sanguínea, bem como redução da imunogenicidade de algumas proteínas (GHADERI *et al.*, 2010). Como bactérias não são capazes de realizar essas modificações pós-traducionais, o aumento dos efeitos imunogênicos, relativos às proteínas produzidas através dessa plataforma, deve ser considerado, o que reforça a necessidade da utilização de outros sistemas mais adequados, como exemplificado na tabela 1 (HOUDEBINE, 2009).

Tabela 1 – Comparação de diferentes sistemas de produção de proteínas recombinantes

Pontos a considerar	Sistema de produção		
	Bactérias	Célula animal (CHO)	Animal transgênico
Nível de produção prática	++	+	++++
Custo de investimento	+++++	+	+++
Custo de produção	+++++	++	++++
Modificação pós-traducional	-	++++	++++
Glicosilação	-	++++	++++

Fonte: Adaptado de Houdebine et al. (2009).

1.4 Plataforma de células de mamíferos

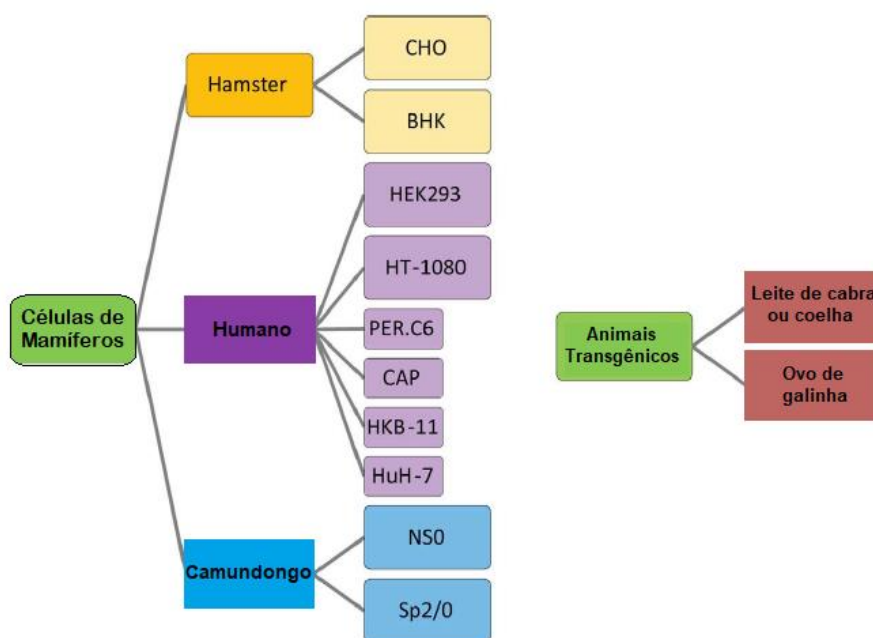
Um dos principais pontos a se considerar na produção de proteínas recombinantes é a plataforma utilizada para sua expressão, uma vez que cada uma apresenta vantagens e desvantagens frente ao que se quer produzir (JEFFERIS, 2016). O sistema mais usado costuma ser através de bactérias, principalmente *E. coli*, uma vez que seu genoma é bem caracterizado, de fácil manipulação e o tempo entre gerações e expressão de proteínas é curto (SPADIUT et al., 2014). Entretanto, no que diz respeito à produção de biofármacos, uma desvantagem da plataforma bacteriana está associada à necessidade de purificação dos produtos uma vez que a administração desses compostos com algum resquício de endotoxinas bacterianas pode desencadear respostas imunológicas indevidas nos pacientes tratados. Além disso, existem os problemas quanto à conformação da proteína gerada, já que este sistema não possui mecanismos de processamento pós-traducionais como os mamíferos (RANG et al., 2016).

O uso de algumas leveduras em alternativa à plataforma bacteriana já é bastante explorado, uma vez que, por serem procariontes, são capazes de realizar glicosilações e também são de fácil cultivo e tempo de geração curto, apresentando rendimentos proteicos satisfatórios que variam entre 2 e 5 gramas de proteína por litro de meio. No entanto, as modificações pós-

traducionais realizadas por esta plataforma podem ser incompletas quando comparadas as realizadas por humanos, o que gera produtos impuros (LEBOZEC et al., 2018).

As células de mamíferos estão entre as opções que melhor atendem ao requisito de produção de proteínas glicosiladas mais semelhantes às humanas usadas pela indústria de biofármacos. Entre elas, as células derivadas de ovário de hamster chinês ou, do inglês, Chinese Hamster Ovary (CHO) são responsáveis por cerca de 70% dessa produção, sendo a maioria anticorpos monoclonais, enquanto células derivadas de linhagens humanas, como as células embrionárias de rim humano (HEK-293) ainda estão sendo estudadas (LALONDE; DUROCHER, 2017; LEBOZEC et al., 2018). Na figura 3 estão alguns exemplos dos sistemas de expressão mais usados para produção de proteínas com necessidades de modificações pós traducionais.

Figura 3 – Sistemas de expressão usados industrialmente para a produção de proteínas glicosiladas.



Fonte: Adaptado de Lalonde e Durocher (2017).

Cerca de 52 % dos biofármacos aprovados, e que necessitam de modificações pós-traducionais, são produzidos por células de mamíferos; desses, 4 % são produzidos em células humanas. Exemplos de outros medicamentos produzidos dessa forma são o Interferon Beta (IFN- β), que possui atividade antiviral e é usado no tratamento de esclerose múltipla, e a Eritropoetina (EPO), hormônio usado para o tratamento de anemia associada a insuficiência renal crônica. O IFN- β não glicosilado gera resposta imune em pacientes, enquanto que a mesma proteína glicosilada apresenta uma redução na imunogenicidade (ABDI, 2016; KURIAKOSE *et al.*, 2016).

1.5 Crise de desabastecimento

Em 2017 o Brasil vivenciou uma grave crise, amplamente divulgada na mídia, como mostra a figura 4, relativa ao desabastecimento de L-ASNase, anteriormente adquirida diretamente pelos hospitais junto à empresa Bagó, licenciada no país para comercialização do medicamento fabricado pela farmacêutica Merck & CO sob o nome de Elspar[®], que teve sua fabricação descontinuada em 2012 (MS, 2019).

Com a descontinuação da fabricação do Elspar[®], através da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE), foi solicitado que o governo fizesse a aquisição de nova remessa do medicamento para repasse aos hospitais. Através da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da Saúde (MS) realizou nova solicitação à representante no Brasil, Bagó, que adquiriu a Aginasa/Medac em quantidades suficientes até 2014, porém ainda sem registro no país. Embora dada entrada ao pedido de registro, este foi negado pela ANVISA, por falta de estudos sobre a eficácia do produto. Uma terceira formulação de L-ASNase passou a ser comprada em caráter excepcional, comercializada sob o nome de Leuginase[®], de fabricação do Laboratório Beijing e comercializada pela empresa Xetley (ANVISA, 2019).

Diante das polêmicas a respeito da eficácia do produto e dos estudos realizados para liberação do medicamento no Brasil, o Ministério Público Federal (MPF) recomendou a suspensão da compra e distribuição da Leuginase[®] com o apoio do Conselho Federal de Medicina (CFM) e da Associação Médica Brasileira (AMB), os quais defendem a importância da avaliação rigorosa a respeito da qualidade de todos os medicamentos comercializados pelo país, conforme notícia veiculada no portal da AMB.

Em janeiro de 2018, uma notícia veiculada pelo portal do Ministério da Saúde informou que um novo modelo de repasse dos valores para pagamento do tratamento da LLA passasse a ser adotado, ficando o MS comprometido a fazer o repasse de valores de acordo com cada fase do tratamento, ao invés de valores mensais, como era praticado. Além disso, informa o registro de uma PEG-asparaginase junto à ANVISA que pode ser adquirida diretamente pelos hospitais de acordo com a necessidade de cada unidade (MS, 2019).

Ainda neste contexto, a ASNase nativa de *E. coli* deixou de ser comercializada nos Estados Unidos em 2013, sendo substituída pela ASNase recombinante, a qual foi introduzida no mercado Europeu em 2016 (KAMINSKY, 2017). Embora a ANVISA se baseie na legislação de órgãos internacionais como o Food and Drug Administration (FDA) e o European Medicines Agency (EMA) para a liberação de biofármacos ainda sem legislação específica no país, por questões econômicas, a PEG-asparaginase é a enzima comercializada em território nacional.

Figura 4 – Notícia veiculada sobre o desabastecimento e as polêmicas sobre novas aquisições para L-ASNase.



Fonte: <http://g1.globo.com/fantastico/noticia/2017/07/ministerio-da-saude-anuncia-que-nao-compra-mais-leuginase-da-china.html>

Dados de 2015 apontam para gastos em torno de R\$ 14 bilhões em medicamentos, dos quais biofármacos e vacinas representam cerca de 51 % desse valor, embora apenas 4 % das unidades de medicamentos comercializados no Brasil sejam dessa natureza, e em 2013, sete em cada dez produtos farmacêuticos mais vendidos mundialmente foram biofármacos, o que reforça a necessidade de desenvolvimento desses produtos nacionalmente (ABDI, 2016).

Tendo em vista a grande demanda e os problemas decorrentes da não produção nacional deste medicamento, bem como as questões relativas à imunogenicidade inerente às atuais plataformas de produção desse biofármaco, o presente trabalho teve por objetivo a expressão de ASNase em células humanas (HEK-293) e produção de uma linhagem de expressão constitutiva para futuras análises de viabilidade de produção da enzima menos imunogênica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar a atividade de uma L-asparaginase II bacteriana em uma linhagem de células de mamíferos HEK-293, secretada no meio de cultivo celular.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Sintetizar o vetor comercial com gene para L-asparaginase II e recombinar em vetor pADTrack;
- b) Produzir linhagem com gene para L-asparaginase II bacteriana integrado ao genoma da célula;
- c) Cultivar a linhagem para expressão da enzima no meio de cultivo celular;
- d) Avaliar a expressão da L-asparaginase II pela linhagem produzida;
- e) Avaliar a glicosilação e atividade enzimática da L-asparaginase II.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese do vetor de clonagem

A partir da sequência do gene *asnB* de *Escherichia coli* para L-asparaginase, obtido através do *GenBank*, cadastrado com a ID 947454, foi enviada uma solicitação à empresa *GenScript* para síntese deste gene no vetor comercial pUC57 com sítio de restrição para a enzima *XhoI* nas extremidades, inclusão de peptídeo sinal da beta caseína para direcionar a secreção para o meio extracelular e otimização de códons para expressão em caprinos.

3.2 Clonagem no vetor de expressão

Para expressão em células de mamíferos, foi utilizado o vetor pAdTrack-CMV, que permite rastrear sua inserção através da expressão do gene repórter da proteína verde fluorescente (*Green Fluorescence Protein* - GFP), o qual permite a visualização de células verdes após a transfecção com a utilização de luz ultravioleta. Este vetor contém ainda um promotor CMV para a expressão do gene de interesse (LUO, 2007).

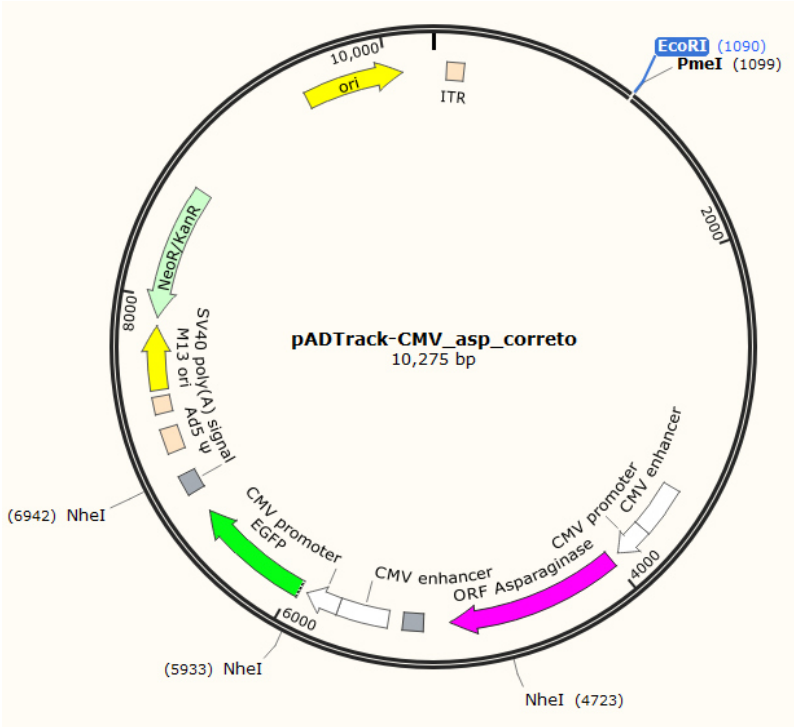
Utilizando a enzima de restrição *XhoI*, foi realizada uma digestão do vetor pUC57, a 37 °C por 2 h para exisção do gene de interesse. Em seguida o fragmento foi purificado com o auxílio do kit de purificação de *DNA Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e ligado ao vetor de expressão pAdTrack-CMV através do protocolo da enzima *Quick Ligase* (NEB), conforme informações do fabricante, utilizando uma proporção de 6:1 (vetor:inserto), com 50 ng de vetor e 8 ng de inserto. Essa ligação foi então transformada em bactérias quimiocompetentes usando 100 µL de bactérias descongeladas em gelo, adicionadas a uma solução com 20 µL de tampão KCM 5x (0,5 M de KCl, 150 mM de CaCl₂, 250 mM de MgCl₂), 2 µL da reação de ligação e 88 µL de água ultrapura, incubada em gelo por 20 min, seguidos de 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 800 µL de LB caldo à transformação, a qual foi incubada sob agitação a 37 °C por 1 h, depois centrifugada a 2000 g por 2 min. Após a centrifugação, 950 µL foram descartados e o precipitado foi ressuscitado nos 50 µL restantes, os quais foram plaqueados em meio LB ágar para seleção através do antibiótico carbenicilina. Colônias positivas foram testadas para análise da correta inserção do gene através de digestões a 37 °C por 2h, seguidos de inativação a 80 °C por 5 min, com a enzima *NheI* e por PCR, utilizando o Master mix 4G, conforme orientações do fabricante, e um par de iniciadores, Fwd – GATTGACAAGTAATACGCTGTTTCTCT e Rev – GCGAAGCTTTTAGTACTGATTGAAGAT, em um ciclo de 30 repetições com temperatura de desnaturação de 95 °C, temperatura de anelamento de 52 °C e temperatura de extensão de 72 °C.

Para inserção em sentido correto ou sentido invertido o padrão de bandas observados após a digestão apresentaria divergências, bem como a amplificação por PCR, utilizando uma estratégia com um par de iniciadores que se anelam um ao vetor e outro ao gene, produzindo assim, fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com o sentido de inserção.

3.3 Preparo de vetor para integração do genoma à célula

O vetor pAdTrack-CMV, com a adição do gene para ASNase, foi linearizado usando a enzima de restrição *EcoRI* (Promega), a 37 ° por 2 h. O sítio da enzima de restrição está destacado em azul na figura 5. Em seguida foi realizada uma reação de defosforilação com auxílio da enzima *Antarctic Phosphatase* (NEB), a 37 °C por 30 min, seguido de inativação a 80 °C por 5 min. Após tratado enzimaticamente, o DNA foi precipitado adicionando 30 µL de acetato de sódio 3M e 600 µL de etanol 100%, levado ao ultrafreezer por 1 h, em seguida centrifugado a 4 °C e 16000 g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% foram adicionados para ressuspensão do precipitado, que foi novamente centrifugado a 16000 g e 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado mais uma vez e mais 500 µL de etanol 70% foram adicionados e novamente centrifugados a 16000 g, 4 °C e 5 min. Em seguida o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma ponteira, o tubo ficou aberto na bancada por 5 min, e o precipitado foi ressuspensionado em 10 µL de água aquecida a 60 °C.

Figura 5 – Mapa do vetor pADTrack-CMV com adição do gene para ASNase.



Fonte: elaborado pela autora com auxílio do software SnapGene.

3.4 Cultivo de células embrionárias de rim humano

Células embrionárias de rim humano (HEK-293 – *human embryonary kidney-293*) mantidas criopreservadas pelo Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) foram aquecidas em banho maria a 37 °C até o descongelamento parcial, sendo adicionado meio de cultivo (DMEM da Gibco®, com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, pH 7,3 e osmolaridade 290), também aquecido a mesma temperatura, para a diluição de crioprotetores presentes e completo descongelamento das células. Em seguida, centrifugadas a 1200 rpm por 10 min, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL do mesmo meio de cultivo. As células foram então cultivadas em placas de 100 mm contendo 8 mL de meio de cultivo e incubadas em estufa a 37 °C utilizando 5% CO₂.

Ao atingirem alta confluência (80-90%), as células foram passadas de acordo com o seguinte protocolo: retirada do meio de cultivo da placa, lavagem com tampão PBS sem íons cálcio e magnésio, incubação com 3 mL de reagente TrypLE™, para desprendimento das células, as quais se mantêm aderidas à superfície da placa, por 5 minutos ou o tempo necessário. Em seguida, foram adicionados 3 mL do meio de cultivo já mencionado, para cessar a ação enzimática da tripsina contida no reagente TrypLE™, e a suspensão celular foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL sendo centrifugada a 1200 rpm por 10 min. Disso, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em meio de cultivo, sendo, então, distribuído em novas placas de cultivo. Para manutenção das células em cultivo, esse protocolo deve ser repetido a

cada dois ou três dias.

3.5 Transfecção de HEK-293

Para a transfecção de HEK-293 e expressão transiente, foi utilizado o sistema de transfecção por eletroporação *Neon™ Transfection System* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Foram transfectados 3 grupos, com um milhão de células e 3 µg de DNA circular, sendo um grupo teste utilizando o plasmídeo pAdTrack-ASNase, um controle positivo usando o plasmídeo pGFP comercial e um controle negativo para o qual não houve inserção de DNA. Os parâmetros utilizados foram 1100 V, 2 pulsos por 20 ms. Após a transfecção, as células foram cultivadas por três dias em meio DMEM, sem a adição de soro fetal bovino, a 37 °C e 5% de CO₂, seguido da coleta do meio de cultura e das células, separadamente.

Uma segunda transfecção, seguindo as mesmas concentrações de células, 5 µg de DNA, e parâmetros 1150 V, 2 pulsos por 20 ms, foi realizada para integração do material genético do vetor ao genoma da célula, objetivando a obtenção de clones celulares expressando estavelmente L-Asparaginase. Para isso foi utilizado o plasmídeo pAdTrack-ASNase linearizado com *EcoRI*, um controle positivo com o plasmídeo pGFP comercial circular e um controle negativo onde não houve adição de plasmídeo. Em seguida, essas células passaram por um processo de isolamento clonal, no qual as células transfectadas foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas de modo que fossem plaqueadas 2 células por poço, em placas de 96 poços. Após a diluição, as placas foram analisadas na luz UV para verificar quais integraram o DNA de interesse através da visualização da expressão do gene repórter. Os poços que apresentaram células verdes foram mantidos em cultivo para expansão das células, que em seguida foram tripsinizadas e passadas a poços de placas de 48 poços. Novamente, foram analisadas a luz UV, mantidas em cultivo as que apresentaram coloração verde e essas foram tripsinizadas e passadas para placas de 24 poços. Esse processo seguiu até a cultura atingir placas de 100 mm, onde todas as células apresentavam coloração verde, garantindo a integração e permanência do gene para ASNase. Esse cultivo seguiu até chegar a dez placas de 100 mm, para a expressão da ASNase no meio. Para isso, ao chegar a quantidade de células desejadas, o meio foi trocado para DMEM sem soro fetal bovino e sem phenol red, o qual foi mantido por três dias. Na sequência, as células e o meio foram recolhidos separadamente.

O meio recolhido das dez placas foi concentrado utilizando Vivaspín GE, seguindo instruções do fabricante, com membrana de 10 kDa. Inicialmente a coluna foi hidratada com 5 ml de água destilada e filtrada centrifugando a 4000 g e 4 °C por 5 min. A partir desse momento a coluna não pode ficar seca. A amostra foi adicionada até o volume limite e centrifugada a 4 °C e 4000 g por 10 min. Após passagem de todo o volume da amostra, foi realizada a troca do meio

por tampão PBS, completando novamente o volume limite e centrifugando a 4 °C e 4000 g por 10 min. Essa centrifugação foi repetida 10 vezes, ao final, foi descartado o volume coletado pela parte inferior do tubo e recolhido a amostra da membrana, agora em tampão PBS e aproximadamente 2 ml, com o auxílio de um pipetador. A enzima foi armazenada a 4 °C.

3.6 Western-Blot

Utilizando a técnica de Western blotting, o meio de cultivo celular da expressão transiente e o conteúdo do interior das células cultivadas foram analisados de modo a verificar a expressão de ASNase. As células coletadas passaram por um processo de lise para liberação do conteúdo interno, para isso foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise (ureia 7M, DTT 0,1M, triton X-100 0,05%, HEPES 2 mM, pH 7,6), incubadas em gelo por 1 h sob agitação de 200 rpm em shaker, depois centrifugadas a 4 °C e 2000 g por 30 min. Após, o sobrenadante foi transferido pra um novo tubo e o precipitado foi descartado. Esse processo foi realizado para as células que expressaram ASNase, as células contendo apenas GFP e as células nas quais não houve integração de DNA. Todas as amostras foram quantificadas seguindo o protocolo do *Qubit® Fluorometer* (Invitrogen). Foram utilizados 1 µL de cada amostra, o lisado de células para ASNase, com 2,59 µg de proteínas, o meio de cultivo da ASNase, com 1,82 µg de proteínas, o lisado de células GFP, com 1,46 µg de proteínas, o meio de GFP, com 1,42 µg de proteínas, o lisado de células sem integração de DNA, com 1,39 µg de proteínas e o meio sem integração de DNA, com 0,34 µg de proteínas, os quais foram aplicados em um gel de poliacrilamida 10%, submetido a uma eletroforese a 100 V por 1 h e 30 min. Após a corrida, o gel foi posto em contato com uma membrana de nitrocelulose e submetido ao processo de transferência em tampão Tris-base 250 mM, glicina 1,92 M e metanol 20%, também a 100 V por 1 h e 30 min. Em seguida, a membrana passou por um bloqueio em solução contendo TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) adicionada de blotto 5% (TBS-T, leite mólico desnatado em pó), por 1 h, sob agitação. Essa solução foi descartada e foi acrescentado 10 mL da mesma solução, contendo o anticorpo primário diluído na proporção 1:1000 (*L-Asparaginase antibody* – orb344093 - Biorbyt), ficando a membrana sob agitação overnight. Decorrido o tempo, foram realizadas três lavagens com TBS-T, por dez minutos cada, e adicionado mais 10mL da solução de TBS-T adicionada de blotto 5%, dessa vez contendo o anticorpo secundário na proporção de diluição 1:20000 (*Rabbit IgG HRP Linked whole Ab* – GE Healthcare, NA934), permanecendo sob agitação de mais uma hora, seguido por mais três lavagens com TBS-T em intervalos de 10 min. Ao final do protocolo, foi realizada a revelação da membrana utilizando o kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Life Sciences).

3.7 Análise de Glicosilação

A partir do meio de cultivo da expressão transiente das células HEK-293 originárias da expressão transiente, foram realizadas duas reações enzimáticas separadas utilizando as enzimas PNGase F e Endo H da New England Biolabs, visando a identificação de glicosilações na ASNase expressa. Para a enzima PNGaseF foi realizado o protocolo em condição desnaturante usando um microlitro de meio de cultivo, 1 μL de tampão desnaturante, completando o volume para 10 μL com água para biologia molecular e aquecendo essa mistura a 100 °C por 10 min, refriando em gelo por 10 seg. Em seguida foram adicionados 2 μL do tampão *Glycobuffer* 2, 2 μL de NP-40 10% e 6 μL de H_2O ultrapura estéril e 1 μL da enzima PNGase F. A reação foi incubada a 37 °C por 1 h,

Para a enzima Endo H também foram usados um microlitro de meio de cultivo, 1 μL de tampão desnaturante, completando o volume para 10 μL de H_2O de água ultrapura estéril e aquecendo essa mistura a 100 °C por 10 min. Em seguida foram adicionados 2 μL do tampão *Glycobuffer* 3, 7 μL de água ultrapura estéril completando o volume da reação para 20 μL e um microlitro da enzima Endo H. A reação também seguiu por um período de incubação de uma hora a 37 °C. Em seguida foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%.

3.8 Atividade enzimática a diferentes pH e temperatura

Utilizando o meio concentrado, a partir do cultivo da linhagem gerada com gene para ASNase integrado, foi realizada a construção de uma curva padrão com uma solução de sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 12mM. Diferentes volumes dessa solução estoque foram adicionados a 80 μL de tampão Tris 50 mM e NaCl 300 mM, pH 8,0, produzindo triplicatas de diluições com concentrações que variaram de 0,216 a 2,4 μM do íon amônio (NH_4^+) , em um volume final de 180 μL . As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min, seguido de adição de 10 μL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M para bloqueio da reação.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 10 μL de cada diluição e 240 μL de reagente de Nessler diluído (25 μL de Nessler + 215 μL de água ultrapura) para reação colorimétrica. A leitura da absorbância, em comprimento de onda de 436 nm, foi realizada em um leitor de placas Synergy™ HTX Multi-Mode.

O meio recolhido da expressão em células foi trocado por tampão fosfato-salino (PBS) com auxílio do sistema Vivaspin® (GE Healthcare Life Science) e quantificado utilizando o equipamento *Qubit® Fluorometer*, o qual registrou a concentração de 848 $\mu\text{g/mL}$. Uma amostra de 10 μL de enzima foi adicionada a uma reação contendo 160 μL de tampão Tris 50

mM e NaCl 300 mM, pH 8,0, e 10 μ L de L-asparagina 189 mM, incubados a 37 °C por 30 min. Para o bloqueio da reação foi adicionado 10 μ L de TCA após o período de incubação.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 10 μ L de cada diluição e 240 μ L de reagente de Nessler diluído (25 μ L de Nessler + 215 μ L de água ultrapura) para reação colorimétrica. A leitura da absorbância, em comprimento de onda de 436 nm, foi realizada em um leitor de placas Synergy™ HTX Multi-Mode.

Foi realizada a atividade enzimática para determinação do pH ótimo usando tubos de 0,2 ml contendo 160 μ L de diferentes tampões, com pH variando entre 3,0 e 11,0, 10 μ L de L-asparagina 189 mM e 10 μ L da amostra de enzima, totalizando 180 μ L de reação. O tampão citrato 0,2 mM-fosfato 0,1 mM foi utilizado para os pH de 3 a 6, o tampão Tris 50 mM para pH 7 a 9 e o tampão Glicina 50 mM para os pH 10 e 11. Os tubos foram mantidos em banho de gelo durante a adição da enzima nas reações. Para cada tampão testado foi realizada uma triplicata e um ensaio branco sem a adição da enzima. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 min em termociclador, seguidos da adição de 10 μ L de TCA 1,5 M.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 10 μ L de cada diluição e 240 μ L de reagente de Nessler diluído (25 μ L de Nessler + 215 μ L de água ultrapura) para reação colorimétrica. A leitura da absorbância, em comprimento de onda de 436 nm, foi realizada em um leitor de placas Synergy™ HTX Multi-Mode.

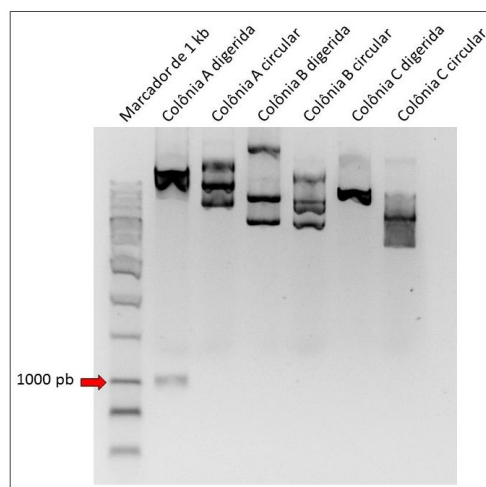
Para avaliação de temperatura ótima para a atividade enzimática, foi utilizado o tampão de pH ótimo, seguindo os mesmos parâmetros utilizados para a reação de determinação do pH, bem como a leitura das absorbâncias seguiu os mesmos padrões.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do vetor de clonagem e montagem do vetor de expressão

Após o isolamento por digestão enzimática do gene da L-asparaginase proveniente do vetor comercial pUC57 e da linearização do pADTrack-CMV, foram obtidas 3 colônias após a seleção com antibiótico. Estas foram digeridas com *XhoI* para verificar a separação do gene e do vetor confirmando a ligação dessas sequências. Foi observado que 1 das 3 colônias teve a ligação realizada, sendo esta a colônia A, na qual pode-se observar a presença de uma banda na altura aproximada de 1000 pb, que não aparece nas demais colônias, e corresponde ao tamanho esperado para o gene isolado nesta digestão. (Figura 6).

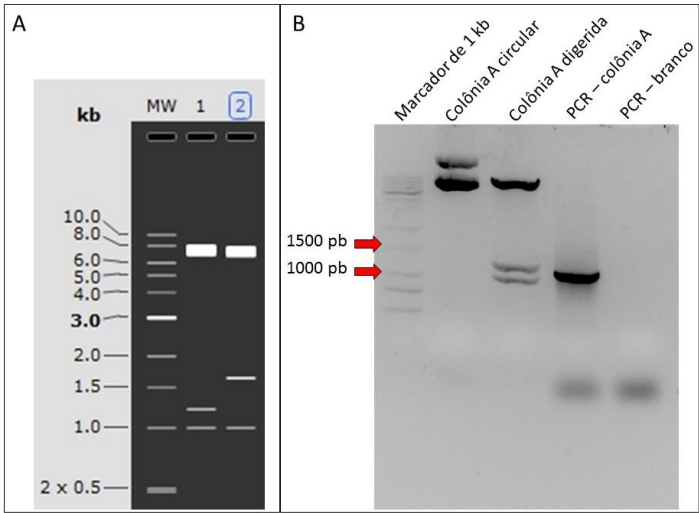
Figura 6 – Gel de agarose mostrando a presença do gene ASNase na colônia transformada.



Fonte: Elaborado pela autora. A banda na altura aproximada de 1000 pb, indicada pela seta vermelha, corresponde ao tamanho esperado do gene da ASNase.

Em seguida, foi realizada a digestão da colônia A com a enzima de restrição *NheI*, visando a identificação de orientação da inserção no vetor. Na Figura 7B, pode-se observar que a colônia A apresentou bandas na altura esperada para a orientação correta, como previstas pelo *software SnapGene* (Figura 7A), nas alturas de 1,2 e 1 Kb. A PCR foi realizada utilizando a estratégia de iniciadores anelando no vetor e no gene de interesse. Isso permitiu verificar dois padrões de bandas distintos, para a situação de inserção da orientação correta ou invertida, com tamanhos de bandas diferentes, uma vez que a região a ser amplificada passa a ser diferente, dessa forma, corroborou a orientação correta do clone A (Figura 7B).

Figura 7 – Projeção do software SnapGene e gel de agarose para identificação de orientação da inserção do gene.

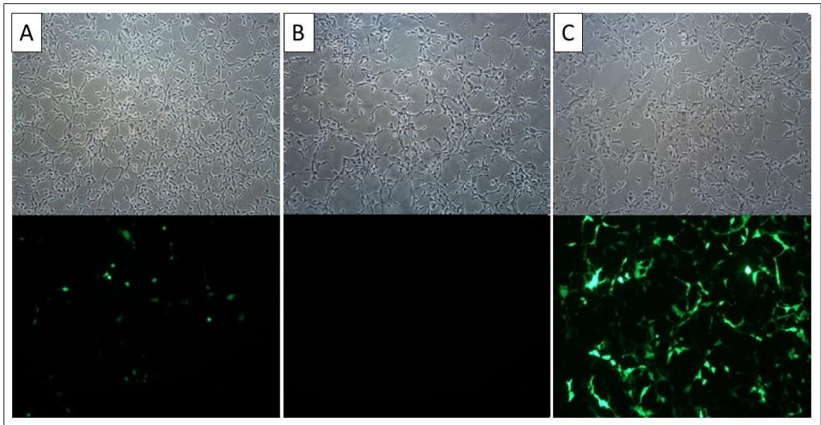


Fonte: Elaborado pela autora. Em (A), MW corresponde ao poço de aplicação do marcador de peso molecular 1 kb, 1 corresponde ao vetor digerido com *NheI* e inserto na orientação correta, e 2 corresponde à digestão do vetor com a mesma enzima, porém com inserto na orientação inversa. Em (B), as setas apontam para as bandas do marcador correspondentes a 1,5 kb e 1 kb, evidenciando que a digestão da colônia A apresenta padrão semelhante ao previsto pelo software para a inserção na orientação correta.

4.2 Transfecção de HEK-293

Foram realizadas as transfecções das células HEK-293, podendo ser observado na Figura 8 a fluorescência à luz UV que indica a internalização do DNA na célula, pois os vetores utilizados expressam a GFP. Para o grupo pAdTrack-ASNase foi observada uma taxa de eficiência de 10 a 15%, enquanto o controle positivo transfectado com pGFP teve uma taxa de transfecção aproximada de 70% (Figura 8).

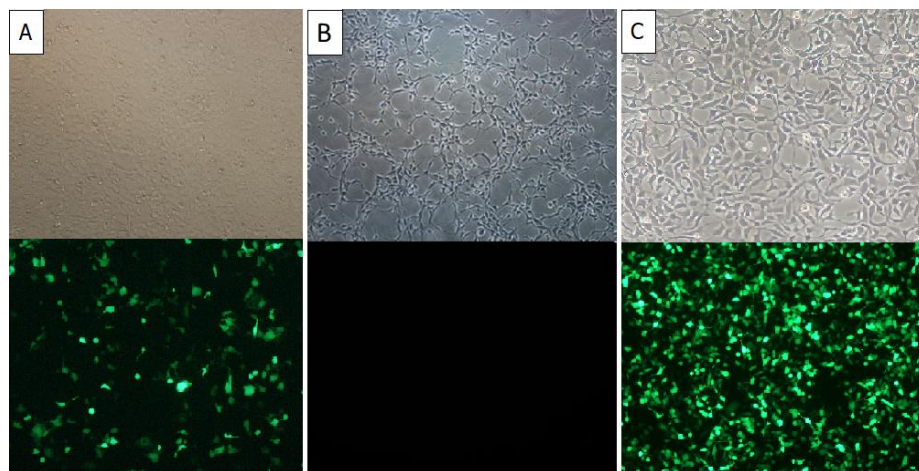
Figura 8 - Expressão *in vitro* de ASNase em HEK-293 para grupo teste e controles.



Fonte: Elaborado pela autora. (A) Grupo pAdTrack-ANSase. (B) Controle negativo. (C) Controle positivo com GFP comercial. Na parte superior estão as células visualizadas à luz branca e à baixo na luz ultravioleta (UV).

A figura 9 mostra os resultados obtidos para a transfecção utilizada para dar origem à linhagem de células HEK-293 com gene para ASNase integrado. É possível observar que houve uma taxa de transfecção melhor tanto para o grupo pADTrack-ASNase, com uma eficiência em torno de 50%, como para o grupo com GFP comercial, que apresentou uma taxa de transfecção de aproximadamente 90%. A partir desse resultado, foi dado início às diluições possibilitando isolar onze colônias. A manutenção dessas células em cultivo, com as consequentes expansões, permitiu verificar que o gene havia sido internalizado pelo genoma da célula, não apenas de forma transiente, sendo possível observar células contendo o gene repórter durante todo o processo. Das onze colônias isoladas inicialmente, dez se mostraram heterogêneas, com o aparecimento de células que não expressaram GFP, e uma homogênea, a partir da qual foi realizada a expansão e expressão de ASNase no meio.

Figura 9 – Transfecção de células HEK-293 para produção da linhagem

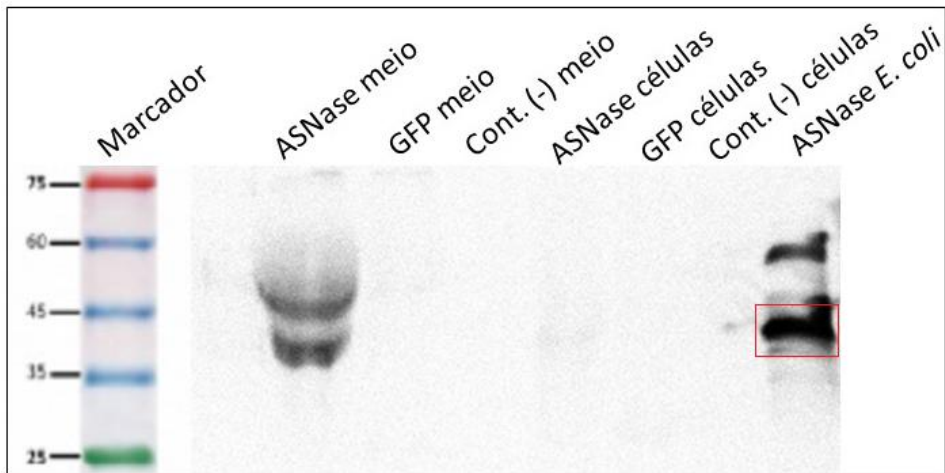


Fonte: Elaborado pela autora. (A) Grupo pAdTrack-ANSase. (B) Controle negativo. (C) Controle positivo com GFP comercial. Na parte superior estão as células visualizadas à luz branca e à baixo na luz ultravioleta (UV).

4.3 Análise da expressão por Western blotting

Após três dias, os meios de cultura e as células, provenientes da expressão transiente, foram coletadas e foi extraído o conteúdo citoplasmático para análise da expressão proteica por Western blotting. Como resultado observado na Figura 10, pode-se inferir que para a amostra de meio de cultura do grupo teste existem duas bandas fortes próximas a altura da ASNase de *E. coli*, comparadas ao controle positivo. O peso molecular esperado para a ASNase bacteriana é de aproximadamente 40 kDa, podendo ser visto na amostra relativa ao controle positivo, enquanto na amostra proveniente da expressão em células HEK-293 observamos uma banda de altura próxima ao encontrado para o controle positivo e uma outra acima, em torno de 50 kDa.

Figura 10 – Análise da expressão proteica por Western blotting.



Fonte: Elaborado pela autora.

Sugere-se que as duas bandas observadas são devido a diferentes formas de glicosilações típica das células eucarióticas, já que o gene da L-Asparaginase possui 6 possíveis sítios para *N*-glicosilação. A glicosilação pode atuar de forma decisiva na imunogenicidade de proteínas. Como a L-Asparaginase comercial mais utilizada atualmente –e que apresenta problemas de reações imunes em pacientes - provém de bactérias, que não glicosilam, pode-se sugerir que uma enzima glicosilada, como a obtida neste trabalho, possa ter potenciais epítomos mascarados pela cadeia de carboidratos, assim como já foi demonstrado previamente, por exemplo, em proteínas recombinantes utilizadas em vacinas (DOWLING *et al.*, 2007).

4.4 Análise da presença de Glicosilações

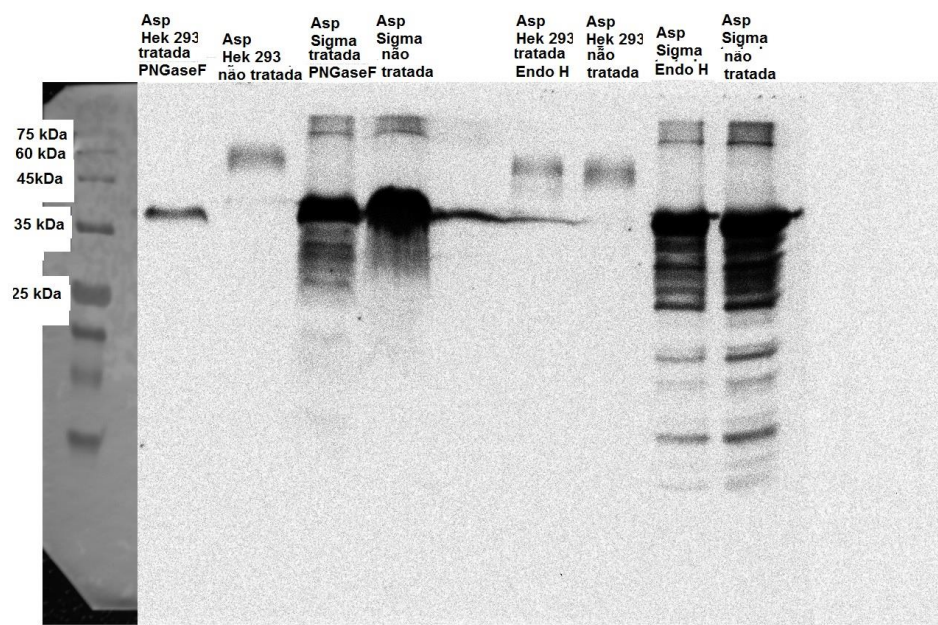
Através de reações enzimáticas que removem diferentes formas de glicosilação foi possível constatar a presença de glicoformas, conforme sugerido pelo Western Blot realizado.

A *Endoglycosidase H* (Endo H) é uma glicosidase recombinante capaz de clivar manoses no sítio N (ROBBINS *et al.*, 1984). Já a *Peptide-N-Glycosidase F* (PNGase F) é uma amidase que cliva entre os resíduos mais internos de N-acetilglucosamina e asparagina de oligossacarídeos ricos em manose (TRETTER *et al.*, 1991).

Ao usar as duas reações, pode-se observar a remoção dessas extremidades para as amostras de ASNase de HEK-293 tratadas com PNGase F, enquanto que no tratamento com Endo H não é possível visualizar diferença nos padrões de banda entre amostra tratada e não tratada, quando comparado a enzima expressa diretamente no meio de cultivo das células, como mostra a Figura 11. Para a ASNase de *E. coli*, usada como controle, observa-se que não houve alteração em nenhum dos tratamentos. A enzima Endo H é responsável pela clivagem de

resíduos de manose e oligossacarídeos híbridos, mas não é capaz de clivar glicosilações mais complexas, enquanto a PNGase F cliva ligações amida em resíduos de asparagina da cadeia polipeptídica da proteína (HAJBA; CSANKY; GUTTMAN, 2016).

Figura 11 – Gel de poliacrilamida para análise de glicosilações.

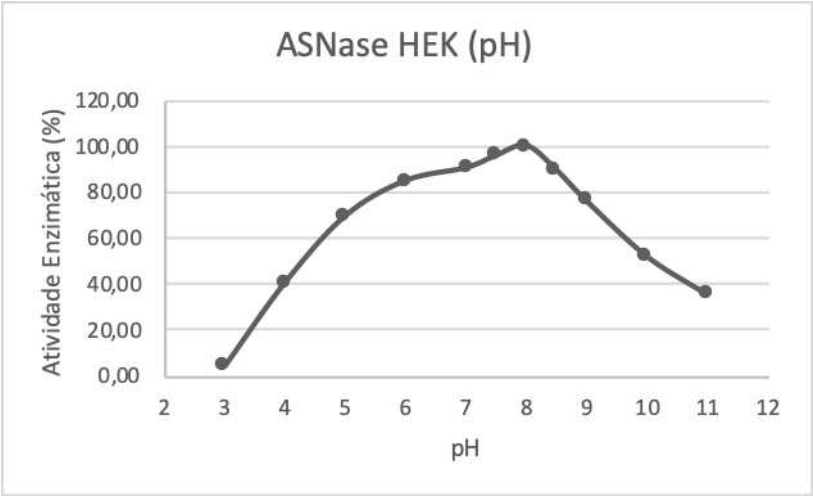


Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Atividade enzimática para diferentes pH e temperatura

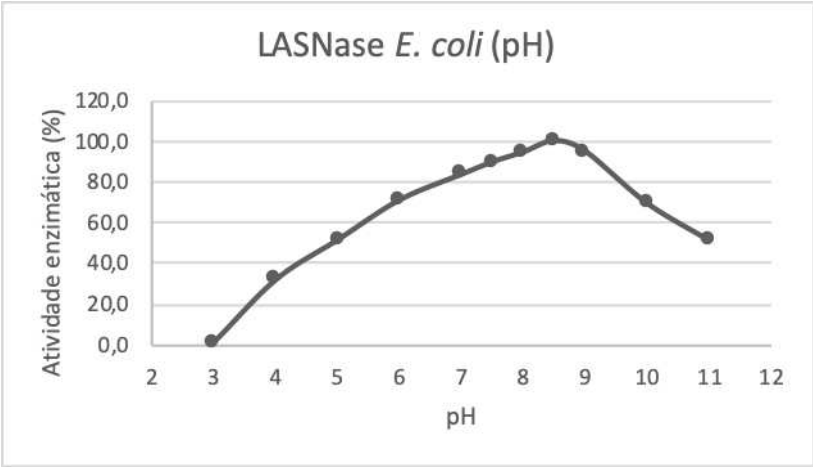
A determinação da temperatura ótima e pH ótimo para a atividade enzimática da ASNase produzida pelas células HEK-293 é de grande importância para possíveis utilizações dessa enzima como um potencial biofármaco. Através das análises feitas, pode-se observar que, embora utilizando um gene de *E. coli*, os valores encontrados divergem dos já registrados na literatura para expressões feitas em bactérias. No gráfico 1 observa-se um valor de pH ótimo em torno de 8, enquanto que WHEHNER *et al.* (1992) obteve pH ótimo de 7,0 e VIDYA *et al.* (2011), pH ótimo de 6,0. Já para a temperatura, o gráfico 3 mostra uma temperatura ótima de 60 °C para atividade realizada em pH 8,0, divergindo dos dados obtidos por VIDYA *et al.* (2011) que observou temperatura ótima de 40 °C. Comparando ainda com os resultados obtidos por TORRES (2018), mostrados nos gráficos 2 e 4, onde foi realizado o mesmo experimento em relação à determinação de pH e temperatura, com a enzima de *E. coli* expressa em *E. coli* observa-se que os valores de pH e temperatura ótimos encontrados são valores bem próximos, dessa forma, sugere-se que a ASNase glicosilada não tem alteração quanto à sua função.

Gráfico 1 – Curva de atividade enzimática para ASNase em HEK em diferentes pH.



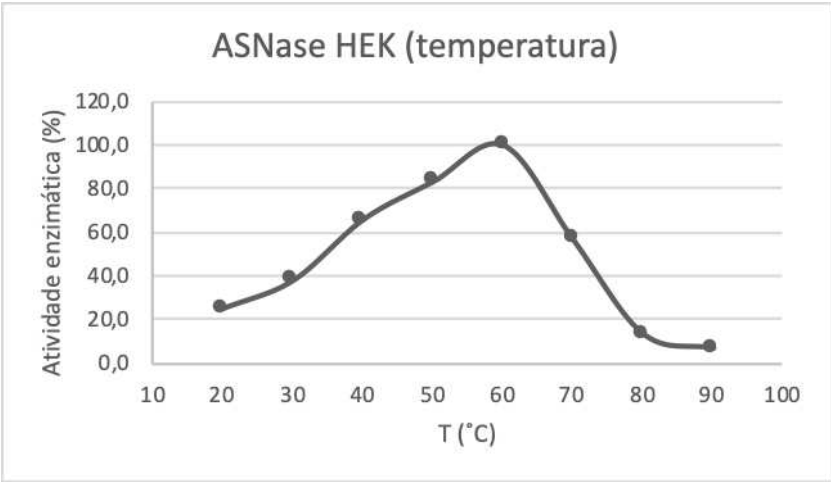
Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 2 – Curva de atividade enzimática para ASNase em *E. coli* em diferentes pH.



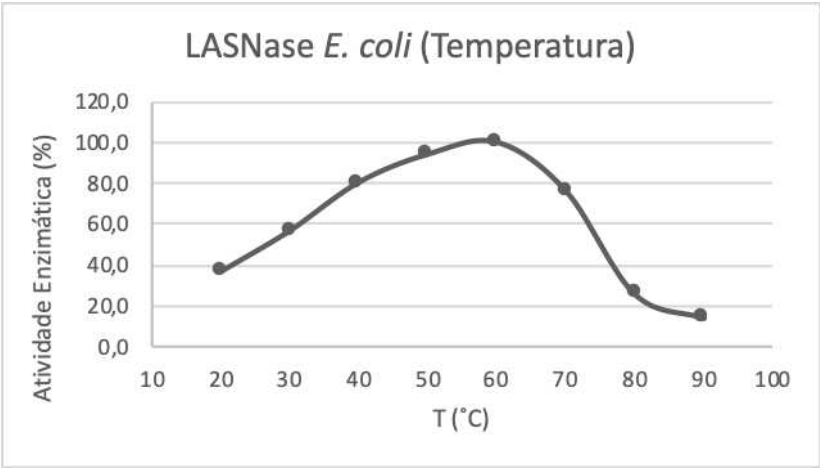
Fonte: TORRES, 2018.

Gráfico 3 – Curva de atividade enzimática para ASNase em HEK em diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 4 – Curva de atividade enzimática para ASNase em *E. coli* em diferentes pH.



Fonte: TORRES, 2018.

5 CONCLUSÕES

Com o presente estudo foi possível avaliar a viabilidade de produção da enzima ASNase através de células humanas, tanto para células transfectadas, como para uma linhagem com a integração do gene de interesse ao seu genoma, sendo ainda possível verificar a existência de duas possíveis glicoformas, as quais podem estar relacionadas a efeitos de diminuição da imunogenicidade em relação ao biofármaco em uso. Além disso, foi possível verificar a atividade da enzima em diferentes condições de pH e temperatura. Os resultados obtidos podem contribuir futuramente para a melhoria da terapia da Leucemia Linfóide Aguda, através da redução da resposta imune dos pacientes.

6 PERSPECTIVAS

Em continuidade a esse trabalho, as perspectivas de novas análises envolvem testes de citotoxicidade da enzima produzida analisando a mortalidade de linhagens de linfomas e a utilização da plataforma animal para sua produção utilizando o leite de cabras como meio de expressão para a L-Asparaginase, avaliando níveis de produção e purificação.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). Disponível em <http://ats.abdi.com.br/SiteAssets/Panorama%20Tecnologico%20ATS%20Biofarmacos%20final.pdf>. Acesso em 30 mai. 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2.%20b%20-%20L-ASPARAGINASE_CIT_22_06_2017.pdf. Acesso em 25 mai. 2019.
- ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA (AMB). Disponível em <https://amb.org.br/noticias/mpf-recomenda-suspensao-de-compra-e-distribuicao-da-asparaginase-chinesa-amb-e-cfm-apoiam-decisao/>. Acesso em 25 mai. 2019.
- AVRAMIS V.I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer research**, v. 32, p. 2423-2438, 2012.
- BOREK, D., JASKÓLSKI M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48 n. 4 p.893-902, 2001.
- BUTLER, M., SPEARMAN, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. **Current opinion in biotechnology**, v. 30 p.107-112, 2014.
- DIVINO, Bruna de Souza, **Produção de L-asparaginase (ASP1) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris***. 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- DOWLING, W., THOMPSON, E., BADGER, C. et al. Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. **J Virol.**, v.81, n.4, p.1821-37, 2007.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Assessment Report**, EMA/826135/2016.
- GHADERI, D., TAYLOR, R.E., PADLER-KARAVANI, V., et al. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. **Nat. Biotechnol.** 28(8), 863–867, 2010.
- HALL, John Edward; GUYTON, Arthur C. **Guyton & Hall tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HIJIYA, Nobuko; VAN DER SLUIS, Inge M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, 57:4, 748-757, 2016.
- HOUEBINE, LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. **CompImmunol Microbiol Infect Dis.** 32(2):107-21, 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Disponível em <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. Acesso em 25 mai. 2019.
- JEFFERIS, R. Posttranslational modifications and the immunogenicity of biotherapeutics. **Journal of Immunology Research**. v.2016, 5358272, 2016.

- KAMINSKY, C.L. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. **Cancer Chemother Pharmacol**, 79: 439-450, 2017.
- KURIAKOSE, A., CHIRMULE, N., NAIR, P. Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. **Journal of Immunology Research**, 1298473, 2016.
- KOSAK M., JASKÓLSKI M., RÖHM K.H. Preliminary crystallographic studies of Y25F mutant of periplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, n. 3, p. 807-814, 2000.
- LALONDE, M.E., DUROCHER, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. **Journal of Biotechnology**, v. 251 p.128-140, 2017.
- LEBOZEC K., JANDROT-PERRUS M., AVENARD G., et al. Quality and cost assessment of a recombinant antibody fragment produced from mammalian, yeast and prokaryotic host cells: A case study prior to pharmaceutical development. **New Biotechnology**, v. 44, p. 31-40, 2018.
- LUO, J. et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. **Nature Protocols**, v. 2, no 5, p. 1236-1247, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42285-ministerio-passara-a-pagar-hospitais-por-fases-da-quimioterapia-de-leucemia-lla>. Acesso em 25 mai. 2019.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- PIETERS R., HUNGER S.P., BOOS J., et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, 117(2), 238-249, 2011.
- RAMYA L.N., DOBLE M., REKHA V.P.B., et al. L-asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 167(8), 2144-2159, 2012.
- RANG H.P., RITTER J.M., FLOWER R.J., et al. **Rang e Dale Farmacologia**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- ROBBINS P., TRIMBLE R., WIRTH D., et al. Primary structure of the Streptomyces enzyme Endo-B-N-acetylglucosaminidase H. **J Biol Chem**. v. 259, n12, p. 7577-7583, 1984.
- SALZER, W.L. ASSELIN B.L., PLOURDE P.V., et al. Development of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1329, n. 1, p. 81-92, 2014.
- SPADIUT O., CAPONES S., KRAINER F., et al. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends Biotechnol**, v. 32, p. 54-60, 2014.
- SZYMANSKA B., WILCZYNSKA-KALAK U., KANG M.H., et al. Pharmacokinetic modeling of an induction regimen for in vivo combined testing of novel drugs against pediatric acute lymphoblastic leukemia xenografts. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33894, 2012.
- TANFOUS M.B., SHARIF-ASKARI B., CEPPI F., et al. Polymorphisms of asparaginase

pathway and asparaginase-related complications in children with acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Cancer Research**, 21(2), 329-334, 2014.

TRETTER V., ALTMANN F., MARZ L. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1---3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. **Eur J Biochem**. v 199, n 3, p. 647-652, 1991.

VIDYA, J., VASUDEVAN, U. M., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. Cloning, functional expression and characterization of L-Asparaginase II from *E. coli* MTCC 739. **Food Technol. Biotechnol**, v. 49, n. 3, p. 286–290, 2011.

WATSON, James D. et al. **Biologia molecular do gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WEHNER, A., HARMS, E., JENNINGS, M. P., et al. Site-specific mutagenesis of *Escherichia coli* asparaginase II. None of the three histidine residues is required for catalysis. **Eur J Biochem**, v. 208, p. 475–480, 1992.

YUN, M. K., et al. Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I. **Journal of Molecular Biology**, v. 369, p 794-811, 2007.

ZHANG, Jinghui et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 481, p. 157-163, 2012.

ZALEWSKA B., GACH A., WYKA K., et al. the cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different l-asparaginase preparations. **Clinical and Experimental Medicine**, 9(2), 113-116, 2009.

TRETTER V., ALTMANN F., MARZ L. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1---3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. **Eur J Biochem**. v 199, n 3, p. 647-652.

ROBBINS P., TRIMBLE R., WIRTH D., et al. Primary structure of the Streptomyces enzyme Endo-B-N-acetylglucosaminidase H. **J Biol Chem**. v. 259, n12, p. 7577-7583.