



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

PURIFICAÇÃO DA ENZIMA GLUCOCEREBROSIDASE HUMANA
PRODUZIDA NO LEITE DO PRIMEIRO CLONE CAPRINO
TRANSGÊNICO DA AMÉRICA LATINA

Mestranda

Elisamar Santos Marin Wagner

Orientador

Prof. Dr. Diógenes Santiago dos Santos

Porto Alegre

2016

ELISAMAR SANTOS MARIN WAGNER

**PURIFICAÇÃO DA ENZIMA GLUCOCEREBROSIDASE HUMANA
PRODUZIDA NO LEITE DO PRIMEIRO CLONE CAPRINO
TRANSGÊNICO DA AMÉRICA LATINA**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Biotecnologia e Farmacêutica, da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago dos Santos

Porto Alegre

2016

ELISAMAR SANTOS MARIN WAGNER

**PURIFICAÇÃO DA ENZIMA GLUCOCEREBROSIDASE HUMANA
PRODUZIDA NO LEITE DO PRIMEIRO CLONE CAPRINO
TRANSGÊNICO DA AMÉRICA LATINA**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Biotecnologia e Farmacêutica, da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Diógenes Santiago dos Santos (Orientador)

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro

Profa. Dra. Giandra Volpato

RESUMO

A doença de Gaucher, descrita pela primeira vez em 1882, é uma rara desordem genética autossômica recessiva caracterizada pela deficiência da atividade da glucocerebrosidase, uma enzima lisossomal que catalisa a hidrólise de glucocerebrosídeo em glicose e ceramida. A presença de dois alelos mutantes localizado na região q21 do cromossomo 1 confirma o diagnóstico, sendo as mutações mais comuns são N370S e L444P. O acúmulo desta enzima pode ser tratada com terapia de reposição enzimática, usando glucocerebrosidase recombinante, bastante eficaz no tratamento da doença, revertendo toda a cascata de eventos bioquímicos que acabam por ocasionar as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes ou melhorando muitos dos seus sinais e sintomas. As características clínicas comumente associados com a doença de Gaucher incluem hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia e envolvimento ósseo, hematológico e comprometimento neurológico no tipo II e III. Há três enzimas recombinantes para a terapia de reposição enzimática na doença de Gaucher: Velaglucerase alfa, Alfataliglucerase e Imiglucerase que diferem entre si principalmente em relação à forma de produção, à sequência de aminoácidos e ao padrão de glicosilação. Atualmente, a terapia de reposição enzimática é administrada por um medicamento chamado Cerezyme® (imiglucerase), produzido através da tecnologia do DNA recombinante utilizando culturas de células obtidas do ovário de hamster chinês. A imiglucerase difere da glucocerebrosidase natural, de origem placentária, por um aminoácido na posição 495, onde a histidina é substituída por arginina. Entretanto, o custo do medicamento disponível é muito alto, dificultando o acesso à terapia. No Brasil, há aproximadamente 600 portadores da doença e o tratamento é garantido por lei a todos os pacientes, embora os gastos com a compra do medicamento sejam muito elevados. Este custo poderia ser consideravelmente reduzido se a enzima pudesse ser produzida de forma alternativa. Estudos demonstraram que técnicas reprodutivas avançadas permitem que animais transgênicos possam ser usados como biorreatores para a produção de proteínas recombinantes de elevado potencial biológico e interesse farmacêutico. O Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento da Universidade de Fortaleza em parceria com a Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento desenvolveu o primeiro clone transgênico de cabras da América Latina cuja glândula mamária é usada como um biorreator para a produção da proteína glucocerebrosidase humana recombinante. Neste presente estudo, foi apresentado uma alternativa de purificação da enzima glucocerebrosidase a partir do leite obtido através da lactação induzida da cabra transgênica e clonada. De acordo com os resultados, pode-se criar

uma expectativa positiva para a obtenção da glucocerebrosidase através do procedimento citado ao longo deste estudo. A confirmação da presença de atividade enzimática de glucocerebrosidase foi realizada pelo ensaio fluorimétrico, Cerezyme[®] e leite da cabra controle (não transgênica) foram usados com controle positivo e negativo, respectivamente. O objetivo deste estudo foi estabelecer protocolos de purificação da enzima glucocerebrosidase a partir do leite da cabra clonada e transgênica e confirmar a atividade enzimática, avaliar a expressão da enzima por eletroforese e caracterizar a proteína recombinante através da espectrometria de massa.

Palavras-chave: Glucocerebrosidase. Doença de Gaucher. Purificação de proteínas. Espectrometria de massas. Animais transgênicos. Biorreator. Animais clonados.

ABSTRACT

Gaucher disease, first described in 1882, is a rare autosomal recessive genetic disorder characterized by a deficiency of glucocerebrosidase, an enzyme that catalyses the hydrolysis of lysosomal glucocerebroside into glucose and ceramide. The presence of two mutant alleles located on chromosome 1 q21 region confirms the diagnosis of Gaucher disease, with N370S and L444P being the most common mutations. Clinical characteristics commonly associated with Gaucher disease include hepatosplenomegaly, anemia, thrombocytopenia and bone involvement, hematological and neurological impairment in type II and III. The accumulation of mutant enzyme and subsequent depletion of normal enzyme can be treated with enzyme replacement therapy using recombinant glucocerebrosidase. Enzyme replacement therapy is quite effective in the treatment of this disease, often reversing the cascade of biochemical events that lead to clinical manifestations and improving many of the patient's signs and symptoms. There are three recombinant enzymes for enzyme replacement therapy in Gaucher disease: Velaglucerase alfa, Alfataglucerase and Imiglucerase. These enzymes differ from each other mainly in relation to the form of production, the amino acid sequence, and the glycosylation pattern. Currently, enzyme replacement therapy is administered by a drug called Cerezyme® (imiglucerase), produced by recombinant DNA technology using cell cultures obtained from Chinese hamster ovary. The imiglucerase differs from natural glucocerebrosidase, from placental origin, by an amino acid at position 495, where histidine is replaced with arginine. However, the cost of Cerezyme® is very high, hindering access to therapy. In Brazil, there are nearly 600 carriers of the disease. Although the treatment is guaranteed by law to all patients, the expenses on the purchase of the medicine are very high. The cost could be considerably reduced if the enzyme could be produced in an alternative way. Studies have shown that advanced reproductive techniques allow transgenic animals to be used as bioreactors for production of recombinant proteins of high potential biological and pharmaceutical interest. The Molecular Biology Laboratory and the development of University of Fortaleza in partnership with Quatro G developed the first Latin America transgenic goat clone, whose mammary gland is used as a bioreactor for producing recombinant protein human glucocerebrosidase. This study presented an alternative of glucocerebrosidase enzyme purification. The alternative method was achieved by using milk obtained through an induced lactation of the transgenic and cloned goat. According to the results, one can create a positive expectation for glucocerebrosidase through the procedure cited throughout this study. The confirmation of the presence of glucocerebrosidase enzyme

activity was carried out by fluorimetry test. Cerezyme[®] and goat's milk control (not genetically modified) were used with positive and negative control, respectively. The objective of this study was to establish protocols for purification of glucocerebrosidase enzyme from the cloned and transgenic goat's milk and confirm the enzyme activity, to evaluate the expression of the enzyme by electrophoresis, and to characterize the recombinant protein by mass spectrometry.

Key words: Glucocerebrosidase. Gaucher disease. Protein purification. Mass spectrometry. Transgenic animals. Bioreactor. Cloned animals.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor.

Ao meu marido, pelo companheirismo e paciência.

Ao meu orientador, pela atenção.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – A glucocerebrosidase (GC) catalisa a hidrólise da glicosilceramida em glicose e ceramida 13
- Figura 2 – A) Topologia bidimensional dos domínios glucocerebrosidase. B) Estrutura tridimensional da glucocerebrosidase mostrando o domínio I em verde, contendo duas pontes dissulfeto, átomos de enxofre mostrados como esferas laranja. O local de glicosilação em N19 é mostrado em modelo “bastões e esferas”. Domínio II é mostrado em magenta. O domínio catalítico (domínio III), que é mostrado em bege, e os sítios ativos nos resíduos E235 e E340 são mostrados como modelos “bastões e esferas” no centro da figura..... 21
- Figura 3 – Estrutura tridimensional da glucocerebrosidase. Domínio I apresentado em verde, domínio II, em magenta e domínio III, em bege. A) detalhe do domínio I; B) detalhe do domínio II; C) detalhe do domínio III; D) detalhe dos domínios II e III; E) visão geral..... 22
- Figura 4 – A) Representação esquemática da cromatografia de troca iônica, com volumes coletados no volume morto (V₀), lavado e gradiente de sal. Frações do V₀ e gradiente contendo banda de massa molecular aproximada de 70 kDa estão indicadas. B) Amostras selecionadas do V₀ analisadas por SDS-PAGE. C) Amostras selecionadas do gradiente analisadas por SDS-PAGE. D) Identificação e confirmação das bandas de interesse por Western blot. Setas indicam banda de massa molecular aproximada de 70 kDa..... 36
- Figura 5 – A) Representação esquemática da cromatografia de interação hidrofóbica, com volumes coletados no volume morto (V₀), lavado e gradiente de sal. Frações do gradiente contendo banda de massa molecular aproximada de 70 kDa estão indicadas. B) e C) SDS-PAGE das frações 9-21 e frações 41-45 do gradiente. Setas indicam banda de massa molecular aproximada de 70 kDa 37
- Figura 6 – SDS-PAGE dos pools da cromatografia de interação hidrofóbica (Octyl1-23 e Octyl41-45). Bandas de interesse (1 a 5) foram excisadas do gel para análise por espectrometria de massa..... 37
- Figura 7 – A) Eletroforese dos pools Octyl1-23 e Octyl41-45 em condições não-desnaturante. B) Western blot dos pools Octyl1-23 e Octyl41-45 em condições não-denaturantes. BSA e Cerezyme[®] (C+) foram usados como padrão de perfil de migração. Círculos e setas indicam as bandas de glucocerebrosidase 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da atividade enzimática em relação a enzima Cerezyme®	35
Tabela 2 – Identificação da glucocerebrosidase e dos principais contaminantes (albumina) nas bandas do gel analisadas por LC-MS/MS	38

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drugs Administration
GBDDL	Grupo Brasileiro de Estudos em Doença de Gaucher e outras Doenças de Depósito Lisossômico
ICGG	International Collaborative Gaucher Group
OMIM	Online Medelian Inheritance in Man
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UNIFOR	Universidade de Fortaleza

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A DOENÇA DE GAUCHER	13
1.2	CLASSIFICAÇÃO	14
1.3	TRANSMISSÃO	14
1.4	DIAGNÓSTICO	14
1.5	TRATAMENTO.....	15
1.5.1	Terapia de reposição enzimática	16
1.5.1.1	<i>Histórico</i>	16
1.5.1.2	<i>Enzimas</i>	17
1.5.1.2.1	Alglucerase - Ceredase®	17
1.5.1.2.2	Velaglucerase alfa - VPRIV®	18
1.5.1.2.3	Alfataliglucerase - ELELYSO® (UPLYSO™)	18
1.5.1.2.4	Imiglucerase - Cerezyme®	19
1.6	GLUCOCEREBROSIDASE - EC 3.2.1.45	19
1.7	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	23
1.8	TECNOLOGIA ALTERNATIVA DE PRODUÇÃO DA GLUCOCEREBROSIDASE	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	PADRÃO DE GLUCOCEREBROSIDASE E AMOSTRA DE LEITE.....	30
4.2	ENSAIO FLUORIMÉTRICO	30
4.3	PRECIPITAÇÃO DA CASEÍNA	30
4.4	CROMATOGRAFIA	31
4.4.1	Cromatografia de troca iônica	31
4.4.2	Diálise.....	31
4.4.3	Cromatografia de Interação hidrofóbica	31
4.5	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E WESTERN BLOT.....	32
4.6	ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	32
4.6.1	Digestão em gel	32

4.6.2	LC-MS/MS	33
4.6.3	Análise de dados	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
6	PERSPECTIVAS.....	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

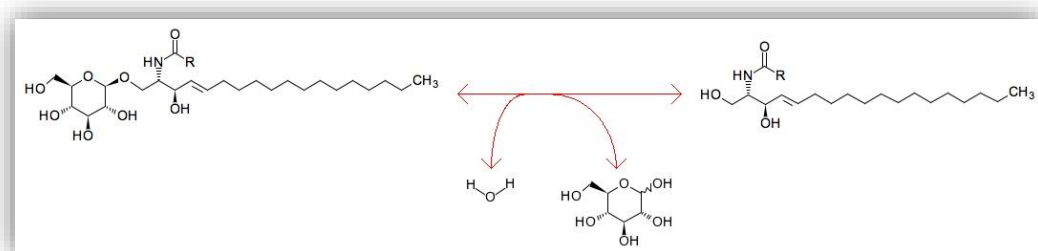
1.1 A DOENÇA DE GAUCHER

Descrita pela primeira vez em 1882 por Phillippe Gaucher, a doença de Gaucher pertence ao grupo de doenças metabólicas hereditárias e leva ao acúmulo de glucocerebrosídeo no interior dos lisossomos do sistema retículo-endotelial, devido à ausência ou à deficiência da enzima glucocerebrosidase (beta-D-glicosil-N-acilesfingosina glicohidrolase - EC 3.2.1.45). Este erro inato do metabolismo é causado por mutações no gene que codifica esta enzima que é responsável pela degradação de glucocerebrosídeo em glicose e ceramida no lisossomo (Figura 1) (BEUTLER, 1988; DVIR et al., 2003).

A incidência é relatada como rara, porém, dentre as doenças raras autossômicas, a doença de Gaucher apresenta maior incidência (1:20000 recém-nascidos vivos) (AERTS et al., 1985; DEEGAN; COX, 2012; GINNS et al., 1985; PASMNIK-CHOR et al., 1997). O diagnóstico precoce e o tratamento adequado podem reverter sintomas agudos e prevenir danos crônicos (DEEGAN; COX, 2012). Dados constataam que existem cerca de 6000 pacientes no mundo portadores da doença de Gaucher (DEEGAN; COX, 2012). O Ministério da Saúde, no seu último levantamento, realizado em 2014, constatou que há cerca de 600 pacientes com doença de Gaucher em tratamento com terapia de reposição enzimática no Brasil (INSTITUTO BARESI, c2013).

Os pacientes com doença de Gaucher são, geralmente, divididos em três tipos de acordo com os sinais e sintomas clínicos apresentados; as manifestações clínicas são variadas e, às vezes, até assintomáticas, sendo as mais comuns a hepatosplenomegalia, trombocitopenia, anemia, infecções recorrentes, alterações ósseas incluindo fraturas e osteoporose (HODANOVA et al., 2003; MICHELIN et al., 2005; MONTFORT et al., 2004).

Figura 1 – A glucocerebrosidase (GC) catalisa a hidrólise da glicosilceramida em glicose e ceramida



Fonte: GenomeNet Database Resources ([s.d.]).

1.2 CLASSIFICAÇÃO

A doença de Gaucher do tipo I (Online Medelian Inheritance in Man [OMIM] #230800) é a mais comum, sendo caracterizada pelo quadro visceral (hepatoesplenomegalia), envolvimento ósseo e hematológico (anemia, plaquetopenia), e ausência de comprometimento neurológico. No tipo II (OMIM#230900), as manifestações clínicas são muito precoces e há comprometimento neurológico importante e grave. A doença do tipo III (OMIM#231000) é semelhante ao tipo II, porém menos precoce e menos grave (GRABOWSKI et al., 1995; WENGER; OLSON, 1981, ZHAO; BAILEY; GRABOWSKI, 2003).

1.3 TRANSMISSÃO

A transmissão da doença de Gaucher tem caráter autossômico recessivo e a alteração genética está localizada no cromossomo 1q21 (BRADY; BARTON, 1996). As mutações mais comuns são N370S e L444P. A mutação N370S consiste na mudança da base adenina para guanina na posição 1226 do cDNA, mudando o aminoácido asparagina para serina na posição 370 do polipeptídeo (BEUTLER, 1992; COX, 2001). Trata-se de uma mutação de efeito leve; sua presença garante um fenótipo de tipo I, provavelmente devido à alta atividade residual e estabilidade da proteína no lisossomo. Em homozigose, observa-se um amplo espectro clínico, que varia desde a ausência de sintomas até uma doença de manifestação infantil, multissistêmica, incluindo graves alterações ósseas (BRADY; BARTON, 1996). A mutação L444P decorre de uma alteração da base timina para citosina na posição 1448 do cDNA, mudando o aminoácido leucina para prolina na posição 444 do polipeptídeo (MICHELIN et al., 2005; MONTFORT et al., 2004; PASMNIK-CHOR et al., 1997). Essa mutação, de efeito grave, leva a uma enzima cataliticamente ativa, porém instável, apresentando, assim, uma baixa atividade residual (DVIR et al., 2003; HODANOVA et al., 2003).

1.4 DIAGNÓSTICO

No Brasil, o método de escolha para o diagnóstico da doença de Gaucher é a medida da atividade da enzima glucocerebrosidase por ensaio fluorimétrico em leucócitos do sangue periférico e, em casos duvidosos, a alternativa é medir a atividade da enzima em fibroblastos ou fazer análise detalhada do gene GBA (SOBREIRA et al., 2007).

O ensaio fluorimétrico é o método de escolha para testar a atividade enzimática por se destacar na rapidez além de apresentar alta especificidade, alta sensibilidade, baixo limite de detecção, quantificação automática da atividade da enzima e registro impresso. No entanto, apresenta a desvantagem de possuir alto custo por análise, pois todos eles são importados e fornecidos unicamente pela *Advanced Instruments*, detentora da patente do método (FENOLL; JOURQUIN; KAUFFMANN, 2002; ROCCO, 1990).

Como as mutações L444P e N370S correspondem à maioria dos alelos dos pacientes brasileiros, a presença dos genótipos N370S/N370S, N370S/L444P e L444P/L444P confirma o diagnóstico para doença de Gaucher (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). No entanto, a maioria dos homozigotos N370S/N370S não apresenta nenhum sintoma ou tem manifestação clínica pouco ominosa (SIBILLE et al., 1993).

1.5 TRATAMENTO

Em 1992, a agência norte-americana *Food and Drugs Administration* (FDA) aprovou a terapia de reposição enzimática para a doença de Gaucher. O *International Collaborative Gaucher Group* recomenda doses iniciais entre 30 a 60 U/kg a cada duas semanas e redução escalonada para a manutenção com dose mínima entre 20 e 30 U/kg a cada duas semanas. O *Gaucher Registry* do *International Collaborative Gaucher Group* (ICGG), patrocinado pela *Genzyme Corporation*, é o maior registro observacional de colaboração sobre a doença de Gaucher, possui pesquisadores que relatam que as doses baixas aplicadas rotineiramente não implicam necessariamente repercussão clínica para os pacientes, mas têm um alto impacto econômico entre os esquemas utilizados (ANDERSON; CHARROW; KAPLAN, 2005; ZIMRAN; ELSTEIN; BEUTLER, 2006). O uso de doses baixas (15 U/kg/mês), fracionadas em três infusões por semana, são as mais recomendadas; a partir das observações das doses e respostas terapêuticas foi comprovado que a enzima apresenta maior facilidade de ligar-se aos receptores dos macrófagos. A resposta a este esquema de dose parece ser um pouco inferior à obtida com 30 U/kg/mês (BEUTLER, 2006).

Para manifestações clínicas na infância, a situação é tratada com peculiaridade. A progressão rápida dos sintomas e a maior gravidade da doença nestes pacientes os tornam elegíveis para doses maiores. Nestes casos, tanto o Consenso Americano como o Internacional recomendam doses iniciais de 30 a 60 U/kg a cada duas semanas (BALDELLOU et al., 2004; CHARROW et al., 2004).

Pela necessidade de um protocolo brasileiro, em 2002, uma reunião de médicos de diversas especialidades e de diferentes partes do país criou o grupo intitulado Grupo Brasileiro de Estudos em Doença de Gaucher e outras Doenças de Depósito Lisossômico (GBDDL) para escrever o primeiro Consenso Brasileiro para Tratamento de Doença de Gaucher (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). No mesmo período, o Ministério da Saúde lançou o Protocolo Clínico e as Diretrizes Terapêuticas para Doença de Gaucher (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Em comum, os três protocolos recomendam que doentes com manifestações graves recebam maior quantidade de enzima que os menos sintomáticos e que todos os doentes sejam monitorizados periodicamente para reavaliar a dose e eficácia da terapia (BLUE CROSS AND BLUE SHIELD OF MASSACHUSETTS MEDICAL POLICY, 1997). Os três protocolos diferem em relação à dose mínima para adultos e crianças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Por fim, todos os órgãos de saúde responsáveis apontam a terapia de reposição enzimática como o tratamento a ser implementado no pacientes com doença de Gaucher (ROSENBERG; CHARGAFF, 1956; ZIMRAN et al., 1994).

1.5.1 Terapia de reposição enzimática

1.5.1.1 Histórico

A alta incidência da doença, quando comparada a outras desordens geneticamente determinadas, mais a possibilidade de reverter muitas das manifestações clínicas fizeram da doença de Gaucher uma das desordens metabólicas herdadas mais conhecidas e protótipo para estudos terapêuticos diversos. A possibilidade de infusão da enzima glucocerebrosidase exógena foi sugerida pela primeira vez em 1964 (DE DUVE, 1964; OWADA; SAKIYAMA; KITOGAWA, 1997; WENGER; OLSON, 1981).

A reposição da enzima possibilita a conversão do substrato em seu produto, diminuindo o acúmulo do glucocerebrosídeo e, conseqüentemente, o desenvolvimento de toda a cascata de eventos bioquímicos que acabam por ocasionar as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes (COX, 2001; JMOUDIAK; FUTERMAN, 2005).

As três enzimas recombinantes para a terapia de reposição enzimática na doença de Gaucher (velaglucerase alfa, alfataliglucerase e imiglucerase) diferem entre si principalmente em relação à forma de produção, à sequência de aminoácidos e ao padrão de glicosilação, porém as estruturas cristalográficas das três enzimas são bastante similares. Não existem

estudos comparando as três enzimas recombinantes para tratamento da doença de Gaucher (GORDON et al., 1980; HAMMER et al., 1985; HEITNER; ARNDT; LEVIN, 2004; PALMITER et al., 1982).

1.5.1.2 Enzimas

Alguns passos foram decisivos no desenvolvimento de enzimas que desencadeou no progresso em pesquisas para o tratamento da doença de Gaucher. Os primeiros registros sobre a enzima glucocerebrosidase e a doença de Gaucher foram na descrição da tese de doutorado de Philippe Gaucher em 1882; Beutler obteve sucesso na clonagem o gene da glucocerebrosidase em 1984 (BEUTLER, 1988); em 1991, após longos anos de trabalho, pesquisadores conseguiram purificar a enzima placentária (alglucerase, com manose terminal, garantindo sua incorporação pelos macrófagos) que se mostrou eficaz no tratamento da doença tipo I (BRADY; BARTON, 1996); em 1994, foi desenvolvida uma glucocerebrosidase recombinante, produzida em culturas de células de ovário de hamster chinês, a imiglucerase, que substituiu com vantagens a anterior (GRABOWSKI et al., 1995). Para o tratamento tornar-se efetivo, muitas descobertas foram necessárias, entre as quais: a importância de direcionar a enzima aos macrófagos, o desenvolvimento de um processo efetivo para a purificação da glucocerebrosidase, a descoberta de receptores de manose nos macrófagos (FURBISH et al., 1977; PLATT; BUTTERS, 2000), o direcionamento da glucocerebrosidase através de modificação dos açúcares e o tratamento da glucocerebrosidase com glicosidades específicas para expor as manoses (ACHORD et al., 1978; FURBISH et al., 1981).

1.5.1.2.1 Alglucerase - Ceredase®

Apenas na década de 90, obteve-se a aprovação da primeira droga para tratamento da doença de Gaucher, esta extraída de placentas humanas (fornecidas comercialmente como Alglucerase, Ceredase®), tendo o início da terapia de reposição enzimática para portadores da doença. Eram necessárias aproximadamente 10 a 12 toneladas, ou cerca de 50.000 placentas humanas, para extração de enzima suficiente para o tratamento anual de apenas um paciente (BRADY; BARTON, 1996; GRABOWSKI et al., 1995). O custo da Ceredase® era muito maior do que o de outros medicamentos. Entidades financiadoras em muitos países foram incapazes de apoiar a sua utilização, tornando a aplicação da enzima onerosa para os órgãos

financiadores, baseado neste contexto, houve um imenso incentivo da Genzyme em desenvolver um medicamento potencialmente mais seguro, com controle de qualidade consistente e disponibilidade de oferta com custos menores de produção. O tratamento (e a oferta) de glucocerebrosidase placentária humana foi mantido ao longo vários anos até que seu sucessor, o produto recombinante Cerezyme, obtido a partir células de ovário de hamster chinês geneticamente modificada, ser desenvolvido e aprovado para ser introduzido no mercado internacional em 1995 (DEEGAN; COX, 2012).

1.5.1.2.2 Velaglucerase alfa - VPRIV®

Em 2007, a substância medicamentosa velaglucerase alfa (VPRIV®, Velaglucerase alfa injetável - Shire Human Genetic Therapies, Inc, MA, USA), produzida por tecnologia de ativação de genes em uma linhagem celular humana de fibroblastos HT-1080, foi desenvolvida como uma alternativa de terapia de reposição enzimática (BURROW; GRABOWSKI, 2011). A linhagem HT-1080 é uma linhagem humana derivada de fibrosarcoma, com um fenótipo do tipo epitelial, que tem sido usada pela empresa Shire para produzir proteínas terapêuticas comerciais, dentre elas a VPRIV®. A velaglucerase alfa é uma glicoproteína cujo monômero é de aproximadamente 63 kDa e possui 497 aminoácidos com a mesma sequência que a enzima humana de ocorrência natural, a glucocerebrosidase (BRUMSHTEIN et al., 2010; BURROW; GRABOWSKI, 2011; Xu et al., 2010). A velaglucerase alfa é fabricada para conter glicanos predominantemente ricos em manose, para facilitar a interiorização da enzima pelas células fagocitárias alvo através do receptor de manose. Entre 2007 e 2009, esta substância foi usada como alternativa na terapia de reposição enzimática nos pacientes com doença de Gaucher (MELLADO; CASTILHO, 2007).

1.5.1.2.3 Alfataliglucerase - ELELYSO® (UPLYSO™)

Em maio de 2012, a FDA concedeu a aprovação de um medicamento para infusão intravenosa chamado ELELYSO®, conhecido na América Latina como UPLYSO™ (alfataliglucerase) e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em março de 2013. A alfataliglucerase é uma forma recombinante da glucocerebrosidase humana expressa em culturas de células vegetais. Esta forma recombinante ativa da enzima lisossômica humana é expressa em um sistema de biorreator descartável de células da raiz da planta de cenoura geneticamente modificadas em suspensão, que a partir do processo

produzem estruturas de manose terminais para macrófagos alvo (ALTARESCU et al., 2000; CHARROW et al., 2004; GRABOWSKI, 2005; HEITNER; ARNDT; LEVIN, 2004).

1.5.1.2.4 Imiglucerase - Cerezyme[®]

Atualmente, a terapia de reposição enzimática é administrada por um medicamento chamado Cerezyme[®] (imiglucerase), produzido através da tecnologia do DNA recombinante utilizando culturas de células de mamíferos (obtidas do ovário de hamster chinês). A imiglucerase difere da glucocerebrosidase natural, de origem placentária, por um aminoácido na posição 495, onde a histidina é substituída por arginina (DVIR et al., 2003; HEITNER; ARNDT; LEVIN, 2004). As cadeias de oligossacarídeos nos sítios de glicosilação são enzimaticamente modificados de maneira a terminarem com resíduos de manose (BRUMSHTEIN et al., 2010; XU et al., 2010). Estas cadeias de oligossacarídeos terminando em manose são especificamente reconhecidas e captadas por receptores endocíticos para manose localizados nos macrófagos, que acumulam glucocerebrosídeo na doença de Gaucher (BERG-FUSSMAN et al., 1993). A preparação farmacêutica da enzima Imiglucerase produzida para a fabricação do Cerezyme[®] está descrita detalhadamente e protegida pela *Genzyme Corporation in United States* sob a patente nº 5.549.892 e 5.236.838.

1.6 GLUCOCEREBROSIDASE - EC 3.2.1.45

A glucocerebrosidase é uma hidrolase lisossômica solúvel que está associada à membrana. A glicoproteína madura é composta por 497 aminoácidos, derivados de 516 ou 536 resíduos incluindo as sequências líder, que são removidas durante a passagem pelo retículo endoplasmático (BEUTLER; GELBART; WEST, 1993; HOROWITZ et al., 1998). A sequência de aminoácidos da glucocerebrosidase parece ser não variável, não existindo polimorfismos funcionais, com exceção das mutações responsáveis pela doença de Gaucher (ALATTIA et al., 2007; LIOU et al., 2006, GRABOWSKI; HOROWITZ, 1997).

O transporte da glucocerebrosidase até a membrana do retículo endoplasmático rugoso requer um peptídeo sinal, que é removido na fase de maturação da enzima. Como o gene GBA possui dois códons ATG iniciadores funcionais, a sequência removida pode ser de 39 ou de 19 aminoácidos (SORGE et al., 1987). A glucocerebrosidase recém-sintetizada é transportada ao lisossomo por uma via dependente de manose, sendo a glicosilação da enzima crítica para esse transporte e para o desenvolvimento e manutenção da conformação

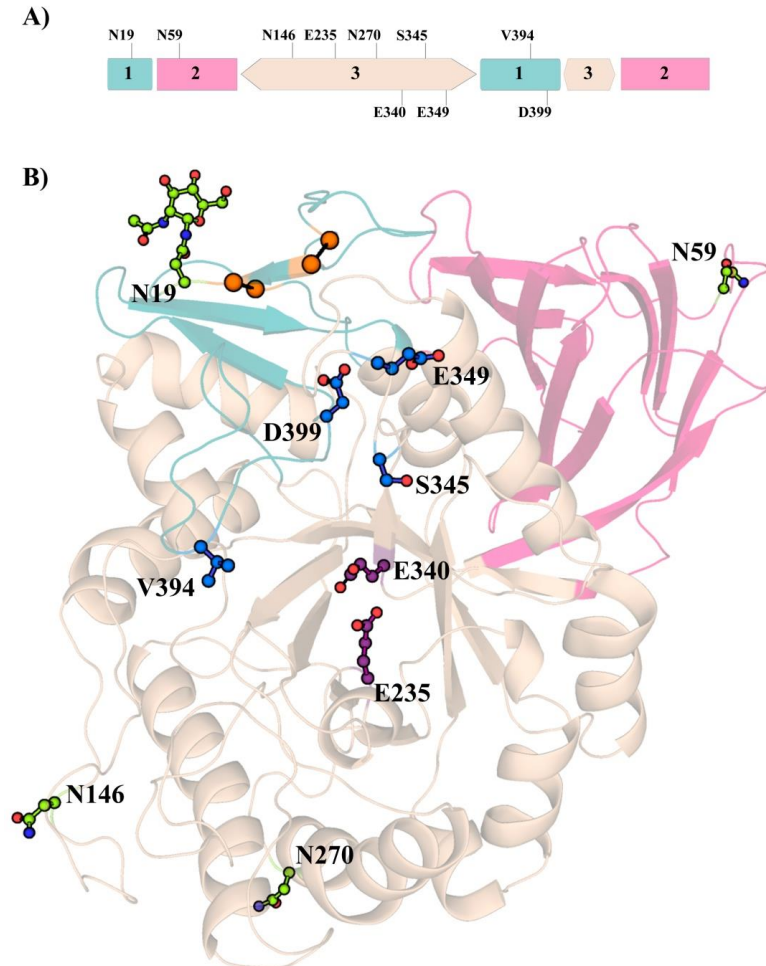
cataliticamente ativa da enzima, pois quando recém-sintetizada é levada para os lisossomos via receptores de manose-6-fosfato e rotas independentes de oligossacarídeos (BERGFUSSMAN et al., 1993; LIOU et al., 2006; RIJNBOUTT et al., 1991). A enzima apresenta cinco sítios de *N*-glicosilação, porém somente os quatro primeiros são utilizados (N19, N59, N146 e N270) (Figura 2B) (ERICKSON; GINNS; BARRANGER, 1985).

Uma vez no lisossomo, a glucocerebrosidase possui meia-vida de 60 horas em fibroblastos, sendo seu principal substrato a glicosilceramida (GINNS et al., 1985). O ciclo catalítico da glucocerebrosidase possui um mecanismo de reação em duas etapas, sendo elas a glicosilação dos sítios ativos pelo substrato e a subsequente desglicosilação com a liberação de uma β -glicose. O nucleófilo neste sítio ativo é o E340 e o ácido/base é o E235. A ligação *O*-glicosídica do substrato é protonada pelo E235 e, logo depois, ela é atacada pelo E340. A glicose torna-se covalentemente ligada à enzima e o grupo de saída, a ceramida, é removido. Em seguida, o complexo enzima-glicose resultante é hidrolisado e uma segunda substituição nucleofílica no carbono anomérico gera um produto com a mesma estereoquímica do substrato. Isso acontece devido à desprotonação da água pelo E235 e ao ataque do complexo enzima-glicose pela hidroxila, liberando o E340 e a β -glicose (BECK, 2010; PREMKUMAR et al., 2005).

A proteína apresenta três domínios. O domínio I é formado pelos aminoácidos 1 a 27 e 383 a 414 (Figura 2B, em verde). Ele contém duas pontes dissulfeto (aminoácidos 4-16 e 18-23) que são necessárias para a estrutura terciária da proteína. O domínio II é formado pelos aminoácidos 30-75 e 431-497 (Figura 2B, em magenta) e tem estrutura similar a de uma imunoglobulina. O primeiro e o segundo domínios possuem função regulatória ou estrutural. O domínio III é formado pelos aminoácidos 76-381 e 416-430 (Figura 2B, em bege) apresentando o sítio catalítico, formado pelos aminoácidos E235 e E340 (DVIR et al., 2003; LIOU et al., 2006; PREMKUMAR et al., 2005). Os domínios II e III parecem estar conectados por uma dobra flexível, ao passo que o domínio I interage estreitamente com o domínio III, conforme mostrado na Figura 3.

Figura 2 – A) Topologia bidimensional dos domínios glucocerebrosidase. B) Estrutura tridimensional da glucocerebrosidase mostrando o domínio I em verde, contendo duas pontes dissulfeto, átomos de enxofre mostrados como esferas laranja. O local de glicosilação em N19 é mostrado em modelo “bastões e esferas”.

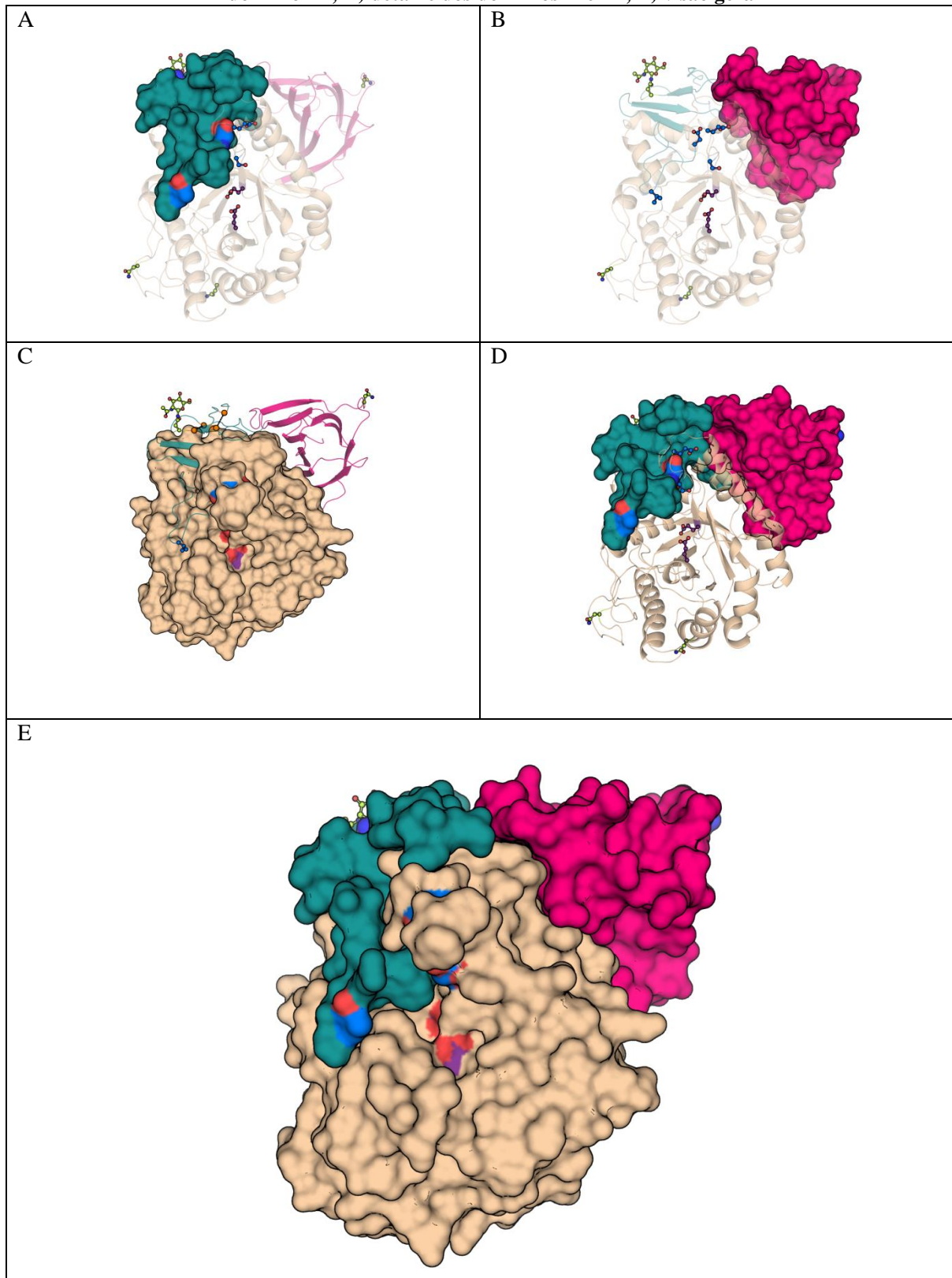
Domínio II é mostrado em magenta. O domínio catalítico (domínio III), que é mostrado em bege, e os sítios ativos nos resíduos E235 e E340 são mostrados como modelos “bastões e esferas” no centro da figura



Fonte: RCSB Protein Data Bank (2003).

O estudo mais detalhado da enzima possibilitou analisar as propriedades de duas alças próximas aos sítios ativos da proteína, formadas pelos aminoácidos 345 a 349 e 394 a 399, mostrando que essas alças funcionam como uma tampa para o acesso aos sítios ativos (ERICKSON; GINNS; BARRANGER, 1985). As mutações já descritas podem impedir parcial ou totalmente a atividade catalítica da proteína, ou interferir na sua estabilidade (BEUTLER, 1992; BRADY; BARTON, 1996). Aparentemente, não existe uma distribuição espacial preferencial das mutações entre os diferentes domínios da proteína. As mutações com distribuição homogênea nos diferentes domínios são de efeito leve e grave, no entanto, as mutações na região próxima aos sítios ativos da enzima apresentam efeito grave, provavelmente por impedir diretamente a atividade catalítica (CONNOCK et al., 2006).

Figura 3 – Estrutura tridimensional da glucocerebrosidase. Domínio I apresentado em verde, domínio II, em magenta e domínio III, em bege. A) detalhe do domínio I; B) detalhe do domínio II; C) detalhe do domínio III; D) detalhe dos domínios II e III; E) visão geral



Fonte: adaptado de Dvir et al. (2003) e RCSB Protein Data Bank (2003).

LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein type 2*) é uma proteína lisossômica transmembrana altamente *N*-glicosilada. Como principal função da LIMP-2, destaca-se o endereçamento da glucocerebrosidase para o lisossoma (BLANZ et al., 2005; BUSSINK et al., 2006; SHAALTIEL et al., 2007). A interação da glucocerebrosidase com a LIMP-2 acontece cedo no processo de tráfego de enzimas lisossômicas, já no retículo endoplasmático (CALVO; DOPAZO; VEGA, 1995; FUJITA et al., 1992). As proteínas LIMP-2 nos lisossomos de macrófagos reconhecem a enzima recombinante de forma dependente de manose, portanto só quando as modificações após o isolamento da enzima recombinante incluíram a exposição de resíduos de manose, a terapia de reposição enzimática obteve eficiência clínica (BARTON et al., 1990; PASTORES; BARNETT, 2005).

1.7 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A purificação de proteínas é essencial para a caracterização da função, estrutura e interações de uma proteína de interesse. O desenvolvimento de técnicas e métodos para purificação de proteínas têm sido um pré-requisito essencial para muitos dos avanços feitos na área de biotecnologia (BLINKS; PRENDERGAST; ALLEN, 1976).

O desenvolvimento de técnicas e métodos para separação e purificação de macromoléculas biológicas, tais como proteínas, tem sido um pré-requisito importante para muitos dos avanços feitos na biociência e biotecnologia nas últimas décadas. Melhoria em materiais e utilização de instrumentos computadorizados fizeram da separação de proteínas uma técnica mais previsível e controlável. No entanto, foram-se os dias em que um investigador tinha que passar meses na busca de uma rota eficiente para purificar uma enzima ou hormônio de um extrato celular. Isto é uma consequência do desenvolvimento de cromatografias com crescente eficiência e seletividade assim como novos sistemas de cromatografia automatizados fornecidos com pacotes de software e banco de dados de interatividade sofisticada. Novas técnicas e sistemas de eletroforese para análises rápidas de composição e pureza de proteínas também contribuíram para o aumento da eficiência da fase de avaliação do processo de purificação (SCOPES, 1994; WARD; SWIATEK, 2009).

No campo da cromatografia, o desenvolvimento de novos suportes de resina porosa permitiu rápido crescimento em técnicas de alta resolução, ambas em uma escala preparativa e analítica. Adsorção de leito expandido permite rápido isolamento de proteínas alvo, diretamente de culturas de células completas ou homogenatos celulares. Outro campo de crescente importância é cromatografia micropreparativa, uma consequência dos métodos

modernos para análise de aminoácidos e sequenciamento que exigem submicrogramas de amostras. (DENNISON; LOYRIEN, 1997; MATTHEWS; HORI; CORNIER, 1977; ROTH, 1985).

Uma ampla variedade de materiais para preenchimento da coluna cromatográfica, tal como meios de filtração em gel, permutadores de íons, fase reversa, adsorventes de interação hidrofóbica e adsorventes de afinidade cromatográficas, estão hoje comercialmente disponíveis. Estes são identificados como meios de diâmetro maiores (90 - 100 µm), meios de diâmetro médio (30 - 50 µm) e meios de diâmetro pequeno (5 - 10µm) a fim de satisfazer os diferentes requisitos de eficiência, capacidade e custo (KARKHANIS; CORMIER, 1971; WARD, 2005; 2012).

No entanto, nem todos os problemas em purificação de proteínas são resolvidos por meio da aquisição de equipamentos de laboratórios e sofisticados e embalagens de colunas que oferecem alta seletividade e eficiência. Dificuldades ainda existem na descoberta de condições para extração de proteínas e pré-tratamento de amostras, bem como na escolha de métodos adequados para monitoramento de concentração de proteínas e atividades biológicas (CHEUNG, 1971).

A escolha da matéria prima, na maioria dos casos, está focada na atividade biológica que o material poderá oferecer. Métodos de extração devem ser cuidadosamente determinados previamente através de um protocolo o qual deverá ser seguido e aprimorado e/ou ajustado mediante o progresso do processo. Fatores como pH, solubilidade, a escolha do tampão a ser usado e temperatura são parâmetros que devem ser considerados de suma importância na etapa de extração para que se obtenha sucesso nas técnicas de fracionamento (precipitação, eletroforese e cromatografia) (DENNISON; LOYRIEN, 1997; MATTHEWS; HORI; CORNIER, 1977; ROTH, 1985). A concepção adequada de um método de extração requer, portanto, experimentos preliminares em que alíquotas são tomadas em vários intervalos de tempo para analisar a atividade e teor de proteína (ROTH, 1985).

1.8 TECNOLOGIA ALTERNATIVA DE PRODUÇÃO DA GLUCOCEREBROSIDASE

Muitos produtos de uso clínico são proteínas ou polipeptídeos recombinantes, obtidos através de organismos geneticamente modificados. A produção destas proteínas requer um alto grau de pureza e o desenvolvimento de um processo efetivo de purificação, devido a isso a metodologia aplicada no processo de purificação deve incluir várias etapas baseadas nas

suas propriedades físico-químicas e propriedades biológicas (COLLARES et al., 2005; VISSERS; LANGRIDGE; AERTS, 2007).

Estudos demonstraram que técnicas reprodutivas avançadas permitem que animais transgênicos possam ser usados como biorreatores para a produção de proteínas recombinantes de elevado potencial biológico e interesse farmacêutico para a saúde humana (BALDASSARRE et al., 2003; BODROGI et al., 2006; ZHAO; BAILEY; GRABOWSKI, 2003). Esta alternativa possibilita um rápido crescimento e avanço tecnológico da biotecnologia, o que proporciona uma vasta expansão na área de pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos expressados em uma gama de polipeptídeos em diferentes sistemas biológicos direcionados para tratamentos de doenças raras que necessitam de terapia de reposição enzimática (COLLARES et al., 2005; MALAJOVICH, 2012; WALSH, 2002).

O uso da tecnologia de transgênicos em cabras oferece uma vantagem significativa em relação às ovelhas, visto que são produtoras de leite mais eficientes (500 a 1000 litros de leite por lactação) e, comparadas com as vacas, oferecem menor custo de manutenção, maturidade sexual mais cedo e menor tempo de gestação. Portanto, cabras são animais próprios para a produção de proteínas recombinantes requeridas na magnitude de várias centenas de quilogramas por ano após os processos de purificação (ANDERSEN; KRUMMEN, 2002; HOUDEBINE, 2004).

Fluidos corporais de mamíferos, especialmente o leite, têm sido evidenciados, atualmente, com uma grande importância para a produção de proteínas recombinantes bioativas. O tecido mamário é capaz de realizar modificações pós-traducionais (eventos de processamento covalente que mudam as propriedades das proteínas por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos) complexas como glicosilação e carboxilação (KEEFER, 2004). A possibilidade de animais transgênicos expressarem proteínas em determinados órgãos os torna viáveis como biorreatores e biofábricas. A glândula mamária representa um dos melhores modelos de biorreatores animais por alcançar uma produção elevada de volume de leite para extração do produto biotecnológico de interesse (MORITA et al., 2004).

Os custos de purificação de um produto biotecnológico podem variar de 20-80% do total do processo, e dependerão exclusivamente do fluido usado para obtenção do produto biotecnológico (WALSH, 2002). A purificação de biomoléculas, desta forma, poderá ditar a viabilidade econômica do processo produtivo. Atualmente, existem vários processos conhecidos de purificação de biomoléculas e a seleção ou combinação das melhores técnicas pode ser decisiva para o processo produtivo. Desta maneira, o conhecimento dos fundamentos

teóricos das técnicas de purificação oferecerá novas opções para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos, como os biofármacos (HOUDEBINE, 2004; WALL et al., 1999).

Somente nas glândulas mamárias a manipulação de proteínas recombinantes não apresentou nenhum problema para o animal. Além disso, o fato destas estarem constantemente produzindo leite faz com que se tornem uma fonte inesgotável para a produção das proteínas de interesses medicinais. Assim, a produção delas em biorreatores vivos torna-se mais vantajosa do que em laboratórios (BODROGI et al., 2006; COLLARES et al., 2005).

Em resumo, vemos que os biofármacos a partir de biorreatores vivos são técnicas com baixo investimento de capital que resultam em produtos seguros para o consumidor. Além disso, possuem uma grande facilidade de estocagem e transporte, além, é claro, de serem medicamentos mais baratos, tanto para o governo como para a população e com a vantagem de produção em larga escala (LINDSAY et al., 2004; POLLOCK et al., 1999).

No Brasil, algumas instituições como a Embrapa, o Instituto Butantan, Biomanguinhos, e algumas Universidades espalhadas pelos estados brasileiros, já adentraram nesse mercado de biofármacos. Contudo, sua técnica é voltada ainda para a produção de biofármacos em células em cultivo ou em bactérias. Embora alguns institutos como a Embrapa, Universidade Estadual do Ceará (UECE) e a Universidade de Fortaleza (UNIFOR) já estejam produzindo em seus laboratórios animais transgênicos e a tentar utiliza-los como biofábricas, a introdução destas técnicas de biorreatores vivos no Brasil ainda é muito incipiente. Essa problemática se deve a inúmeros fatores de ordem econômica, devido aos altos custos para a compra e manutenção dos equipamentos necessários para as técnicas de transgenia, educacional, no que diz respeito à especialização de profissionais para atuarem nessa área e legislativa, uma vez que o Brasil é um dos países com mais regras e questões burocráticas com relação a área da saúde e da biotecnologia (HOUDEBINE, 2004; HYVÖNEN et al., 2006; LINDSAY et al., 2004; POLLOCK et al., 1999).

Novas abordagens para a análise proteômica quantitativa e qualitativa por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) estão sendo aplicadas para o estudo de expressão de proteína para desenvolvimento de novos fármacos. Como uma alternativa complementar a métodos de quantificação, a LC-MS surgiu para identificar e quantificar peptídeos e proteínas em misturas de várias complexidades (TANG et al., 2012; VISSERS; LANGRIDGE; AERTS, 2007). A robustez da técnica analítica de LC-MS para a caracterização de proteínas em relação aos demais métodos diferencia-se por sua agilidade (resultados possíveis em minutos), precisão na determinação de grandes massas moleculares e

confiabilidade da técnica (WILKINS et al., 1997). Possibilita a resolução de diversos problemas, tais como: identificação de proteínas, determinação da fidelidade e homogeneidades de proteínas recombinantes, identificação e determinação de glicosilações e outras modificações pós-traducionais e sequenciamento de proteínas e peptídeos em larga escala (SIUZDAK, 1996). O espaço que a LC-MS detêm como ferramenta padrão é uma estratégia utilizada por diversos e avançados grupos de pesquisas (SIMPSON, 2003; WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

Em virtude do exposto, a assertividade da técnica escolhida para purificação e quantificação possibilita a utilização confiante de compostos complexos, produzidos por meios que não a extração direta de fontes naturais, com finalidade terapêutica ou para diagnóstico *in vivo*. Assim, o composto alvo em combate a doença de Gaucher, o biofármaco glucocerebrosidase extraída da glândula mamária de cabra transgênica e clonada, com a sequência de aminoácidos idêntica à proteína humana nativa se enquadra na definição de Keefer (2004).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é totalmente dependente da importação da proteína glucocerebrosidase recombinante, e o Ministério da Saúde gasta entre R\$ 180 milhões e R\$ 250 milhões por ano com a importação do biofármaco para o tratamento dos pacientes com a doença de Gaucher registrados (em torno de 600 pacientes). A doença, apesar de ser considerada rara e de carácter recessivo, é uma das que mais geram despesas ao sistema de saúde pública do país. Este projeto representa um avanço significativo e singular para a produção nacional da glucocerebrosidase humana em animais transgênicos, o que resultará em um medicamento com menor custo e mais acessível para os portadores da doença de Gaucher.

O Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento da UNIFOR em parceria com a Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento (empresa sediada no parque tecnológico da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, em Porto Alegre) desenvolveu o primeiro clone transgênico de cabras da América Latina cuja glândula mamária é usada como um biorreator para a produção da proteína glucocerebrosidase humana recombinante. A autonomia brasileira para o enfrentamento da doença de Gaucher ratifica a nossa capacidade de projetar, desenvolver, estabelecer as técnicas (produção e qualidade) e atingir o consumidor final, promovendo qualidade de vida significativa para os pacientes

portadores desta enfermidade que atualmente dependem exclusivamente da importação do medicamento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar a enzima β -glucocerebrosidase humana presente no leite produzido por um clone caprino transgênico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) confirmar a atividade enzimática da glucocerebrosidase produzida no leite da cabra clonada e transgênica através de ensaios fluorimétricos;
- b) estabelecer protocolos de purificação da glucocerebrosidase a partir do leite da cabra clonada e transgênica;
- c) avaliar a expressão da glucocerebrosidase no leite da cabra clonada e transgênica por eletroforese e western blot;
- d) caracterizar a proteína recombinante por espectrometria de massa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PADRÃO DE GLUCOCEREBROSIDASE E AMOSTRA DE LEITE

O padrão utilizado para controle positivo nas análises de eletroforese, western blot e espectrometria de massas foi a enzima imiglucerase (glucocerebrosidase), obtida por recombinação genética e marcada para o macrófago, Cerezyme[®] (ATC: A16AB02). As amostras utilizadas no procedimento foram obtidas através da lactação induzida da cabra transgênica e clonada pela UNIFOR desenvolvida para secretar leite contendo a enzima humana glucocerebrosidase tendo a glândula mamária como biorreator.

4.2 ENSAIO FLUORIMÉTRICO

Para a determinação da atividade específica da enzima glucocerebrosidase, seguiu-se o protocolo adaptado de Sa Miranda et al. (1990). Amostras de leite bruto da cabra clonada e transgênica, leite bruto de cabra controle (controle negativo) e Cerezyme[®] (controle positivo) foram submetidos a ensaios fluorimétricos usando 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside como substrato artificial em espectrômetro de fluorescência (Spectra Max M2) usando filtros de emissão e excitação de comprimentos de onda 450 nm e 365 nm, respectivamente. A quantificação da atividade enzimática foi efetuada por comparação com fluorescências do produto da reação 4-methylumbelliferone (4-MU) em concentrações conhecidas. A atividade enzimática foi expressa em mM de 4-MU produzidos por hora (mM 4-MU/h).

4.3 PRECIPITAÇÃO DA CASEÍNA

A amostra obtida através da lactação induzida da cabra transgênica e clonada foi diluída 5 vezes em tampão CAPS 100 mM em pH 10,2 e centrifugada a 13.000 x g por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 μ m e o pH foi ajustado para 4,5 com a solução de HCl. Após incubação de 30 minutos a 37°C, a amostra foi novamente centrifugada (13.000 x g, 30 minutos, 4°C) para a precipitação de caseína. O sobrenadante resultante foi diluído em 20 vezes em tampão CAPS 100 mM, o pH ajustado para 10,2 e submetido a filtração em membrana de 0,22 μ m (ZHANG et al., 2008).

4.4 CROMATOGRAFIA

4.4.1 Cromatografia de troca iônica

A amostra diluída em tampão de equilíbrio CAPS 100 mM, pH 10,2 foi aplicada na coluna HiPrep Q XL 16/10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB), de 20 mL, e lavada com o tampão de equilíbrio, a fluxo de 2,0 mL/min, em sistema AKTA. Após a saída do material não retido (V_0 e lavado), o material adsorvido foi eluído em um gradiente linear de tampão CAPS 100 mM, pH 10,2 contendo NaCl 1 M. Frações de 10 mL foram coletadas.

4.4.2 Diálise

As frações eluídas no gradiente da cromatografia de troca iônica foram reunidas de acordo com o perfil de distribuição de glucocerebrosidase e concentradas em Amicon com membrana de 30 kDa. As frações foram concentradas 5 vezes, para um volume final de 60 mL, e dialisadas em membrana com corte para 10 kDa contra tampão Tris.HCl 50 mM, pH 8,8 (2,5 litros) a 4° C, com 8 horas de intervalo entre as trocas de tampão (quatro repetições). O volume final das frações dialisadas foi ajustado para 100 mL.

4.4.3 Cromatografia de Interação hidrofóbica

Foi adicionada à amostra da cromatografia de troca iônica sulfato de amônio, na concentração final de 1 M. Após agitação por 30 minutos em temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada (13.000 x g, 30 minutos a 4°C), filtrada (membrana de 0,22 µm), aplicada na coluna HiPrep Octyl FF 16/10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB), de 20 mL, em sistema AKTA e lavada com o tampão de equilíbrio Tris.HCl 50 mM/sulfato de amônio 1 M em pH 8,8, a fluxo de 5,0 mL/min. Após a saída do material não retido, o material adsorvido foi eluído em gradiente linear de tampão Tris.HCl 50 mM, pH 8,8. Frações de 10 mL foram coletadas.. O pool das frações 1-23 e 41-45 da coluna Octyl foram analisadas em SDS-PAGE em condições desnaturantes. Bandas de interesse foram excisadas do gel e submetidas a protocolo de digestão em gel e analisadas por LC-MS/MS.

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E WESTERN BLOT

Amostras (leite bruto, frações cromatográficas e controles) foram submetidas à separação por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% desnaturante ou nativo (LAEMMLI et al., 1970), utilizando marcadores de peso molecular comerciais. A separação eletroforética foi realizada no sistema BioRad, com corrente de 80 mV até o momento da entrada das proteínas no gel de empacotamento, seguida de corrente de 100mV até o final do gel de corrida. Os géis foram corados com Azul de Coomassie.

A confirmação da presença da enzima glucocerebrosidase foi realizada por Western blot. Géis de eletroforese foram transferidos para membranas de nitrocelulose no sistema iBlot (Invitrogen). As membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-glucocerebrosidase humana (SC166407, produzido em camundongo, Santa Cruz) em diluição de 1:1000, *overnight* em temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Invitrogen) em diluição de 1:10000. As membranas foram reveladas de acordo com instruções do fabricante usando substrato cromogênico (Invitrogen).

4.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA

4.6.1 Digestão em gel

Bandas de gel de poliacrilamida foram descorados com solução descorante (50% metanol/5%ácido acético em água) *overnight*. O descorante foi removido e os fragmentos de gel desidratados com acetonitrila 100 % por 5 minutos duas vezes. As pontes dissulfeto foram reduzidas com DTT 10 mM e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após remoção da solução redutora, as cisteínas livres foram alquiladas com iodoacetamida 50 mM por 30 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. Os fragmentos de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos e desidratadas em acetonitrila 100 %. As proteínas foram digeridas adicionando-se 20-50 µL de solução da enzima tripsina (20 ng/µL, Promega) durante aproximadamente 18 horas a 37°C. A digestão foi interrompida pela adição 10-30 µL de ácido fórmico 5% e os peptídeos trópticos extraídos com 20 µL de ácido fórmico 5%/Acetonitrila 50% duas vezes. As amostras foram secas em SpeedVac (centrífuga a vácuo) e armazenadas a -20°C. As amostras foram ressuspensas em solução de ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 5% em água para uso.

4.6.2 LC-MS/MS

As separações cromatográficas das misturas complexas de peptídeos foram realizadas utilizando o sistema nanoLC Ultra (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent, EUA) equipado com um autosampler nanoLC AS-2 (Eksigent, EUA) e conectado a um espectrômetro de massas híbrido LTQ-XL Orbitrap Discovery (Thermo Fischer Scientific, EUA) contendo uma fonte de ionização nano-eletrospray (Thermo Fischer Scientific, EUA). As colunas capilares analíticas (diâmetro interno de 100 μm e 20 cm de comprimento com ponteira de 5 μm de diâmetro interno) e pré-colunas (diâmetro interno de 150 μm e 2 cm de comprimento), foram empacotadas no laboratório com resina de fase reversa (5 μm ODS-AQ C18 Yamamura Chemical Lab, EUA).

As amostras foram carregadas no sistema pelo *autosampler* com fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 15 minutos. O método cromatográfico de 120 minutos empregou o seguinte gradiente descontínuo da fase móvel A (5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico em água) à fase móvel B (90 % de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico): 0-5% B em 5 min; 5-25% B em 60 min; 25-50% B em 20 min; 50-80% B em 15 min; 80% B isocrático por 5 min; 80-5% B em 1 min; 5% B isocrático por 14 min com fluxo de 400 nL/min.

A eluição e emissão em fonte de nano-eletrospray dos peptídeos ocorreram diretamente da extremidade da coluna analítica. O instrumento foi programado para ciclos de aquisição, em modo de ionização positiva, de um espectro de MS1 no intervalo de razão massa/carga (m/z) de 400-1600 com resolução de 30.000 (em m/z 400) no Orbitrap, seguido de oito espectros de MS2 dos oito íons mais abundantes do espectro de MS1. Dissociação induzida por colisão (CID) foi utilizado como método de fragmentação, com uma ativação Q de 0,250, um tempo de ativação de 30 ms, energia de colisão normalizada de 35%, e uma amplitude de isolamento de 1 Da. Para explorar a complexidade da amostra e adquirir espectros de peptídeos menos abundantes, massas de peptídeos adquiridos foram adicionadas a uma lista de exclusão dinâmica com tamanho de 100 íons e tempo de permanência de 30s durante a aquisição dos espectros MS2. Análises foram realizadas em triplicata.

4.6.3 Análise de dados

A identificação de peptídeos e proteínas foi realizada com software Patternlab for Proteomics (CARVALHO et al., 2012). Espectros de MS2 foram buscados diretamente dos arquivos RAW pelo software de busca Comet (ENG; JAHAN; HOOPMANN, 2013)

utilizando banco de dados não-redundante de sequências da enzima glucocerebrosidase. Os dados foram buscados com tolerância de 50 ppm para íons precursores e 1 Da para íons fragmento. Os espectros identificados foram filtrados usando o software Search Engine Processor (CARVALHO et al., 2012). Os peptídeos identificados foram agrupados de acordo com o estado tríptico e carga. Os parâmetros Xcorr, DeltaCN, DeltaMass, Peaks Matched e Spec Count Score foram usados para gerar um escore bayesiano. Foi estabelecido um valor de corte para aceitar 1% de falso positivo baseado nas identificações do banco de dados reverso. Adicionalmente, um comprimento de sequência mínimo de 6 resíduos foi usado. Os resultados foram pós-processados para acertar identificações com menos de 10 ppm de variação de massa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste presente estudo, foi apresentado uma alternativa de purificação da enzima glucocerebrosidase a partir do leite obtido através da lactação induzida da cabra transgênica e clonada. De acordo com os resultados parciais relatados abaixo, pode-se criar uma expectativa positiva para a obtenção da glucocerebrosidase através do procedimento citado ao longo deste estudo.

A confirmação da presença de atividade enzimática de glucocerebrosidase do leite da cabra transgênica e clonada foi realizada pelo ensaio fluorimétrico utilizando o substrato 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside. Cerezyme[®] e leite da cabra controle (não transgência) foram usados com controle positivo e negativo, respectivamente. A Tabela 1 apresenta as diluições utilizadas para cada amostra e atividades totais, expressas em mM de produto (4-MU) produzido por hora.

Considerando resultados a partir da atividade obtida na amostra de Cerezyme[®] (concentração de 1 mg de enzima/mL, 1 mg equivale a 40 U de enzima), estima-se que a amostra de leite obtido a partir de lactação induzida possua 0.54 mg de enzima glucocerebrosidase ativa por mL de leite (aproximadamente 20U de enzima por mL de leite).

Tabela 1 – Resultados da atividade enzimática em relação a enzima Cerezyme[®]

	Diluição	Atividade (mM 4-MU/h)
Cerezyme	2000 x	676.5
	3000 x	696.7
	5000 x	706.5
Leite Lactação Induzida	500 x	383.5
	1000 x	378.9
	2000 x	366.8
Leite Controle	20 x	0.9

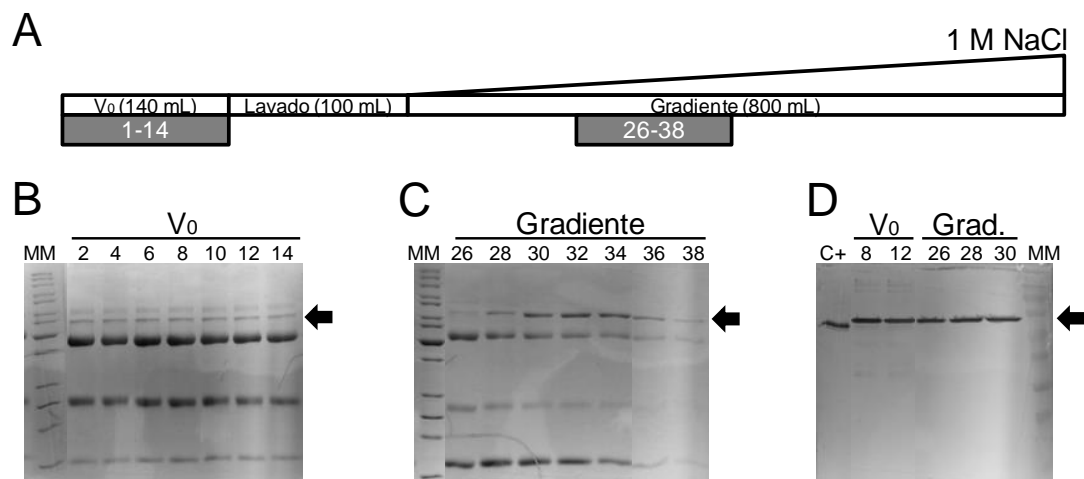
Fonte: dados da pesquisa.

Dado ao êxito na confirmação da presença da enzima glucocerebrosidase ativa no leite, a amostra foi preparada para separação cromatográfica. Para a amostra ser submetida à cromatografia, se fez necessário remover o componente predominante do leite, a caseína, através do procedimento de precipitação. A amostra do procedimento de precipitação de caseína foi submetida à cromatografia de troca iônica, como mostrado na representação esquemática na Figura 4A. Todas as frações foram submetidas a análise por SDS-PAGE. A avaliação dos géis mostra a presença de uma banda, com massa molecular aproximada de 70

kDa, no volume morto da coluna (frações V_0 1 a 14, Figura 4B) e no gradiente de sal (frações 26 a 38, Figura 4C).

Frações selecionadas do volume morto (frações V_0 -8 e V_0 -12) e do gradiente de sal (frações 26, 28 e 30) foram submetidas a Western blot, utilizando anti-glucocerebrosidase humana como anticorpo primário. Uma banda reativa, com massa molecular esperada, foi identificada, confirmando a presença de glucocerebrosidase nas frações cromatográficas (Figura 4D).

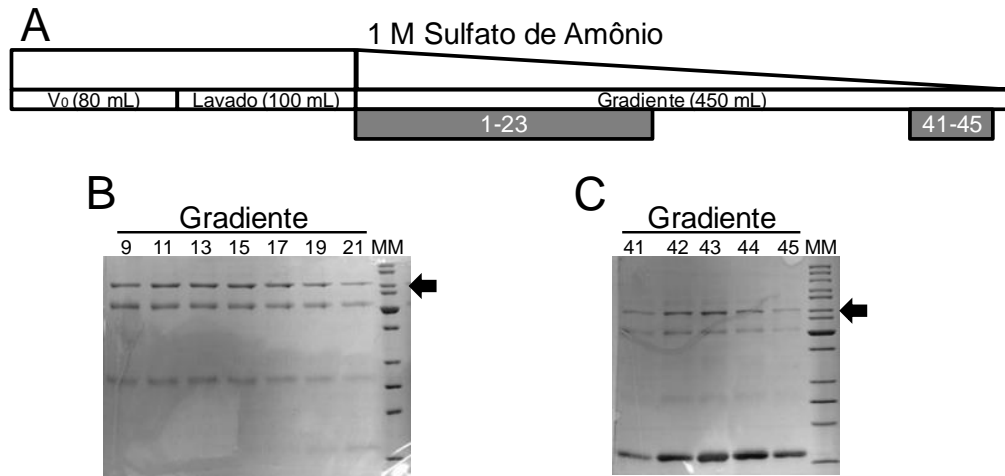
Figura 4 – A) Representação esquemática da cromatografia de troca iônica, com volumes coletados no volume morto (V_0), lavado e gradiente de sal. Frações do V_0 e gradiente contendo banda de massa molecular aproximada de 70 kDa estão indicadas. B) Amostras selecionadas do V_0 analisadas por SDS-PAGE. C) Amostras selecionadas do gradiente analisadas por SDS-PAGE. D) Identificação e confirmação das bandas de interesse por Western blot. Setas indicam banda de massa molecular aproximada de 70 kDa



Fonte: dados da pesquisa.

As frações eluídas no gradiente (frações 26-38) foram reunidas, dialisadas e preparadas para aplicação em uma coluna de interação hidrofóbica. Conforme mostrado na Figura 5, a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 70 kDa foi identificada, por SDS-PAGE, em duas faixas do gradiente linear (frações 1-23 e 41-45).

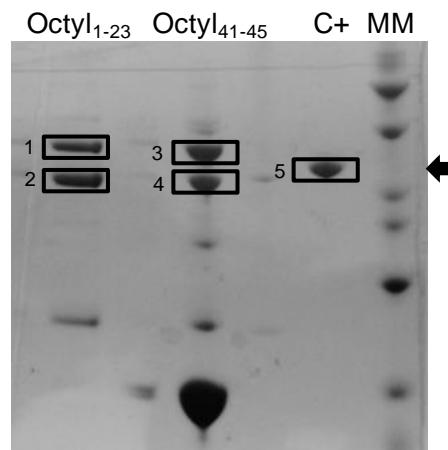
Figura 5 – A) Representação esquemática da cromatografia de interação hidrofóbica, com volumes coletados no volume morto (V₀), lavado e gradiente de sal. Frações do gradiente contendo banda de massa molecular aproximada de 70 kDa estão indicadas. B) e C) SDS-PAGE das frações 9-21 e frações 41-45 do gradiente. Setas indicam banda de massa molecular aproximada de 70 kDa



Fonte: dados da pesquisa.

As frações de interesse da cromatografia de interação hidrofóbica foram reunidas em dois pools, Octyl₁₋₂₃ e Octyl₄₁₋₄₅. Os pools foram analisados em SDS-PAGE, juntamente com um controle positivo de Cerezyme[®] como mostrado na Figura 6, bandas forma selecionadas para análise subsequente por espectrometria de massa.

Figura 6 – SDS-PAGE dos pools da cromatografia de interação hidrofóbica (Octyl₁₋₂₃ e Octyl₄₁₋₄₅). Bandas de interesse (1 a 5) foram excisadas do gel para análise por espectrometria de massa



Fonte: dados da pesquisa.

A Tabela 2 apresenta um resumo dos resultados de identificação de proteínas por espectrometria de massa, mostrando número de peptídeos identificados, número de contagens espectrais e cobertura de sequência da proteína alvo, glucocerebrosidase, e de dois contaminantes mais abundantes, albumina e fragmento de albumina.

Os resultados obtidos mostram que as bandas 1 e 2 do pool Octyl₁₋₂₃ são albumina e fragmentos de albumina, contendo a enzima glucocerebrosidase apenas como um contaminante (2 peptídeos identificados, 3 contagens espectrais). A banda 3 do pool Octyl₄₁₋₄₅, mostra que a enzima glucocerebrosidase está sendo retida na coluna de interação hidrofóbica e sendo eluída apenas no final do gradiente (13 peptídeos identificados, 34 contagens espectrais). Entretanto, ainda há uma grande contaminação com albumina, mesmo nesse tempo de retenção.

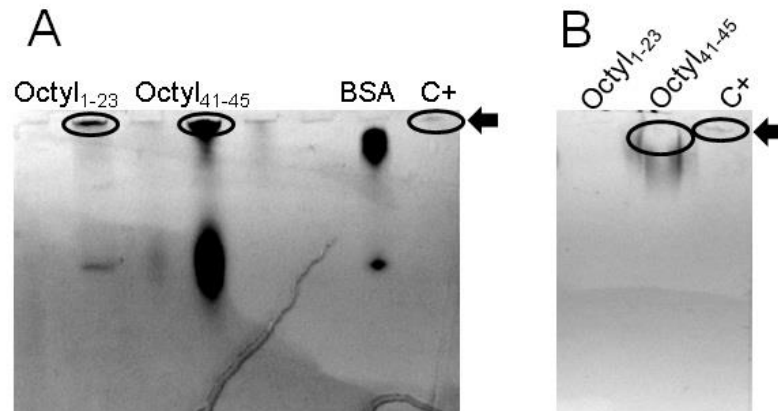
Tabela 2 – Identificação da glucocerebrosidase e dos principais contaminantes (albumina) nas bandas do gel analisadas por LC-MS/MS

		Glucocerebrosidase			Albumina			Albumina (Fragmento)		
		no. de peptídeos	no. de contagens espectrais	cobertura de sequência	no. de peptídeos	no. de contagens espectrais	cobertura de sequência	no. de peptídeos	no. de contagens espectrais	cobertura de sequência
Octyl ₁₋₂₃	Banda 1	2	3	39,0%	59	448	46,6%	108	816	77,0%
	Banda 2	0	0	0	0	0	0	12	147	21,7%
Octyl ₄₁₋₄₅	Banda 3	13	34	20,3%	15	63	19,1%	33	142	44,0%
	Banda 4	6	8	12,1%	0	0	0	13	17	20,7%
Cerezyme	Banda 5	53	214	65,8%	0	0	0	0	0	0

Fonte: dados da pesquisa.

Mediante aos resultados obtidos, a presença de albumina como um contaminante majoritário nas amostras Octyl₁₋₂₃ e Octyl₄₁₋₄₅ foi confirmada usando eletroforese em gel de poliacrilaminada em condições nativas. A figura 7A mostra os perfis de migração das frações Octyl₁₋₂₃ e Octyl₄₁₋₄₅, de albumina bovina (BSA) e do padrão de glucocerebrosidase, (Cerezyme[®], C+). Os perfis eletroforéticos nessas condições mostram grande contaminação com albumina em ambas as amostras. A presença de glucocerebrosidase foi novamente confirmada por Western blot, como mostrado na Figura 7B.

Figura 7 – A) Eletroforese dos pools Octyl1-23 e Octyl41-45 em condições não-desnaturante. B) Western blot dos pools Octyl1-23 e Octyl41-45 em condições não-denaturantes. BSA e Cerezyme® (C+) foram usados como padrão de perfil de migração. Círculos e setas indicam as bandas de glucocerebrosidase



Fonte: dados da pesquisa.

A validação dos resultados de espectrometria de massa comprova a identidade da enzima glucocerebrosidase do leite da cabra transgênica e clonada. Entretanto, a presença da albumina define a necessidade de alterar os processos de purificação, adicionando um procedimento de remoção da mesma.

Os resultados obtidos neste estudo auxiliam o aprimoramento na técnica de purificação da glucocerebrosidase expressa no leite da cabra transgênica e clonada, mostrando otimizações no processo para a produção da enzima com metodologias alternativas, porém robustas e com reprodutibilidade.

Além de um protocolo bem sucedido para uma nova geração de glucocerebrosidase, este estudo mostra que os métodos de purificação tradicionais para gerar proteínas recombinantes pode ser uma alternativa útil para a produção de biofármacos em países emergentes.

6 PERSPECTIVAS

A necessidade de remover a albumina surgiu ao longo dos experimentos. A alta concentração da albumina no leite dificulta a purificação e identificação da glucocerebrosidase. Os resultados obtidos na etapa final do processo de purificação deixam clara a necessidade da inclusão de um processo de remoção da albumina, ainda nas etapas iniciais, em conjunto com a precipitação da caseína.

Algumas metodologias foram testadas seguindo alguns protocolos já existentes (CHEN et al., 2005; COLANTONIO et al., 2005; FATTAHI et al., 2012). Tentativas de remover a albumina têm contado com métodos baseados na afinidade que utilizam corantes e anticorpos ou na precipitação com sal. Métodos que empregam exclusão por tamanho não têm tido sucesso na remoção de albumina e métodos como precipitação com sulfato de amônio ou sulfato de sódio resultaram na remoção eficiente de proteínas de alta concentração.

Testes de remoção de albumina estão atualmente em andamento. Um protocolo de adição de solução de NaCl (concentração final de 0,1M), com delicada agitação (60 minutos a 4°C), adição de etanol 95% e centrifugação (16.000 x g por 45 minutos a 4°C) obteve um resultado positivo, sendo efetivo para a remoção de albumina sem interferência na proteína de interesse (CHEN et al., 2005; COLANTONIO et al., 2005; FATTAHI et al., 2012).

No entanto, para assegurar que a enzima glucocerebrosidase atinja os macrófagos (células alvo) durante a terapia de reposição enzimática, é necessário confirmar se a exposição de resíduos de manose da enzima promova o seu reconhecimento por parte dos receptores de manose-6-fosfato existentes na membrana plasmática dos macrófagos e posteriorinternalização até o sistema endolisossomal através de ensaios fluorimétricos confirmando o potencial de uso da enzima na terapia de reposição enzimática (AMENTO et al., 1984; BRUMSHTEIN et al., 2010; KORNFELD, 1986).

Em paralelo aos testes de internalização, ensaios de caracterização das glicosilações da enzima serão realizados, buscando identificar a estrutura das glicosilações e desenvolver um possível processo de modificação do padrão de glicosilação da glucocerebrosidase por glicosidases específicas, resultando na exposição de resíduos de manose na superfície da proteína.

REFERÊNCIAS

- ACHORD, D. T. et al. Human beta-glucuronidase: in vivo clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. **Cell**, Cambridge, v. 15, n. 1, p. 269-278, 1978.
- AERTS, J. M. et al. The occurrence of two immunologically distinguishable beta-glucocerebrosidases in human spleen. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 565-574, 1985.
- ALATTIA, J. R. et al. Molecular imaging of membrane interfaces reveals mode of β -glucosidase activation by saposin C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 104, n. 44, p. 17394-17399, 2007.
- ALTARESCU, G. et al. Comparative efficacy of dose regimens in enzyme replacement therapy of type I Gaucher disease. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, La Jolla, v. 26, n. 4, p. 285-290, 2000.
- AMENTO, E. P. et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ induces maturation of the human monocyte cell line U937, and, in association with a factor from human T lymphocytes, augments production of the monokine, mononuclear cell factor. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 73, n. 3, p. 731-739, 1984.
- ANDERSEN, D. C.; KRUMMEN, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2002.
- ANDERSON, H. C.; CHARROW, J.; KAPLAN, P. Individualization of long-term enzyme replacement therapy for Gaucher disease. **Genetics in Medicine**, Baltimore, v. 7, n. 2, p. 105-110, 2005.
- BALDASSARRE, H. et al. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, n. 3-4, p. 831-839, 2003.
- BALDELLOU, A. et al. Paediatric non-neuronopathic Gaucher disease: recommendations for treatment and monitoring. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 163, n. 2, p. 67-75, 2004.
- BARTON, N. W. et al. Therapeutic Response to Intravenous Infusions of Glucocerebrosidase in a Patient with Gaucher Disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 5, p. 1913-1916, 1990.
- BECK, M. Therapy for lysosomal storage disorders. **IUBMB Life**, London, v. 62, n. 1, p. 33-40, 2010.
- BERG-FUSSMAN, A. et al. Human acid betaglucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 20, p. 14861-14866, 1993.

BEUTLER, E. Gaucher disease. **Blood Reviews**, Edinburgh, v. 2, n. 1, p. 59-70, 1988.

_____. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. **Science**, New York, v. 256, n. 5058, p. 794-799, 1992.

_____. Lysosomal storage diseases: natural history and ethical and economic aspects. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 88, n. 3, p. 208-215, 2006.

BEUTLER, E.; GELBART, T.; WEST, C. Identification of six new Gaucher disease mutations. **Genomics**, San Diego, v. 15, n. 1, p. 203-205, 1993.

BLANZ, J. et al. Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 563-572, 2010.

BLINKS, J. R.; PRENDERGAST, F. G.; AND ALLEN, D. G. Photoproteins as biological calcium indicators. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 28, n. 1, p. 1-93, 1976.

BLUE CROSS AND BLUE SHIELD OF MASSACHUSETTS MEDICAL POLICY. **Alglucerase (Ceredase and Cerezyme) for Gaucher Disease**. Boston, 1997.

BODROGI, L. et al. High level expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits. **Transgenic Research**, London, v. 15, n. 5, p. 627-636, 2006.

BRADY, R. O.; BARTON, N. W. Enzyme replacement and gene therapy for Gaucher's disease. **Lipids**, Chicago, v. 31, suppl., p. S137-S139, 1996.

BRUMSHTEIN, B. et al. Characterization of gene-activated human acid-beta-glucosidase: crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages. **Glycobiology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 24-32, 2010.

BURROW, T. A.; GRABOWSKI, G. A. Velaglucerase alfa in the treatment of Gaucher disease type 1. **Clinical Investigation**, London, v. 1, n. 2, p. 285-293, 2011.

BUSSINK, A. P. et al. The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. **International Review of Cytology**, New York, v. 252, p. 71-128, 2006.

CALVO, D.; DOPAZO, J.; VEGA, M. A. The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMP-II (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. **Genomics**, San Diego, v. 25, n. 1, p. 100-106, 1996.

CARVALHO P. C. et al. Search engine processor: filtering and organizing PSMs. **Proteomics**, Weinheim, v. 12, n. 7, p. 944-949, 2012.

CHARROW, J. et al. Enzyme replacement therapy and monitoring for children with type 1 Gaucher disease: consensus recommendations. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 144, n. 1, p. 112-120, 2004.

CHEN, Y. Y. et al. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 26, n. 11, p. 2117-2127, 2005.

CHEUNG, W. Y. Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase-evidence for and properties of a protein activator. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 246, n. 9, p. 2859-2869, 1971.

COLANTONIO, D. A. et al. Effective removal of albumin from serum. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 15, p. 3831-3835, 2005.

COLLARES, T. et al. Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2. n. 1, p. 11-27, 2005.

CONNOCK, M. et al. The clinical effectiveness and costeffectiveness of enzyme replacement therapy for Gaucher's disease: a systematic review.2006. **Health Technology Assessment**, Winchester, v. 10, n. 24, p. iii-iv, ix-136, 2006.

COX, T. M. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Lancaster, v. 24, suppl. 2, p. 106-121, 2001.

DE DUVE, C. From cytochromes to lysosomes. **Federation Proceedings**, Washington, DC, v. 23, p. 1045-1049, 1964.

DEEGAN, P. B.; COX, T. M. Imiglucerase in the treatment of Gaucher disease: a history and perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, Auckland, v. 6, p. 81-106, 2012.

DENNISON, C.; LOVRIEN, R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 11, n. 2, p. 149-161, 1997.

DVIR, H. et al. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. **EMBO Reports**, Oxford, v. 4, n. 7, p. 704-709, 2003.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: an open source tandem mass spectrometry sequence database search tool. **Proteomics**, Weinheim, v. 13, n 1, p. 22-24, 2013.

ERICKSON, A. H.; GINNS, E. I.; BARRANGER, J. A. Biosynthesis of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 26, p. 14319-14324, 1985.

FATTAHI, S. et al. Comparison of different albumin removal methods for evaluation of human serum proteome. **Zahedan Journal of Research In Medical Sciences**, Zahedan, v. 14, n. 4, p. 1-5, 2012.

FENOLL, J.; JOURQUIN, G.; KAUFFMANN, J. M. Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in solid and fluid dairy products. **Talanta**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 1021-1026, 2002.

FUJITA, H. et al. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 184, n. 2, p. 604-611, 1992.

FURBISH, F. S. et al. Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: large-scale purification of glucocerebrosidase suitable for human administration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 8, p. 3560-3563, 1977.

FURBISH, F. S. et al. Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 673, n. 4, p. 425-434, 1981.

GENOMENET DATABASE RESOURCES. **Reaction**: R01498. [S.d.]. Disponível em: <http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn:R01498>. Acesso em: 8 mar. 2016.

GINNS, E. I. et al. Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 82, n. 20, p. 7101-7105, 1985.

GORDON, J. W. et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 77, n. 12, p. 7380-7384, 1980.

GRABOWSKI, G. A. et al. Enzyme therapy in type 1 gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 122, n. 1, p. 33-39, 1995.

GRABOWSKI, G. A. Recent clinical progress in Gaucher disease. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 17, n. 4, p. 519-524, 2005.

GRABOWSKI, G. A.; HOROWITZ, M. Gaucher's disease: molecular, genetic and enzymological aspects. **Baillière's Clinical Haematology**, London, v. 10, n. 4, p. 635-656, 1997.

HAMMER, R. E. et al. Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection. **Nature**, London, v. 315, n. 6021, p. 680-683, 1985.

HEITNER, R.; ARNDT, S.; LEVIN, J. B. Imiglucerase low-dose therapy for paediatric Gaucher disease: A long-term cohort study. **South African Medical Journal**, Cape Town, v. 94, n. 8, p. 647-651, 2004.

HODANOVA, K. et al. Transient expression of wild-type and mutant glucocerebrosidases in hybrid vaccinia expression system. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 11, n. 5, p. 369-374, 2003.

HOROWITZ, M. et al. Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population. **Hum Mutation**, New York, v. 12, n. 4, p. 240-244, 1998.

HOUDEBINE, L. M. Preparation of recombinant proteins in milk. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 267, p. 485-494, 2004.

HYVÖNEN, P. et al. Human and bovine lactoferrins in the milk of recombinant human lactoferrin-transgenic dairy cows during lactation. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 1, n. 4, p. 410-412, 2006.

INSTITUTO BARESI. c2013. Disponível em: <<http://institutobaresi.com/tag/genetica-medica/>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

JMOUDIAK, M.; FUTERMAN, A. H. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 129, n. 2, p. 178-188, 2005.

KEEFER, C. L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 5-12, 2004.

KARKHANIS, Y. D.; CORMIER, M. J. Isolation and properties of renilla reniformis luciferase, a low molecular weight energy conversion enzyme. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 10, n. 2, p. 317-326, 1971.

KORNFELD, S. Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 77, n. 1, p. 1-6, 1986.

LAEMMLI, U. K., et al. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 99-113, 1970.

LINDSAY, M. et al. Purification of recombinant DNA derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1026, n. 1-2, p. 149-157, 2004.

LIU, B. et al. Analyses of variant acid β -glucosidases. Effects of Gaucher disease mutations. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 7, p. 4242-4253, 2006.

MALAJOVICH, M. A. **Biociencia 2011**. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MATTHEWS, J. C.; HORI, K.; CORMIER, M. J. Purification and properties of renilla reniformis luciferase. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 16, n. 1, p. 85-91, 1977.

MELLADO, M. C.; CASTILHO, L. R. Proteínas recombinantes terapêuticas. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Roca, 2007. p. 384-402.

MICHELIN, K. et al. Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligate heterozygotes for Gaucher disease carriers. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 362, n. 1-2, p. 101-109, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria nº 449, de 8 de julho de 2002. **Diário Oficial da Imprensa Nacional. República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 130, seção 1, 9 jul. 2002.

MONTFORT, M. et al. Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. **Human Mutation**, New York, v. 23, n. 6, p. 567-575, 2004.

MORITA, T. et al. Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. **Transgenic Research**, London, v. 13, n. 6, p. 551-557, 2004.

OWADA, M.; SAKIYAMA, T.; KITOGAWA, T. Neuropathic Gaucher's disease with normal 4-methylumbelliferyl-fl-glucosidase activity in the liver. **Pediatric Research**, Basel, 1997, v. 11, n. 5, p. 641-646.

PALMITER, R. D. et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. **Nature**, London, v. 300, n. 5893, p. 611-615, 1982.

PASMANIK-CHOR, M. et al. Expression of mutated glucocerebrosidase alleles in human cells. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 887-895, 1997.

PASTORES, G. M.; BARNETT, N. L. Current and emerging therapies for the lysosomal storage disorders. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, London, v. 10, n. 4, p. 891-902, 2005.

PLATT, F. M.; BUTTERS, T. D. Substrate deprivation: a new therapeutic approach for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2000.

POLLOCK, D. P. et al. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 231, n. 1-2, p. 147-157, 1999.

PREMKUMAR, L. et al. X-ray Structure of Human Acid- β -Glucosidase Covalently Bound to Conduritol-B-Epoxyde: Implications for Gaucher Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 25, p. 23815-23819, 2005.

RCSB PROTEIN DATA BANK. **1OGS human acid-beta-glucosidase**. 2003. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1OGS>>. Acesso em: 9 mar. 2016.

RIJNBOUTT, S. et al. Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, 1991; v. 266, n. 8, p. 4862-4868, 1991.

ROCCO, R. M. Fluorimetric analysis of alkaline phosphatase in fluid dairy products. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 7, p. 588-591, 1990.

ROSENBERG, A.; CHARGAFF, E. A reinvestigation of the cerebroside deposited in Gaucher's disease. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 233, n. 6, p. 1323-1326, 1958.

- ROTH, A. F. **Purification and protease susceptibility of the green-fluorescent protein of *aequorea aequorea* with a note on *halistaura***. 1985. Master's Thesis – Rutgers University, New Brunswick, 1985.
- SA MIRANDA, M. C. et al. Activity of glucocerebrosidase in extracts of different cell types from type 1 Gaucher disease patients. **Clinical Genetics**, Copenhagen, v. 38, n. 3, p. 218-227, 1990.
- SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3rd. ed. New York: Springer-Verlag, 1994. (Springer Advanced Texts in Chemistry).
- SHAALTIEL, Y. et al. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 579-590, 2007.
- SIBILLE, A. et al. Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type I: clinical and therapeutic implications. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 52, n. 6, p. 1094-1101, 1993.
- SIMPSON, R. J. **Proteins and proteomics: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 2003.
- SIUZDAK, G. **Mass spectrometry for biotechnology**. Cambridge: Academic Press, 1996.
- SOBREIRA, E. et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: A comparison between Brazil and the rest of the world. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 90, n. 1, p. 81-86, 2007.
- SORGE, J. A. et al. The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 41, n. 6, p. 1016-1024, 1987.
- TANG, L. et al. Characterization of the N370S Mutant of Glucocerebrosidase by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 13, n. 15, p. 2243-2250, 2012.
- VISSERS, J. P.; LANGRIDGE, J. I.; AERTS, J. M. Analysis and quantification of diagnostic serum markers and protein signatures for Gaucher disease. **Molecular Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 6, n. 5, p. 755-766, 2007.
- WALL, R. J. Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 59, n. 2-3, p. 243-255, 1999.
- WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 135-138, 2002.
- WARD, W. W. Biochemical and physical properties of green-fluorescent proteins. In: CHALFIE, M.; KAIN, S. (Eds). **Green fluorescent proteins: properties, applications, and protocols**. Philadelphia: Wiley-Interscience, 2005. p. 45-75.

WARD, W. W. **Novel purification of soybean peroxidase (glycine max) and SBP applications in detecting bisphenol A**. San Diego: Cambridge Healthtech Institutes's Pep Talk, 2012.

WARD, W. W.; SWIATEK, G. Protein purification. **Current Analytical Chemistry**, Saif Zone, v. 5, p. 85-105, 2009.

WENGER, D. A.; OLSON, G. C. Heterogeneity in Gaucher disease. In: CALLAHEN, J. W.; LOWDEN, J. A. (Eds.). **Lysosomes and lysosomal storage diseases**. New York: Raven Press, 1981. p. 157-171.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis**. Philadelphia: Wiley, 2002.

WILKINS, M. R. et al. **Proteome research: new frontiers in functional genomics**. Berlin: Springer-Verlag, 1997.

XU, Y. H. et al. Comparative therapeutic effects of velaglucerase alfa and imiglucerase in a Gaucher disease mouse model. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e10750, 2010.

ZHANG, J. et al. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 57, n. 2, p. 127-135, 2008.

ZHAO, H.; BAILEY, L. A.; GRABOWSKI, G. A. Enzyme therapy of Gaucher disease: clinical and biochemical changes during production of and tolerization for neutralizing antibodies. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, La Jolla, v. 30, n. 1, p. 90-96, 2003.

ZIMRAN, A.; ELSTEIN, D.; BEUTLER, E. Low-dose therapy trumps high-dose therapy again in the treatment of Gaucher disease. **Blood**, New York, v. 108, n. 3, p. 802-803, 2006.