

PRODUÇÃO DE ASPARAGINASE BACTERIANA DE *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris* E *Wolinella succinogenes* EM SISTEMA DE EXPRESSÃO PROCARIOTO

Illana Carneiro Lisboa Magalhães(1); Kalil Andrade Mubarac Romcy(2); Davi Almeida Freire(3);
Lívia Érika Carlos Marques(4); Maria Izabel Florindo Guedes(5).

1. Universidade Estadual do Ceará (UECE), ilanamagalhaes@hotmail.com
2. Universidade Estadual do Ceará (UECE), kakkd12@gmail.com
3. Universidade Estadual do Ceará (UECE), davi_freire_@hotmail.com
4. Universidade Estadual do Ceará (UECE), liviaerika@hotmail.com
5. Universidade Estadual do Ceará (UECE), florinfg@uol.com.br

INTRODUÇÃO

A leucemia é uma doença maligna que ocorre nos glóbulos brancos em decorrência do acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, ocupando a nona posição no ranking nacional de doenças (BRASIL, 2008). Essa doença é dividida em crônica e aguda, possuindo, a aguda, uma progressão rápida que afeta a maioria das células que ainda não estão totalmente diferenciadas e não realizando, assim, suas funções normais (ABRALE, 2016) A Leucemia Linfoblástica Aguda (Acute Lymphoblastic Leukemia – ALL) é uma doença que afeta principalmente crianças (INCA, 2015) e atualmente tem ocorrido enorme progresso em seu tratamento, com uma taxa de cura próxima a 80% (Pui e Evans, 1998).

A produção de enzimas oriundas de bactérias possui diversas vantagens, dentre elas a capacidade de serem alcançadas em grandes quantidades e em um espaço de tempo relativamente curto e com desenvolvidas tecnologias de manipulação genéticas que aumentem a seu rendimento (ANBU, 2015). Em 1950 descobriu-se que a enzima L-Asparaginase possui propriedades antitumorais, diminuindo níveis séricos de asparagina, o que ocasiona apoptose de alguns tipos de tumores por causa da perda da capacidade de síntese *de novo* de asparagina, fazendo-as sensíveis a quedas prolongadas de níveis de asparaginases no sangue, entretanto células normais do corpo são pouco afetadas por produzirem asparagina sintetase (AVRAMIS e TIWARI, 2006).

A Asparaginase é uma enzima tetraédrica que hidrolisa a L-asparagina e a L-glutamina em L-aspartato e L-glutamato, e em amônia, diminuindo, assim, a disponibilidade desses aminoácidos e diminuindo a síntese de proteínas constitutivas e regulatórias fundamentais para as células tumorais (AVRAMIS, 2012). As asparaginases atualmente disponíveis comercialmente são de *E. coli* e *Erwinia* e as drogas originadas são Elspar®, Crasnitin® e Kidrolase® e Erwinase® (Duval *et al.*, 2002).

Efeitos colaterais comumente relatados na literatura científica, como problemas pancreatites, disfunção hepática, hipersensibilidade, complicações no sistema nervoso central e hiperglicemia, são associados a queda de níveis séricos de glutamina, estruturalmente semelhante a asparagina e necessária às células saudáveis do corpo (ANDRADE *et al.*, 2014). Nesse contexto, buscaram-se enzimas que possuam alta atividade contra o aminoácido asparagina (não essencial às células saudáveis), mas com baixa atividade contra glutamina (essencial às células sadias). Outro problema importante é a produção de anticorpos pelo próprio paciente contra a asparaginase nativa de *E. coli*, o que acaba neutralizando seus efeitos e retornando os níveis de asparagina sérica, assim, quando ocorrem esses casos são usados medicamentos de segunda linha (como asparaginase de *Er. chrysanthemii* ou a forma peguilada da asparaginase de *E. coli*) não reativos em primeiro momento contra anticorpos anti-asparaginase de *E. coli* (PIETERS *et al.*, 2011). Com isso, faz-se de extrema importância a produção de uma asparaginase mais eficaz e de menor custo.

Segundo a ABIFINA (2013) – Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades, o Brasil ocupa um pequeno espaço frente ao cenário mundial no que diz respeito à pesquisa tecnológica e produção industrial de biofármacos, aumentando, assim, a necessidade de pesquisas para a produção de enzimas terapêuticas, que são de grande interesse para a biotecnologia, indústria e medicina brasileira (DIVINO, 2015). O florescimento da indústria farmacêutica deu-se nos anos de 1980 e 1990, onde se mostrou que a fabricação de enzimas bacterianas era economicamente favorável, desde que estes microrganismos são mais simples, fáceis de manipulação e geneticamente mutáveis, reduzindo custo e aumentando a qualidade enzimática (DEMAIN, 2009).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a produção e expressão da enzima asparaginase proveniente de três bactérias distintas, a fim de proporcionar uma maior independência de importações neste setor que movimenta milhões de reais todos os anos.

METODOLOGIA

Para este estudo, foi feito uma busca em bancos de dados de sequências e escolhidas três sequências de DNA de genes codificante de asparaginases que apresentam alta afinidade por asparagina e baixa afinidade por glutamina. Os genes escolhidos foram de asparaginases de *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Wolinella succinogenes*. Os genes foram sintetizados (Biobasic, Canadá), adicionando sequências de enzimas de restrição *upstream* e *downstream* ao

gene, o que permitiu inserir o gene da proteína de interesse em um vetor de expressão bacteriano. Estas etapas foram primeiramente realizadas *in silico*, para confirmação das clonagens.

Na primeira etapa, foram utilizadas células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B, aptas a receber o plasmídeo pUC 57 contendo os insertos, fornecidos pela empresa de síntese de DNA, para a clonagem das sequências de asparaginases. As bactérias com o gene de interesse foram confirmadas após cultivo em meio LB com ampicilina e miniprep (Kit Promega Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems) para a retirada dos insertos e sua posterior inserção no plasmídeo de expressão pET28a. Após a ligação dos insertos no pET28a, estes foram inseridos em *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) para a expressão das proteínas. Todos os processos foram confirmados por meio de PCR.

As bactérias contendo o gene de interesse da asparaginase foram crescidas em meio LB com canamicina como antibiótico seletivo a 37°C até atingir OD entre 0.4-0.6 a 600 nm, e induzidas com IPTG por 3 horas. Após este procedimento, as células foram lisadas para a retirada das proteínas. As proteínas foram confirmadas por meio de gel de acrilamida em SDS-PAGE 12% e *Western Blot* através de anticorpo primário anti-cauda de histidina e anticorpo secundário anti-IgG mouse. Para o processo de purificação, inicialmente foi realizada a solubilização do precipitado da lise bacteriana utilizando um tampão contendo 8M de Uréia. Posteriormente, a solução foi inserida em uma coluna de afinidade por níquel que continha um tampão de equilíbrio com 20mM de Imidazol. Foram realizadas quatro lavagens com a mesma concentração de 20mM de Imidazol, porém tendo uma diminuição gradativa da concentração de uréia: 6M, 4M, 2M, 1M, respectivamente. A eluição foi realizada utilizando 500mM de Imidazol e sem a presença de Uréia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Asparaginase recombinante já tem sido estudada por diversos autores (WINK, 2009; CHOI *et al.*, 2006) como método de pesquisa para atender a crescente demanda por novos produtos farmacológicos. Dentre os diversos métodos de produção de proteínas recombinantes, mostra-se promissor o uso de bactérias para a produção de asparaginases usada no tratamento de leucemia aguda (ROTH, 2011, p. 38). Neste trabalho, três genes de asparaginases proveniente dos microrganismos *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Wolinella succinogenes* (AHp, APv e AWs, respectivamente) foram eficientemente clonados em *E. Coli*. Os clones positivos foram confirmados por análise de PCR e gel de agarose a 1%. Todas as clonagens foram bem sucedidas com as

proteínas AHp, APv e AWs expressas no tamanho adequado, 1205 pb, 1247 pb e 1205 pb, respectivamente.

Para avaliar a produção das asparaginases AHp, APv e AWs em *E. coli*, após o crescimento e indução com IPTG das bactérias contendo cada gene individualmente, foi utilizado SDS-Page a 12%, incluindo nos poços as amostras presentes no sobrenadante e no precipitado para cada inserto. As mesmas amostras foram utilizadas, nesta mesma ordem, para serem analisadas por *Western Blotting*, contendo também, uma amostra positiva e uma amostra negativa, sendo esta última a indução da bactéria sem os genes de interesse. Os mesmos procedimentos de eletroforese e *Western Blotting* foram realizados para a avaliação da purificação das enzimas. O aparecimento de bandas únicas em ambos os métodos comprova que a purificação foi realizada com sucesso.

Os resultados obtidos foram semelhantes com os resultados da produção de asparaginases de outras espécies bacterianas, como *Withania somnifera* no trabalho de Oza, et al. (2011) e de *Helicobacter pylori* realizado por Capelletti, et al. (2008), demonstrando assim o potencial da produção destas biomoléculas recombinantes em *E.coli*. Embora futuras análises sejam necessárias para a confirmação das atividades enzimáticas, assim como testes comparativos com as enzimas disponíveis comercialmente, os resultados já obtidos aumentam as perspectivas de uma produção sustentável de biofarmacêuticos no Brasil, aumentando assim a segurança no setor farmacêutico.

CONCLUSÃO

A produção de produtos biológicos e outros produtos biológicos a nível nacional, reduziriam os gastos do governo com a importação de medicamento, além de, evitar a oscilação dos preços no mercado internacional e facilitar o acesso à população. Desta maneira, os resultados obtidos neste trabalho até o momento são avaliados positivamente na busca por uma independência neste setor, sendo confirmada a produção das três enzimas escolhidas no sistema procarioto, e a continuidade deste trabalho será de fundamental importância para contribuir para as pesquisas na produção de fármacos com proteínas recombinantes para atender as necessidades populacionais quem necessitam de tratamento de saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALE, Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. **O que é Leucemia**. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/doencas/leucemia>>. Acessado em 09 ago. 2016.

ANBU P.; GOPINATH S. C.; CHAULAGAIN B. P.; TANG T. H.; CITARTAN M. **Microbial Enzymes and their applications in Industries and Medicine 2014**. BioMed Research International. V. 2015 Article ID 816419, 3 pages

ANDRADE, A. F.; BORGES, K. S.; SILVEIRA, V. S. **Update on the use of L-Asparaginase in infants and adolescent patients with acute lymphoblastic leukemia**. Clinical Medicine Insights: Oncology, v. 8, p. 95-100, 2014.

AVRAMIS, V. I. **Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance**. Anticancer research, v. 32, n.7, p. 2423-2437, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Leucemia Aguda**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344>. Acesso em 09 ago. 2008.

CAPPELLETTI, D.; CHIARELLI, L. R.; PASQUETTO, M. V.; STIVALA, S.; VALENTINI, G.; SCOTTI, C. **Helicobacter pylori L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 377, issue 4, p. 1222-1226, dezembro 2998.

CHOI, J.; KEUM, K., LEE, S. **Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli**. Chemical Engineering Science, 61, 3, 876-885 (2006).

DEMAIN, Arnold L.; VAISHNAV, Preeti. **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms**. Biotechnology Advances, [s.l.], v. 27, n. 3, p.297-306, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>.

DIVINO, B. S. **Produção Biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris*.** 2015. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A.; RIALLAND, X.; NELKEN, B.; LUTZ, P.; BENOIT, Y.; ROBERT, A.; MANEL, A. M.; VILMER, E.; OTTEN, J.; PHILIPPE, N. 2002. **Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies:** results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* 99:2734-2739, 2002.

OZA, V. P.; PARMAR, P. P.; Patel, D. H.; Subramanian R. B. **Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production.** 3 *Biotech*, v.1, issue 1, p. 21-26, julho 2011.

PIETERS, R.; HUNGER, S. P.; BOOS, J.; RIZZARI, C.; SILVERMAN, L.; BARUCHEL, A.; GOEKBUGET, N.; SCHRAPPE, M.; PUI, C.-H. **L-Asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia:** A focus on *Erwinia* asparaginase. *Cancer*, p. 238-249, 2011.

PUI, CH; EVANS, W. E. **Acute Lymphoblastic Leukemia.** *The New England Journal of Medicine*, 339:605-615, Agosto 1998.

RICHA, J. K.; ZAIDI, Y. V.; POOJA, S. **L-Asparaginase:** A Promising Enzyme for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *People's Journal of Scientific Research*, 2012, v. 5(1), p. 29-35.

ROTH, G. **Produção de L-Asparaginase II Recombinante de *Erwinia Carotovora* em cultivos de *Escherichia Coli* em batelada alimentada.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Biociências da Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WINK, P L. **Produção da enzima antileucêmica L-Asparaginase II a partir da clonagem do gene ErA de *Erwinia carotovora* supsp. atroseptica em *Escherichia coli*.** 2009. 53f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Porto Alegre. 2009.