

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELLA MACEDO MASCARENHAS DINIZ

**Caracterização *ex vivo* e *in vivo* da enzima β -glicosilceramidase
lisossomal recombinante e clonagem celular da linhagem humana com
produção permanente dessa molécula**

Ribeirão Preto

2018

GABRIELLA MACEDO MASCARENHAS DINIZ

**Caracterização *ex vivo* e *in vivo* da enzima β -glicosilceramidase
lisossomal recombinante e clonagem celular da linhagem humana com
produção permanente dessa molécula**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Genética

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto

2018

Autorizo, após 24 meses, a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Diniz, Gabriella

Caracterização *ex vivo* e *in vivo* da enzima β -glicosilceramidase lisossomal recombinante e clonagem celular da linhagem humana com produção permanente dessa molécula.

Diniz, Gabriella Macedo Mascarenhas; orientadora, Aparecida Maria Fontes. Ribeirão Preto, 2018.

114 f. : il. 30 cm

Dissertação (Mestrado em Genética) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Versão original

1. Doença de Gaucher; 2. β -Glicosilceramidase ; 3. Terapia de reposição enzimática
4. Métodos de produção de β -Glicosilceramidase recombinantes; 5. Integração de transgenes e clonagem celular 6. Modelo murino para DG.

Nome: DINIZ, Gabriella Macedo Mascarenhas

Título: Caracterização *ex vivo* e *in vivo* da enzima β -glicosilceramidase lisossomal recombinante e clonagem celular da linhagem humana com produção permanente dessa molécula.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, sem sessão pública realizada a ____ / ____ / _____, considerou

() Aprovada

() Reprovada

Banca Examinadora

Prof. Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sinceramente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho e para meu desenvolvimento profissional. Nesse sentido, meu agradecimento ao que fizeram parte dessa realização:

À Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes, pela contribuição para meu crescimento científico e acadêmico.

À minha Família, que sempre me apoiaram e sempre serão meu suporte. Em especial aos meus pais, Ricardo e Giovanna, pelo amor incondicional, e meus irmãos, Arthur, Vítor e Manuela, pela alegria que sempre estão mais que dispostos a trazer para meu dia a dia. A minha avó Ilma, que sempre esteve torcendo por mim e me apoiando. Ao João Paulo, meu companheiro de longa data.

Ao Departamento Pós-graduação de Genética e funcionários pela convivência e profissionalismo. Aos técnicos de laboratório pelo aconselhamento científico, pela amizade e também pelas broncas. Um agradecimento especial para a Bete, Rosana e a Cláudia, por sempre estarem dispostas a me guiar e ajudar em tudo que fosse possível.

Ao Laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias e o Bloco B, seus integrantes e aos amigos adquiridos nessa jornada, por todo o apoio e suporte tanto intelectual quando social. Em especial aos meus companheiros do dia a dia, Ana Carolina Coelho, Ana Carolina Rabelo, Carolina, Fábio, Jéssica, Nathalia, Frederico e Wilson.

Agradeço a colaboração dos docentes da FMRP e FFCLRP do *campus* da USP de Ribeirão Preto, que possibilitaram a realização de experimentos em seus respectivos laboratórios e também auxiliaram com as discussões científicas, a Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior, Profa. Dra. Danielle Pretti da Cunha Tirapelli, Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, Prof. Dr. Vítor Marcel Faça, bem como, de Dra. Maristela Delgado Orellana do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Agradeço a colaboração da Profa Dra. Vania D'Almeida da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e a funcionária Joyce

Umbelino da Silva Yamamoto que auxiliaram nos ensaios de atividade biológica por fluorimetria.

À Comissão de Programa de Pós-Graduação da FMRP-USP e ao Programa The Fox International Fellowship de Yale University – EUA que permitiram meu estágio no laboratório do Prof. Dr. Pramod Kumar Mistry, Diretor do Centro de Doença Lisossomal e de Tratamento de Doença de Gaucher da Faculdade de Medicina da Universidade de Yale, New Haven, CT, USA para a realização dos ensaios em modelo animal. E juntamente, agradeço aos técnicos e pesquisadores Jiapeng Ruan, Gleen Belinsky e Ruby Yang.

Aos amigos que eu cruzei o mundo para conhecer, o Luís Henrique, a Zoia e o Gabriel, que me deram muito apoio quando as coisas ficaram difíceis.

Aos amigos da graduação que até hoje me dão suporte, Augusto, Tales, Joel, Flávio e Fernanda.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por colocar à disposição a área experimental e os laboratórios.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo N° 130282 /2016-2) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

DINIZ, Gabriella Macedo Mascarenhas. **Caracterização *ex vivo* e *in vivo* da enzima β -glicosilceramidase lisossomal recombinante e clonagem celular da linhagem humana com produção permanente dessa molécula.** 2018. 114 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A doença de Gaucher (DG) é a doença mais comum dentre as disfunções de armazenamento lisossomal, sendo decorrente de mutações no gene que codifica a enzima β -glicosilceramidase (GBA). A terapia de reposição enzimática com GBA recombinante é a principal forma de tratamento para pacientes com DG, mas ainda é um medicamento de alto custo. Resultados recentes em nosso grupo de pesquisa mostraram, por meio da produção transiente, que a molécula mutGBA está relacionada com elevada atividade biológica e, assim, foi gerada a linhagem celular humana L16_293-FT-P2-mutGBA com produção permanente dessa enzima. Neste trabalho, o objetivo foi continuar a caracterização dessa molécula por meio de ensaios *ex vivo* e *in vivo* e realizar a clonagem dessa linhagem celular. A primeira etapa foi realizar o escalonamento da produção da enzima recombinante mutGBA pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA. Assim, após o cultivo em larga escala foi possível obter 9677 U GBA no sobrenadante da cultura celular, um aumento de 217 x em relação ao cultivo em pequena escala. Na segunda etapa, a molécula mutGBA foi caracterizada por meio de ensaios *ex vivo* e *in vivo* em modelo de camundongo condicional para DG e fibroblastos de pacientes. OS fibroblastos de indivíduos saudáveis e indivíduos com DG foram caracterizados quanto o nível das três enzimas GBA (GBA lisossomal, GBA2 e GBA3). Com o uso de inibidores específicos (CBE e NB-DNJ) foi possível demonstrar que fibroblasto de indivíduo saudável produz cerca de 70,9 (\pm 3,1) U GBA/mg de proteína e que 30% da atividade enzimática avaliada pelo ensaio fluorimétrico com o substrato sintético 4-MU são relativas as outras enzimas GBAs não lisossomais, sendo desses 70% GBA2 e 30% GBA3. Fibroblastos de pacientes com DG produzem cerca de 6,9 (\pm 1,5) U GBA/mg de proteína e a relação para o nível das 3 enzimas GBAs foi a mesma relatada para indivíduos saudáveis. Em seguida, ensaios de *uptake* da enzima mutGBA e da enzima recombinante comercial (VPRIV) mostraram que as mesmas não são absorvidas por fibroblasto até 6 h de incubação. Análises *ex vivo* da atividade da enzima GBA em macrófagos em 6 tempos após a infusão de 19 U de mutGBA mostraram que a mesma é biologicamente ativa em macrófagos com pico mais elevado da atividade biológica no tempo de 1:30 h (46,5 U GBA/mg proteína) ou 30 min. (4 U GBA/mg proteína) em macrófago derivado de camundongo controle e camundongo com DG, respectivamente. Ensaios preliminares *in vivo* também foram investigados. A análise da atividade biológica da enzima GBA em baço, fígado e leucócitos após 1 hora da infusão de 19 U da enzima mutGBA permitiu mostrar um aumento de 1,4x, 1,5x e 1,8x, respectivamente, o que sugere a internalização da enzima mutGBA nesses tecidos. Por fim, foi possível realizar a clonagem celular e identificação de dois clones com maior produção de GBA em relação a população mista ($p < 0,05$). O clone 5, com maior produção de mutGBA no sobrenadante, cerca de 301,4 (\pm 4,35) U GBA/mL ou 207 (\pm 3,23) U GBA/10⁶ células e o clone 13, com maior produção de mutGBA intracelular, cerca de 622 (\pm 4,35) U GBA/mg de proteína ou 325,5 (\pm 3,23) U GBA/10⁶ células. Em conclusão, os dados apresentados mostram que a linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA

apresenta elevados níveis de produção de β -glicosilceramidase recombinante, é capaz de ser internalizada por macrófagos e biologicamente ativa *in vivo*, sendo assim, uma linhagem de produção promissora para uso na TRE.

Palavras-chave: Doença de Gaucher, Esfingolipidose, Glicosilceramidase Recombinante, Linhagem Celular Humana, Camundongo Condicional para Doença de Gaucher (Mx1/Cre/LoxP).

ABSTRACT

DINIZ, Gabriella Macedo Mascarenhas. ***Ex vivo* and *in vivo* characterization of recombinant β -glucosylceramidase enzyme and cell cloning of a human cell line with stable production of this molecule.** 2018. 114 f. Dissertation (Master in Genetics) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Gaucher disease (GD) is the most common disease among lysosomal storage disorders, and is caused by mutations in the β -glucosylceramidase (GBA) enzyme encoding gene. Enzyme replacement therapy is the main treatment for GD patients, but recombinant GBA is expensive. Recent results in our research group showed, through transient production, that the mutGBA molecule possess high biological activity, so the human cell line L16_293-FT-P2-mutGBA was generated with permanent production of this enzyme. In this work, the aim was to continue the characterization of this molecule using *ex vivo* and *in vivo* assays and perform single cell cloning. First, we enhanced the production of the recombinant mutGBA enzyme from L16_293-FT-P2-mutGBA cell line. After large-scale culture we obtained 9677 U GBA in the supernatant of the cell culture, which is an 217x increase in relation to the small-scale culture. The level of the three GBA enzymes (GBA lysosomal, GBA2 and GBA3) were characterized in fibroblasts from healthy individuals and GD patients. Using specific inhibitors (CBE and NB-DNJ) we were able to show that healthy fibroblast produces 70.9 (\pm 3.1) U GBA / mg protein and that 30% of the enzymatic activity evaluated by the fluorimetric assay with the synthetic substrate 4-MU are other non-lysosomal GBA enzymes. Of the non-lysosomal 30%, 70% are GBA2 enzyme and 30% are GBA3 enzyme. GD patients' fibroblasts produce about 6.9 (\pm 1.5) U GBA / mg protein and the ratio for the level of the 3 GBAs enzymes was the same as reported for healthy subjects. Next, we did mutGBA enzyme uptake assays with mutGBA and a commercial recombinant enzyme (VPRIV), both molecules didn't show any enhanced GBA activity up to 6 h of incubation. Then, the mutGBA molecule was characterized by *ex vivo* and *in vivo* assays in a GD mouse model. *Ex vivo* analyzes of GBA enzyme activity in macrophages with infusion of 19 U mutGBA showed that the enzyme is biologically active in macrophages. The biological activity highest peak was after 1:30 h (46.5 U GBA / mg protein) or 30 min. (4 U GBA / mg protein) incubation in macrophage derived from mouse control and GD mouse, respectively. Preliminary *in vivo* assays were also investigated. The GBA biological activity in spleen, liver and leukocytes after 1h infusion with 19 U of mutGBA enzyme showed an increase of 1.4x, 1.5x and 1.8x, respectively, suggesting mutGBA internalization in these tissues. Finally, it was possible to perform single cell cloning and identification of two clones with higher GBA production in relation to the heterologous population ($p < 0.05$). Clone 5 showed the highest production of mutGBA in the supernatant, 301.4 (\pm 4.35) U GBA / ml or 207 (\pm 3.23) U GBA/ 10^6 cells and clone 13 with the highest intracellular production, about 622 (\pm 4.35) U GBA / mg protein or 325.5 (\pm 3.23) U / 10^6 cells. In conclusion, L16_293-FT-P2-mutGBA line shows high levels of recombinant β -glycosylceramidase production, and the enzyme is active and capable of being internalized by macrophages and biologically active *in vivo*, thus being a promising cell line for use in ERT.

Key words: Gaucher disease. Sphingolipidosis. Recombinant Glucosylceramidase. Human Cell Line. Cre-Lox conditional GBA mutation mouse.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
Nota de esclarecimento.....	16
1 Introdução.....	17
1.1. Doença de Gaucher	17
1.2 β -Glicosilceramidase	18
1.3 Terapia de reposição enzimática.....	23
1.4 Métodos de produção de β -Glicosilceramidase recombinantes	25
1.5 Integração de transgenes e clonagem celular.....	30
1.6 Modelo murino para DG	34
2 JUSTIFICATIVA.....	37
3 HIPÓTESE.....	38
4 OBJETIVO GERAL.....	39
4.1 Objetivos específicos:	39
5 MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1 Cultivo e expansão da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA.....	41
5.2 Escalonamento de produção da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA.....	42
5.3 Obtenção de clones celulares	44
5.4 Experimento para obtenção de amostra de sobrenadante e intracelular dos clones celulares	44
5.5 Cultivo e expansão de fibroblastos primários.....	45
5.6 Camundongos modelo para DG.....	46
5.6.1 Genotipagem	47
5.7 Isolamento de macrófagos de medula óssea de camundongos	47
5.8 Isolamento de leucócitos.....	48

5.9	Extração e quantificação de proteínas	48
5.9.1	Extração de proteína total dos órgãos dos camundongos	48
5.9.2	Extração de proteína total das amostras de cultura de fibroblastos e de macrófagos	50
5.9.3	Extração proteica dos leucócitos e das linhagens derivadas da 293FT	51
5.10	Atividade Biológica da β -Glicosilceramidase	51
5.10.1	Atividade biológica da GBA do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (UNIFESP)	51
5.10.2	Atividade biológica da GBA intracelular em microplaca segundo o Laboratório de Medicina e Pediatria (YALE)	53
5.11	Análises estatísticas	56
6	RESULTADOS	57
6.1	Escalonamento da produção de GBA da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA	57
6.2	Atividade biológica da GBA nos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos modelos para DG	58
6.3	Internalização da proteína mutGBA por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos modelos para DG	60
6.4	Atividade enzimática específica de GBA de fibroblastos de pacientes com DG versus indivíduos saudáveis	62
6.5	Fibroblastos incubados com mutGBA	65
6.6	Genotipagem dos camundongos modelos de DG	69
6.7	Internalização da mutGBA no fígado, baço, cérebro e pulmões de camundongos modelos para DG	69
6.8	Produção extracelular e intracelular de GBA pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA	72
6.9	Clonagem celular e produção de mutGBA secretada	73
6.10	Atividade enzimática específica e produção de GBA intracelular nos clones celulares	78

7	DISCUSSÃO.....	84
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
9	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
	ANÉXOS	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APP	Ácido polinosínico-policitidílico
BHE	Barreira hematoencefálica
CBE	Epóxido de conduritol B
CHO	Células de ovário de <i>hamster</i> chinês
DG	Doença de Gaucher
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
mRNA	RNA mensageiro, Ácido ribonucleico mensageiro
mutGBA	GBA recombinante mutante produzida pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA
NB- DNJ	N-butyldeoxynojirimycin
GBA	β - Glicosilceramidase, ou GBA lisossomal
GBAP1	Pseudogene da GBA
GBA2	β - Glicosilceramidase 2, ou GBA do ácido biliar
GBA3	β - Glicosilceramidase 3, ou GBA citosólica
GlcCer	Glicosilceramida
LIMP-2	<i>Lysosomal integral membrane protein</i>
LSD	<i>Lisosomal Storage Disease</i> , do inglês, Doenças de acúmulo lisossômico.
LEIM	Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulator factor</i> , do inglês, Fator de estimulação de colônias de macrófago
Pb	Pares de Base
RE	Retículo Endoplasmático
rGBA	GBA recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro bovino fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
TCP80	<i>Translational Control Protein 80</i>
TRS	Terapia de redução de substrato

TRE	Terapia de reposição enzimática
URF	Unidades Relativas de Fluorescência
VPRIV	Alfa-velaglucerase
WT	Wild type, do inglês, tipo selvagem

Nota de esclarecimento

Espera-se que o produto desse projeto de pesquisa gere uma patente. Para evitar a quebra de novidade, atividade inventiva e suficiência descritiva, requisitos mínimos de patenteabilidade, os resultados foram apresentados sem mencionar as mutações geradas (mutações não caracterizadas).

1 Introdução

1.1. Doença de Gaucher

A doença de Gaucher (DG) (OMIM: 230800; 230900; 231000) é uma esfingolipidose herdada de forma autossômica recessiva, sendo a mais frequente entre as Doenças de Acúmulo Lisossomal (LSD, *Lisosomal Storage Disease*). A DG tem prevalência de 1:40.000 nascimentos no mundo (MEIKLE et al., 1999; ZIMRAN; ELSTEIN, 2015) sendo caracterizada pelo aumento visceral progressivo, afetando principalmente o baço, o fígado e pulmões, acompanhado de alterações na medula óssea e, em alguns casos, danos no sistema nervoso central (COX, 2010). O quadro clínico é consequência da mutação em ambos os alelos do gene da β -Glicosilceramidase (GBA) que resulta na baixa atividade da enzima β -Glicosilceramidase (GBA) (BRADY; KANFER; SHAPIRO, 1965). A inatividade da GBA gera o acúmulo de seu substrato, a glicosilceramida (GlcCer), nos lisossomos dos macrófagos e promove respostas inflamatórias em vários tecidos (BARTON et al., 1991; PANICKER et al., 2014).

A etiologia da DG é o foco de diversos estudos desde sua descrição por Phillip Gaucher, em 1882 (BRADY, 1966), sendo que, apenas em 1901, foi introduzido o termo "Doença de Gaucher" (BRILL, 1901). Considerando as manifestações clínicas, DG é geralmente dividida em três classes denominadas Tipo I, Tipo II e Tipo III (GRABOWSKI; ZIMRAN; IDA, 2015). O Tipo I da doença é o mais frequente, representando 94% dos casos (CHARROW et al., 2000). Nessa classe os portadores possuem mutações que inviabilizam parcialmente a atividade da GBA e não apresentam comprometimento do sistema nervoso central (SNC) (COX, 2010). Já em indivíduos com mutações que resultam em deficiência severa da atividade enzimática, a doença é classificada como Tipos II e III, e nesses casos há manifestações neurológicas por consequência da incapacidade de degradar glicoesfingolípídeos presentes nos neurônios (NILSSON; SVENNERHOLM, 1982). O Tipo II é caracterizado pelo comprometimento neurológico grave e precoce, sendo chamado de infantil devido à expectativa de vida curta dos indivíduos afetados. Já o Tipo III, é

considerado o tipo crônico da doença, nesse grupo os pacientes apresentam diferentes níveis de atraso cognitivo e tempo de vida variável (SOUZA et al., 2010).

Segundo Mistry e colaboradores (2015), a DG é uma doença com grande variação fenotípica, muito heterogênea, com idade de início dos sintomas incerta e um amplo espectro clínico de severidade, podendo ser letal durante a infância ou ter início dos sintomas em idosos. Pacientes com Gaucher tipo I podem apresentar combinações variáveis de esplenomegalia, hepatomegalia, retardo de crescimento e doença óssea. Além disso, entre os órgãos a gravidade das manifestações é diferente, por exemplo, a osteopenia pode ocorrer sem doença hematológica ou visceral significativa (SIDRANSKY, 2004). Muitos aspectos da DG não são totalmente compreendidos, incluindo aspectos do tipo neuropático, a patogênese da doença óssea e a variabilidade das manifestações entre pacientes do mesmo genótipo (CAPABLO et al., 2008; SIDRANSKY, 2004). Além disso, mutações na *GBA* têm sido consideradas fatores de risco para outras doenças como câncer (DE FOST et al., 2006; LO et al., 2010), e neuropatias (SCHAPIRA; GEGG, 2018; VELAYATI; YU; SIDRANSKY, 2010). Mutações na *GBA* são o maior fator de risco para o desenvolvimento da Doença de Parkinson idiopática, considerando apenas um gene individualmente. A análise de 5.691 pacientes com Doença de Parkinson, e 4.898 controles, mostrou que a chance desses pacientes possuírem um alelo mutante da *GBA* é 5,4 vezes maior comparado aos controles saudáveis (SIDRANSKY et al., 2009).

1.2 β -Glicosilceramidase

A β -Glicosilceramidase (*GBA*, OMIM # 606463) é uma enzima lisossômica que hidrolisa a glicosilceramida, um esfingolípido presente na membrana plasmática de células de mamíferos. O gene *GBA* é constituído por 11 éxons e 10 íntrons, que se distribuem em 7,6 kb, localiza-se no cromossomo 1q21 (BARNEVELD et al., 1983; GINNS et al., 1985) e apresenta um pseudogene homólogo localizado a 16kb a jusante do gene funcional (Figura.1A) (HOROWITZ et al., 1989; WINFIELD et al., 1997; ZIMRAN et al., 1990). O pseudogene da *GBA* (*GBAP1*) possui mais de 96% de similaridade de sequência na porção exônica com a *GBA*, entretanto é mais curto devido a exclusão de 55 pb no éxon 9 no *GBAP1*, e também as várias inserções de sequências *Alu* em regiões intrônicas na *GBA* (HOROWITZ et al., 1989; SORGE et

al., 1990). O alto grau de similaridade e proximidade física entre o *GBAP1* e a *GBA*, têm como consequência eventos de recombinação, resultando em fusões, duplicações e deleções no gene funcional que podem causar a DG (LATHAM et al., 1991; MARTÍNEZ-ARIAS et al., 2001).

De acordo com o *The Human Gene Mutation Database*, mais de 400 mutações da β -Glicosilceramidase já foram descritas, e as mutações mais frequentes mundialmente são c.1226A> G (N370S), c.1448T> C (L444P) (Figura 1A) (SCOTT et al., 2000). No Brasil, um estudo envolvendo 221 indivíduos afetados com DG mostrou que o genótipo mais frequente é o heterozigoto composto, N370S/L444P, enquanto no resto do mundo é N370S/N370S (SOBREIRA et al., 2007). Outra mutação que se destaca na população brasileira é a c.1246G>A (G377S), em especial em Tabuleiro do Norte – Ceará. Nessa região, a frequência de indivíduos afetados com DG é de 1:4000, na qual Chaves e colaboradores (2015) sugerem que tenha ocorrido um caso de efeito fundador (CHAVES et al., 2015). Embora a correlação genotípica e fenotípica seja complexa na DG, alguns alelos têm um padrão clínico já conhecido, e assim as mutações são divididas em três grupos de acordo com o seu efeito fenotípico, sendo então mutações nulas, severas e leves (BEUTLER; GELBART; SCOTT, 2005). Mutações nulas são aquelas que não produzem nenhum produto proteico com atividade enzimática, como a mutação 84GG, exclusiva de descendentes de judeus Ashkenazi, que causa uma alteração no quadro de leitura (BEUTLER; GELBART; SCOTT, 2005). O N370S é considerado um alelo de efeitos leves, sendo que geralmente um único N370S, independentemente de segunda mutação, é suficiente para evitar a doença neuropática aguda. Já a L444P é uma mutação severa, e, na ausência de um alelo N370S, é frequentemente associado a danos neurológicos de início precoce correlacionados a um fenótipo neuropática típico do tipo III da doença (BALWANI; GRACE; DESNICK, 2011; SCOTT et al., 2010). O alelo G377S, pode ser considerado leve, pois em homozigose acarreta em pacientes os sintomas do tipo I da doença, mas quando em heterozigotos compostos pode culminar no tipo neuropático da DG (ROZENBERG et al., 2006).

A enzima GBA é uma hidrolase lisossomal associada à membrana que, com o auxílio de Saposina C, cliva a ligação β -glicosil da glicosilceramida, produzindo glicose e ceramida, e sua deficiência resulta no acúmulo de seu substrato no lisossomo (Figura. 1B)(O'BRIEN; KISHIMOTO, 1991; TAMARGO et al., 2012). Embora a

atividade da GBA esteja diminuída em todos os tipos de células dos pacientes com DG, no tipo I da doença grandes acúmulos de GlcCer são observados principalmente em macrófagos (BUSSINK et al., 2006). As chamadas "células de Gaucher" são macrófagos aumentados devido ao acúmulo de GlcCer, e essas são encontradas em vários órgãos nos pacientes com DG, embora sejam predominantes na medula óssea, fígado e baço (BUSSINK et al., 2006). Acredita-se que esse acúmulo ocorra em especial nos macrófagos devido a função dessas células no *turn-over* celular, processo pelo qual os macrófagos endocitam grandes quantidades de GlcCer derivado da membrana de eritrócitos e leucócitos (NAITO; TAKAHASHI; HOJO, 1988).

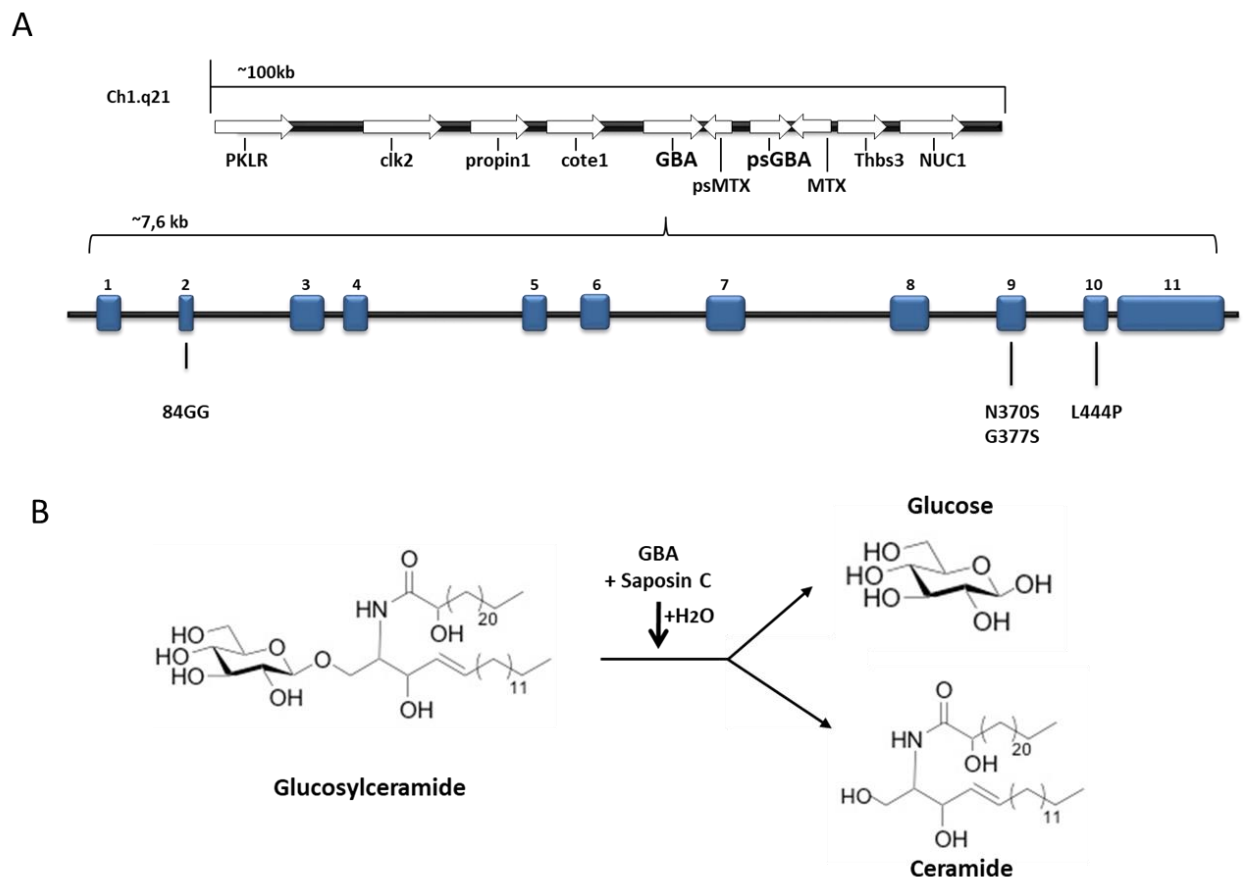


Figura 1. A) Estrutura e posição do gene *GBA* e *GBAP1*, com destaque para a posição das mutações mais comuns no gene, 84GG; N370S; G377S e L444P. B) Reação catalisada pela *GBA* + SaposinaC; Glicosilceramida hidrolisada por *GBA*+SaposinaC gera Glicose e Ceramida. Modificada de Clark et al., 2013 e Dvir et al., 2003.

A enzima GBA, em sua forma madura, contém 497 aminoácidos e possui entre 59 e 69 kDa, dependendo das modificações após a tradução (GRABOWSKI et al., 1990). Dvir e colaboradores (2003), por meio de análises de raios X, foram os

primeiros pesquisadores a elucidar a GBA estruturalmente e descreveram a presença de três domínios. O domínio I, que fica entre os resíduos 1 a 27 e 383 a 414, contendo duas pontes de dissulfeto, resíduos 4-16 e 18-23, que são necessárias para a conformação tridimensional. Além disso, nesse domínio o aminoácido N19 é glicosilado, característica essencial para a atividade catalítica *in vivo* da GBA (BERGFUSSMAN et al., 1993). O Domínio II corresponde aos resíduos 30-75 e 431-497 e o Domínio III, entre os resíduos 76-381 e 416-430, ele também contém o sítio catalítico e possui três cisteínas livres nas posições 126, 248 e 342. As cisteínas presentes na molécula têm grande participação na estabilidade da proteína e atividade enzimática, em especial a cisteína 342, devido a sua proximidade ao sítio catalítico (Figura 2A). A estrutura quaternária da GBA não é completamente compreendida, assim, ainda não se sabe a conformação da GBA *in vivo* (SMITH; MULLIN; SCHAPIRA, 2017).

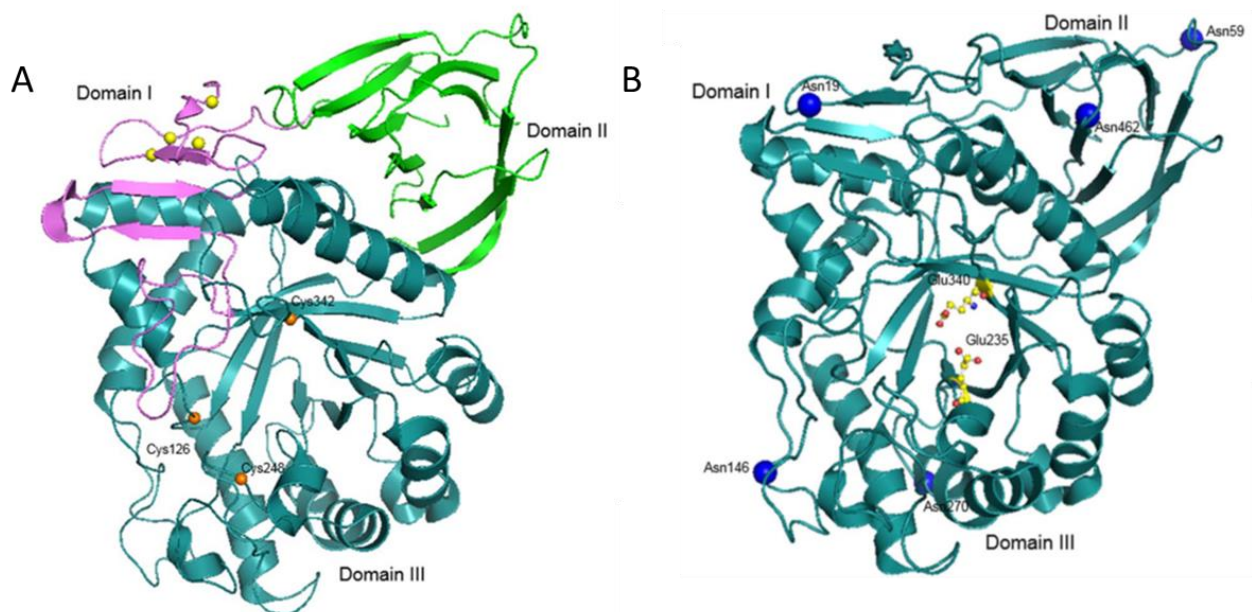


Figura 2. Estruturas de raios-X da β -glicosilceramidase ácida (*Protein Data Bank*, 3GXD). A) Domínio I, em rosa, com os átomos de enxofre representados por esferas amarelas. Domínio II, em verde claro. Domínio III, em verde-azulado, o domínio catalítico, contém as três cisteínas livres representadas por esferas laranja. B) Estruturas de raios-X da β -Glicosilceramidase ácida, posições de N-glicosilação. Os locais de N-glicosilação estão representados como esferas azuis, o sítio catalítico está representado pelas esferas amarelas e vermelhas. Fonte: SMITH; MULLIN; SCHAPIRA, (2017)

A GBA é traduzida no retículo endoplasmático (RE), passa por modificações estruturais no Complexo de Golgi e, então, é direcionada aos lisossomos por meio da proteína lisossômica de membrana integral tipo 2 (LIMP-2) (SMITH; MULLIN; SCHAPIRA, 2017; ZUNKE et al., 2016). A LIMP-2 é uma proteína transmembrana

essencial para o direcionamento adequado da GBA. A interação das duas proteínas ocorre no RE, seguido do tráfego do complexo LIMP2/GBA para as vesículas lisossomais (RECZEK et al., 2007; ROTH AUG et al., 2014). Reczek e colaboradores (2007), avaliaram a atividade biológica da GBA em camundongos nocaute para LIMP-2, nessas condições foram observadas diminuições de pelo menos 50% na atividade da GBA no baço, fígado e nos pulmões, e aproximadamente 60% de atividade no cérebro. Os mesmos autores, realizaram um experimento de imuno-fluorescência em cortes de fígado e baço nos camundongos nocaute para LIMP-2, e observaram baixa, ou ausência, de fluorescência respectiva da proteína GBA (RECZEK et al., 2007). Destacando, assim, a importância de uma LIMP-2 funcional para o direcionamento da GBA e sua não depleção (RECZEK et al., 2007; ZUNKE et al., 2016).

Na via de biossíntese da GBA, a proteína passa por uma fase de maturação, onde há a remoção do peptídeo sinal de 19 ou 39 aminoácidos dos 536 ou 516 aminoácidos iniciais, e é convertida na proteína final com 497 resíduos (SORGE et al., 1987). Outra modificação pós traducional importante são as glicosilações que ocorrem no Complexo de Golgi pois, como diversas enzimas lisossomais, a GBA é glicosilada para manter sua estabilidade conformacional e atividade catalítica (RIJNBOUTT et al., 1991). Os cinco sítios potenciais de N-glicosilação são Asn 19, Asn 59, Asn 146, Asn 270 e Asn 462 (Figura 2B), e geralmente os 4 primeiros são mantidos glicosilados (DVIR et al., 2003). Como esperado para uma enzima lisossomal, o pH ótimo para a atividade da GBA é de 4,7–5,9 (TAN et al., 2014) e em pH neutro (~ 7,4), semelhante ao lúmen do RE, a atividade enzimática é completamente interrompida (LIEBERMAN et al., 2007). O pH ácido do lisossomo proporciona estabilidade à conformação tridimensional da enzima GBA.

A GlcCer é degradada por três hidrolases diferentes, sendo a GBA uma enzima lisossômica, a GBA2 e GBA3 enzimas não-lisossômicas. Embora os genes que codificam para *GBA*, *GBA2* e *GBA3* não tenham similaridade na sequência gênica, elas possuem atividade catalítica similar (YILDIZ et al., 2013). O gene que codifica a enzima GBA2 localiza-se no cromossomo 9p13 (MATERN et al., 2001), e essa é uma proteína citosólica associada a membrana, encontrada na superfície RE e Complexo de Golgi (BOOT et al., 2007; KÖRSCHEN et al., 2013). A GBA2 é importante em respostas de sinalização e como contribui para a atividade da GBA1 (KÖRSCHEN et al., 2013; WOESTE; WACHTEN, 2017). Indivíduos com mutações em ambos os alelos

da *GBA2*, apresentam uma combinação variável de ataxia cerebelar, paraplegia espástica e comprometimento cognitivo (YILDIZ et al., 2013). Já o gene que codifica para a *GBA3*, está localizado no cromossomo 4p15. Essa é uma enzima citosólica solúvel presente no rim, fígado, baço, intestino e linfócitos de mamíferos e compartilha domínios similares às proteínas da família Klotho, diferindo das mesmas por se apresentar como a única proteína desse grupo com atividade beta-Glicosilceramidase (CHEN et al., 2018; HAYASHI et al., 2007). Outra diferença entre as hidrolases de GlcCer é a forma pela qual elas podem ser inibidas, a *GBA* é inibida de forma específica e irreversível pelo epóxido de conduritol B (CBE), enquanto esse composto não afeta as *GBAs* não-lisossômicas (GRABOWSKI et al., 1984). Já a atividade da *GBA2* é muito sensível à inibição por análogos de desoxinojirimicina hidrofóbicos, como por exemplo, o N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ), que em altas concentrações afeta também a *GBA* (PLATT et al., 1994). Por consequência dessa inibição seletiva das *GBAs*, quando o CBE e o NB-DNJ são acrescentados ao método convencional de mensuração da atividade enzimática da *GBA*-total é possível analisar a atividade biológica específica de cada *GBA*.

1.3 Terapia de reposição enzimática

A DG foi a primeira doença de acúmulo lisossomal na qual foi criada uma terapia específica, sendo até hoje considerada como modelo para o desenvolvimento de tratamentos para doenças do erro inato do metabolismo. Atualmente existem duas principais opções de tratamento para DG, terapia de reposição enzimática (TRE) e terapia de redução de substrato (TRS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A TRE é basicamente a reposição da enzima deficiente através da infusão intravenosa aos pacientes a cada 15 dias. A TRS consiste na inibição da formação da GlcCer nas células para que não ocorra seu acúmulo. O miglustate (Zavesca®, Actelion Pharmaceuticals), por exemplo, é um análogo à glicose que inibe a glicosilceramida sintase, que é a primeira enzima na síntese da glicosilceramida, tendo como consequência a redução da GlcCer nas células (PLATT et al., 2001). Embora exista essa segunda opção terapêutica disponível, a grande maioria dos pacientes são tratados com TRE. No Brasil, por exemplo, dos 670 pacientes com DG cadastrados

no Sistema Único de Saúde, 96% utilizam a TRE e 4% TRS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A terapia de reposição enzimática para doenças de acúmulo lisossomal foi sugerida em 1964 por Christian de Duve, na qual o autor propôs que substâncias absorvidas intracelularmente em um processo endocítico poderiam alcançar os lisossomos com facilidade (DE DUVE, 1964). Os primeiros tratamentos utilizavam a GBA purificada da placenta humana, entretanto, mesmo sendo observada a redução de GlcCer no fígado, a proteína era de difícil obtenção e elevado custo (GRABOWSKI, 1995). Apenas em 1994, com o avanço da tecnologia e manipulação do DNA, uma GBA recombinante (rGBA) foi disponibilizada para grande parte dos pacientes e, desde então, a TRE revolucionou a forma de tratamento e mudou a qualidade de vida de pessoas com DG (GOLDMAN; CLARKE; GARBER, 1992).

Atualmente no Brasil, são comercializados 3 tipos de rGBAs, a imiglucerase (Cerezyme®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA), a taliglucerase alfa (Elelyso®, Protalix Biotherapeutics, Carmiel, Israel) e a alfa-velaglucerase (VPRIV®, Shire HGT, Cambridge MA). As enzimas diferem-se pela forma de produção, a sequência de aminoácidos e ao padrão de glicosilação, o que pode afetar a eficiência de internalização e propriedades imunogênicas das moléculas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). As rGBAs são administradas aos pacientes em doses de aproximadamente 15 unidades / kg a 60 unidades / kg de peso corporal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Assim, considerando a dose média de 30 U/kg/infusão a cada 15 dias para um adulto de 70 kg, anualmente cada paciente receberia 50.400U da enzima (Relatório da Conitec [Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias SUS], 2014). Considerando que o custo da dose de 400U de imiglucerase é, atualmente, U\$1.664,34, então cada paciente adulto requer aproximadamente U\$ 210.000,00 por ano.

A TRE é eficaz na maioria dos pacientes, com redução no volume de fígado e baço, aumento das concentrações de hemoglobina e contagem de plaquetas, sendo que os pacientes com DG atingem um patamar clínico estável, após os primeiros anos de tratamento. Existem poucos efeitos colaterais, pode ser observado o aumento de peso temporário, resistência à insulina, com poucas reações de hipersensibilidade e casos raros de anafilaxia (MISTRY et al., 2017; STARZYK et al., 2007). Embora a TRE seja padrão ouro para o tratamento de DG, seu benefício é apenas para indivíduos

com DG tipo I. Em pacientes com a variante neuropática pouco ou nenhum efeito é observado no sistema nervoso, pois as enzimas administradas não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE), por consequência do grande tamanho da GBA, (BRADY; YANG; ZHUANG, 2013).

Mesmo a TRE sendo o padrão ouro para o tratamento para pacientes com DG, o alto custo de produção dificulta a manipulação de doses elevadas da enzima para os pacientes (DANDANA et al., 2016). E, além disso, a comercialização das rGBA está sob monopólio de grandes empresas internacionais como a Genzyme Corporation, a Shire Human Genetic Therapies e a Protalix Biotherapeutics. Considerando essas deficiências na TRE atual, fica clara a importância da produção de novas proteínas com funções e produção otimizadas, para fornecer melhores condições aos pacientes com um baixo custo para o país.

1.4 Métodos de produção de β -Glicosilceramidase recombinantes

Até a década de 90, antes da implementação da terapia de reposição enzimática com GBA, os tratamentos disponíveis aos afetados com DG eram limitados à amenização dos sintomas secundários, com transfusões de sangue, administração de analgésicos, oxigenoterapia e repouso (GOLDMAN; CLARKE; GARBER, 1992; STARZL et al., 1993). Em casos mais graves, eram realizados transplantes de medula óssea (RAPPEPORT; GINNS, 1984) e porções do baço e do fígado eram retirados por procedimentos cirúrgicos ou até transplantados. Entretanto, ambas as intervenções resultaram pouca, ou nenhuma, melhora do quadro clínico a longo prazo (AYTO et al., 2010; FLESHNER et al., 1991; GROTH et al., 1971; STARZL et al., 1993). A sugestão de utilizar-se a proteína GBA purificada de outros tecidos como alternativa de tratamento foi definida por Roscoe O. Brady (1966), na década de 60, mas apenas em 1973, Pentchev e colaboradores, foram capazes de extrair e purificar a GBA de placentas humanas, sendo mais tarde chamada de alglucerase (Ceredase®) (BRADY, 1966; GOLDMAN; CLARKE; GARBER, 1992; PENTCHEV et al., 1973). No ano seguinte, Brady e colaboradores (1974) realizaram o primeiro teste clínico da Alglucerase, no qual foi administrado a dois pacientes com DG, aproximadamente, $1,6 \times 10^6$ U de GBA por dois dias consecutivos. Uma biópsia do fígado dos pacientes, após 24h da infusão, mostrou a redução dos níveis de

glicosilceramida em 26%, em ambos os casos. Já os leucócitos desses pacientes foram avaliados após 72h, e também foi detectada uma redução de glicosilceramida de 16,2% e 10,3% (BRADY et al., 1974). Com esses resultados iniciais positivos, nos anos seguintes, foi conduzida uma série de análises clínicas da Alglucerase e o aperfeiçoamento de sua purificação, até que, em 1991, o FDA aprovou a administração de Alglucerase em pacientes com DG tipo I (GOLDMAN; CLARKE; GARBER, 1992). Entretanto, a principal limitação desse tratamento era disponibilidade do produto bruto. Conforme descrito por Grabowski et al 1995, para o tratamento anual de cada paciente eram necessárias aproximadamente 50.000 placentas humanas (GRABOWSKI, 1995). Assim, sabendo da eficácia da TRE para o tratamento de pacientes com GD e a dificuldade de obtenção da GBA extraída da placenta, foi estudada a possibilidade da produção de GBAs recombinantes a partir de plataformas de expressão de proteínas (GOLDMAN; CLARKE; GARBER, 1992; GRABOWSKI, 1995).

Um fator crítico na produção eficiente de uma proteína recombinante é a escolha do sistema de expressão, GBAs recombinantes já foram produzidas em várias plataformas incluindo células de mamíferos como CHO, células de inseto, leveduras, células de raiz de cenoura, tabaco transgênico e células humanas, HEK 293 (utilizada no atual estudo) e linhagens de fibrosarcoma (BANDARANAYAKE; ALMO, 2014; LALONDE; DUROCHER, 2017). Cada sistema tem suas próprias vantagens, entretanto para a produção de proteínas administradas em seres humanos, como a GBA, é importante que o modelo celular tenha semelhança com processo de enovelamento de proteínas, além dos tipos modificações pós-traducional e padrões de glicosilação, que podem ser alcançados com a utilização de células humanas (WALSH, 2010). A falta de fidelidade nesses processos pode afetar a estabilidade da proteína, diminuir a afinidade pelo substrato, levar ao aumento da imunogenicidade e gerar rápida desnaturação da enzima (LALONDE; DUROCHER, 2017; WALSH; JEFFERIS, 2006). Em especial para GBA, as modificações pós transducionais e padrões de glicosilação são essenciais para internalização por macrófagos em manutenção da atividade enzimática (SATO; BEUTLER, 1993; SMITH; MULLIN; SCHAPIRA, 2017). Em sistemas de produção que não reproduzem a estrutura da GBA humana, etapas adicionais para gerar as modificações pós traducionais são

acrescidas ao processo de produção, entretanto isso eleva o custo e o tempo de produção (GRABOWSKI, 1995).

A primeira descrição de uma β -Glicosilceramidase recombinante foi em 1988, na qual Martin e colaboradores realizaram a infecção de células do inseto *Spodoptera frugiperda* (SF9) com o baculovírus AcNPV, contendo a sequência do cDNA da GBA humana (MARTIN et al., 1988). Os autores mostraram por meio da produção transitória que com o cultivo de $1,2 \times 10^8$ células SF9, infectadas com o baculovírus recombinante portador do gene GBA, permitiu a produção de 400,000 U de GBA intracelular e 270,000 U em 200 ml de meio de cultura. Então nessas condições, 40% da GBA produzida pelas células SF9 estavam no meio de cultura. Nesse estudo, para avaliação da atividade específica da enzima GBA, as amostras foram submetidas a ensaios de radioatividade para mensurar a quantidade de glicose liberada marcada com radioisótopo utilizando o substrato glucocerebrosídeo marcado com ^{14}C conforme descrito por Ginns e colaboradores (GINNS et al., 1982). Esse ensaio utiliza-se 70 μmol de ^{14}C -esfingolmielina (158.000 cpm/ μmol) e 1 U de atividade de enzima é definida como a quantidade de 1 μmol de esfingolmielina por minuto (GINNS et al., 1982). Martin e colaboradores demonstraram que a GBA recombinante era altamente glicosilada e que a sequência de aminoácidos da porção amino-terminal é idêntica à GBA da placenta humana, o que indica que a sequência do peptídeo sinal foi reconhecida e apropriadamente removida nas células SF9 (MARTIN et al., 1988). Os autores também compararam a GBA obtida do sobrenadante e por meio intracelular, quanto aos parâmetros de *western blot* e atividade biológica. Não houve diferença entre a imunoreatividade considerando as duas condições de produção, entretanto a detecção do pico de atividade biológica das enzimas variou quando avaliado em diferentes condições de pH. No caso da GBA obtida de forma intracelular foi observado um único pico de máxima atividade, em pH 5,5, enquanto na GBA presente no sobrenadante foram observados dois picos de atividade enzimática máxima, pH 4,5 e 5,5, sugerindo pequenas diferenças entre ambas enzimas (Martin et al., 1988).

Em 1994, a imiglucerase (Genzyme®), produzida em culturas de células de ovário de *hamster* chinês (CHO), se tornou a primeira β -Glicosilceramidase recombinante aprovada pelo FDA (FRIEDMAN, 1996). Essa rGBA é isolada do sobrenadante das células CHO recombinantes e difere-se da alglucerase por um aminoácido na posição 495, onde a histidina é substituída pela arginina, visando a exposição de resíduos de

manose (FRIEDMAN, 1996). Além disso, a produção dessa rGBA também envolve a desglicosilação sequencial *in vitro*, isto é, a remoção sequencial de açúcares siálico, galactose e N-acetil-glicosamina das cadeias oligossacarídicas nos locais de N-glicosilação para terminarem em manose (FRIEDMAN, 1996; FURBISH et al., 1981; GRABOWSKI, 1995). No relatório de características da imiglucerase fornecido pelo fabricante, é relatado que durante o primeiro ano de terapia aproximadamente 15% dos indivíduos tratados com esse fármaco desenvolvem anticorpos IgG contra a imiglucerase (GENZYME.LTD, [s.d.]). Atualmente, a Cerenzyme ainda é a proteína recombinante mais utilizada na TRE de pacientes com DG no Brasil (FRIEDMAN, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Pesquisadores brasileiros também geraram uma linhagem CHO com produção de GBA recombinante, para isso foram utilizadas as células CHO-DXB11 que são uma linhagem auxotrófica deficiente na atividade da diidrofolato redutase (NOVO et al., 2012). Novo e colaboradores (2012) demonstraram por experimentos de *western blot*, a expressão da GBA recombinante intracelular (~64 e 59 kDa) e secretada no meio de cultura (63–69 kDa). Para avaliar a estabilidade da melhor linhagem heterogênea produtora de GBA, esses autores mantiveram a cultura das células recombinantes por 45 dias em meio não seletivo, e observaram uma diminuição gradativa na taxa de produção, e ao final do experimento a linhagem apresentava o mesmo nível de GBA que as células controles. Então, a linhagem foi subclonada e a partir de uma nova seleção do clone com maior produção de GBA secretada, obtiveram produção estável com uma média de atividade biológica da GBA de $28,54 \pm 2,75 \mu\text{mol 4MU}/\text{min}/\text{mg}$ (NOVO et al., 2012).

Reggi e colaboradores, em 2005, produziram e purificaram a enzima GBA a partir de sementes de tabaco transgênico (REGGI et al., 2005). Os autores mostraram que a enzima recombinante derivada de tabaco foi enzimaticamente ativa, absorvida por fibroblastos humanos e isenta de resíduos imunogênicos. Por meio de imunomarcção, os autores mostraram localização específica do armazenamento de GBA recombinante dentro de vacúolos das sementes (REGGI et al., 2005). A internalização por fibroblastos por essa GBA produzida pelas sementes de tabaco foi 3 vezes menor que a internalização por imiglucerase, entretanto, os autores sugerem que isso pode ser que a purificação dessa rGBA foi apenas parcial. A produção observada foi de cerca de $720 \mu\text{mol}/\text{min}$ de GBA em 1 kg de sementes de tabaco colhidas de 30.000 plantas das 10 melhores linhagens (REGGI et al., 2005). He e

colaboradores (2012) descreveram a produção de rGBA em outro sistema de expressão baseado em plantas, utilizando da *Arabidopsis thaliana* (HE et al., 2012). A rGBA de *A. thaliana* apresentou um alto conteúdo de N-glicanos terminados em manose, mas para a remoção de 15% das rGBA com potencial imunogênico, um passo de purificação teve que ser adicionado (HE et al., 2012). He e colaboradores geraram 43 linhagens transgênicas com produção permanente de GBA, e foram capazes de selecionar uma com produção de GBA estável. Avaliando as sementes da a maior produção foi de 1440 nmol/h/mg de proteína total das amostras (HE et al., 2012).

Em 2007, a VPRIV (Shire Human Genetic Therapies), produzida em uma linhagem celular humana de fibroblastos HT-1080 por meio da tecnologia de ativação gênica, foi desenvolvida como uma alternativa de terapia de reposição enzimática (DANIEL, 2006). Em contraste com a imiglucerase e a taliglucerase, a velaglucerase alfa contém a sequência enzimática humana nativa. Como descrito por Daniel (2006), o modelo de produção em células HT-1080 afeta a composição de N-glicanos da GBA, o tipo de N-glicano predominante na velaglucerase alfa é o tipo *high-manose*, com nove unidades de manose presentes na molécula, enquanto a alglucerase e a imiglucerase contêm principalmente glicanos do tipo complexo (BRUMSHTEIN et al., 2010; DANIEL, 2006). A alglucerase, por exemplo, possui ~20% das cadeias de glicano com alto conteúdo de manose, e assim 80% são predominantemente do tipo complexo (TAKASAKI et al., 1984), sendo que essas diferenças podem afetar a eficácia de absorção celular das enzimas. Resultados descritos pelo fabricante da velaglucerase alfa apontam que a quantidade de pacientes que desenvolve anticorpos contra o fármaco é de 1%, após um ano de tratamento (SHIRE, [s.d.]). Brumshtein e colaboradores realizaram um experimento com incubação de velaglucerase e imiglucerase por 3h utilizando macrófagos derivados de células U937, e nessas condições os autores observaram que a velaglucerase alfa foi internalizada 2,5x mais rapidamente do que a imiglucerase (BRUMSHTEIN et al., 2010).

Em maio de 2012, a FDA aprovou a taliglucerase alfa, que é expressa em células em suspensão de raiz cenoura. Esta rGBA é armazenada no vacúolo das células e durante o processo de tradução produzem estruturas terminais de manose possibilitando a internalização pelos macrófagos (SHAALTIEL et al., 2011; ZIMRAN et al., 2018). Sendo assim, nesse sistema de expressão não são necessárias

modificações adicionais *in vitro*, como a Imiglucerase. Entretanto, nessa molécula foram feitas modificações na sequência original da GBA, com modificações na porção N-terminal e C-terminal (SHAALTIEL et al., 2011). Para avaliar a segurança e a eficácia da taliglucerase em pacientes adultos e pediátricos foram realizados estudos clínicos em vários centros médicos em todo o mundo, incluindo no Brasil (CRAVO et al., 2018; GUPTA; PASTORES, 2017). Os resultados em geral foram positivos e os eventos adversos relacionados ao medicamento foram considerados leves ou moderados, e transitórios (GUPTA; PASTORES, 2017). Entretanto, na descrição do medicamento realizado pela Pfizer Labs, em 2016, é relatado que em um ensaio clínico, 21 dos 72 pacientes tratados com taliglucerase (26%) apresentaram efeitos adversos com reações de hipersensibilidade e anafilaxia (PFIZER, 2016). Como descrito, dentre as enzimas aprovadas pelo FDA a velaglucerase alfa, produzida em células humanas de fibrosarcoma, apresenta a menor taxa de formação de anticorpos para o fármaco, o que evidencia que uma plataforma de expressão baseada em células humanas apresenta proteínas com menor imunogenicidade (SWIECH; PIKANÇO-CASTRO; COVAS, 2012).

1.5 Integração de transgenes e clonagem celular

O projeto genoma humano, concluído em abril de 2003, deixou claro que pouco compreendemos sobre a complexidade do genoma. Considerando que a sequência de DNA haplóide humana possui 3 bilhões de nucleotídeos e apenas cerca de 23.000 genes, o que nos torna diferentes não é o número de genes, mas como eles são regulados (CONSORTIUM, 2012). Esses conceitos fundamentam os desafios da manipulação genética de organismos vivos, pois para a expressão correta de um transgene de interesse existem diversos fatores regulatórios e posicionais que podem afetar a transcrição e tradução eficiente (BANDARANAYAKE; ALMO, 2014; CHEN et al., 2018). Um fator importante para a inserção de um transgene são os tipos de vetores, uma opção muito utilizada são vetores virais que podem ser utilizados para de transferência um fragmento de DNA de forma transiente ou permanente (CIUFFI, 2008). O modo de integração por vetores virais de uma sequência de DNA ao genoma das células levanta preocupações de segurança com relação a terapia gênica e sobre a eficácia de produção em plataformas de expressão.

Vetores retrovirais são muito utilizados na transferência de genes e em terapia gênica *in vivo* e *ex vivo*, em especial por permitirem a inserção de sequências de interesse no genoma da célula hospedeira. Os retrovírus se caracterizam por serem vírus de RNA que utilizam da transcriptase reversa para transcrever o RNA viral em um DNA de fita dupla, que é então, inserido de forma estável no cromossomo do organismo hospedeiro (LUSIC; SILICIANO, 2017; WALTHER; STEIN, 2000; CIUFFI, 2008; PICANÇO-CASTRO et al., 2008). O grupo dos retrovírus podem ser divididos em sete gêneros (*alpha*-, *beta*-, *gamma*-, *delta*-, e *epsilon-Retroviridae*, *Spumaviridae* e *Lentiviridae*) e, entre eles, os *gamma-Retroviridae* (MLV) e o *Lentiviridae* (HIV) possuem os padrões de integração extensivamente caracterizados (POLETTI; MAVILIO, 2018). Esses estudos têm mostrado que os *gamma*-retrovirus possuem sítios preferencias de inserção em regiões promotoras e elementos *enhancers*, associado a locais da cromatina enriquecidas em marcas epigenéticas como HeK4me1-3 e H3K27ac. Já os lentivírus possuem como sítios preferencias de inserção sequências transcricionalmente ativas, se integrando sem diferenciar íntrons ou éxons, além de estar associado a regiões do genoma enriquecidas em histonas do tipo H3K36me3 (LUSIC; SILICIANO, 2017; POLETTI; MAVILIO, 2018). De fato, experiências anteriores em nosso grupo de pesquisa permitiram mostrar as preferências diferenciais de sítios de integração no genoma da célula hospedeira entre os vetores derivados de *gamma*-retrovírus (CORREA DE FREITAS et al., 2014; CASTILHO-FERNANDES et al., 2015) e os vetores derivados de lentivírus (RUSSO-CARBOLANTE et al., 2011), bem como sua dependência de acordo com o tipo celular. A diversidade observada é, em parte, devido às diferenças da maquinaria responsável pela integração desses vetores retrovirais na célula hospedeira (POLETTI; MAVILIO, 2018). Poletti e Mavilio (2018) mostraram que a integração dos vetores *gamma*-retrovirus é dependente da interação das proteínas virais com as proteínas remodeladoras de cromatina do tipo BRD2, BR3 e BR4 que são responsáveis por alterações epigenéticas nas histonas (DE RIJCK et al 2013; POLETTI; MAVILIO, 2018). Por outro lado, a integração dos vetores lentivirais é dependente da formação de um complexo pré-integração formado pelas proteínas Nup153/ LEDGF/ p75 com as proteínas do capsídeo lentiviral (MARINI et al 2015; POLETTI; MAVILIO, 2018). Em conjunto, esses estudos têm auxiliado ao constante desenvolvimento de novas

gerações de lentivírus para aumentar sua eficácia e segurança dos mesmos em protocolos clínicos (CIUFFI, 2008; PIKANÇO-CASTRO et al., 2008).

A terapia gênica *ex vivo* para a doença de Gaucher já foi realizada com ambos tipos de vetores. Dunbar e colaboradores (1998) utilizaram vetores *gamma*-retrovirais para modificação gênica de células mononucleares do sangue periférico e células-tronco hematopoéticas da medula óssea (CD34⁺) de três pacientes com DG. Nesse estudo, a eficiência da transdução foi da ordem de 1-10% e após o término da transdução, os pacientes foram infundidos com as células autólogas modificadas geneticamente. Por fim, a análise da atividade biológica da enzima glicosilceramidase em células mononucleares dos pacientes até 3 meses após a infusão não mostrou alteração no nível da mesma, mostrando ausência da correção fenotípica (DUNBAR, 1998). Kim e colaboradores (2004) utilizaram de vetores lentivirais para modificação gênica de células de fibroblastos de pacientes com DG do tipo I, II e III. Cinco dias após a transdução, os autores observaram níveis elevados de GBA nos fibroblastos de pacientes ($152 \pm 3,2$ U/mg de proteína) comparado a quantidade de GBA em fibroblastos antes da modificação gênica ($17,4 \pm 4,66$ U/mg proteína) (KIM et al., 2004). A análise comparativa desses dois estudos sugere uma maior eficácia no uso dos vetores lentivirais para terapia gênica *ex vivo* em DG quando comparado com os vetores retrovirais.

No trabalho de Kim e colaboradores (2004) e Dunbar e colaboradores (1998), a análise das células após a transdução viral foi realizada sem a seleção de uma população enriquecida com o transgene. Para gerar linhagens recombinantes com produção permanente de proteínas, após a integração do transgene, a cultura passa por seleção, geralmente, realizada com antibióticos para que todas as células mantidas tenham o gene de interesse. Entretanto, imediatamente após a seleção a população celular recombinante gerada ainda é heterogênea, pois é composta por diferentes sub-populações com variações no nível de expressão proteica, o que pode ser explicado pelo número variável de cópias do gene de interesse, variações no sítio de integração do genoma, entre outros (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007; WILSON; BELLEN; GEHRING, 1990). Essa heterogeneidade na linhagem dificulta a estabilidade de produção e o rendimento, sendo que, um declínio na produção é frequentemente observado com o aumento de passagens devido ao crescimento de subpopulações de baixa expressão (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007). Se após o

tratamento com antibiótico não for realizada a clonagem celular, à medida que as células que produzem menos populam a linhagem, a produtividade pode diminuir com o tempo e a população irá apresentar atividade e velocidade de crescimento instável (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007). Assim, a clonagem celular, após a seleção, é considerada um pré-requisito para a produção industrial e em larga escala (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007).

Independentemente do método de isolamento, os clones celulares gerados são altamente heterogêneos entre si, assim para a seleção do melhor grupo de clones há a análise de diversas propriedades dessas linhagens, além da produtividade (BANDARANAYAKE; ALMO, 2014). A caracterização envolve a avaliação da qualidade do produto gerado, estabilidade genética, capacidade de crescimento celular, as propriedades dos perfis metabólicos e estabilidade de produção (NAKAMURA; OMASA, 2015). Além disso, Lai e colaboradores (2013) realizam uma análise comparativa das diferentes linhagens celulares recombinantes CHO produtoras de proteínas de interesse comercial e discutem os diferentes sistemas utilizados para obtenção de uma população celular com produção estável da proteína terapêutica, bem como, as diferentes estratégias para a clonagem celular. Em conjunto, os dados mostram uma grande diversidade de protocolos e estratégias para obtenção de uma linhagem celular com elevados níveis da proteína terapêutica e o conhecimento na era genômica tem permitido avanços nessa área (LAI; YANG; NG, 2013). Spidel e colaboradores (2016), utilizaram da HEK293 para produzir anticorpos monoclonais e geraram 40 clones celulares, e observaram expressões aumentadas até no máximo 3x em relação à média de todos os clones (SPIDEL et al., 2016). Visando a produção da GBA recombinante, Novo e colaboradores (2012), geraram uma linhagem com produção permanente de GBA humana em células CHO, utilizando o vetor plasmidial por meio da seleção com metotrexato. Após a obtenção da população mista, os autores geraram 24 clones celulares e selecionaram os três clones, os quais mostraram níveis de GBA, da ordem de 1,84-5,14 pg/célula/dia (NOVO et al., 2012). De maneira interessante, considerando consistir em vetor plasmidial convencional, os autores realizaram também estudos sobre estabilidade clonal. Os clones com níveis mais elevados de produção de GBA, quando submetidos ao cultivo durante 45 dias na ausência do tratamento com metotrexato, diminuíram gradativamente o nível de produção da enzima, até que ao final do experimento, os

níveis de GBA ficaram similares as células controle sem modificação gênica (NOVO et al., 2012). Com base nessas informações, em nosso projeto de pesquisa, após a recuperação das células do processo de descongelamento optamos pelo tratamento da população celular com produção estável de GBA por 5 dias com o antibiótico de seleção, antes de prosseguirmos com nossas análises.

1.6 Modelo murino para DG

Um dos grandes desafios da pesquisa em doenças raras é alcançar um número adequado de indivíduos para testar métodos de tratamento, intervenções e até mesmo delinear o curso natural de desenvolvimento da doença. Modelos animais que recapitulam as características clínicas e fisiológicas encontradas em doenças humanas são de extrema importância para pesquisa, em especial para doenças genéticas raras. Camundongos são especialmente importantes para pesquisas genéticas devido à similaridade de seu genoma ao dos humanos e também por sua disponibilidade, facilidade de manipulação e reprodução (FAGUNDES; TAHA, 2004). Desde os meados da década de 70, diversos grupos tentam desenvolver um modelo em camundongos que reproduza o quadro clínico e fisiológico da DG (FARFEL-BECKER et al., 2009). Os primeiros camundongos desenvolvidos foram classificados como quimicamente induzidos, pois o método pelo qual esses modelos foram criados baseia-se na inibição da GBA pela administração intraperitoneal diária de CBE aos camundongos (KANFER et al., 1975). Após três semanas de tratamento com CBE, esse composto inibe aproximadamente 90% da GBA em diferentes tecidos e gera a acumulação de GlcCer no fígado, no baço e no cérebro (STEPHENS et al., 1978). Apesar da facilidade de reprodução do método, os camundongos quimicamente induzidos são considerados modelos limitados, pois não recapitulam todos os sintomas clínicos observados em humanos. Em 1992, Tybulewicz e colaboradores, desenvolveram o primeiro camundongo GBA^{-}/GBA^{-} utilizando o método *Neo cassette* nos éxons 9 e 10 da GBA, o que resultou em uma drástica redução de atividade da GBA nas células de todos os tecidos, mas causou letalidade neonatal (TYBULEWICZ et al., 1992). Esse modelo se mostra similar ao tipo neuropático agudo da doença, com acúmulo expressivo de GlcCer, principalmente nos macrófagos. A letalidade neonatal do camundongo GBA^{-}/GBA^{-} ocorreu pela perda de água trans-epidérmica

devido a função da GlcCer na permeabilidade da pele de camundongos, característica que até então não havia sido descrita e não é observada em humanos (HOLLERAN et al., 1994).

Com o objetivo de gerar modelos de DG com características mais próximas aos sintomas em pacientes e com maior tempo de sobrevivência, o próximo passo foi a criação de camundongos com mutações comumente encontradas em humanos como L444P e N370S (O'NEILL et al., 1989). Vários camundongos portadores de mutações pontuais foram gerados nos últimos anos, mas sem grandes avanços. Enquanto algumas das mutações resultaram em letalidade, outras não geraram acúmulo de GlcCer, ou não refletiram os fenótipos clínicos da doença. Por exemplo, camundongos homocigotos para L444P e N370S morriam após algumas horas de vida, já as mutações D409H, D409V ou V394L mostraram poucas características fenotípicas similares a DG mesmo com apenas 4-10% da atividade residual de GBA (MIZUKAMI et al., 2002; XU et al., 2003).

Em 2006, o modelo murino de DG desenvolvido por Enquist e colaboradores foi capaz de recapitular sintomas clínicos como a hepatomegalia, anemia e a presença de células de Gaucher, além de manter o tempo de vida normal dos camundongos. Esse avanço foi alcançado com a inativação condicional do gene da *GBA* no sistema hematopoiético e mesenquimal, utilizando o sistema *Mx1-Cre-loxP*, seguido do tratamento com ácido polinosínico-policitidílico (APP) que é responsável por ativar o promotor *Mx1* (ENQUIST et al., 2006). A administração de APP após o nascimento permite a manutenção da atividade de *GBA* durante o início do desenvolvimento, evitando assim os defeitos de permeabilidade na pele. Nesse modelo, os éxons de 9 a 11 foram deletados logo após o nascimento, por meio da ativação do promotor *Mx1*. Além disso, esse promotor não é ativado no cérebro o que possibilitou a geração de um camundongo sem comprometimento do SNC, sendo essa condição similar a pacientes com DG do tipo I (ENQUIST et al., 2006).

Em 2010, Mistry e colaboradores refinaram o modelo murino para aproximá-lo mais das características clínicas dos pacientes, em especial quanto ao fenótipo da DG nos ossos, característica que não foi detectada no modelo anterior. Utilizando o sistema *Mx1-Cre-loxP* de deleção condicional do gene da *GBA*, os autores geraram a deleção dos éxons 8 a 11 da *GBA* nos camundongos no segundo dia de vida. Como esse método depende da ativação do promotor *Mx1*, a inativação da *GBA* ocorreu

principalmente em células originadas da linhagem hematopoiética e mesenquimal. Os camundongos exibiram hepato e esplenomegalia, anemia, tendência para a trombocitopenia, além de também apresentarem baixo colesterol HDL e aumento das enzimas hepáticas semelhante à doença humana. Um dos destaques desse modelo é sua capacidade de reproduzir os defeitos esqueléticos, incluindo osteonecrose focal e osteopenia, ambos relatados em pacientes com DG do tipo I (MISTRY et al., 2010). Análises mostraram uma redução de 95% da atividade de GBA nos órgãos sem afetar o nível dessa proteína no SNC (MISTRY et al., 2010). Além disso, os camundongos com inativação condicional apresentaram um acúmulo de GlcCer cerca de 15 vezes maior no fígado e 10 vezes maior no baço quando comparados com o tipo selvagem, apesar de o conteúdo geral de lipídios não constituir mais de 1% do peso dos órgãos aumentados (MISTRY et al., 2010). Dessa forma, os camundongos modelo Mx1/Cre/LoxP recapitulam grande parte das manifestações clínicas características da DG, e podem ser utilizados para analisar os aspectos biológicos e fisiológicos da doença.

2 JUSTIFICATIVA

A DG foi descrita em 1882, e apesar de ser a doença de acúmulo lisossomal mais frequente no mundo, ainda não possui cura. Segundo o Ministério da Saúde (2014), são 670 pacientes com DG no Brasil e 96% deles são tratados com terapia de reposição enzimática. Apesar dos grandes benefícios observados com o uso da TRE, a terapia atual possui desvantagens que comprometem sua disponibilidade e eficácia, em especial o alto custo de comercialização, o que dificulta a manipulação de doses elevadas aos pacientes com DG. Em 2007, o tratamento com TRE no Brasil custou aproximadamente R\$ 250 milhões de reais para o sistema público de saúde, sendo que nesse ano apenas 500 pacientes foram tratados e essa terapia deve ser mantida por toda a vida do paciente. O Brasil ainda não possui produção nacional dessa enzima, e assim, a comercialização depende de grandes multinacionais como a Genzyme Corporation® e Shire HGT®. Considerando a situação da TRE para DG no Brasil, fica clara a importância de uma produção brasileira otimizada da proteína GBA para fornecer melhores condições aos pacientes com um baixo custo ao estado.

Desde 2013, o laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP trabalha em um projeto de pesquisa na área de doença de Gaucher com foco no desenvolvimento de uma nova *GBA* mutante que apresente um nível de produção otimizada. Para isso, foi gerada uma linhagem recombinante utilizando um vetor lentiviral codificando para uma sequência mutante da enzima GBA, esse vetor foi transfectado na linhagem celular humana 293FT. Assim, foi gerada uma linhagem celular denominada L16_293-FT-P2-mutGBA que produz níveis de GBA secretada no sobrenadante celular da ordem de 22,24 (\pm 2,35) nmol/h/mL de GBA, cerca de 3 vezes a quantidade de GBA secretada pela célula 293FT. Esse trabalho tem como objetivo dar continuidade a caracterização a linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA por meio da clonagem celular e identificação do clone com maior produção de β -glicosilceramidase recombinante (mutGBA) no sobrenadante e intracelular, e caracterizar a mutGBA por ensaios funcionais *ex vivo* e *in vivo*.

3 HIPÓTESE

A enzima lisossomal β -glicosilceramidase recombinante presente no sobrenadante da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA com produção permanente de GBA apresenta atividade biológica *in vivo* e *ex vivo*, e é possível obter clones celulares a partir dessa linhagem celular com produção homogênea e níveis mais elevados da enzima lisossomal mutGBA comparada com a população heterogênea L16_293-FT-P2-mutGBA.

4 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a atividade biológica da enzima lisossomal recombinante mutGBA por meio de ensaios *in vivo* e *ex vivo* em modelo animal transgênico para Doença de Gaucher e realizar a clonagem da linhagem celular humana L16_293-FT-P2-mutGBA visando obter uma população celular homogênea para a produção permanente da enzima recombinante β -glicosilceramidase, previamente gerada no laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias. Selecionar o clone com maior atividade biológica *in vitro* da enzima recombinante presente no sobrenadante da cultura celular, maior atividade enzimática específica e maior produtividade.

4.1 Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a produção da enzima lisossomal recombinante mutGBA secretada pela linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA após o escalonamento das condições de cultivo;
- 2) Estabelecer cultura primária de macrófagos murinos e realizar a análise comparativa da internalização da enzima lisossomal recombinante mutGBA pelos macrófagos de camundongos com GBA ativa (LoxP/LoxP) *versus* macrófagos de camundongos com DG (Mx1/Cre/LoxP) em diferentes tempos.
- 3) Estabelecer cultura primária de fibroblastos de indivíduos saudáveis e indivíduos com Doença de Gaucher, determinar a atividade específica da enzima lisossomal GBA e investigar se na presença do inibidor conduritól B epóxido (CBE) que induz inibição irreversível de GBA, a atividade da GBA lisossomal em fibroblastos é alterada;
- 4) A partir da cultura primária de fibroblastos de indivíduos saudáveis e indivíduos com Doença de Gaucher investigar se na presença do inibidor N-butildesoxinogirimicina (NB-DNJ) de GBA2 e da enzima glicosiltransferase que transfere o açúcar para a ceramida, a atividade da GBA lisossomal em fibroblastos é alterada;

- 5) Investigar se a enzima lisossomal recombinante mutGBA secretada pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA pode ser absorvida *in vitro* por fibroblastos de indivíduos saudáveis e fibroblastos de indivíduos com Doença de Gaucher;
- 6) Investigar a capacidade da enzima recombinante lisossomal mutGBA secretada pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA ser absorvida *in vivo* por leucócitos, baço, fígado e cérebro em modelo animal transgênico para DG e em camundongos controles.
- 7) Determinar a atividade específica da enzima lisossomal recombinante produzida pela linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA;
- 8) Realizar a clonagem da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA e identificar clones com níveis elevados de secreção da enzima recombinante lisossomal mutGBA;
- 9) Realizar a clonagem da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA e identificar clones com níveis elevados de atividade específica da enzima recombinante lisossomal mutGBA;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cultivo e expansão da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA

A linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA foi gerada previamente por pesquisadores do laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias, sendo essa uma população heterogênea (não clonal) produzida a partir do sistema lentiviral com vetor portador da sequência da mutGBA, em células 293FT. A Figura 3 mostra que a morfologia da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA manteve o tamanho celular e formato alongado com pequenas projeções da linhagem virgem 293FT. Esse trabalho dá continuidade à caracterização da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA que apresenta produção permanente de uma variante da *GBA*.

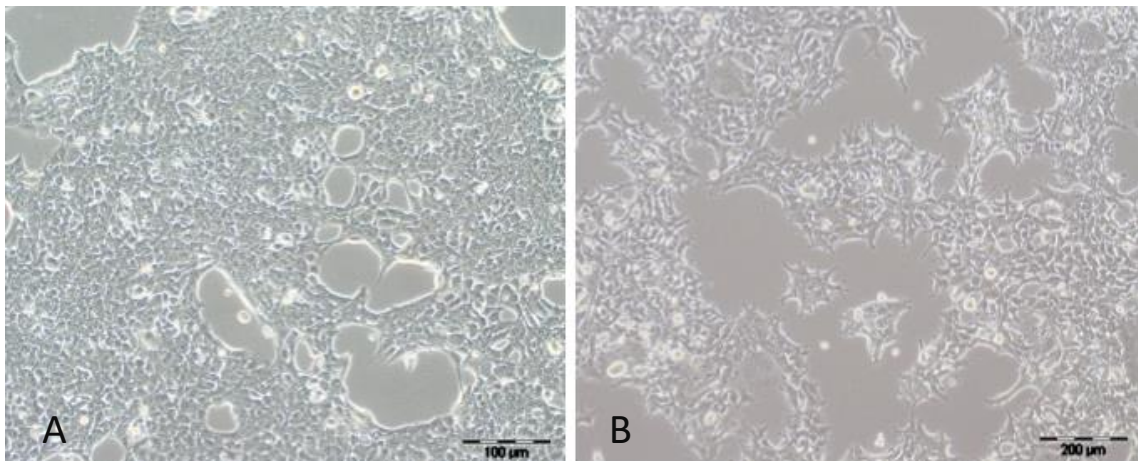


Figura 3. Morfologia das linhagens celulares humanas em cultura (A) 293FT virgem (100 μm) (B) L16_293-FT-P2-mutGBA com produção permanente de mutGBA (200 μm).

O cultivo da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA foi realizado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) da GIBCO® com 10% de soro fetal bovino (SBF) da Hyclone® previamente inativado a 56°C por 30 minutos, e 1% de antibiótico, penicilina e estreptomicina da GIBCO®. Para alguns experimentos, que serão descritos, o meio DMEM foi utilizado sem adição de SBF, para garantir que as proteínas contidas no mesmo não gerassem variações nos experimentos de atividade biológica. As células foram incubadas em estufa a 37°C com suplementação de 5% de CO₂, sendo que as condições de cultivo foram mantidas estáveis por todos os tratamentos.

5.2 Escalonamento de produção da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA

Ensaio anteriores realizados por pesquisadores do laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias descreveram a análise comparativa do nível de produção da mutGBA pela linhagem celular humana L16_293-FT-P2-mutGBA em pequena escala. Para essa quantificação da atividade biológica da enzima, a linhagem celular recombinante humana L16_293-FT-P2-mutGBA e a célula virgem 293FT, foram plaqueadas em triplicata em placas de 6 poços, com 3×10^5 células por poço. Após 48 horas, o meio dessas células foi trocado por novo meio com SBF, e após 48 horas adicionais, o sobrenadante foi coletado, centrifugado por 15 min. a 1.500 rpm para eliminação de *debris* celulares e congelado em -80°C até o momento da análise. Conforme mostra a Figura 4, após 48 h a linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA secreta níveis de GBA da ordem de 22,24 ($\pm 2,3$) U/mL de meio de cultura, aproximadamente 3 x maior que o nível de GBA produzido pela célula virgem, cerca de 7,03 ($\pm 0,2$) U/mL ($p = 0,0073$, teste *Welch*).

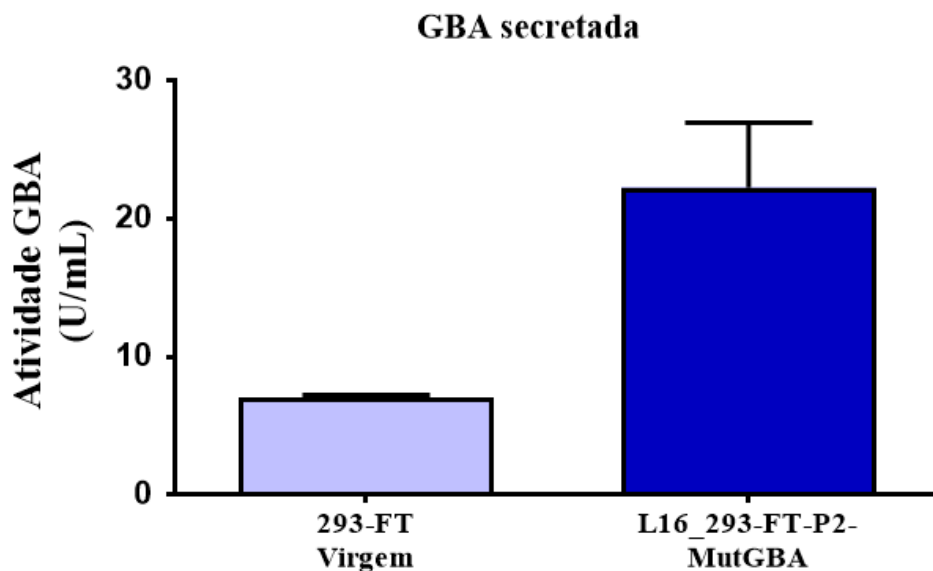


Figura 4- Produção da enzima lisossomal GBA na presença de SFB pela linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA, após 48 h de cultivo estático em monocamada, comparada com a célula virgem (293FT) ($p = 0,0073$; Teste de *Welch*). O número de GBA biologicamente ativa foram determinadas pelo ensaio fluorimétrico.

A linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA foi também caracterizada quanto à produtividade da enzima lisossomal GBA nessas condições com SFB. Para tanto, foi realizada a contagem celular. Conforme mostra a Figura 5, quando mantida em meio DMEM com SFB, a linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA secreta 25,6 ($\pm 4,2$) U GBA/ 10^6 células, cerca de 5,8 x maior que o nível de GBA secretada pela linhagem celular virgem 293FT 4,43 ($\pm 0,1$) U GBA/ 10^6 células ($p = 0,015$, Teste de *Welch*).

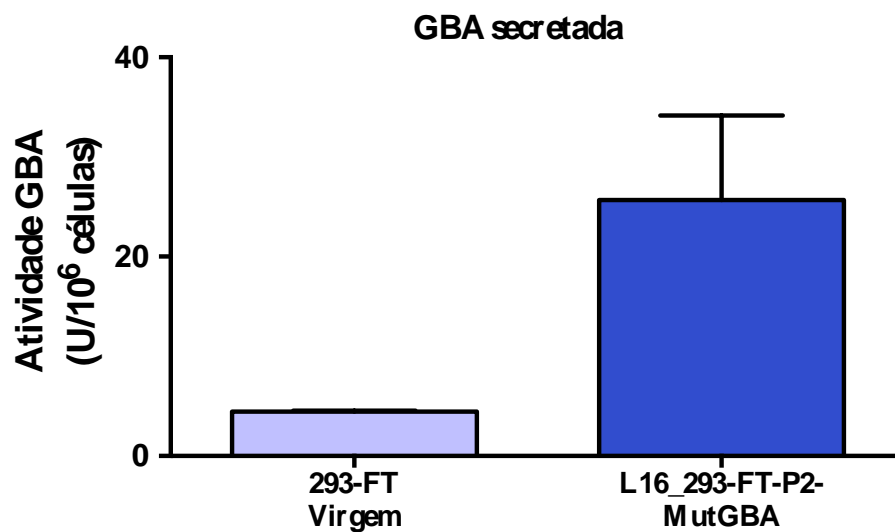


Figura 5- Produtividade da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA na presença de SFB, após 48 h de cultivo estático em monocamada, comparado com a célula virgem (293FT). ($p = 0,015$, teste de *Welch*). O número de GBA biologicamente ativa foram determinadas pelo ensaio fluorimétrico.

Dando continuidade a caracterização da linhagem celular, o próximo passo foi o escalonamento da produção. Para tanto, a linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA foi cultivada em placas de cultura de tamanhos gradativamente maiores, até a obtenção de número suficiente para o plaqueamento em larga escala em placas de múltiplas camadas (Falcon Cell Culture Multi-Flask - BD®). Após 5 dias nessas placas, o meio de cultivo foi trocado por meio DMEM sem SFB e a coleta do sobrenadante foi realizada após 72h. Após a coleta do sobrenadante, o mesmo foi armazenado em tubos Falcon de 50 mL a -80°C , e as células foram contabilizadas.

5.3 Obtenção de clones celulares

Visando obter uma população celular homogênea foi realizada a clonagem celular da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA, utilizando um método de plaqueamento de um baixo número de células seguido de acompanhamento diário sobre o aparecimento de clones celulares. Inicialmente, foram plaqueadas 1000 células em 3 placas de 100 mm estéreis, e após 5 a 10 dias de cultivo em meio DMEM (10% SBF-Hyclone®; 1% penicilina e estreptomicina - GIBCO®), 4 clones isolados foram identificados em cada placa. Com o auxílio do microscópio invertido, as colônias isoladas foram marcadas na parte inferior da placa. Em seguida, no fluxo laminar foram adicionados 10 a 20 µl de tripsina a cada clone isolado. Após 1 minuto, os 10-20µl de tripsina foram coletados, e então os clones foram colocados em placa de 6 poços com meio DMEM (10% SBF, 1% Penicilina e Estreptomicina) e incubados em estufa a 37°C com suplementação de 5% de CO₂, sendo que o meio DMEM era trocado a cada 48h. O cultivo foi mantido até as células alcançarem confluência de 80-90%, cerca de 10 a 15 dias, e então tratadas com puromicina na concentração de 2µg/mL por mais 5 dias. Ao final da expansão, as células foram tripsinizadas e armazenadas em criotubos a -80°C com solução de congelamento (10% DMSO, 90% SBF).

5.4 Experimento para obtenção de amostra de sobrenadante e intracelular dos clones celulares

Com a intenção de determinar quais eram os clones com maior produção de GBA tanto intracelular quanto extracelular, foi realizado um experimento de 4 dias, no qual foram plaqueadas 2×10^5 células em meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Primeiramente, as células foram descongeladas em garrafas de 25 cm² e após dois dias de expansão, os clones foram tratados por 5 dias com puromicina na concentração de 2 µg/mL. Após esse tratamento, cada clone previamente cultivado foi plaqueado em triplicata em placas de 6 poços com 2×10^5 células por poço com o meio DMEM com 10% SFB e 1% de antibiótico. Após 48 horas trocou-se o meio de cultura antigo por meio DMEM com 10% SFB e 1% de antibiótico. E após mais 48h, foi coletado o sobrenadante e as células para avaliação de atividade biológica intracelular. As células foram contadas para obtenção de quanto da enzima mutGBA

foi produzida por milhão de células e passaram por duas lavagens com PBS seguidos de centrifugação a 1200 rpm, a 20 °C por 5 min, e posteriormente foram ressuspensas em 200ul de NaCl 0,5%. Ao final, as amostras coletadas foram congeladas no freezer a -80°C até o momento da análise de atividade biológica.

5.5 Cultivo e expansão de fibroblastos primários

Os experimentos com amostras de fibroblastos foram realizados em colaboração com o PhD. ME. Dr. Pramod Mistry da Universidade de YALE, Connecticut- Estados Unidos, tendo sido obtidos de pacientes com DG e pessoas saudáveis de acordo como os termos de consentimento e ética em pesquisa (HIC# 0209021074). Os fibroblastos originaram-se de células pluripotentes induzidas derivadas de células do sangue de pacientes com DG e controles saudáveis. As células eram mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e plaqueadas em meio DMEM (Gibco®) suplementado com 20% de SBF previamente inativado a 56°C por 30 minutos, e 2% de antibiótico, penicilina e estreptomicina da GIBCO®.

Foram escolhidas 6 culturas de fibroblastos, sendo 3 controles saudáveis e 3 pacientes com DG. Para manter o sigilo, os doadores e pacientes foram representados por siglas. Os doadores saudáveis são PM, SW, MC, e os pacientes são MN e RB, com a mutação N370S/L444P e WR, homozigoto para mutação N370S.

Para a caracterização das células quanto à produção de GBA pelos fibroblastos, foram plaqueadas 1×10^5 células em placas de 6 poços em duplicata e coletadas após dois dias, com aproximadamente 90% de confluência.

Os experimentos de fibroblastos com incubação de mutGBA foram realizados em placas de 6 poços, meio DMEM com 10% SBF em três tempos de incubação (2h, 4h e 6h). Nas células tratadas, foram adicionados 100µl de mutGBA concentrada 10x, o que representa aproximadamente 19 U. Após o experimento, as células foram coletadas utilizando EDTA 5%, e congeladas a -80°C, para então serem analisadas.

5.6 Camundongos modelo para DG

Os experimentos envolvendo camundongos foram realizados em parceria com o PhD. ME. Dr. Pramod Mistry da Universidade de YALE, Connecticut- Estados Unidos, seguindo os regulamentos descritos pelo comitê de ética em pesquisa (nº IACUC #: 2016-10872). Os modelos para DG foram obtidos a partir do método Mx1/Cre/LoxP como descrito por Mistry e colaboradores em 2010 (Mistry et al., 2010).

Nesse experimento foram utilizados 4 camundongos Mx1/Cre/LoxP, sendo dois tratados com mutGBA e dois injetados com PBS, e dois camundongos LoxP/LoxP como controles saudáveis, fêmeas com 14 meses. Os camundongos foram aquecidos por uma luz incandescente, aproximadamente 40°C, por 10 minutos para facilitar a injeção pelas veias da cauda. Em 2 camundongos Mx1/Cre/LoxP foram injetados 100 µl de sobrenadante contendo a mutGBA concentrada 10x, correspondendo a aproximadamente 19 U. Em 2 camundongos Mx1/Cre/LoxP foram injetados 100 µl PBS. Os camundongos LoxP não foram tratados com nenhuma solução.

Após 1 hora, os camundongos foram anestesiados por inalação de isoflurano 3% e sacrificados por deslocamento cervical. Foram obtidos a partir dos 6 camundongos, o baço, fígado, cérebro e 500µl de sangue que foram armazenados em *Eppendorfs* a -80°C. Após serem sacrificados, os camundongos foram avaliados em relação ao seu peso total, e peso do baço e fígado (Tabela.1).

Tabela 1. Peso do baço, fígado e total dos camundongos Mx1/Cre/LoxP e LoxP/LoxP

Camundongo*	Genótipo	Tratamento	Peso total (g)	Baço (g)	Fígado (g)
31	Mx1/Cre/LoxP	PBS	26,4	0,410	1,7
34	Mx1/Cre/LoxP	MutGBA	33,4	0,21	1,5
70	Mx1/Cre/LoxP	MutGBA	25,9	0,112	1,2
88	Mx1/Cre/LoxP	PBS	32	0,137	1,5
95	LoxP/LoxP	Não Tratado	42,7	0,235	1,6
78	LoxP/LoxP	Não Tratado	42,7	0,142	1,6

*Numeração não sequencial, designada em YALE sendo referente ao camundongo.

5.6.1 Genotipagem

A genotipagem dos camundongos utilizados foi feita a partir da obtenção do DNA genômico isolado de um fragmento da cauda. Foi realizado uma PCR convencional utilizando os oligonucleotídeos para as sequências LoxP e Cre, seguida por uma corrida em gel de agarose 1%.

5.7 Isolamento de macrófagos de medula óssea de camundongos

Foram utilizados, nesse experimento, dois camundongos Mx1/Cre/LoxP e dois LoxP/LoxP, fêmeas com aproximadamente 14 meses de idade, tendo sido anestesiados (Inalação de isoflurano, 3%) e sacrificados por deslocamento cervical. Utilizando métodos assépticos, a pele e músculos ao redor do fêmur foram removidos com tesouras e pinças. As pernas traseiras foram cortadas na articulação do quadril com uma tesoura, deixando o fêmur intacto. Foi adicionado etanol 70% diretamente no fêmur por 1 min. Usando tesoura de ponta fina, o fêmur foi separado dos ossos e tecidos proximais, e foi feita uma inserção transversal em cada articulação. Em seguida, uma seringa de 10 mL anexada à uma agulha 25-G, foi preenchida com 10 mL de meio DMEM. A agulha foi inserida na cavidade da medula óssea do fêmur, e a mesma foi lavada com 10 mL de meio DMEM, a solução celular obtida foi adicionada em placas de 6 poços. O procedimento foi repetido até o grumo vermelho de células sair completamente do osso, e a suspensão celular foi ressuspensa com uma pipeta de vidro estéril. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para um tubo de centrifuga cônico estéril de 50 mL e centrifugada por 3 min a 420 × g, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensa em 1 mL de solução de lise de eritrócitos (ACK lysing buffer, Lonza®). A suspensão foi incubada nesta solução por 5 min. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de DMEM ao tubo Falcon e a suspensão foi centrifugada por 3 min a 420 × g, 4 ° C. O *pellet* de células foi ressuspensa em meio DMEM (10% SBF, 1% Antimicótico/Antibiótico -Gibco®). As células foram plaqueadas em placas de *petri* não tratadas de 100 × 15 mm (Falcon ®) com 10 mL de DMEM (10% de FBS, 1% de Antimicótico / Antibiótico-Gibco) e 10 ng/mL de M-CSF (ConnStem®) e mantidas a 37 ° C, 5% CO₂ durante 5 dias. Durante esses 5 dias, foram adicionados 10 ng/mL de M-CSF a cada 24h.

5.8 Isolamento de leucócitos

Para o isolamento das células brancas do sangue, foram adicionadas às amostras de sangue de voluntários saudáveis 2x o volume em solução Dextran 3%. Então, a amostra foi homogeneizada por inversão (de 4 a 5 x) e deixado em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente, com a tampa aberta. Após a incubação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon de 15 mL com uma pipeta de Pasteur e centrifugado por 15 min, a 3300 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foram adicionados 2 mL de H₂O *miliQ* e misturados por vórtex por 45 segundos. Seguido pela adição de 2 mL de NaCl 1,7% e misturados por vórtex por 45 segundos. Após essa homogeneização, a solução foi centrifugada por 5 min, a 3300 rpm, 4°C. O procedimento de lavagem com H₂O e NaCl 1,7% seguido de centrifugação foi repetido 3x. Após o último ciclo o *pellet* foi mantido no gelo por 5 minutos e ressuspenso em 0,3 mL de NaCl 0,9%. Em seguida, a solução celular foi alíquotada em Eppendorfs de 0,6 mL e congelada no freezer a -80°C, até a extração de proteínas para o ensaio de atividade biológica.

5.9 Extração e quantificação de proteínas

5.9.1 Extração de proteína total dos órgãos dos camundongos

Para a obtenção da proteína total dos órgãos dos camundongos, foi realizada extração mecânica dos tecidos com um homogeneizador de vidro. A quantidade inicial de amostra dos órgãos foi diferente, sendo utilizados de cada animal: metade do cérebro; de 20-100mg de baço; 100-200mg de fígado. Os Eppendorfs e soluções foram sempre mantidos no gelo para evitar a desnaturação das proteínas. Para homogeneização dos tecidos, a cada tubo foram adicionados 0,5 mL de *Homogenization Buffer* (HB; 0,5% *Tween*; 4mM *2-Mercaptoethanol*; 1X *Protease inhibitors*- SigmaFast; 1mM EDTA) os quais em seguida foram colocados em um homogeneizador de vidro, a 3000-4000 rpm por 30 segundos. Caso a solução não estivesse homogênea, as amostras eram recolocadas no gelo e após 5 minutos o processo era repetido. Após a dissociação dos tecidos, foram adicionados mais 0,65 mL de *Homogenization Buffer* e a reação foi incubada no gelo por 30 min. Após a

incubação, 200ul de cada amostra foram colocados em novos tubos, e o restante foi armazenado a -80°C.

Para romper as membranas e grandes grumos proteicos, as amostras de 200 µl passaram pelo processo de congelamento e descongelamento (*freeze and thaw*), que consiste em 3 ciclos de 1 min em nitrogênio líquido e 2 min em banho-maria a 37°C. Após esse processo, foram adicionados 0,4 mL de HB e a solução proteica foi centrifugada a 13.000 rpm, 4 °C, por 25 min. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Pequenas alíquotas do lisado final foram diluídas 1:5 para medição da concentração de proteína pelo método de Bradford (BioRad®), seguindo as recomendações do fabricante, sendo que a absorbância foi lida nos comprimentos 590 e 450 nm e o resultado é a razão entre os dois valores, como descrito por Ernst e Zor, 2010 (ERNST; ZOR; 2010). As amostras originais do lisado foram armazenadas em -80 °C.

5.9.2 Extração de proteína total das amostras de cultura de fibroblastos e de macrófagos

A extração de proteínas de culturas de fibroblastos controle e fibroblastos de pacientes com DG foi realizada conforme o protocolo desenvolvido no laboratório de Ph ME Dr. Pramod Kumar Mistry, Diretor do Centro de Doença Lisossomal e de Tratamento de Doença de Gaucher da Faculdade de Medicina da Universidade de Yale, New Haven, CT, USA. Para a obtenção das amostras proteicas a partir da cultura de fibroblasto, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas, gentilmente, por 3 x com PBS, e então a placa de 6 poços foi colocada sobre gelo. Nessas condições foi adicionado diretamente à placa de 6 poços o *Homogenization Buffer* (0,5% *Tween*; 4mM 2-Mercaptoethanol; 1X Protease inhibitors - SigmaFast; 1mM EDTA) preparado no dia e resfriado. As células foram retiradas da placa com um espalhador de células (*scraper*), homogeneizadas com a pipeta e transferidas para um Eppendorf de 1,5 mL. Logo após, as amostras (cerca de 50 μ L) foram sonicadas por 30 segundos, seguidos de 5 minutos no gelo, por 3 x. Após os ciclos de sonicação, a solução celular foi centrifugada a 13.000 rpm, por 15 min a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi colocado em um novo tubo e uma pequena alíquota foi utilizada para quantificação de proteínas, e o resto do lisado foi armazenado no -80°C até o momento da análise de atividade biológica. A quantificação de proteínas total foi realizada pelo método de Bradford (BioRad®), seguindo as recomendações do fabricante (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, #5000006). Brevemente, foram realizadas 8 pontos de diferentes concentrações da solução de albumina, sendo essas: 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0 (Zero) mg/ml. Em cada poço adiciona-se 4 μ L da albumina, nas diferentes diluições, ou das respectivas amostras e então são adicionados em todos os poços 200 μ L do reagente Bio-rad Assay (BioRad #5000006). A reação foi incubada à temperatura ambiente por 15 min. protegida da luz. Em seguida, a determinação da quantidade de proteína em cada amostra foi realizada a partir da construção da curva de calibração da albumina, sendo que a absorbância foi lida nos comprimentos 590 e 450 nm e o resultado expresso como a razão entre os dois valores, como descrito por Ernst e Zor (2010).

5.9.3 Extração proteica dos leucócitos e das linhagens derivadas da 293FT

A extração de proteínas das células da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA, dos clones derivados dessa linhagem e dos leucócitos, foi realizada conforme o protocolo desenvolvido no laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) coordenado por PhD. ME. Dra. Vânia D'Almeida. Essas células foram isoladas e congeladas a -80°C na solução de NaCl 0,9% até o momento da extração. Para a extração, as amostras foram descongeladas no gelo e, então, passaram por 3 ciclos de sonicação, com amplitude de 60% por 10 segundos, seguidos de incubação no gelo por 5 min. Em seguida, a quantidade de proteína total das amostras foi mensurada pelo método de Lowry com o kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad®), de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, foram realizadas quatro diluições seriadas 1:2 da solução de albumina, partindo da solução mãe a 1,4 mg/mL, e foi adicionado o branco (H_2O destilada). Em seguida, em cada poço da placa de 96 wells (placa transparente), adiciona-se 5 μL da amostra, 25 μL da solução A (tartarato cúprico alcalino) e 200 μL da solução B (reagente Folin). A reação foi incubada à temperatura ambiente por 15 min. protegida da luz. Em seguida, a determinação da quantidade de proteína em cada amostra foi realizada a partir da construção da curva de calibração da albumina, cuja leitura foi realizada em comprimento de onda de 750 nm.

5.10 Atividade Biológica da β -Glicosilceramidase

5.10.1 Atividade biológica da GBA do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (UNIFESP)

A análise da atividade biológica do sobrenadante foi realizada por ensaio fluorimétrico no laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e no laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias (FMRP-USP), ambas seguindo o mesmo protocolo. O método se baseia na ação da enzima β -Glicosilceramidase sobre o substrato fluorimétrico 4-metilumbiliferona- β -D-glicopiranosídeo, como descrito por Wenger e colaboradores (WENGER et al., 1978).

Para a quantificação da atividade biológica das amostras de GBA secretada no sobrenadante foram adicionados a cada tubo 20µl de solução trabalho (TDC 1% + tampão citrato fosfato 0,5M); 50µl de substrato (4MUG, 20mM); 30µl da amostra a ser testada em tubo âmbar. A reação foi incubada por 2h, a 37°C em banho-maria sob agitação de 100rpm. Após as 2h, as reações foram resfriadas no gelo por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2mL da solução STOP (0,25M glicina, pH 5,1). A leitura é feita no fluorímetro *SpectraMax M2* (Molecular Devices; UNIFESP) ou no *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (Agilent®, USP), ambos com excitação de 360 nm e emissão de 450 nm. Na UNIFESP foram transferidos 150 µl da solução de reação para a cubeta de aspiração, já na USP o espectrofluorímetro foi lido em placa preta com 300 µl de solução de reação.

Para análise da atividade biológica da GBA intracelular, foram adicionados ao tubo de reação, 20 µl de solução trabalho (TDC 1% + tampão citrato fosfato 0,5M); 50 µl de substrato (4MUG, 20mM); e 30µl de amostra proteica recém sonicada com 40 a 60 ug de proteína total. A reação foi incubada por 2h, a 37°C em banho-maria sob agitação de 100rpm. Após a incubação, os tubos foram resfriados no gelo por 5 minutos. Em seguida são adicionados 2mL da solução STOP (0,25M glicina, pH 5,1) a reação e então são lidas alíquotas de 150 µl no espectrofluorímetro com excitação de 360 nm e emissão de 450 nm.

A curva de calibração utilizada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (UNIFESP) para amostras de leucócitos contém as seguintes quantidades de 4MU em nmol: 1,5; 0,75; 0,375; 0,1875; 0,09375; 0,0468 e zero (Figura 6). As leituras de fluorescência são corrigidas pelo valor do “branco”, e os resultados são aplicados na equação da reta, obtida a partir da regressão linear da curva de calibração do substrato sintético 4-metilumbeliferona (4-MU; Sigma®). Os valores de atividade enzimática são expressos em nanomoles de substrato hidrolisado, por hora, por mililitro de sobrenadante (U/mL).

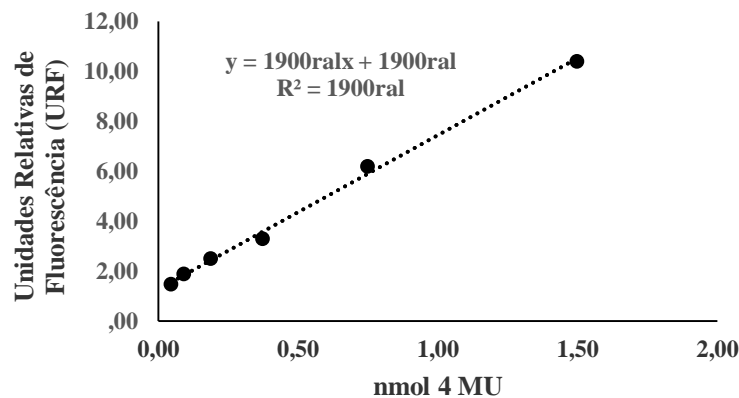


Figura 6. Gráfico da curva padrão para determinação da atividade biológica *in vitro* da GBA, com o substrato sintético 4MU.

Como controle da reação foi utilizado um *pool* de leucócitos de pessoas que não apresentam DG. Para isso foram utilizados entre 40-60 µg de proteína extraída em 30µl de volume final. O laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (UNIFESP), considera como atividade padrão para GBA em leucócitos a faixa entre 8 a 13 U GBA/mg de proteína.

5.10.2 Atividade biológica da GBA intracelular em microplaca segundo o Laboratório de Medicina e Pediatria (YALE)

A determinação da atividade biológica da GBA intracelular utilizada para os fibroblastos, células e tecidos derivados de camundongos modelos para DG foi realizada na Universidade de YALE, Connecticut - Estados Unidos, no laboratório do PhD. ME. Dr. Pramod Mistry. O método utilizado no laboratório do Dr. Mistry é adaptado para microplacas de 96 poços, mas também se baseia na detecção de um dos produtos da hidrólise do substrato da β-glicosilceramida por meio de fluorescência, como proposto por Wenger et al. (1978), com algumas modificações (WENGER et al., 1978). A atividade total de GBA é determinada utilizando o substrato sintético 4-metilumbeliferona-b-glucopiranosídeo (4-MUG; BioSYNTH®) e a 4-metilumbeliferona (4-MU; Sigma®) para curva de calibração. Para a quantificação da atividade biológica da GBA total, a reação é realizada sem a adição de inibidores. Atividade biológica específica da GBA e GBA2 foram obtidas com incubações na presença de 36µM de CBE (Sigma®) e 10µM NB-DNJ (Sigma®) em poços adicionais.

Para o cálculo das atividades específicas, foram utilizadas as fórmulas descritas na Figura 7.

$$\begin{aligned}
 GBA3 &= (rCBE + rNBDNJ) - GBAtotal \\
 GBA1 &= rNBDNJ - GBA3 \\
 GBA2 &= rCBE - GBA3
 \end{aligned}$$

Figura 7. Equações utilizadas para calcular a atividade específica das GBA, GBA2 e GBA3. A GBA total é o resultado da atividade biológica da GBA sem inibidores; rCBE é o resultado de atividade biológica da GBA obtido na reação incubada com 36µM CBE; rNBDNJ é o resultado observado da atividade biológica da GBA quando tratada com 10µM NB-DNJ.

A atividade da GBA foi realizada em microplacas de PCR de 96 poços, de 0,2 mL por poço. A cada poço foram adicionados 21 µl de solução de reação contendo 4mM de 4MUG (0,25 µL do 4MUG a 0,4M); 4mM de 2-Mercaptoethanol; e reação foi completada para 21 µL com M-Buffer (0,05M ácido cítrico; 0,1M K₂HPO₄, pH 5,1; com 0,1%BSA), e então foram adicionados 2 µl de amostra proteica nas concentrações de 1 a 10 µg. Nessa reação de atividade, foram adicionados 2 µl de água para se fazer a avaliação da GBA total, entretanto, para avaliar a atividade específica da GBA ou GBA2, eram adicionados 2µl de um inibidor específico (CBE ou NB-DNJ). A reação foi mantida, primeiramente, por 30 min no gelo, e incubada por 1 hora, a 37°C. Após a incubação, a reação foi interrompida com a adição de 200µl de tampão de glicina (0,5 M glicina-NaOH pH 10,6) a 4°C em cada poço. A placa foi deixada no gelo durante 3 minutos, e então 200 µl de solução foram transferidos para uma placa preta de 96 poços. A fluorescência foi lida em um espectrofluorímetro com excitação 366 nm e emissão a 445 nm. Os valores de fluorescência relativa foram convertidos em nmol pela equação da curva padrão com 4MU, e divididos pelo tempo de reação e quantidade de proteína total, e assim, o resultado final em unidades é nmol/h/mg. A curva de calibração foi realizada com as seguintes concentrações do 4MU em nmol 0,4; 0,2; 0,1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,01563 e zero. Os resultados obtidos para as amostras referentes ao sobrenadante foram comparados com a curva de calibração abaixo (Figura 8).

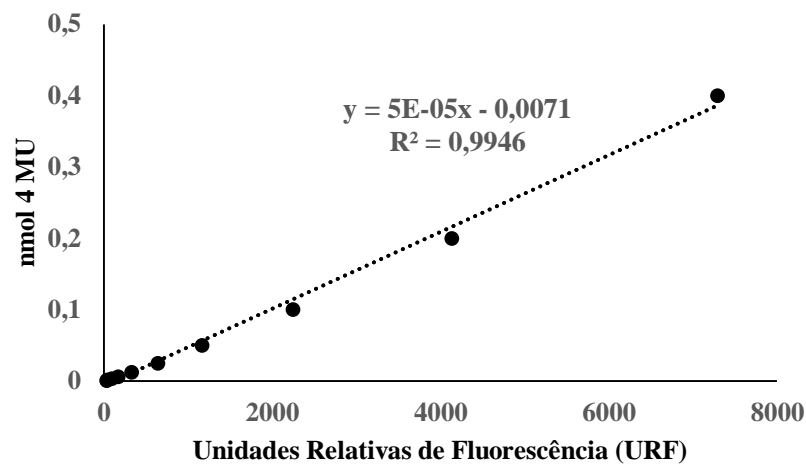


Figura 8. Gráfico da curva padrão para determinação da atividade biológica *in vitro* da GBA, obtida a partir do substrato sintético 4MU.

5.11.3. Atividade biológica da GBA no Laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias (FMRP-USP)

Todos os experimentos de atividade biológica da mutGBA, derivada da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA e clones, realizados nesse projeto foram avaliados de acordo com o protocolo utilizado na UNIFESP. As leituras feitas na USP foram realizadas no *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (Agilent®), ajustado na abertura de 10 excitação/10 emissão, voltagem de 600 volts (Voltagem média) e com os filtros de excitação e emissão na opção autoajuste (Auto). Os resultados foram analisados em uma curva padrão de 1,5 nmol de 4MU, com as quantidades, 1,5; 0,75; 0,375; 0,1875; 0,09375; 0,0468 e zero. Como controle da qualidade da atividade biológica da GBA foi utilizado um *pool* leucócitos de indivíduos saudáveis, sonificado e quantificado antes dos experimentos.

Uma unidade de atividade biológica da enzima lisossomal GBA foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de 4 MU por hora e por mL de meio de cultura. A atividade específica foi definida como a atividade biológica da enzima GBA por mg de proteína.

5.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes ANOVA, teste t de *student* e teste de *Welch*, com valor p fixado em 0,05. O teste de ANOVA foi utilizado para comparações dos clones celulares gerados a partir da população heterogênea L16_293-FT-P2-mutGBA, quando essas envolviam mais de 3 grupos. Para avaliações de grupos de clones celulares dois a dois, foi utilizado o teste de *Welch*. Nos experimentos envolvendo o tratamento *in vitro* com mutGBA, foi utilizado o teste t de *student*. Os gráficos foram gerados por meio do software GraphPad Prism versão 7 (GraphPad Software, San Diego California USA).

6 RESULTADOS

6.1 Escalonamento da produção de GBA da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA

O cultivo da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA em larga escala produziu 500 mL de sobrenadante e a quantificação da atividade biológica da GBA secretada nessa condição resultou em 19,35 (\pm 3,07) U/ml, sendo um total de 9677 U (\pm 1089) U GBA, em meio DMEM sem SFB. Como mencionado acima, em pequena escala (2 mL) a produção de GBA foi 44,5 (\pm 9,42) U. Portanto, conforme mostra a Figura 9, pôde-se observar um aumento na quantidade de GBA da ordem de 217x em larga escala (500 mL), comparada com a produção em pequena escala (2 mL).

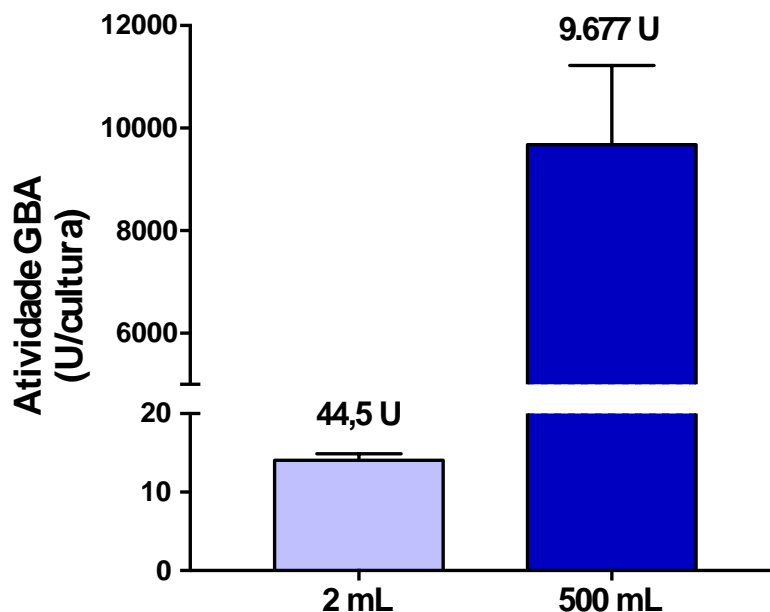


Figura 9. Escalonamento de produção de GBA pela linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA. Comparação de produção em pequena escala, 2mL de DMEM com SBF, e em larga escala, em placas de 10 andares com volume total de 500 mL, sem SBF.

O número total de células nas placas de 10 andares foi quantificado, em câmara de Neubauer, e foram observadas $6,18 \times 10^8$ células. Assim, nessas condições de cultivo, a produtividade de GBA pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA foi de 16,1 U/ 10^6 células, e, conforme relatado acima, no experimento em pequena escala a produtividade da linhagem celular virgem (293-FT) foi 4,43 (\pm 0,1) U GBA/ 10^6 células,

ou seja, um aumento de produtividade de 3,6 vezes. Como descrito por pesquisadores anteriores do grupo de pesquisa, a produtividade da GBA em pequena escala linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA da com SBF foi 25,6 (\pm 4,2) U GBA/10⁶, sendo então, 1,6x maior que o observado em larga escala, porém essa diferença não é significativa ($p < 0,05$; Teste *Welch*)

6.2 Atividade biológica da GBA nos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos modelos para DG

Com o objetivo de analisar a capacidade de internalização da proteína mutGBA e se a mesma manteria sua atividade biológica após esse processo, foram realizados testes com macrófagos de camundongos modelos para DG e camundongos controles sem a doença. Para isso foram coletadas células da medula óssea do fêmur de 4 camundongos fêmeas, sendo dois com o gene da GBA inativado (Mx1/Cre/LoxP) e dois camundongos controle (LoxP/LoxP).

A suspensão celular obtida a partir da medula óssea de dois camundongos LoxP/LoxP foram submetidas a uma única cultura de diferenciação em macrófagos. O mesmo foi realizado para a suspensão celular obtida de dois camundongos Mx1/Cre/LoxP. Para a diferenciação celular, durante 5 dias cada uma das culturas receberam o tratamento com fator estimulador de macrófagos (M-CSF). Gradualmente, os monócitos aderiram a placa e mudaram da conformação arredondada para células retangulares, como é o esperado de cultura de macrófagos (Figura 10).

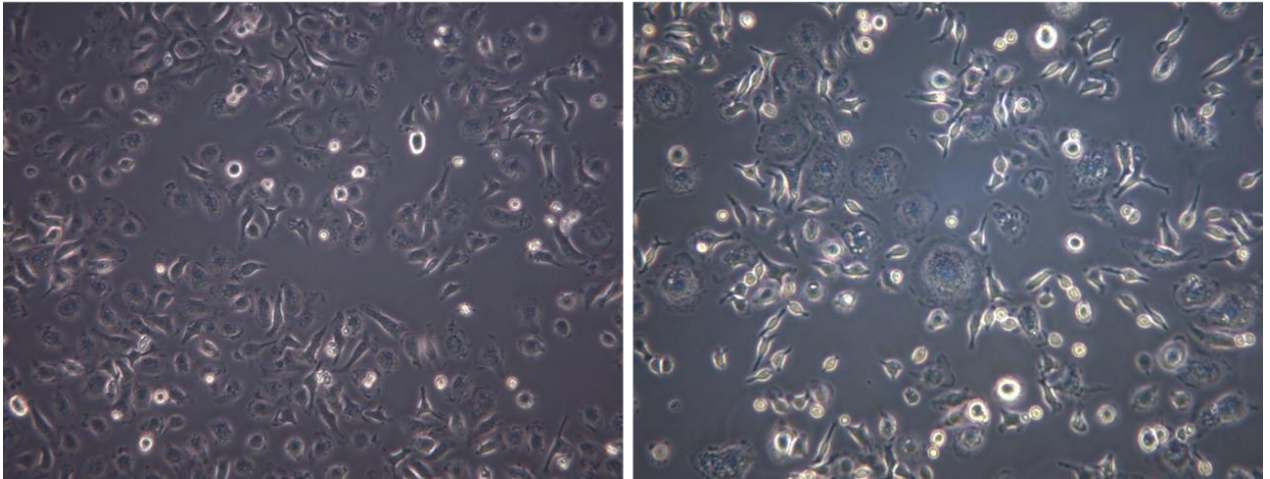


Figura 10. Cultura de macrófagos obtidas pela diferenciação de monócitos da medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagem e C57BL/6 com mutação condicional para GBA. Células após 5 dias de tratamento com M-CFS 10ng/μl. A esquerda, macrófagos com o gene da GBA funcional (LoxP/LoxP), a direita, macrófagos com o gene da GBA mutado (Mx1/Cre/LoxP). Aumento total de 400x em microscópio invertido.

Após o 5º dia, os macrófagos obtidos de cada uma das culturas foram plaqueados em placas de 6 poços. No dia seguinte, os macrófagos foram recolhidos e realizada a atividade enzimática da GBA de cada uma das culturas. A média da atividade biológica da GBA intracelular dos macrófagos derivados do camundongo LoxP/LoxP foi 34,75 (\pm 6,37) U/mg e dos macrófagos derivados do modelo de DG foi 2,55 (\pm 0,33) U/mg (Figura 11).

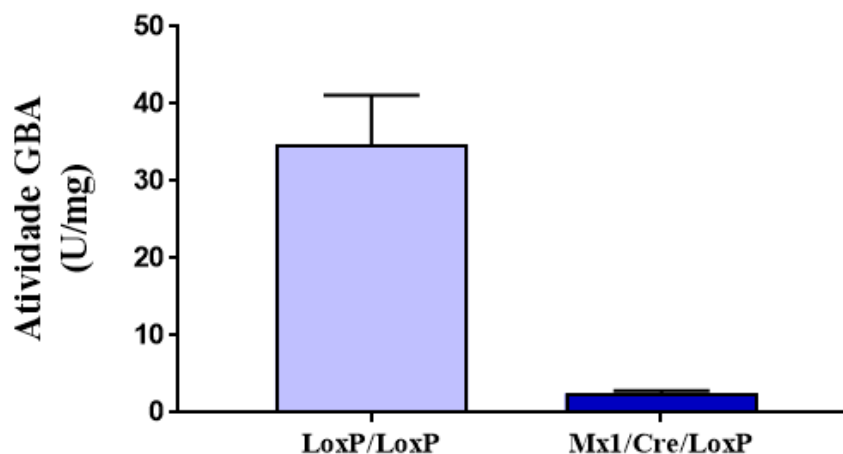


Figura 11. Atividade específica da enzima GBA produzida por macrófagos de camundongos C57BL/6 com GBA funcional (LoxP/LoxP) e de camundongos C57BL/6 com deleção condicional do gene GBA (Mx1/Cre/LoxP) após o cultivo em meio com SFB. Os valores da atividade específica da enzima GBA lisossomal foram determinados pelo ensaio fluorimétrico.

Conforme mostra a Figura 11, o nível de GBA intracelular presente em macrófagos do modelo animal para DG foi cerca de 13,6 x inferior, quando comparada à quantidade de GBA presente em macrófagos de camundongos controles (LoxP/LoxP).

6.3 Internalização da proteína mutGBA por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos modelos para DG

Os macrófagos derivados da medula óssea de camundongos LoxP/LoxP e Mx1/Cre/LoxP foram plaqueados em placas de 6 poços e tratados com 100 µl do sobrenadante concentrado 10x, sendo aproximadamente 19 U de GBA. A atividade biológica da GBA total foi avaliada após os tempos de 0 (zero), 20min, 50min, 1:30h, 3h e 6h. A média de atividade biológica obtida pelos diferentes tratamentos com mutGBA nos macrófagos de camundongos saudáveis (LoxP/LoxP) e com DG está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 Correlação da quantificação proteica e atividade biológica dos macrófagos LoxP/LoxP e com DG, pelo tempo de incubação

Macrófago	Tratamento	Tempo de incubação	Proteína total Bradford (mg/ml)	Atividade Biológica específica GBA (U/mg)
LoxP/LoxP	Controle	30 min	1,7	38,1
LoxP/LoxP	mutGBA	30 min	1,0	39,3
LoxP/LoxP	Controle	50 min	1,5	44,2
LoxP/LoxP	mutGBA	50 min	1,0	38,6
LoxP/LoxP	Controle	1:30 h	1,3	29,1
LoxP/LoxP	mutGBA	1:30 h	2,6	46,5
LoxP/LoxP	Controle	3:00 h	0,9	32,9
LoxP/LoxP	mutGBA	3:00 h	0,9	37,1
LoxP/LoxP	Controle	6:00 h	1,4	29,5
LoxP/LoxP	mutGBA	6:00 h	2,2	32,9
Macrófago DG	Controle	30 min	1,6	2,7
Macrófago DG	mutGBA	30 min	2,5	4,0
Macrófago DG	Controle	50 min	1,0	3,0
Macrófago DG	mutGBA	50 min	2,8	3,4
Macrófago DG	Controle	1:30 h	2,7	2,5
Macrófago DG	mutGBA	1:30 h	2,8	2,7
Macrófago DG	Controle	3:00 h	1,8	2,2
Macrófago DG	mutGBA	3:00 h	2,1	2,4
Macrófago DG	Controle	6:00 h	1,4	2,3
Macrófago DG	mutGBA	6:00 h	1,5	3,1

A Figura 12 mostra os picos de atividade biológica da GBA nos macrófagos, sendo que nas células derivadas dos camundongos controle (LoxP/LoxP) o pico de atividade foi observado no tempo de 1h e 30 min, com uma diferença de 1,33x quando comparado com o tempo 0 ($p = 0,04$). Porém, após 30 minutos o nível de GBA detectado foi similar ao nível de GBA no tempo zero, sugerindo a degradação da mesma. Nas células derivadas de camundongos com DG, foi observado após 30 minutos de incubação um aumento de 1,6 vezes no nível de GBA intracelular,

indicando a internalização da mesma. Nessas condições, a concentração de mutGBA demorou 1h para voltar a níveis similares ao descrito no tempo 0 (zero).

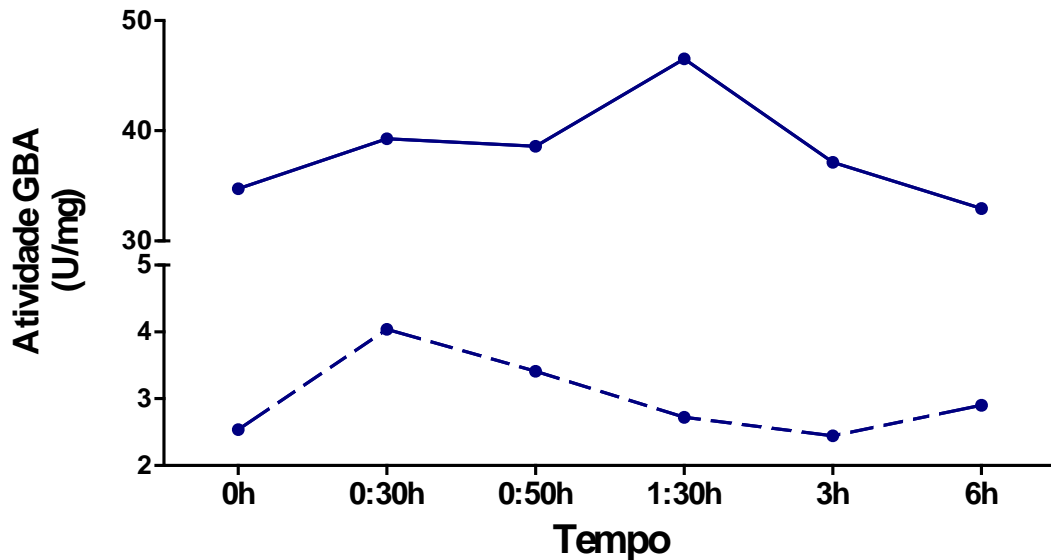


Figura 12. Atividade específica da enzima GBA produzida por macrófagos derivados de camundongos com a GBA ativa, LoxP/LoxP, (linha sólida) e camundongos com a GBA inativada, Mx1/Cre/LoxP, (linha pontilhada) após tratamento por 0, 30min, 50min, 1:30h, 3h e 6h com MutGBA.

6.4 Atividade enzimática específica de GBA de fibroblastos de pacientes com DG versus indivíduos saudáveis

Caracterizamos o nível de atividade específica da enzima lisossomal GBA produzida por fibroblastos de pacientes afetados com doença de Gaucher e fibroblastos de indivíduos saudáveis (*WT, wild type*) que foram utilizados nesse trabalho. Os fibroblastos controle, PM, SW, MC obtiveram os valores de 71,5; 65,2 e 76,0 U/mg de proteína, respectivamente. Já os fibroblastos obtidos de pacientes com doença de Gaucher, RB (N370S/L444P), WR (N370S/N370S) e (MN N370S/L444P) mostraram valores baixos de atividade específica da enzima GBA, sendo 3,9; 7,9 e 8,9 U GBA/mg de proteína, respectivamente. Conforme mostra a Figura 13, a média da atividade específica da enzima GBA em fibroblastos de pacientes com DG é 6,9 (\pm 1,5) U GBA/mg de proteína, sendo cerca de 10x inferior quando comparada à atividade específica da enzima GBA em fibroblastos de indivíduos saudáveis (70,9 \pm 3,1 U GBA/mg de proteína. Essa diferença é significativa ($p < 0,0001$, com teste t).

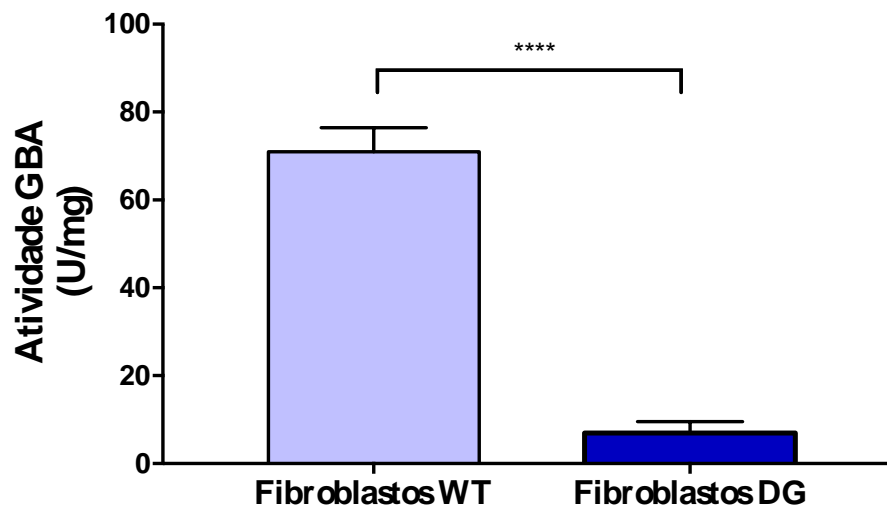


Figura 13. Atividade específica da enzima lisossomal GBA produzida por fibroblastos de indivíduos saudáveis ($n = 3$) comparados com fibroblastos de pacientes afetados ($n = 3$) com doença de Gaucher submetidos a cultura por 24 h com SFB ($p < 0,0001$; Teste t). Os valores da atividade específica da enzima GBA lisossomal foram determinados pelo ensaio fluorimétrico.

Para maior precisão da atividade específica da enzima GBA lisossomal, em reações adicionais de atividade biológica, foram incluídos os inibidores CBE (inibidor da GBA lisossomal) e NB-DNJ (inibidor da GBA2). O tratamento dos fibroblastos com NB-DNJ mostrou que a atividade específica da enzima GBA nos indivíduos saudáveis PM, SW, MC foi da ordem de 50,1; 44,1 e 54,3 U GBA/mg de proteína, respectivamente. Enquanto em fibroblastos de pacientes com DG, a atividade enzimática específica na presença do inibidor NB-DNJ foi 3,8; 6,2 e 7,9 U GBA/mg de proteína nas amostras RB, WR e MN, respectivamente. Conforme mostra a Figura 14, a atividade específica da enzima GBA em fibroblastos de indivíduos com DG é 5,9 ($\pm 1,2$) U GBA/mg de proteína, sendo cerca de 8x inferior a atividade específica da enzima de indivíduos saudáveis com média de 49,5 ($\pm 2,9$) U GBA/mg de proteína. Essa diferença é significativa ($p = 0,0004$).

O tratamento dos fibroblastos com CBE mostrou o nível de GBA2 associada a membrana do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi. Nos indivíduos saudáveis PM, SW, MC a atividade da GBA2 foi de 14,9; 15,5 e 14,1 U/mg de proteína, respectivamente. Enquanto em fibroblastos com doença de Gaucher foi: 0,6; 1,3 e 3,5 U/mg de proteína. Conforme mostra a Figura 14, a quantidade de GBA2 em pacientes com DG foi cerca de 8x inferior, sendo que, nesses pacientes a média foi 1,7 ($\pm 1,5$) U/mg de GBA2 e em indivíduos saudáveis essa média foi de 14,9 ($\pm 0,7$) U/mg GBA ($p < 0,0001$).

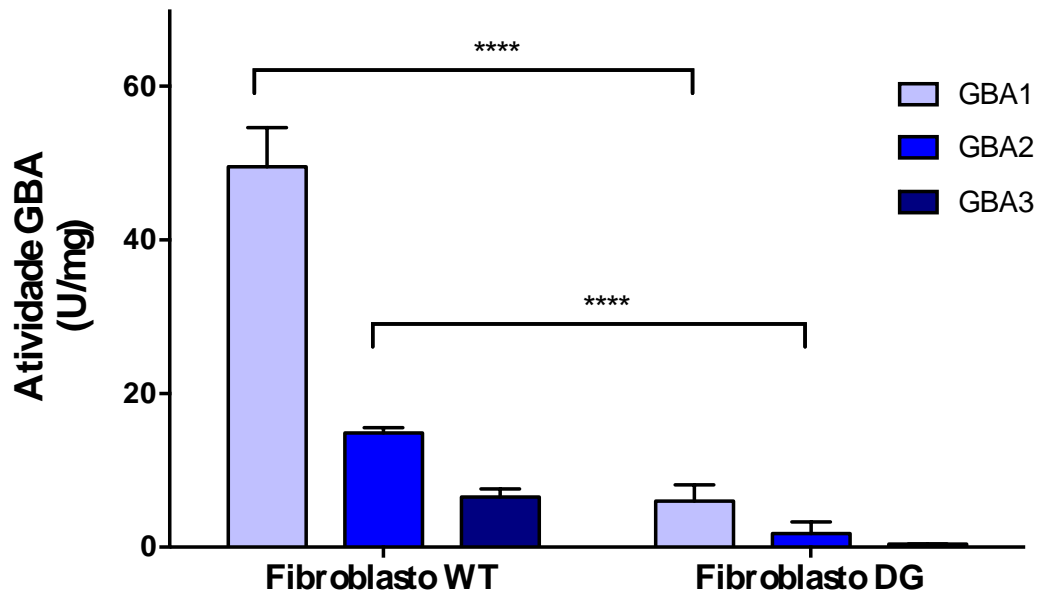


Figura 14. Atividade biológica *in vitro* da enzima lisossomal GBA, da enzima GBA2, associada com REG e CG e da enzima GBA3 citoplasmática produzida por fibroblastos de indivíduos saudáveis (n=3) versus fibroblastos de pacientes com DG (n=3). (p < 0,0001, Teste t)

6.5 Fibroblastos incubados com mutGBA

Com o intuito de investigar se a mutGBA seria capaz de ser absorvida por fibroblastos de pacientes afetados com doença de Gaucher ou fibroblastos de pessoas saudáveis, foram conduzidos experimentos utilizando 100 μ l de mutGBA 10x concentrada, que representa aproximadamente 19 U GBA. Os fibroblastos foram incubados pelos tempos de 2, 4 e 6 horas e nenhum tempo de tratamento mostrou aumento significativo em nenhuma das 6 amostras, como mostra a Figura 15 A-C.

A média de atividade específica de GBA em fibroblastos controles não tratados no tempo de 2h de incubação foi de 79,66 (\pm 11,85) U/mg de proteína, enquanto a média de atividade específica de GBA nos mesmos fibroblastos incubados com mutGBA foi 75,81 (\pm 12,20) U/mg de proteína. Após 4h, a média da GBA em fibroblastos controles não incubados foi 68,45 (\pm 4,94) U/mg de proteína, e a média da GBA em fibroblastos incubados com a enzima recombinante foi 59,03 (\pm 4,52) U/mg de proteína. No tempo de 6 horas a média da atividade específica da enzima GBA em fibroblastos não tratados foi de 72,55 (\pm 9,71) U/mg de proteína, enquanto em fibroblastos submetidos à incubação com mutGBA foi 66,45 (\pm 13,35) U/mg de proteína.

A atividade específica da enzima GBA em fibroblastos derivados de pacientes com e sem a incubação com mutGBA demonstrou o mesmo padrão das células derivadas de indivíduos saudáveis, isto é, sem diferença significativa entre fibroblastos tratados e não tratados. Após 2h de incubação, a média da atividade específica da enzima GBA entre os fibroblastos DG não tratados foi de 6,05 (\pm 2,96) U/mg de proteína, e dos tratados com mutGBA foi de 5,99 (\pm 3,06) U/mg de proteína. Após 4h de incubação, a média da atividade específica da enzima GBA em fibroblastos de pacientes com DG não tratados foi de 7,26 (\pm 3,57) U/mg de proteína, enquanto após o tratamento foi de 6,13 (\pm 2,94) U/mg de proteína. Após 6h do início do experimento, os fibroblastos DG não tratados tiveram uma média de 6,17 (\pm 2,85) e os tratados 5,91 (\pm 2,77) U/mg.

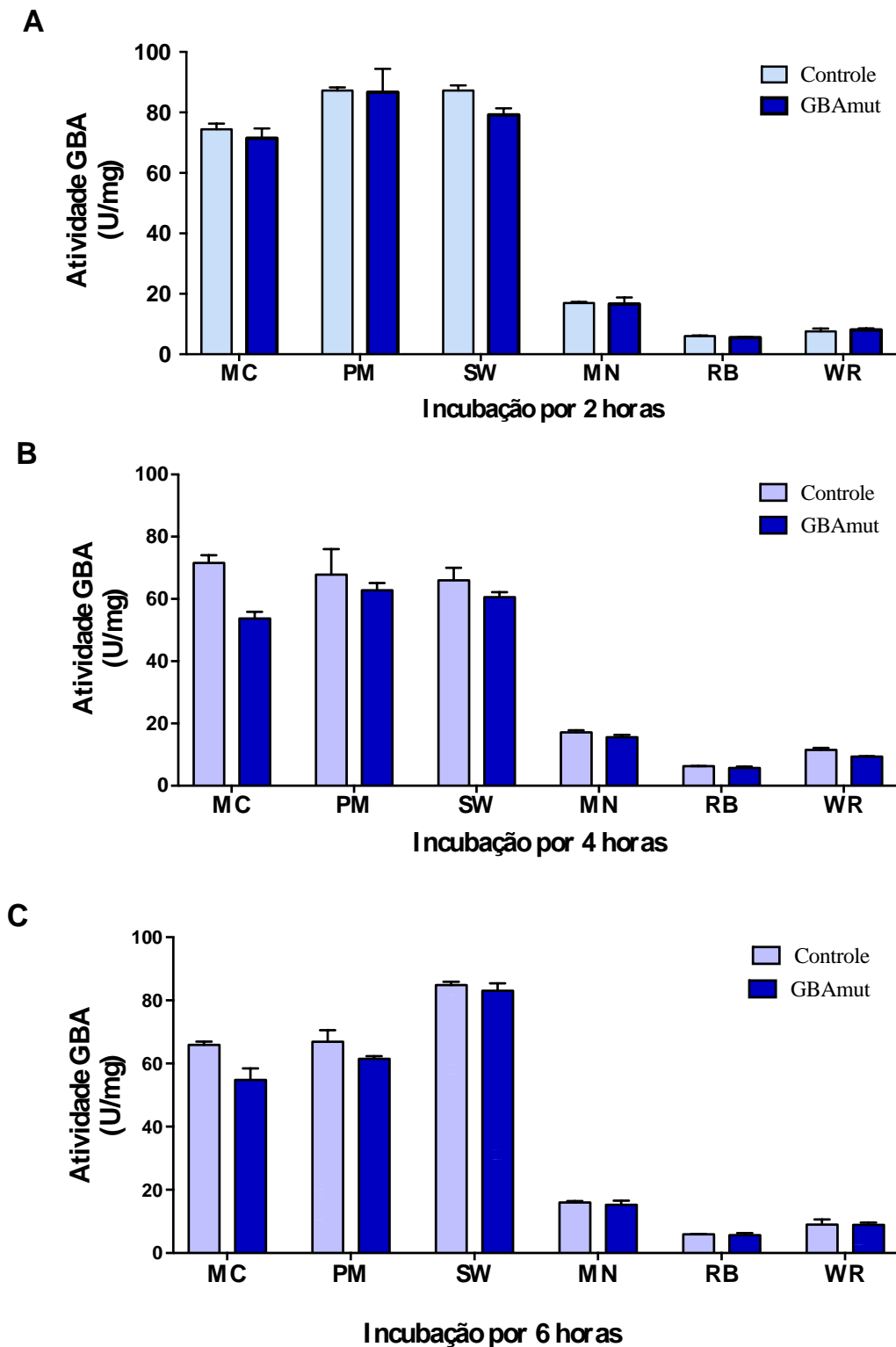


Figura 15. Ensaio de *uptake in vitro* da enzima lisossomal GBA recombinante (mutGBA) por fibroblastos. Atividade biológica *in vitro* da enzima mutGBA em fibroblastos após incubação por diferentes tempos com mutGBA ou com DMEM como controle. Em todos os ensaios foram utilizadas culturas de fibroblastos de indivíduos controle (MC; PM e SW) e de fibroblastos de pacientes com DG (MN; RB e WR). A) incubação de 2h com mutGBA ou com DMEM. B) incubação de 4h com mutGBA ou com DMEM e C) incubação de 6h de mutGBA com mutGBA ou com DMEM.

Para fim de comparação da capacidade de *uptake* da enzima lisossomal recombinante mutGBA com moléculas de GBA recombinantes comerciais, foi utilizado 10 ng de alfa velaglucerase – VPRIV. Assim, os fibroblastos de todos os pacientes e controles saudáveis também foram incubados por 2 horas com 10 ng de VPRIV. Não foram observados aumentos significativos na atividade biológica da GBA com o tratamento com VPRIV (Figura 16). A média da atividade específica de GBA em fibroblastos de indivíduos saudáveis tratados no tempo de 2h de incubação com VPRIV foi de 54,2 (\pm 1,9) U/mg de proteína e não tratados foi de 62,5 (\pm 9,58) U/mg (Figura 16). Já, a média da atividade específica de GBA em fibroblastos DG sem tratamento foi de 5,9 (\pm 2,09) U/mg de proteína, enquanto os tratados com VPRIV resultaram em 7,9 (\pm 1,8) U/mg. As amostras de fibroblastos dos pacientes com DG e de um indivíduo saudável, foram testadas com incubações com VPRIV de 4 e 6 horas, também não tendo sido observadas variações na atividade específica de GBA com a adição de VPRIV nesses tempos, como mostra a Figura 16.

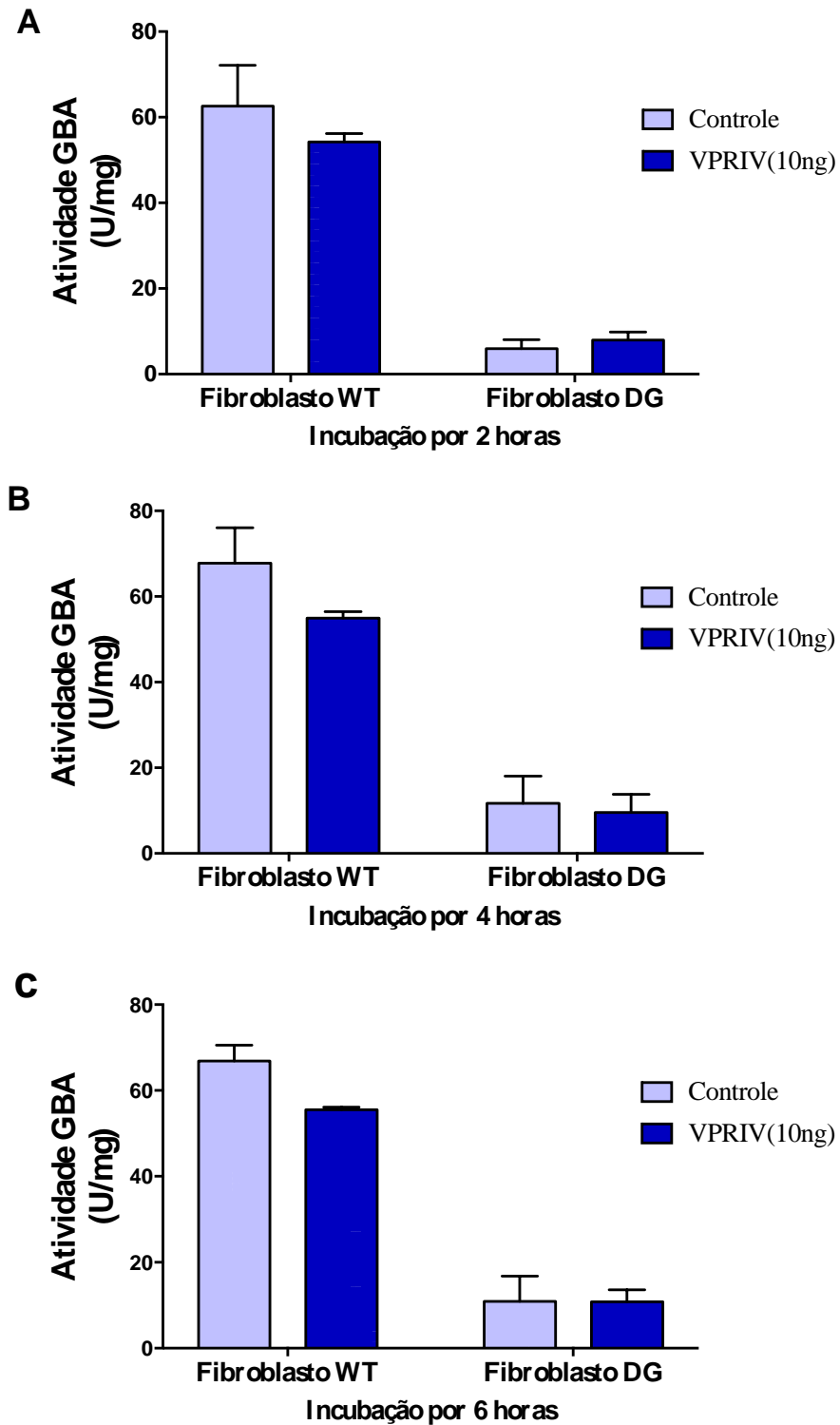


Figura 16. Comparação da atividade específica da GBA em fibroblastos incubados com alfa velaglucrase - VPRIV (10ng) por diferentes tempos; A) média da atividade específica de GBA em fibroblastos controles, MC, PM e SW, e de pacientes com GD, MN, RB e WR, incubados por 2h com VPRIV; B) média da atividade específica de GBA em fibroblasto controle PM e de pacientes DG incubados por 4h com VPRIV e C) média da atividade específica de GBA em fibroblasto controle e de pacientes com DG incubados por 6h com VPRIV.

6.6 Genotipagem dos camundongos modelos de DG

Nesse trabalho utilizamos um modelo animal para DG, com inativação condicional da GBA. A genotipagem desses animais é realizada com frequência para a confirmação do genótipo. Portanto, após a realização do experimento, foi feita a genotipagem para caracterizar os camundongos quanto à presença da sequência Cre entre os éxons 8 e 11 do gene GBA de camundongo. A genotipagem mostrou marcação apenas nos camundongos 31,34, 70 e 88 com um produto de PCR de intensidade para a sequência Cre e a genotipagem nos camundongos 78 e 95, não apresentou banda. Os camundongos 31, 34, 70, 88, 78 e 95 mostraram bandas representativas do gene LoxP.

6.7 Internalização da mutGBA no fígado, baço, cérebro e pulmões de camundongos modelos para DG

Para investigar se a enzima mutGBA pode ser internalizada em diferentes órgãos dos camundongos modelo para DG e não apenas em macrófagos obtidos *in vitro* a partir de células da medula óssea dos animais, foi realizada a infusão com aproximadamente 19 U de mutGBA em animais modelo para DG. Após 1h, foram coletados sangue periférico e amostras de fígado, baço e tecido cerebral. Foram analisados 6 camundongos, sendo 2 com DG (Mx1/Cre/LoxP) tratados com mutGBA, 2 com DG (Mx1/Cre/LoxP) tratados com PBS e 2 controles (LoxP/LoxP) sem DG e sem tratamento.

A análise da atividade específica da enzima GBA no baço de camundongos modelo para DG antes e após a infusão da mutGBA mostrou um aumento de 1,4 vezes, como representado pela Figura 17A. O camundongo tratado com PBS mostrou uma média de atividade de 17,69 (\pm 4,62) U GBA/mg de proteína *versus* a atividade dos camundongos tratados com mutGBA 24,13 (\pm 0,72) U GBA/mg de proteína. Assim, esses níveis de atividade específica de GBA nos camundongos com DG após o tratamento com mutGBA se aproximaram aos níveis de GBA no baço de camundongo controle LoxP/LoxP com média de 27,57 (\pm 4,05) U GBA/mg de proteína.

Esses dados sugerem que ocorreu a internalização da mutGBA no baço dos camundongos modelo para DG tratados com a mesma.

A análise da atividade específica da enzima GBA no fígado de camundongos modelo para DG antes e após a infusão mostrou também um aumento de 1,5 vezes no nível de GBA. O camundongo tratado com PBS nessas condições apresentou uma média de atividade de GBA de 12,82 (\pm 1,61) U GBA/mg de proteína *versus* a média 19,51 (\pm 0,46) U GBA/mg de proteína obtida pelo camundongo tratado com mutGBA. Quando comparamos os níveis de GBA presentes no fígado de camundongos controle LoxP/LoxP de 21,43 (\pm 3,0) U GBA/mg de proteína com os camundongos com DG tratados com mutGBA, percebemos que o tratamento com a molécula recombinante se aproxima dos valores esperados para o controle sem inativação da GBA (Figura 17B). Esses dados sugerem que, também ocorreu a internalização da mutGBA no fígado dos camundongos tratados com a mesma.

No caso de leucócitos, a análise da atividade biológica da GBA em camundongos modelo para DG antes e após a infusão da mesma mostrou um aumento de 1,8 x no nível de GBA quando comparado com o camundongo tratado com PBS, sendo a atividade específica da enzima 9,33 (\pm 2,28) U GBA/mg *versus* 5,53 (\pm 0,89) U GBA/mg de proteína, respectivamente. Nesse caso, os níveis de GBA presentes nos camundongos com DG sem tratamento foram 4,2 x inferiores ao nível de GBA no camundongo controle LoxP/LoxP que apresentou atividade de 22,94 U GBA/mg de proteína (Figura 17C). A diferença de atividade dos camundongos LoxP/LoxP diminuí para 2,3 quando comparada com o camundongo tratado com mutGBA.

Por fim, avaliamos também a atividade específica da GBA no cérebro de camundongos modelo para DG antes e após a infusão da mutGBA. Conforme mostra a Figura 17D, em camundongos controle LoxP/LoxP, os níveis de GBA foram 48,97 (\pm 10,65) U GBA/mg de proteína. E no modelo de DG sem e com a infusão de MutGBA os níveis de GBA foram 43,80 (\pm 3,49) e 41,32 (\pm 9,38) U GBA/mg de proteína, respectivamente. Esses dados mostram pouca variação nos camundongos modelo para DG após a infusão de mutGBA, como esperado, uma vez que a barreira hematoencefálica não permitiria o transporte da mesma para o sistema nervoso central.

Em conjunto, esses dados sugerem que a mutGBA produzida pela linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA é biologicamente ativa em modelo animal para DG e internalizada no baço, fígado e leucócitos.

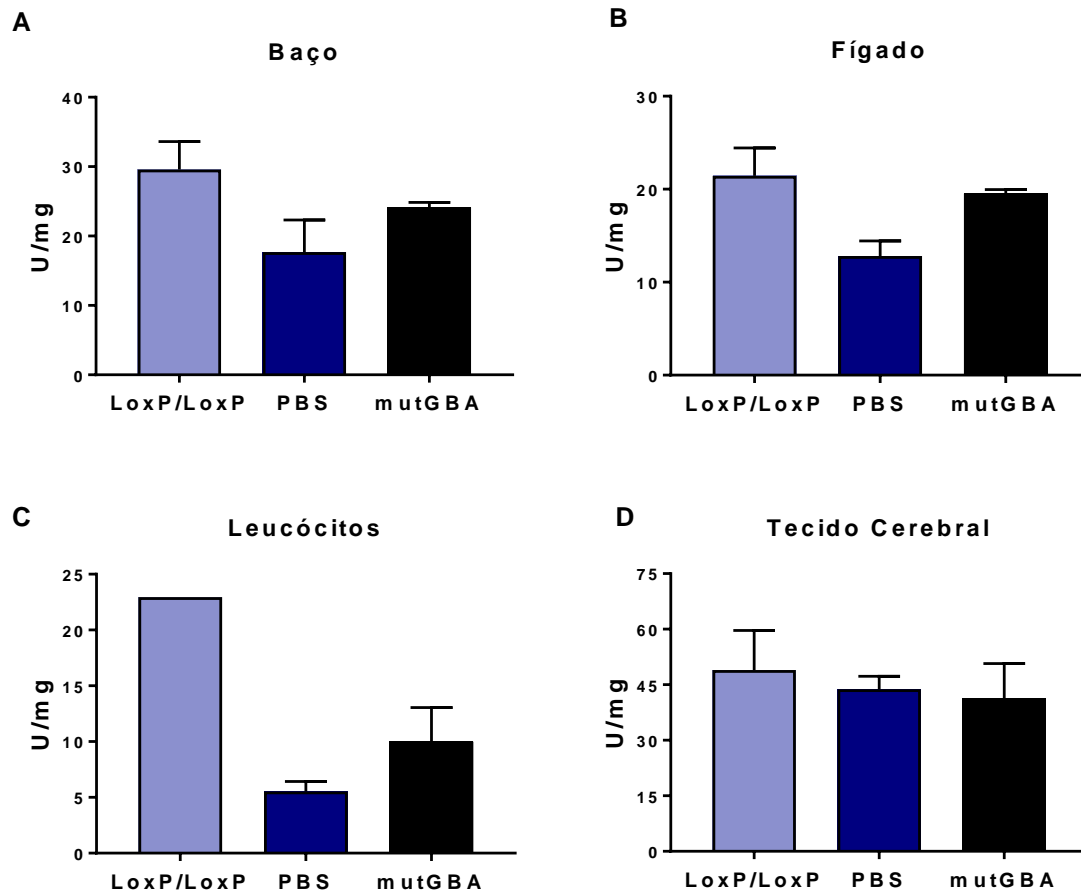


Figura 17. Ensaio de *uptake in vivo* da enzima lisossomal GBA recombinante (mutGBA) em diferentes órgãos e tecidos após 1 hora da infusão com 100 μ l de sobrenadante, concentrado 10x, contendo a enzima recombinante mutGBA. Como controle, os camundongos modelo para DG foram infundidos com 100 μ l de PBS. Também foram analisados os camundongos controles saudáveis (LoxP/LoxP). A) atividade biológica da GBA no baço nos diferentes grupos testados, mostrou um aumento de 1,4 x no camundongo tratado com mutGBA; B) atividade biológica da GBA no fígado dos camundongos, sendo que houve um aumento de 1,5 x com o tratamento de mutGBA; C) atividade biológica da GBA em leucócitos de camundongos com DG e controles, com aumento de 1,8x nos camundongos tratados com mutGBA e D) atividade biológica da GBA no cérebro de camundongos com DG e controles, sem modificações nos níveis de atividade entre os três grupos.

6.8 Produção extracelular e intracelular de GBA pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA

Ensaio prévios mostraram a atividade biológica *in vitro* da enzima mutGBA secretada pela linhagem celular humana L16_293-FT-P2-mutGBA apenas em pequena escala e quando mantida em meio DMEM com soro bovino fetal. Nessas condições, a atividade da GBA está na ordem de 22,24 (\pm 2,3) U/mL, cerca de 3 x maior que o nível de GBA produzida pela célula virgem de 7,03 (\pm 0,2) U/mL ($p = 0,0073$), e ao final desse experimento, foram contabilizadas $7,2 \times 10^6$ células. No presente trabalho, foi avaliada a atividade biológica da enzima mutGBA secretada pela linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA quando a mesma é cultivada em DMEM sem adição de 10% de SBF ao meio. Nessas condições, a produção de mutGBA pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA está na ordem de 5,29 (\pm 31,79) U/mL. Ao final do experimento sem SBF havia $2,4 \times 10^6$ células da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA nas repetições feitas em placas de 6 poços, cerca de 3 x menos células em comparação com o cultivo com SBF ($7,2 \times 10^6$ células).

Quando a atividade biológica da GBA é avaliada em relação a sua produtividade em condições de cultivo, com e sem 10% SBF, não há diferença estatística significativa quanto às médias de produção. Como mostra a Figura 18, células da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA cultivadas sem soro bovino fetal obtiveram uma produtividade de 17,84 (\pm 6,34) U/ 10^6 células, já quando a linhagem foi cultivada com SBF a produtividade foi de 25,6 (\pm 4,2) U GBA/ 10^6 células ($p = 0,35$; Teste *Welch*).

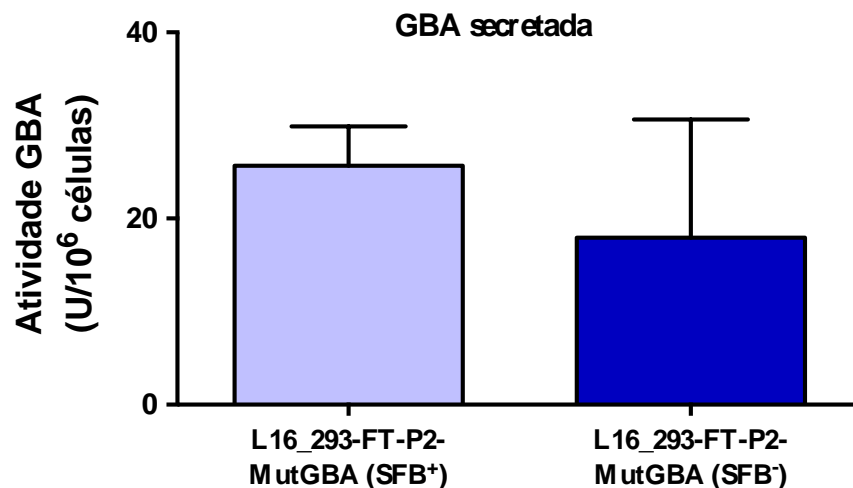


Figura 18. Produtividade da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA, após 48 h de cultivo estático em monocamada na presença e na ausência de SFB. O número de unidades de GBA biologicamente ativa foram determinadas pelo ensaio fluorimétrico.

A análise comparativa da produção de GBA após 48 h mostrou que na presença de 10% SFB foi 1,43 vezes maior que na presença de SFB, porém não apresentou diferença estatística significativa pelo teste de *Welch*. Considerando a maior aderência celular na presença de 10% SFB prosseguimos as culturas dos clones celulares nessa condição.

6.9 Clonagem celular e produção de mutGBA secretada

Foram gerados 13 clones celulares, derivados da população heterogênea permanente L16_293-FT-P2-mutGBA, a partir da seleção de uma colônia derivada de uma única célula. A Tabela 3 resume os dados obtidos da atividade biológica da GBA secretada pelos diferentes clones celulares e a produtividade dos mesmos a partir do cálculo do número de células/ cultivo celular.

Conforme mostra a Tabela 3, a quantidade de enzima secretada pelos clones no cultivo com SFB e no tempo de 48 horas variou entre 5,1 (\pm 2,02) U GBA/mL (clone 9) e 301,4 (\pm 4,35) U GBA/mL (clone 5) (Figura 19), com diferença significativa ($p < 0,0001$, ANOVA). Observamos que o clone 5 secreta níveis de GBA cerca de 301,4 (\pm 4,35) U GBA/mL de meio de cultura, cerca de 1,7 vezes maior que a população mista, que secreta níveis de 181,8 (\pm 13,54) U GBA/mL ($p = 0,0077$). O segundo clone que secreta maior quantidade de GBA é o clone 6 com níveis de 226,7 (\pm 9,04) U GBA/ mL cerca de 1,3 vezes maior que a população heterogênea

($p = 0,0057$). Com relação a população celular virgem, o clone 5 produz cerca de 500x mais ($p < 0,0001$).

As medidas de atividade biológica dos diferentes clones foram também determinadas pelo número de células presentes em cada cultura celular. A partir desses valores pôde-se obter a produtividade dos respectivos clones celulares. Conforme mostra a Tabela 3, a produtividade dos clones após o cultivo com SFB e por 48 h variou entre 10,3 ($\pm 4,17$) U GBA/ 10^6 células (clone 9) e 207 ($\pm 3,23$) U GBA/ 10^6 células (clone 5) ($p = 0,0005$). O clone com maior produtividade foi também o clone 5 que cuja produtividade é 2,6 vezes maior que a população heterogênea, cuja produtividade é 79,9 ($\pm 6,7$) U/ 10^6 células.

Comparando com a produtividade da população heterogênea podemos dizer que 23% dos clones gerados apresentam baixa produtividade de GBA (entre 10-46 U/ 10^6 células), 46% dos clones apresentam produtividade intermediária de GBA (entre 51-75 U/ 10^6 células) e 31% dos clones apresentam elevada produtividade de GBA (entre 112 - 204 U/ 10^6 células).

Tabela 3. Atividade biológica da molécula GBA-mut secretada e Produtividade dos diferentes clones celulares após 48 h em cultivo com 10% SFB

Linagem	Repetição	Número de células após 96h	Atividade Biológica - Sobrenadante (U/mL)	Média de Atividade Biológica (U/mL)	Produtividade (U/1x10 ⁶)	Média Produtividade (U/1x10 ⁶)
293FT-Virgem	1	2675000	0,1	1,2	0,2	0,6
	2	2350000	1,4		1,2	
	3	2537500	2,0		0,3	
População Mista	1	4525000	204,2	181,8	91,5	80,0
	2	4675000	157,4		68,3	
	3	4650000	183,7		80,1	
Clone_1	1	3125000	73,4	74,3	47,0	51,3
	2	2575000	51,5		40,07	
	3	2925000	98,0		67,1	
Clone_2	1	1350000	8,5	20,4	12,7	23,9
	2	1625000	28,5		35,1	
	3	2025000	24,2		23,9	
Clone_3	1	2825000	212,8	220,9	152,8	160,7*
	2	2700000	187,9		141,2	
	3	2825000	262,1		188,2	
Clone_4	1	4125000	258,8	238,8*	127,3	113,9*
	2	4275000	223,8		106,2	
	3	4375000	233,7		108,4	
Clone_5	1	3100000	310,1	301,4*	202,9	207,4*
	2	2825000	297,5		213,7	
	3	2925000	296,6		205,7	
Clone_6	1	2975000	211,8	226,7	144,4	166,5*
	2	2700000	243,0		182,6	
	3	2650000	225,3		172,5	
Clone_7	1	3900000	76,1	89,8	39,0	47,1
	2	4100000	83,4		40,7	
	3	3575000	110,0		61,6	
Clone_8	1	3225000	130,0	145,0	80,6	76,7
	2	4450000	110,5		49,6	
	3	3900000	194,5		99,9	
Clone_9	1	1050000	5,9	5,1	11,2	10,3
	2	962500	8,2		17,1	
	3	900000	1,3		2,7	
Clone_10	1	2950000	91,8	100,9	62,2	71,3
	2	2250000	95,4		84,8	
	3	3450000	115,5		67,0	
Clone_11	1	1625000	46,5	54,5	57,3	56,9
	2	1900000	52,9		55,8	
	3	2225000	64,2		57,8	
Clone_12	1	2800000	62,2	73,9	44,4	63,9
	2	2275000	67,6		59,4	
	3	2100000	92,0		87,8	
Clone_13	1	1562500	65,9	46,9	84,3	55,8
	2	1762500	56,0		63,5	
	3	1925000	18,7		19,5	
Leucócito controle	2			5,5 U/mg		
	3			8,1 U/mg		

Os clones mostraram produção aumentada de GBA quando comparadas com a população heterogênea L16_293-FT-P2-mutGBA, como demonstrado na Figura 19 ($p < 0,0001$, ANOVA). Os clones 4 e 5 mostraram níveis de produção da GBA da ordem de 1,31 e 1,65 vezes maior que a população heterogênea, respectivamente ($p = 0,03$ e $0,0077$, respectivamente, teste de *Welch*). Dentre eles, o clone 5 mostrou níveis mais elevados e produção de GBA (Figura 20) e, portanto, avaliamos a produção da enzima β -glicosilceramidase do clone 5, considerando as três repetições juntamente, P1, P2 e P3, em um total de 6 mL foi obtida uma produção de 1808,5 U de enzima lisossomal.

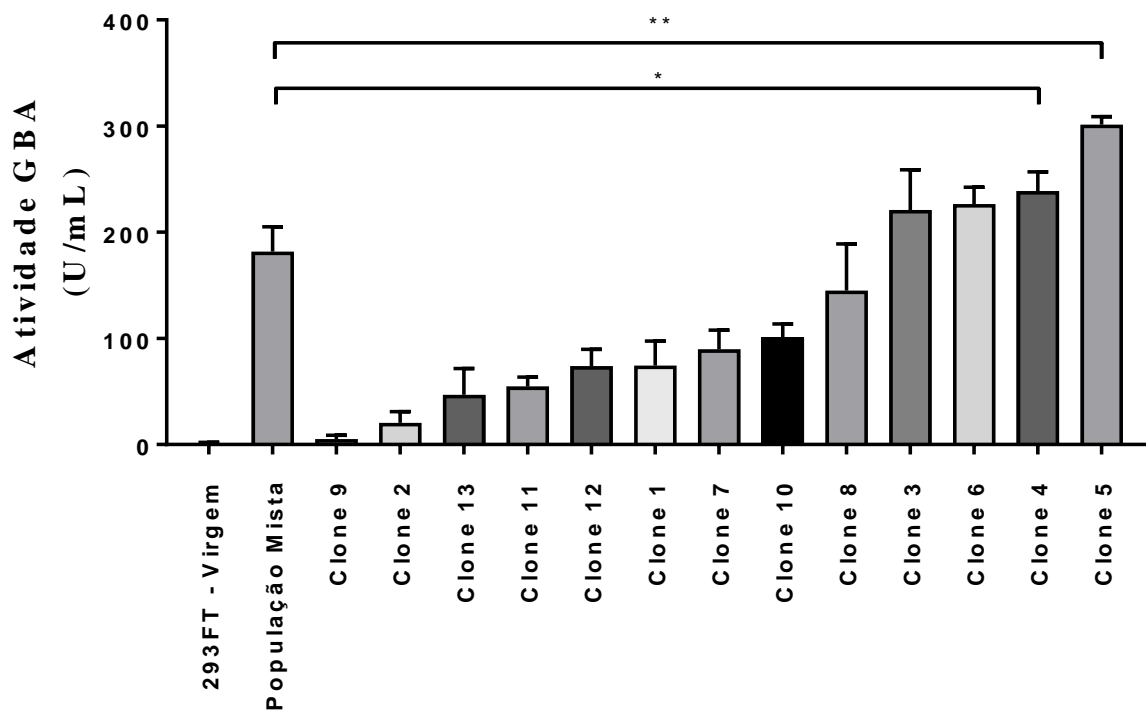


Figura 19. Atividade biológica *in vitro* da enzima GBA dos 13 clones gerados a partir da linhagem heterogênea L16_293-FT-P2-mutGBA e submetidos ao cultivo por 48 h em meio com 10% SFB. (* $p = 0,03$; ** $p = 0,0077$, teste de *Welch*).

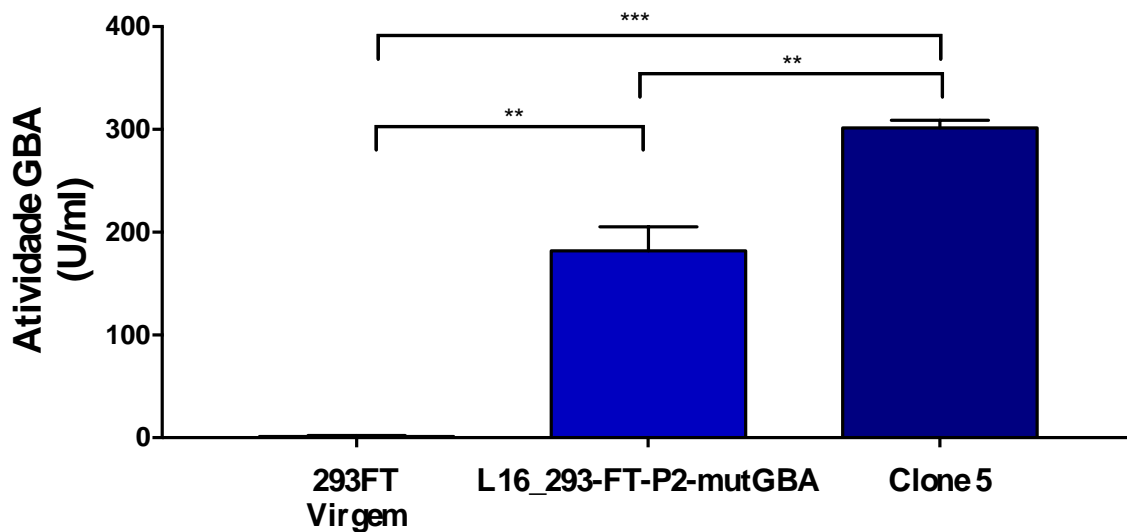


Figura 20. Atividade biológica *in vitro* da enzima GBA comparando as células 293FT controle, a linhagem heterogênea L16_293-FT-P2-mutGBA e o melhor clone selecionado pelo seu nível de produção de mutGBA no sobrenadante (Clone 5) (** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Teste de *Welch*).

Sabendo o número de células em cada cultivo, foi possível estimar a produtividade dos respectivos clones celulares, bem como, da população mista e da população controle em cultivo em monocamada por 48 h em meio com SFB, como resume a Figura 21. Os quatro clones com maior nível de produção de GBA em 2 mL, clones 3, 4, 5 e 6, também apresentaram maior produtividade, referente a produção total por 1×10^6 células, com diferença significativa pelo teste de *Welch*. Com destaque que o clone 5 continua como maior produtor da enzima de interesse. Pôde-se observar que os níveis de produção de GBA pelo clone 5 foi $207,4 (\pm 5,6)$ U GBA/ 10^6 células, comparado com a linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA que mostrou níveis de GBA da ordem de $78,9 (\pm 11,5)$ U GBA/ 10^6 células e com a célula virgem que mostrou níveis de GBA de $1,0 (\pm 0,8)$ U GBA/ 10^6 células. Isso indica um aumento de produtividade de 2,6 x em relação a população mista ($p < 0,0001$) e de aproximadamente 207 x em relação a célula virgem ($p < 0,0001$).

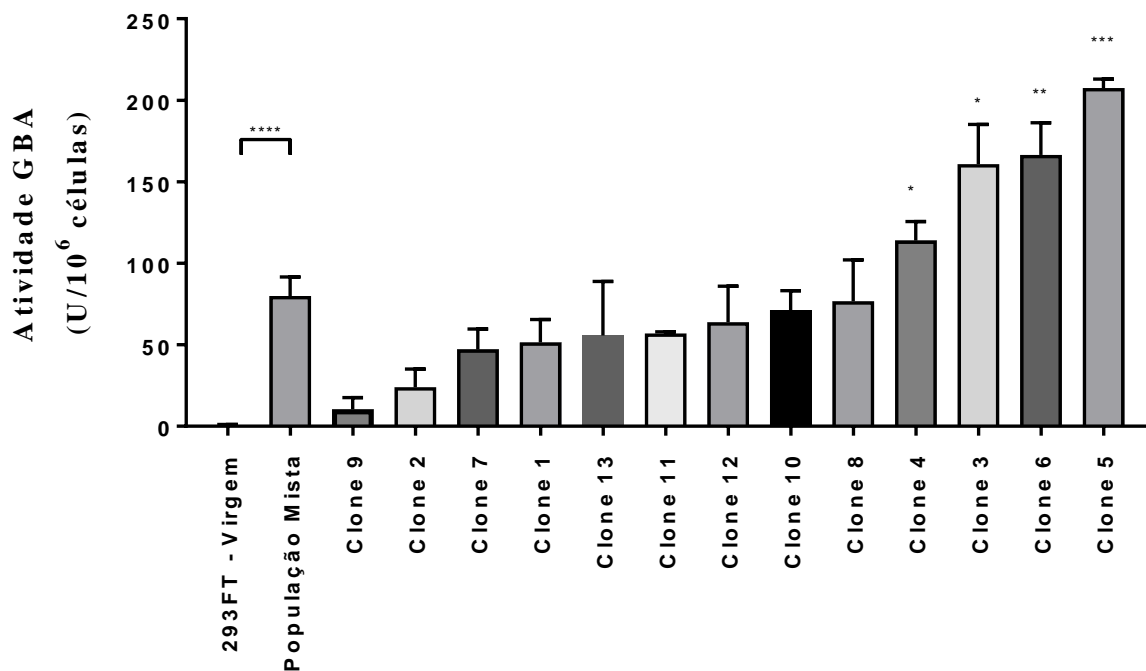


Figura 21. Produtividade dos 13 clones celulares na presença de SFB, após 48 h de cultivo estático em monocamada. Clones 4, 3, 6 e 5 apresentam valores estatisticamente aumentados quando comparados a produtividade da população mista (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; *Welch*).

6.10 Atividade enzimática específica e produção de GBA intracelular nos clones celulares

A atividade específica da enzima GBA produzida pelos 13 clones, bem como da enzima GBA produzida pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA e pela célula 293FT virgem foram também avaliadas. Os resultados da atividade enzimática específica estão na Tabela 4, onde são mostrados o número de células, os valores de proteína obtidos pela técnica de Lowry, atividade específica descrita como U GBA/mg de proteína total e a produtividade da linhagem celular e respectivos clones descrita como U GBA/10⁶ células. A Figura 22 mostra as médias obtidas para todos os clones celulares e o controle 293FT quando comparadas com a produção média da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA.

Pudemos observar que a atividade específica da enzima lisossomal GBA produzida pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA, quando cultivada em meio DMEM com 10% de SBF por um período de 48 h foi 294,4 ($\pm 63,1$) U/mg proteína. Observou-se, portanto, que a atividade específica da enzima recombinante é cerca de 1,9 vezes maior comparada com a célula virgem, com produção de 150,8 ($\pm 63,1$)

U/mg de proteína ($p = 0,0309$). Em seguida, passamos para as análises dos clones celulares.

Conforme mostra a tabela 4, a produção da enzima lisossomal GBA pelos diferentes clones celulares variou de 297,0 ($\pm 56,2$) U/mg de proteína (clone 1) a 622,2 ($\pm 48,2$) U/mg de proteína (clone 13), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0010$). Também, foi observado diferença estatística quando foi comparado o clone 13 com maior atividade específica e a população heterogênea ($p = 0,0009$).

Tabela 4. Atividade enzimática específica, proteína total, número de células/ cultivo em cada clone celular e produtividade após o cultivo por 48 h em meio com 10% SFB

	Repetições	Número de células	Proteína total Lowry (mg)	Atividade Enzimática Específica (U/mg)	Média de Atividade Específica (U/mg)	Produtividade em 2 mL (U/1x10 ⁶)	Média Produtividade (U/1x10 ⁶)
293FT-Virgem	1	2675000	1,2	106,9		31,12	
	2	2350000	1,2	105,4	150,8	35,90	49,32
	3	2537500	1,4	240,1		80,95	
População Mista	1	4525000	1,5	238,2		53,39	
	2	4675000	1,4	282,5	294,4	57,60	84,39
	3	4650000	3,0	362,6		142,20	
Clone_1	1	3125000	1,3	298,3		84,35	
	2	2575000	1,7	240,1	297,0	104,99	143,01
	3	2925000	3,2	352,5		239,67	
Clone_2	1	1350000	1,1	338,9		176,44	
	2	1625000	1,1	346,6	385,7	157,77	201,15
	3	2025000	1,9	471,6		269,24	
Clone_3	1	2825000	2,5	237,9		138,47	
	2	2700000	1,2	426,6	341,5	125,64	167,61
	3	2825000	3,0	360,1		238,71	
Clone_4	1	4125000	2,3	374,8		136,73	
	2	4275000	1,7	496,0	501,4	131,25	210,42
	3	4375000	4,0	633,4		363,28	
Clone_5	1	3100000	1,9	303,6		126,61	
	2	2825000	1,6	315,9	360,0	120,17	156,67
	3	2925000	2,3	460,4		223,23	
Clone_6	1	2975000	1,1	499,3		122,72	
	2	2700000	1,7	291,9	398,9	124,97	150,14
	3	2650000	2,1	405,5		202,72	
Clone_7	1	3900000	1,2	278,7		54,83	
	2	4100000	1,1	255,8	336,3	45,75	105,92
	3	3575000	2,6	474,4		217,19	
Clone_8	1	3225000	1,5	522,6		158,17	
	2	4450000	1,7	385,4	520,3	96,71	203,31
	3	3900000	3,3	652,7		355,06	
Clone_9	1	1050000	0,4	374,8		95,72	
	2	962500	0,6	512,9	427,4	198,72	182,83
	3	900000	0,9	394,3		254,04	
Clone_10	1	2950000	1,5	510,8		168,42	
	2	2250000	1,3	521,7	534,9*	205,28	219,15*
	3	3450000	2,7	572,2		283,75	
Clone_11	1	1625000	1,2	557,6		263,78	
	2	1900000	1,2	546,1	508,2*	228,21	281,14*
	3	2225000	3,0	420,9		351,44	
Clone_12	1	2800000	1,2	457,1		130,73	
	2	2275000	1,1	513,5	504,6*	168,97	242,37
	3	2100000	2,6	543,2		427,42	
Clone_13	1	1562500	1,2	567,3		298,12	
	2	1762500	1,1	657,4	622,2*	285,33	325,55*
	3	1925000	1,9	641,8		393,20	
Leucócito controle	1				7,55 U GBA/mg proteína		
	2				39,02 U GBA/mg proteína		

A figura 22 mostra a média da atividade enzimática específica de cada clone celular, bem como, da população celular heterogênea L16_293-FT-P2-mutGBA e da linhagem celular virgem (293FT).

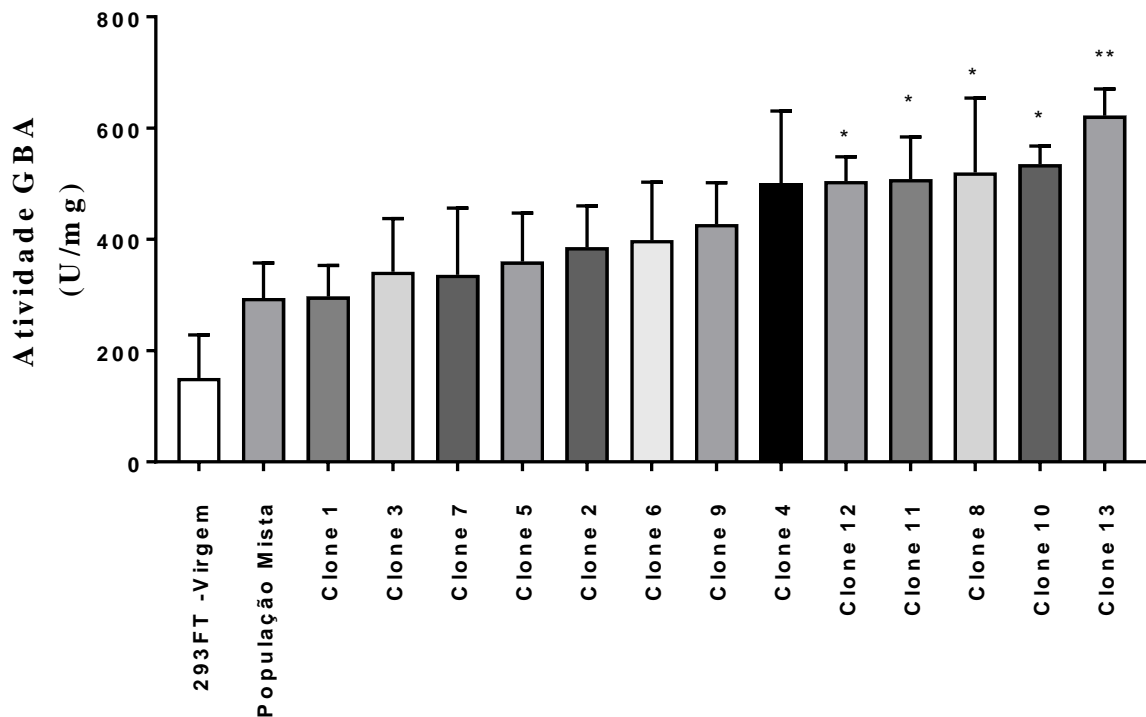


Figura 22. Atividade específica da enzima recombinante GBA produzida pela população com produção estável de GBA L16_293-FT-P2-mutGBA e 13 clones obtidos a partir da mesma. (* $p < 0,05$; ** $p = 0,006$; *Welch*).

Em seguida, avaliamos a atividade biológica intracelular pelo número de células presentes em cada cultura celular. Para tanto, antes da obtenção do extrato proteico total, as células foram lavadas em PBS, coletadas e quantificado o número de células/cultura celular. A partir desses valores pôde-se obter a produtividade intracelular da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA e os respectivos clones em cultivo em monocamada por 48 h em meio com SFB. Como controle foi avaliado a produtividade da célula virgem. Conforme mostram a tabela 3 e figura 23, dentre as linhagens clonais geradas, o clone 13 mostrou níveis de produção de GBA de 325,55 ($\pm 58,9$) U/mg de proteína, sendo aproximadamente 6,6 x maior que a 293FT virgem ($p = 0,0063$) e 3,9 x maior que a população celular L16_293-FT-P2-mutGBA ($p = 0,0061$). Para analisar a produção total de GBA intracelular do clone 13 foram consideradas as três repetições produzidas na placa de 6 poços, e assim, a partir de $5,25 \times 10^6$ células totais obtidas dessas culturas celulares pôde-se obter 1709 U GBA.

A análise comparativa da produtividade dos respectivos clones considerando U GBA intracelular/ 10^6 células está representada na Figura 23. Considerando uma análise conjunta dos dados por ANOVA, houve diferença significativa entre as médias, e a produtividade da enzima GBA, avaliada por teste de *Welch*, indicou que os clones 10, 11 e 13 diferem estatisticamente da população mista.

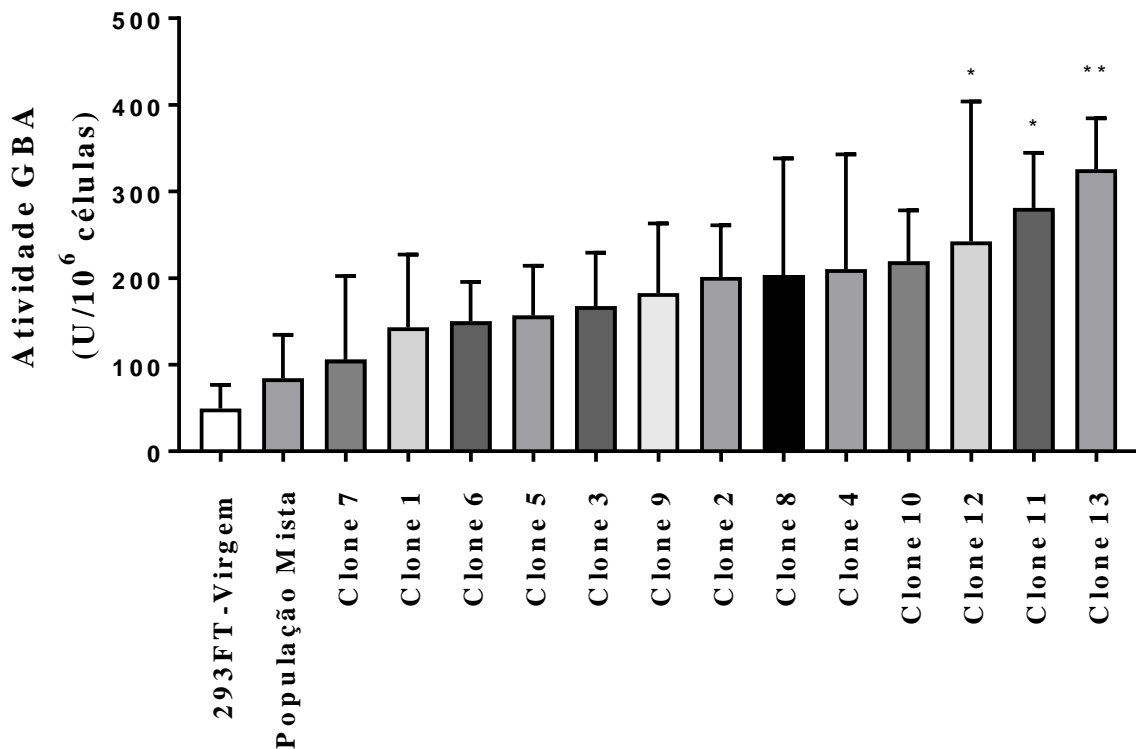


Figura 23. Produtividade da linhagem controle 293FT, a L16_293-FT-P2-syntGBA-Mut-1 (População Mista) e clones celulares (* $p < 0,05$; ** $p = 0,006$; *Welch*)

Por fim, realizamos a análise comparativa do nível de enzima GBA secretada *versus* a intracelular / 10^6 células cultivadas por 48 h em monocamada, conforme mostra a Figura 24. Essa análise mostra que muitas vezes, por exemplo, os clones que produzem maior quantidade de GBA intracelular produzem baixa quantidade de GBA secretada. O mesmo ocorre com clones com alta produção de GBA secretada, e conseqüentemente produzem menos dessa proteína terapêutica de forma intracelular.

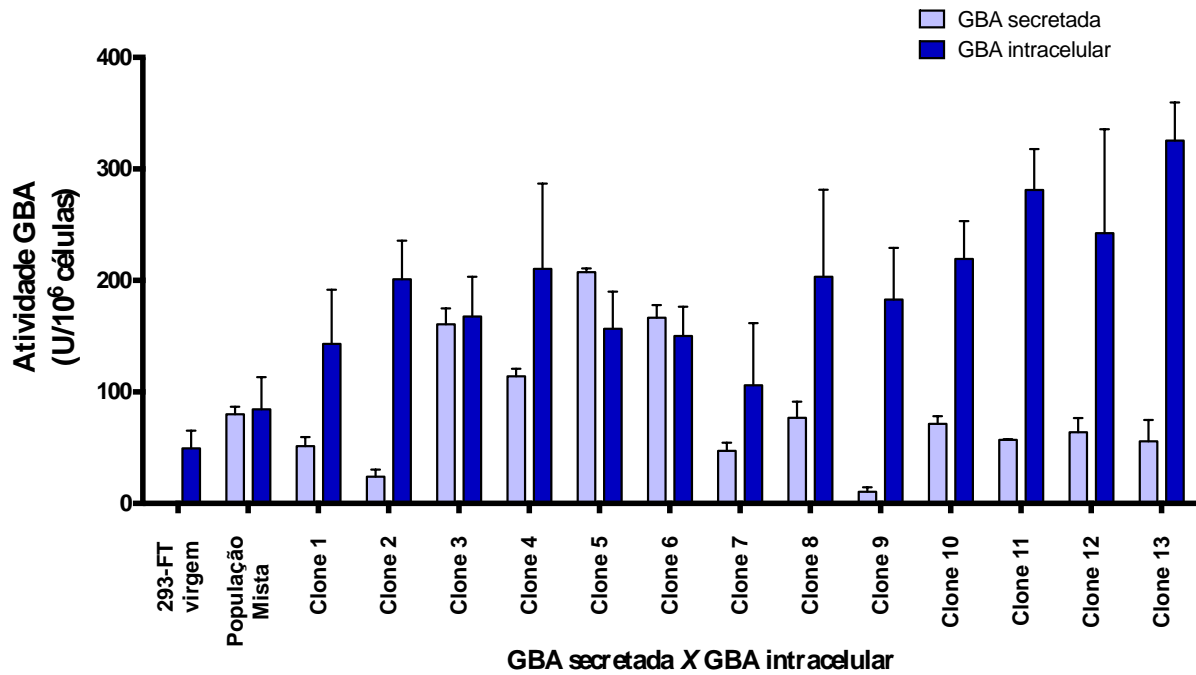


Figura 24. Análise comparativa do nível da enzima lisossomal GBA secretada e intracelular/10⁶ células da população mista, dos clones celulares e linhagem controle após 48 h de cultivo estático em monocamada na presença de SFB.

7 DISCUSSÃO

Os dados aqui apresentados mostram que é possível escalonar a produção da β -Glicosilceramidase recombinante a partir da linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA com a geração de GBA enzimaticamente ativa, como mostrado por testes *in vivo* e *ex vivo*. A caracterização dos clones celulares, isolados a partir da população heterogênea, permitiu a seleção de clones com aumento de produtividade de 2,6x de GBA secretada e 3,9 x de intracelular. O cultivo da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA em larga escala resultou níveis de produção da ordem de 9677 (\pm 1089) U de GBA secretada, com aumento de 217x em comparação à quantificação em pequena escala (Figura 9). As análises de atividade biológica da GBA obtidas do cultivo em pequena escala, quando comparados com a produção escalonada, não mostram diferença estatística na produção de GBA por mL e de produtividade. Assim, apesar de populações heterogêneas (não clonais) possuírem grande variabilidade e sistemas de produção utilizando células de mamíferos sejam considerados difíceis de expandir, como citado por Xiao e colaboradores (2014) (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007; XIAO; SHILOACH; BETENBAUGH, 2014) os dados apresentados indicam que a L16_293-FT-P2-mutGBA manteve média de produção constante após as várias passagens necessárias para o cultivo na garrafa de 10 andares. O escalonamento em larga escala foi propiciado, em parte, devido a utilização da linhagem 293FT, pois linhagens derivadas das células HEK293 são conhecidas pelas altas taxas de produção de proteínas (HACKER; BALASUBRAMANIAN, 2016; VINK et al., 2014). Outros fatores que, possivelmente, contribuíram de forma significativa foram, primeiramente, o método de inserção por vetor lentiviral, que tem preferência por regiões ativas do genoma, e o processo de seleção com antibióticos por cinco dias anterior a realização dos experimentos, ambos processos possibilitaram a manutenção de uma cultura celular com níveis elevados de produção da proteína recombinante (LUSIC; SILICIANO, 2017, NAKAMURA; OMASA, 2015).

Com o sobrenadante obtido do escalonamento da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA foi possível realizar incubações *ex vivo* com macrófagos derivados da medula óssea de camundongos modelos para DG e controles. Inicialmente foi necessário isolar monócitos da medula óssea dos animais e, então, induzir a diferenciação com um fator de estimulação de macrófago (M-CSF). A metodologia de

diferenciação de macrófagos a partir da medula óssea de camundongos com M-CSF é um procedimento bem estabelecido em todo o mundo (WANG et al., 2013). A Figura 10 mostra células alongadas similar ao descrito por Wang e colaboradores (2013), sendo células pequenas retangulares com poucas projeções. Após a diferenciação, foi quantificada a atividade biológica da GBA total dos macrófagos, sendo que as células derivadas dos camundongos modelo de DG apresentaram 7,34% da atividade dos tipos controle LoxP/LoxP ($p < 0,0001$) (Figura 11). O modelo de camundongo de DG utilizado foi induzido por Mx1/Cre/LoxP (MISTRY et al., 2010) e teve inativação condicional do gene da GBA nos tecidos hematopoiéticos e mesenquimais, assim, a baixa atividade da GBA observada nessas células é o resultado esperado. Essa atividade da enzima é mais uma evidência da capacidade de inativação do método.

Após a confirmação dos padrões fenotípicos, os macrófagos derivados da medula óssea de camundongos controle LoxP/LoxP e os Mx1/Cre/LoxP, ambos foram tratados com aproximadamente 19 U de GBA. Essas células internalizaram a enzima MutGBA secretada pela linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA, como esperado para células com receptores de manose (SATO; BEUTLER, 1993) e a MutGBA se mostrou biologicamente ativa. Os macrófagos LoxP/LoxP tiveram um pico de atividade da GBA após 1:30h, com aumento de 1,33 x e apresentaram atividade da GBA similar ao nível basal após 3h do tratamento (Figura 12). Mx1/Cre/LoxP obteve pico de atividade após 30min de tratamento, aumento de 1,5x e após 1h e 30 min de incubação mostrou atividade da GBA em nível basal. Limkul e colaboradores (2016) incubaram macrófagos derivados de camundongos selvagens, por um período de 3 horas, com duas variantes de GBA produzida a partir de folhas de *Nicotiana benthamiana*, e mesmo com um tratamento de 5400 U (descrito como 90 $\mu\text{mol}/\text{min}$) os pesquisadores observaram um aumento entre 1,5 e 1,8x (LIMKUL et al., 2016). Já He e colaboradores (2012), trataram macrófagos selvagens por 3h com 3000 U de GBA produzida em *A. thaliana*, e obtiveram um aumento de apenas 1,2x (HE et al., 2012). Dessa forma, uma dose de mutGBA aproximadamente 400 x mais concentrada, apresentou resultados similares aos do presente trabalho. Assim, mesmo com baixas concentrações, a mutGBA obteve valores como os descritos pela literatura, o que pode ser considerado um resultado promissor, sugerindo um alto nível de atividade enzimática com menor quantidade de proteína. Para mais detalhes sobre a atividade específica dessa GBA e para eliminar os possíveis efeitos de proteínas

inespecíficas, a proteína recombinante mutGBA deve ser purificada, o que é um dos objetivos futuros do grupo de pesquisa.

Como descrito, nas culturas de macrófagos as células derivadas de camundongos Mx1/Cre/LoxP e LoxP/LoxP incubadas com mutGBA mostraram aumento na atividade intracelular de GBA, entretanto, elas diferiram quanto ao tempo do pico de atividade enzimática. Apesar da cultura de macrófagos *ex vivo* ser considerada um modelo estável e homogêneo (WANG et al., 2013), a GBA está diretamente relacionada com o metabolismo e fisiologia dos macrófagos, além dos camundongos induzidos possuírem alterações feitas diretamente ao sistema hematopoiético. Dessa forma, é possível que exista diferenças entre os dois tipos de células avaliadas, Mx1/Cre/LoxP e LoxP/LoxP, por consequência da inativação do gene GBA. Kallemeijn e colaboradores (2017), avaliaram a internalização de rGBA em macrófagos humanos e descreveram a internalização da enzima. Esses autores usaram imiglucerase e velaglucerase com sondas marcadas (*Activity-Based probes*) e observaram o pico de absorção após uma hora e a atividade biológica nos macrófagos se manteve constante por até 180 min (KALLEMEIJN et al., 2017). Resultados similares de foram observados nesse trabalho nos macrófagos controles, entretanto não foi o observado em macrófagos de camundongos modelo de DG. Assim, no presente trabalho, não foi possível definir um tempo de vida média geral para a mutGBA devido à variação entre as linhagens, mas é um dos objetivos em estudos futuros.

A técnica de quantificação da atividade biológica da β -Glicosilceramidase utilizando reagentes fluorescentes foi estabelecida por Wenger e colaboradores (1978), e até hoje é utilizada para avaliação de pacientes com suspeita de doença de Gaucher (KANG et al., 2017; WENGER et al., 1978). Esse procedimento de medição da atividade enzimática da GBA tem sido modificado e aprimorado, entretanto, ainda são poucos os grupos de pesquisa que consideram diferenciar a quantidade de GBA, GBA2 e GBA3. Nesse trabalho também mostramos que a adição dos inibidores CBE e NDJ se mostrou eficaz para reproduzir as unidades de atividade das diferentes GBAs em fibroblastos. O tratamento da cultura primária de fibroblasto com o inibidor específico de GBA lisossomal (CBE) e com o inibidor de GBA2 (NB-DNJ) mostrou que 30% da atividade enzimática avaliada pelo ensaio fluorimétrico são relativas as outras enzimas GBAs não lisossomais, sendo dessa porção, 70% da GBA2 e 30% da GBA3. Interessante notar que a atividade da GBA2 também foi reduzida nos fibroblastos de

pacientes com DG, apesar desses indivíduos possuírem um alelo funcional para esse gene. Körschen e colaboradores (2013) avaliaram o padrão de distribuição e atividade enzimática da GBA lisossomal e GBA2 em camundongos e fibroblastos humanos. Os resultados desses autores em fibroblastos de pacientes, quando o teste fluorimétrico foi realizado em pH 6, também mostrou que a atividade da GBA lisossomal é mais da metade da atividade total de GBA. Além disso, os autores também descrevem que a GBA2 se mostra diminuída em fibroblastos com mutação na GBA lisossomal, e o mesmo ocorre em camundongos *knock-out* para o gene da GBA. A partir dos resultados de diversos testes em diferentes tecido e células, eles sugerem que a atividade da GBA2 é dependente da atividade da GBA lisossomal. Dessa forma, os resultados descritos por nosso grupo de pesquisa são similares ao descrito por Körschen e colaboradores (2013).

A atividade da GBA total dos fibroblastos controles foi cerca de 10x maior do que os fibroblastos derivados de pacientes com DG como foi descrito para outros tecidos ($p < 0,0001$) (MCNEILL et al., 2014; MONTFORT et al., 2004). Considerando a média dos controles, como 70,9 ($\pm 3,1$) U/mg de GBA, as culturas de fibroblastos MN, WR e RB mostraram 5,6%, 11,1% e 12,6 % de atividade da GBA, respectivamente. Montfort e colaboradores (2004), relataram que as mutações N370S e L444P possuem atividade enzimática da GBA entre 6-14%, estando de acordo com os valores do presente estudo (MONTFORT et al., 2004). Sasagasako e colaboradores (1993) observaram uma diminuição de atividade da GBA de fibroblastos de pacientes do tipo I de 3,4% e 11,7%, do tipo II de 2,9% e 2,8% e do tipo III de 4,3% e 7,3, em comparação a atividade biológica da enzima observada em fibroblastos de indivíduos saudáveis (SASAGASAKO et al., 1994). Dessa forma, os resultados observados no presente estudo estão dentro do esperado para mutações N370S e L444P.

Nos fibroblastos de indivíduos saudáveis e pacientes com DG tratados com 19 U de mutGBA não foi observado aumento de atividade biológica da GBA, nos tempos testados. As mesmas células tratadas com 10ng de VPRIV também não apresentaram variação significativa na atividade da GBA. Hespanhol e colaboradores (2005), descreveram a internalização de proteínas por fibroblastos pelos receptores de manose, indicando que os receptores não seriam a causa da não detecção de rGBA nos fibroblastos (HESPANHOL et al., 2005). Reggi e colaboradores (2012) realizaram o tratamento com uma GBA recombinante derivada de sementes de tabaco e

imiglucerase, em fibroblastos de indivíduos com DG por 5h com 1260 U de GBA, e observaram um aumento de atividade biológica da GBA de 2,6 x (REGGI et al., 2005). Considerando que a quantidade de GBA utilizada por esses autores foi aproximadamente 50x maior do que a utilizada no presente trabalho, é possível sugerir que doses mais altas da enzima sejam necessárias para gerar o aumento da atividade enzimática da GBA nos fibroblastos. Além disso, é provável que o aumento da pureza da mutGBA melhore a atividade específica da enzima, uma vez que a agregação de proteínas e agentes inespecíficos podem competir pelos receptores de manose (GRAMLICH et al., 2016; VAN PATTEN et al., 2007).

Para observar a atividade da mutGBA em tecidos específicos, 19 U de mutGBA foram injetados em dois camundongos dois Mx1/Cre/LoxP. Como controle, em dois camundongos Mx1/Cre/LoxP foi injetado PBS, e dois camundongos LoxP/LoxP foram utilizados como controles saudáveis. Como descrito por Kallemeijn e colaboradores (2017), a semivida de rGBAs é dependente do tecido, esses autores observaram em camundongos um decaimento bifásico em todos os tecidos observados, com geralmente uma meia-vida de aproximadamente 60 a 90 minutos. Dessa forma os modelos murinos desse experimento foram injetados com mutGBA e sacrificados após 1h. No baço dos camundongos modelo de DG foi observada uma aproximação da atividade da GBA comparada com o camundongo selvagem, com aumento de 1,4x da atividade de GBA em comparação aos camundongos não tratados (Figura 17A). Estudos descreveram a meia vida de imiglucerase e velaglucerase observada no baço de camundongos modelo para DG de aproximadamente 60 min, com a manipulação de 60 U/kg de ambas as enzimas (XU et al., 2010). Dessa forma, apesar de ser possível observar um aumento de GBA, é possível que o pico de atividade não tenha sido representado nesse estudo.

No fígado o aumento da atividade enzimática foi expressivo, cerca de 1,5x maior do que o camundongo tratado com PBS, e com níveis de atividade próximos ao do controle LoxP/LoxP (Figura 17B). Aproximadamente 60% das GBAs recombinantes são observadas no fígado, nesse órgão tanto hepatócitos parenquimatosos, bem como células endoteliais e células de Kupffer, absorvem a GBA recombinante com terminação em manose (FRIEDMAN et al., 1999; XU et al., 2010). Xu e colaboradores (2010), avaliaram a atividade de imiglucerase e velaglucerase em camundongos modelos para DG, e observaram um pico de atividade no fígado aos 20 min, com

aumento de atividade de 2,5 a 3,5 x maior que o controle não tratado para ambas as enzimas (XU et al., 2010). O mesmo estudo mostrou as proteínas rGBA com meia vida de 100 minutos. Dessa forma, o aumento de 1,5 x da proteína pode não representar a absorção total pelo órgão, embora já apresente a capacidade de internalização e atividade dentro das células. O tempo de tratamento desse trabalho foi similar a Limkul e colaboradores (2016), no qual os autores trataram camundongos selvagens por uma hora com 5400 U por grama de rGBA, com dois tipos de GBA produzida a partir de folhas de *N. benthamiana*, nessas condições eles observaram um aumento significativo de 1,5 x de GBA no fígado (LIMKUL et al., 2016). Assim, os valores observados nesse estudo estão similares aos que descritos pela literatura no mesmo tempo, podendo ser realizados mais estudos para investigação do pico de atividade. Nos leucócitos o aumento de atividade observado em camundongos tratados com GBA foi de 1,8x, mostrando que as células do sangue também internalizaram a mutGBA. O conjunto de todos os resultados de atividade biológica da GBA observados nos diferentes tecidos dos camundongos Mx1/Cre/LoxP indica que houve a internalização da mutGBA e que a proteína se mostrou enzimaticamente ativa nas células alvo da TRE para DG.

No cérebro não houve variação perceptível (Figura 17D). Mistry et al. (2010) e Enquist et al. (2006), descreveram que o sistema Mx1/Cre/LoxP supostamente não deve afetar a atividade da GBA no SNC, devido ao fato do promotor Mx1 ser um método de inativação genética condicionada às células hematopoiéticas e mesenquimais (ENQUIST et al., 2006; MISTRY et al., 2010). Além do genótipo selvagem da GBA nos cérebros dos modelos de DG, os camundongos tratados não mostraram diferença significativa comparados com os não tratados, provavelmente devido à incapacidade de grandes proteínas, como a MutGBA, atravessarem a BHE e a falta de receptores de manose nas células endoteliais do cérebro (BRADY; YANG; ZHUANG, 2013; GRUBB; VOGLER; SLY, 2010).

Com os resultados obtidos após a internalização da GBA em macrófagos *ex vivo*, e *in vivo* nos camundongos com inativação parcial da GBA, demos continuidade ao processo de geração de uma linhagem produtora de rGBA por meio da clonagem celular. Assim, visando a potencialização e estabilidade da produção enzimática, foram gerados 13 clones celulares da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA, sendo a produção de β -Glicosilceramidase recombinante avaliada pela quantidade secretada

no meio de cultura, atividade específica e produtividade. Esses experimentos foram realizados no laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias utilizando o protocolo realizado no laboratório LEIM-UNIFESP. Para isso, realizamos a quantificação da atividade biológica da enzima GBA em leucócitos de indivíduos saudáveis como controle para a técnica de atividade biológica. Esses apresentaram média de 18,08 U GBA/mg de proteína (Tabela 2 e 3), mostrando valores similares aos descritos por Michelin e colaboradores (2005), que obtiveram média de 14,96 U GBA/mg de proteína na análise de 610 indivíduos sem DG (MICHELIN et al., 2005), e também Kang e colaboradores (2017) que observaram uma variação entre 6,5 e 55 U GBA/mg de proteína na avaliação de 116 controles saudáveis (KANG et al. 2017).

A avaliação da atividade biológica da enzima GBA do sobrenadante revelou que dos 13 clones isolados, 2 apresentaram uma média de produção maior que a população mista ($p < 0,0086$; $p < 0,0001$), 3 não mostraram diferença estatística e 8 produziram menos que a população mista ($p < 0,05$) (Figura 19). Assim, a quantidade de enzima recombinante secretada pelos clones celulares variou de forma considerável, entre 0,03x e 1,7x, em comparação a população heterogênea. Browne e colaboradores (2007) descreveram que mesmo linhagens recombinantes submetidas a seleção são compostas de diversas variações, e essas podem ser observadas na grande diferença de produtividade dos clones (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007). Segundo esses autores, essa diversidade é consequência do número variável de cópias do gene alvo, das diferentes posições do gene no genoma e até mesmo de células apenas com o gene de resistência e sem o gene de interesse. E assim, por meio da clonagem celular é possível o desenvolvimento de uma linhagem recombinante estável e de alta expressão.

Dos clones celulares isolados, o clone 5 obteve a maior produção de GBA secretada, com média de 301,4 ($\pm 8,78$) U/mL, sendo cerca de 251x maior que atividade biológica de GBA secretada obtida pela célula virgem 293FT e 1,7x maior que a linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA ($p = 0,0077$) (Figura 20). O aumento de produção de GBA secretada pelo clone 5, em relação a população mista, foi relativamente baixa quando comparada com o trabalho de outros autores utilizando a célula HEK293. Por exemplo, Spidel e colaboradores (2016), utilizaram a HEK293 para gerar anticorpos monoclonais e geraram 40 clones celulares, nessas condições eles observaram expressões aumentadas até 3x em relação à média de todos os

clones (SPIDEL et al., 2016). Já Song e colaboradores (2011), realizaram a clonagem celular de uma linhagem HEK293 com produção permanente de anticorpos monoclonais, e obtiveram um clone com 7x mais produção de anticorpos que a população heterogênea, sendo consideravelmente maior que os valores obtidos nesse trabalho (SONG et al., 2011). A dificuldade do aumento de produção de GBA com relação à população mista pode ser parcialmente explicado pela complexidade de produção da própria enzima GBA, como já descrito por outros autores. Reggi e colaboradores (2002), produziram GBA em semente de tabaco, e descreveram que as sementes com maior produção se mostraram inviáveis, mesmo após extensivos testes de germinação, incluindo tratamento com CBE. Nessas condições, os autores sugeriram que altas produções de GBA humana possam levar à inviabilidade celular e dificultar o processo de divisão (REGGI et al., 2005). Além disso, outro fator importante, é a proteína TCP80 que tem ação inibitória sobre o RNA mensageiro da GBA, sendo que análogos da TCP80 ocorrem em todos os mamíferos, incluindo células como HEK 293 e CHO (XU; BUSALD; GRABOWSKI, 2000). Essa proteína se liga a uma região de 180 nucleotídeos da porção 5' UTR do mRNA da GBA e tem expressão variada nos diferentes órgãos de mamíferos, regulando assim a expressão de GBA. Considerando a possível inviabilidade de células de alta produção unida à regulação da tradução da GBA pelo TCP80, esses fatores podem ser limitantes para a produção da enzima, o que resulta na baixa produção dos clones em relação a linhagem mista.

Quanto à produção de GBA intracelular, entre as linhagens clonais, o clone 13 mostrou a maior atividade enzimática, com média de 622,2 (\pm 48,15) U/mg, sendo aproximadamente 4,1 x maior que a 293FT virgem ($p < 0,0001$) e 2,1 x maior que a população heterogênea L16_293-FT-P2-mutGBA ($p = 0,0009$) (Figura 22). Avaliando a produção intracelular geral, 5 dos 13 clones apresentaram maior produção de GBA que a linhagem heterogênea ($p < 0,05$), e 8 não foram observadas diferenças significativas entre as médias e a L16_293-FT-P2-mutGBA (Figura 22). Assim, a análise da GBA intracelular dos clones não mostrou nenhuma linhagem com produção menor que a L16_293-FT-P2-mutGBA, ao contrário da GBA secretada. Essa diferença pode ser parcialmente explicada pela forma de transporte da enzima para o meio extracelular, sendo que mesmo clones em que o gene de interesse foi inserido em regiões de alta expressão podem não transportar a GBA para os lisossomos, e assim

há uma grande amplitude de resultados de produção da GBA secretada (RECZEK et al., 2007; ROTH AUG et al., 2014). Já quanto aos resultados de atividade específica, é possível observar que até mesmo a virgem produz níveis relativamente altos, estabelecendo assim uma quantidade basal de GBA.

Outro detalhe que pode ser notado na avaliação do nível de produção dos clones celulares é que as linhagens com maior produção da enzima mutGBA intracelular (Clones 13, 10, 8), diferiram dos clones com secreção de GBA significativamente aumentada (Clones 5, 4) (Figura 24). O clone 13, por exemplo, que possui a maior produção intracelular de GBA, entretanto tem média igual a linhagem controle 293FT na análise de GBA secretada (Figura 19). Considerando a sua produtividade intracelular e secretada, o clone 13 tem cerca de 85% de sua GBA de origem intracelular e 15% é secretada. Já a produtividade do clone 5, revela que 57% de atividade enzimática da GBA é encontrada no meio de cultura. Martin e colaboradores também avaliaram a produção intracelular e extracelular de uma mesma linhagem recombinante de GBA, no caso realizada por meio da produção transitória em células SF9, e observaram que 40% da GBA total obtida encontrava-se no meio de cultura (MARTIN et al., 1988). Os resultados obtidos no trabalho atual se assemelha quando consideramos a produção de GBA do clone 5, entretanto os clones com alta produção de GBA intracelular possuem, relativamente, baixa quantidade de GBA secretada. Esses dados sugerem que na população mista existem células cujas modificações no DNA ou na proteína gerada que especificam para que a enzima seja secretada ou mantida dentro da célula. A expressão da proteína LIMP-2, responsável pelo direcionamento da GBA para os lisossomos, pode ter um papel significativo para a rota final da proteína recombinante produzida (RECZEK et al., 2007; ROTH AUG et al., 2014). Aranyi e colaboradores (2016) descreveram que vetores lentivirais induzem alterações epigenéticas e, assim, é possível que exista uma expressão diferencial do gene da LIMP-2 nos clones que pode afetar a localização da GBA. Para inferir mais precisamente como a proteína se comporta na célula, experimentos de imunohistoquímica poderiam ser realizados.

Escalonamento de produção da enzima lisossomal β -Glicosilceramidase pela linhagem celular humana L16_293-FT-P2-mutGBA_Clone 5

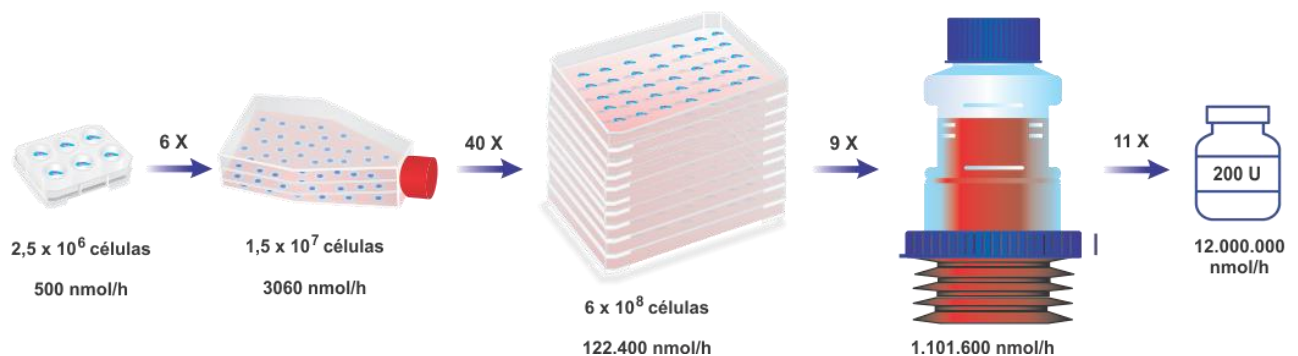


Figura 25. Previsão do escalonamento de produção de GBA, considerando a produção secretada pelo L16_293-FT-P2-mutGBA Clone 5.

Considerando as produções de 301,5 U/mL, do clone 5, e 622,2 U/mg, do clone 13, em comparação dos valores de produção obtidos por autores na literatura podemos dizer que as linhagens são promissoras (Figura 25). He e colaboradores (2012) geraram 43 linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* com produção permanente de GBA, e analisando as sementes dessas linhagens, a maior produção foi de 1440 U/mg de proteína total das sementes (HE et al., 2012). Assim, a produção por miligramas de GBA do clone 13 é aproximadamente metade da quantidade obtida pelas melhores linhagens de *A. thaliana*, sendo que para a produção das sementes avaliadas, ainda foram necessários meses de plantio (HE et al., 2012). Já Reggi e colaboradores (2005), obtiveram cerca de 43.200.000 U da produção de β -Glicosilceramidase em 1 kg de sementes de tabaco colhidas de 30.000 plantas das 25 melhores linhagens, após a purificação (REGGI et al., 2005). Comparativamente, com 1kg de células da linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA - Clone 13, a produção seria de 622.000.000 U, e considerando a produção de 1L de sobrenadante secretado pela L16_293-FT-P2-mutGBA Clone 5, seria produzido 301.333,0 U de GBA. Embora os concentrados de proteína bruta ainda tenham que passar pelo processo de purificação, que geralmente diminui a quantidade de proteína por aproximadamente 20 a 60% (CHOY, 1989; DALE; BEUTLER, 1976; HE et al., 2012), os resultados apresentados nesse trabalho mostram que as linhagens podem gerar altos níveis de proteína terapêutica e, assim, pode se dar continuidade em estudos mais aprofundados da mutGBA e das linhagens mais produtivas geradas nesse estudo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Na primeira etapa deste projeto foi possível o escalonamento de produção da enzima lisossomal recombinante mutGBA pela linhagem celular L16_293-FT-P2-mutGBA e permitiu um aumento de 217 vezes na quantidade de enzima GBA biologicamente ativa secretada nessas condições em relação ao cultivo em pequena escala;
- Foi possível cultivar macrófagos da medula óssea de modelo de camundongo para doença de Gaucher que mostraram características morfológicas típicas após 5 dias de tratamento com citocina específica;
- O ensaio visando caracterizar o nível de GBA lisossomal em macrófagos em cultura mostrou que a atividade específica da enzima GBA em camundongos C57BL/6 com GBA funcional (LoxP/LoxP) é 34,75 (\pm 6,37) U/mg de proteína e em camundongos C57BL/6 com deleção condicional do gene GBA (Mx1/Cre/LoxP) é 2,55 (\pm 0,33) U GBA/mg de proteína;
- O ensaio preliminar sobre a internalização da enzima recombinante mutGBA por macrófagos em cultura em 6 tempos diferentes mostrou que em macrófagos derivados de camundongos controle o pico da atividade biológica da enzima foi no tempo de 1:30 h (46,5 U GBA/mg proteína) e em camundongo com DG foi no tempo de 30 min. (4 U GBA/mg proteína);
- O ensaio visando caracterizar o nível de GBA lisossomal em cultura primária de fibroblasto mostrou que a atividade específica da enzima GBA em indivíduos saudáveis é 70,9 (\pm 3,1) U GBA/mg de proteína e em pacientes com Doença de Gaucher é 6,9 (\pm 1,5) U GBA/mg de proteína ($p = 0,0004$);
- O tratamento da cultura primária de fibroblasto com o inibidor específico de GBA lisossomal (condurotol B epóxido - CBE) na concentração de 36 μ M e com o inibidor N-butildesoxinogirimicina (NB-DNJ) de GBA2 na concentração de 10 μ M mostrou que 30% da atividade enzimática avaliada pelo ensaio fluorimétrico com o substrato sintético 4-MU são relativas as outras enzimas GBAs não lisossomais, sendo desses 70% da GBA2 e 30% da GBA3;
- Ensaios de internalização *in vitro* da enzima lisossomal recombinante mutGBA secretada pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA por fibroblastos de indivíduos saudáveis e de pacientes com DG mostraram que a atividade específica da enzima

GBA não foi alterada em diferentes tempos de incubação mostrando que a mesma não pôde ser absorvida por esse tipo celular. Como controle foi avaliada a capacidade de internalização da enzima lisossomal recombinante comercial alfa velaglucerase com 10 ng, e os resultados foram similares à enzima recombinante deste estudo;

- Ensaios preliminares sobre o *uptake* da enzima lisossomal recombinante mutGBA secretada pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA em modelo animal condicional para Doença de Gaucher mostrou que a mesma apresenta atividade biológica *in vivo*;
- Em camundongos controle, a atividade biológica da enzima lisossomal em baço, fígado e leucócitos é 29,57 (\pm 4,05), 21,44 (\pm 3,00) e 22,94 U GBA/mg de proteína, respectivamente e em camundongos transgênicos para GD esses valores são 17,69 (\pm 4,62), 12,82 (\pm 1,61) e 5,53 (\pm 0,89) U GBA/mg proteína, respectivamente;
- A análise da atividade biológica da enzima GBA 60 minutos após a infusão de 19 U mutGBA mostrou no baço, fígado e leucócitos níveis de 24,13 (\pm 0,72), 19,51 (\pm 0,46) e 9,98 (3,08) U GBA/mg de proteína mostrando um aumento de 1,4; 1,5; e 1,8x, respectivamente, o que sugere a internalização da enzima mutGBA nesses tecidos.
- Com relação ao tecido cerebral, a análise da atividade biológica da enzima GBA mostrou níveis de 48,98 (\pm 10,65) U GBA/mg em camundongos LoxP/LoxP, 43,80(\pm 3,49) U GBA/mg nos animais modelo de DG sem tratamento e 41,32 (\pm 9,38) U GBA/mg nos camundongos transgênicos tratados com mutGBA, sugerindo a ausência da internalização da enzima recombinante nesse tecido;
- Foi possível realizar a clonagem celular da linhagem transgênica L16_293-FT-P2-mutGBA, sendo obtidos 13 clones.
- A caracterização dos 13 clones com relação a atividade biológica da enzima recombinante secretada e a produtividade/10⁶ células mostrou que os clones 5 e 6 produzem níveis mais elevados de GBA do que a população mista ($p < 0,05$) e com relação a produtividade mostrou que os clones 3, 4, 5 e 6 são mais produtivos em relação a população mista ($p < 0,05$) clones. Dentre eles, o clone 5 se mostrou mais produtivo considerando o volume e secreta níveis de 301,4 (\pm 4,35) U GBA/mL ou 207 (\pm 3,23) U de GBA/10⁶ células, respectivamente;

- A caracterização dos 13 clones com relação a atividade biológica da enzima recombinante intracelular e a produtividade/10⁶ células mostrou que os clones 10, 11, 12 e 13 produzem níveis mais elevados de GBA do que a população mista ($p < 0,05$) e com relação a produtividade mostrou que os clones 10, 11 e 13 são mais produtivos em relação a população mista ($p < 0,05$). Dentre eles, o clone 13 maior atividade biológica intracelular e maior produtividade da ordem de 622 ($\pm 4,35$) U GBA/mg de proteína ou 325,5 U GBA ($\pm 3,23$) U/10⁶ células, respectivamente;
- Em nosso estudo, não existe uma correlação entre o nível de secreção e a quantidade de enzima lisossomal, ou seja, o clone que secreta maior quantidade de enzima lisossomal no sobrenadante não é o clone que apresenta maior quantidade de enzima lisossomal intracelular;
- Os clones celulares com maiores níveis de enzima lisossomal recombinante biologicamente ativa podem ser considerados potencialmente adequados para futuros estudos que visam investigar o número de cópias do transgene no genoma, caracterizar o sítio de integração do mesmo e realizar estudos para teste de drogas indutoras da produção da enzima GBA.

9 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que a linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA é capaz de produzir elevados níveis de β -glicosilceramidase recombinante. A proteína gerada por essas células foi capaz de ser internalizada por macrófagos de camundongos e se mostrou biologicamente ativa *in vivo*, sendo assim, uma linhagem promissora para uso na terapia de reposição enzimática para o tratamento da doença de Gaucher.

Considerando os resultados positivos obtidos pela mutGBA produzida pela linhagem L16_293-FT-P2-mutGBA, foi realizada a clonagem celular da população mista, visando a estabilidade de produção. Dos 13 clones isolados, foi possível selecionar um clone com aumento de produtividade de 2,6x (207 (\pm 3,23) U/10⁶ células) de β -glicosilceramidase secretada e, também, um clone com aumento de produtividade da proteína terapêutica intracelular em 3,9x (325,5 (\pm 3,23) U de GBA/10⁶ células). Dessa forma, as linhagens clonais selecionadas se mostram aptas para os passos seguintes na geração de uma linhagem produtora de β -glicosilceramidase para tratamento da doença de Gaucher.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYTO, R. M. et al. Long-term outcomes of liver transplantation in type 1 Gaucher disease. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 8, p. 1934–1939, 2010.
- BALWANI, M.; GRACE, M. E.; DESNICK, R. J. Gaucher disease: when molecular testing and clinical presentation disagree -the novel c.1226A>G(p.N370S)--RecNcil allele. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, n. 3, p. 789–793, 2011.
- BANDARANAYAKE, A. D.; ALMO, S. C. Recent advances in mammalian protein production. **FEBS Letters**, v. 588, n. 2, p. 253–260, 2014.
- BARNEVELD, R. A. et al. Assignment of the gene coding for human β -glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. **Human Genetics**, v. 64, n. 3, p. 227–231, 1983.
- BARTON, N. W. et al. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency — Macrophage-Targeted Glucocerebrosidase for Gaucher's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 21, p. 1464–1470, 1991.
- BERG-FUSSMAN, E. et al. Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. **Journal of biological chemistry**, n. 268, p. 14861–14866, 1993.
- BEUTLER, E.; GELBART, T.; SCOTT, C. R. Hematologically important mutations: Gaucher disease. **Blood Cells Mol. Dis.** v. 12, n. 35, p. 355-64, 2005.
- BOOT, R. G. et al. Identification of the Non-lysosomal Glucosylceramidase as β -Glucosidase 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1305–1312, 2007.
- BRADY, R. O. The Sphingolipidoses. **New England Journal of Medicine**, v. 275, n. 6, p. 312–318, 1966.
- BRADY, R. O. et al. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 291, n. 19, p. 989–993, 1974.
- BRADY, R. O.; KANFER, J.; SHAPIRO, D. The metabolism of Glucocerebrosides I. Purification and properties. **The Journal of biological chemistry**, v. 240, p. 39–43, 1965.
- BRADY, R. O.; YANG, C.; ZHUANG, Z. An innovative approach to the treatment of Gaucher disease and possibly other metabolic disorders of the brain. **Journal of**

Inherited Metabolic Disease, v. 36, n. 3, p. 451–454, 2013.

BRILL, N. E. Primary splenomegaly-Gaucher type. Report on one of four cases occurring in a single generation in one family. **American Journal of Medical Science**, n. 121, p. 377–392, 1901.

BROWNE, S. M.; AL-RUBEAI, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 425–432, 2007.

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

BUSSINK, A. P. et al. The Biology of the Gaucher Cell: The Cradle of Human Chitinases. In: **International review of cytology**. v. 252, p. 71–128, 2006.

CAPABLO, J. L. et al. Neurological evaluation of patients with Gaucher disease diagnosed as type 1. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 79, n. 2, p. 219–222, 2008.

CASTILHO-FERNANDES, et. al., 2015. Significant differences in integration sites of Moloney murine leukemia virus/Moloney murine sarcoma virus retroviral vector carrying recombinant coagulation factor IX in two human cell lines. **Biotechnol Lett.** v. 37, p. 991-1001, 2015.

CHARROW, J. et al. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. **Archives of internal medicine**, v. 160, n. 18, p. 2835–43, 2000.

CHAVES, R. G. et al. Consanguinity and founder effect for Gaucher disease mutation G377S in a population from Tabuleiro do Norte, Northeastern Brazil. **Clinical Genetics**, v. 88, n. 4, p. 391–395, 2015.

CHEN, G. et al. α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 461–466, 2018.

CHOY, F. Y. M. Purification of lysosomal membrane-bound glucocerebrosidase from human cultured fibroblasts using high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 2, p. 312–318, 1989.

CIUFFI, A. Mechanisms Governing Lentivirus Integration Site Selection. **Current Gene Therapy**, v. 8, n. 6, p. 419–429, 2008.

CONITEC. **Ampliação de uso da alfatiglicerase para uso pediátrico na doença de Gaucher**. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2017/Relatorio__ALFATALIGLICERASE_GAUCHER__264_FINAL.pdf>. Acesso em: 17 de Abril de 2018.

CONSORTIUM, T. 1000 G. P. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 56–65, 2012.

CORREA DE FREITAS, M.C., et al. Murine leukemia virus-derived retroviral vector has differential integration patterns in human cell lines used to produce recombinant factor VIII. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v. 36, p. 213-218, 2014.

COX, T. M. Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments. **Biologics : targets & therapy**, v. 4, p. 299–313, 2010.

CRAVO, R. et al. Taliglucerase alfa in Gaucher disease: Description of a Brazilian experience. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 68, p. 160–162, 2018.

DALE, G. L.; BEUTLER, E. Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: a rapid, high-yield method for purification of glucocerebrosidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 12, p. 4672–4, 1976.

DANDANA, A. et al. Gaucher Disease: Clinical, Biological and Therapeutic Aspects. **Pathobiology**, v. 83, n. 1, p. 13–23, 2016.

DANIEL, P. F. **High mannose proteins and methods of making high mannose proteins**, 2006. Disponível em: <<https://encrypted.google.com/patents/WO2002015927A1?cl=es>>. Acesso em: 27 de Abril de 2018.

DE DUVE, C. From Cytases to Lysosomes. **Federation proceedings**, v. 23, p. 1045–1059, 1964.

DE FOST, M. et al. Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 36, n. 1, p. 53–58, 2006.

DE RIJCK, J. et al. The BET family of proteins targets moloney murine leukemia virus integration near transcription start sites. **Cell Reports**, v. 5, p. 886–894, 2013.

DUNBAR, C. E. Retroviral Transfer o f the Glucocerebrosidase Gene into CD34 + Cells from Patients with Gaucher Disease: *In vivo* Detection of Transduced Cells without Myeloablation. **Human Gene Therapy**. v. 9, n. 4 , p. 2629–2640, 1998.

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

ENQUIST, I. B. et al. Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 37, p. 13819–24, 2006.

ERNST, O.; ZOR, T. Linearization of the Bradford Protein Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 38, 2010.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. . Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira -Vol**, v. 19, n. 1, p. 59–65, 2004.

FARFEL-BECKER, T. et al. No evidence for activation of the unfolded protein response in neuronopathic models of Gaucher disease. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 8, p. 1482–1488, 2009.

FLESHNER, P. R. et al. A 27-Year experience with splenectomy for Gaucher's disease. **The American Journal of Surgery**, v. 161, n. 1, p. 69–75, 1991.

FRIEDMAN, B. **Enhanced *in vivo* uptake of glucocerebrosidase**, 1996. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US5549892A/en>>. Acesso em: março de 2018

FRIEDMAN, B. et al. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived beta-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. **Blood**, v. 93, n. 9, p. 2807–16, 1999.

FURBISH, F. S. et al. Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 673, n. 4, p. 425–34, 1981.

GAIGALAS, A. K. et al. The development of fluorescence intensity standards. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 106, n. 2, p. 381, 2001.

GEGG, M. E.; SCHAPIRA, A. H. V. The role of glucocerebrosidase in Parkinson disease pathogenesis. **The FEBS Journal**, 2018.

GENZYME.LTD. Imiglucerase, Summary of product characteristics.

GINNS, E. I. et al. Mutations of glucocerebrosidase: discrimination of neurologic and non-neurologic phenotypes of Gaucher disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 18, p. 5607–10, 1982.

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**, v. 82, n. 20, p. 7101–5, 1985.

GOLDMAN, D. P.; CLARKE, A. E.; GARBER, A. M. The Orphan Drug Act In The Development Of Ceredase. **International Journal of Technology Assessment in Health Care**, v. 8, n. 4, p. 583–597, 1992.

GRABOWSKI, G. A. et al. Human lysosomal beta-glucosidase: kinetic characterization of the catalytic, aglycon, and hydrophobic binding sites. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 231, n. 1, p. 144–57, 1984.

GRABOWSKI, G. A. et al. Acid β -Glucosidase: Enzymology and Molecular Biology of Gaucher Diseases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 6, p. 385–414, 1990.

GRABOWSKI, G. A. Enzyme Therapy in Type 1 Gaucher Disease: Comparative Efficacy of Mannose-Terminated Glucocerebrosidase from Natural and Recombinant Sources. **Annals of Internal Medicine**, v. 122, n. 1, p. 33, 1995.

GRABOWSKI, G. A.; ZIMRAN, A.; IDA, H. Gaucher disease types 1 and 3: Phenotypic characterization of large populations from the ICGG Gaucher Registry. **American Journal of Hematology**, v. 90, p. 12–18, 2015.

GRAMLICH, P. A. et al. A peptide-linked recombinant glucocerebrosidase for targeted neuronal delivery: Design, production, and assessment. **Journal of Biotechnology**, v. 221, p. 1–12, 2016.

GROSS, A. et al. Technologies for single-cell isolation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 16897–16919, 2015.

GROTH, C. . et al. Splenic Transplantation in a case of Gaucher's Disease. **The Lancet**, v. 297, n. 7712, p. 1260–1264, 1971.

GRUBB, J. H.; VOGLER, C.; SLY, W. S. New Strategies for Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Storage Diseases. **Rejuvenation Res.** v. 13, n. 2, 2010.

GUPTA, P.; PASTORES, G. M. Spotlight on taliglucerase alfa in the treatment of pediatric patients with type 1 Gaucher disease. **Pediatric health, medicine and therapeutics**, v. 8, p. 73–81, 2017.

HACKER, D. L.; BALASUBRAMANIAN, S. Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 38, p. 129–136, 2016.

HAYASHI, Y. et al. Klotho-related Protein Is a Novel Cytosolic Neutral β -Glycosylceramidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30889–30900, 2007.

HE, X. et al. Production of active human glucocerebrosidase in seeds of *Arabidopsis thaliana* complex-glycan-deficient (cgl) plants. **Glycobiology**, v. 22, n. 4, p. 492–503, 2012.

HESPANHOL, R. C. et al. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 35–44, 2005.

HOLLERAN, W. M. et al. Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 4, p. 1756–1764, 1994.

HOROWITZ, M. et al. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. **Genomics**, v. 4, n. 1, p. 87–96, 1989.

KALLEMEIJN, W. W. et al. Investigations on therapeutic glucocerebrosidases through paired detection with fluorescent activity-based probes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–23, 2017.

KANFER, J. N. et al. The Gaucher mouse. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 67, n. 1, p. 85–90, 1975.

KANG, L. et al. Successful newborn screening for Gaucher disease using fluorometric assay in China. **Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 8, p. 763–768, 2017.

KIM, E. Y. et al. Expression and secretion of human glucocerebrosidase mediated by recombinant lentivirus vectors *in vitro* and *in vivo*: Implications for gene therapy of Gaucher disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, n. 2, p. 381–390, 2004.

KÖRSCHEN, H. G. et al. The non-lysosomal β -glucosidase GBA2 is a non-integral

membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 5, p. 3381–3393, 2013.

LAI, T.; YANG, Y.; NG, S. K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 5, p. 579–603, 2013.

LALONDE, M.-E.; DUROCHER, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. **Journal of Biotechnology**, v. 251, p. 128–140, 2017.

LATHAM, T. E. et al. Heterogeneity of Mutations in the Acid β -Glucosidase Gene of Gaucher Disease Patients. **DNA and Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. 15–21, 1991.

LIEBERMAN, R. L. et al. Structure of acid β -glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 101–107, 2007.

LIMKUL, J. et al. The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 8, p. 1682–1694, 2016.

LO, S. M. et al. Expanding spectrum of the association between Type 1 Gaucher disease and cancers: A series of patients with up to 3 sequential cancers of multiple types-Correlation with genotype and phenotype. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 5, p. NA-NA, 2010.

LONGO, P. A. et al. **Single cell cloning of a stable mammalian cell line**. (Chapter 14). Elsevier Inc. v. 536, p.165-172, 2014.

LUSIC, M.; SILICIANO, R. F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 69–82, 2017.

MARTIN, B. M. et al. Glycosylation and processing of high levels of active human glucocerebrosidase in invertebrate cells using a baculovirus expression vector. **Dna**, v. 7, n. 2, p. 99–106, 1988.

MARTÍNEZ-ARIAS, R. et al. Sequence variability of a human pseudogene. **Genome research**, v. 11, n. 6, p. 1071–85, 2001.

MARTINS, A. M. et al. Recommendations on Diagnosis, Treatment, and Monitoring for Gaucher Disease. **Journal of Pediatrics**, v. 155, n. 4 SUPPL., 2009.

MARINI, B. et al. Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. **Nature**

v. 521, p. 227–231, 2015.

MATERN, H. et al. Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 41, p. 37929–33, 2001.

MCNEILL, A. et al. Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. **Brain**, v. 137, n. 5, p. 1481–1495, 2014.

MEIKLE, P. J. et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. **JAMA**, v. 281, n. 3, p. 249–54, 1999.

MICHELIN, K. et al. Application of a comprehensive protocol for the identification of Gaucher disease in Brazil. **American Journal of Medical Genetics**, v. 136 A, n. 1, p. 58–62, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 1.266, DE 14 DE NOVEMBRO DE 2014**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/19/Publica----o-nov-2014-Doen--a-de-Gaucher.pdf>>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.

MISTRY, P. K. et al. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 45, p. 19473–19478, 2010.

MISTRY, P. K. et al. Understanding the natural history of Gaucher disease. **American Journal of Hematology**, v. 90, p. S6–S11, 2015.

MISTRY, P. K. et al. Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 120, n. 1–2, p. 8–21, 2017.

MIZUKAMI, H. et al. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 9, p. 1215–21, 2002.

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

NAITO, M.; TAKAHASHI, K.; HOJO, H. An ultrastructural and experimental study on the development of tubular structures in the lysosomes of Gaucher cells. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 58, n. 5, p. 590–8, 1988.

NAKAMURA, T.; OMASA, T. Optimization of cell line development in the GS-CHO expression system using a high-throughput, single cell-based clone selection system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 3, p. 323–329, 2015.

NILSSON, O.; SVENNERHOLM, L. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. **Journal of neurochemistry**, v. 39, n. 3, p. 709–18, 1982.

NOVO, J. B. et al. Generation of a Chinese hamster ovary cell line producing recombinant human glucocerebrosidase. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-10; 2012.

O'BRIEN, J. S.; KISHIMOTO, Y. Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 5, n. 3, p. 301–8, 1991.

O'NEILL, R. R. et al. Comparison of the chromosomal localization of murine and human glucocerebrosidase genes and of the deduced amino acid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 5049–53, 1989.

PANICKER, L. M. et al. Gaucher iPSC-Derived Macrophages Produce Elevated Levels of Inflammatory Mediators and Serve as a New Platform for Therapeutic Development. **STEM CELLS**, v. 32, n. 9, p. 2338–2349, 2014.

PENTCHEV, P. G. et al. Isolation and characterization of glucocerebrosidase from human placental tissue. **The Journal of biological chemistry**, v. 248, p. 5256–5261, 1973.

PFIZER. **Taliglucerase alfa, Eleyso Highlights of Prescribing Information**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/022458s012lbl.pdf>. Acesso em: 3 de Abril de 2018.

PICANÇO-CASTRO, et al. Lentiviral-mediated gene transfer – a patent review. **Expert Opinion on Therapy Patents**, v.18, p.525-539, 2008.

PLATT, F. M. et al. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8362–5, 1994.

PLATT, F. M. et al. Inhibition of substrate synthesis as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 24, n. 2, p. 275–90, 2001.

POLETTI, V., AND F. MAVILIO. Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. **Mol Ther Methods Clin Dev.** v.8, p. 31-41, 2018.

RAPPEPORT, J. M.; GINNS, E. I. Bone-Marrow Transplantation in Severe Gaucher's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 311, n. 2, p. 84–88, 1984.

RECZEK, D. et al. LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. **Cell**, v. 131, n. 4, p. 770–783, 2007.

REGGI, S. et al. Recombinant human acid β -glucosidase stored in tobacco seed is stable, active and taken up by human fibroblasts. **Plant Molecular Biology**, v. 57, n. 1, p. 101–113, 2005.

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**, v. 266, n. 8, p. 4862–8, 1991.

ROZENBERG, R. et al. High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 39, n. 9, p. 1171–9, 2006.

RUSSO-CARBOLANTE, E.M.S, et al. Integration pattern of HIV-1 based lentiviral vector carrying recombinant coagulation factor VIII in SK-HEP and 293T cells. **Biotechnol Lett.** V. 33 p. 23–31, 2011.

SASAGASAKO, N. et al. Glucosylceramide and Glucosylsphingosine Fibroblasts Deficient in Acid α -Glucosidase Metabolism in Cultured Naokazu Yukiko Yamaguchi , Nobue. **Journal of Biochemistry**, v. 115, n. 1, p. 113–119, 1994.

SATO, Y.; BEUTLER, E. Binding, internalization, and degradation of mannose-terminated glucocerebrosidase by macrophages. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 5, p. 1909–17, 1993.

SCOTT, C. R. et al. The clinical expression of Gaucher disease correlates with genotype: Data from 570 patients. **Genetics in Medicine**, v. 2, n. 1, p. 65–65, 2000.

SCOTT, S. A. et al. Experience with carrier screening and prenatal diagnosis for 16 Ashkenazi Jewish genetic diseases. **Human Mutation**, v. 31, n. 11, p. 1240–1250, 2010.

SHAALTIEL, Y. et al. **Human lysosomal proteins from plant cell culture.** US Patent, , 2011.

SHIRE. **Velaglucerase Alfa, Summary of product characteristics**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/001249/WC500096382.pdf>. Acesso em: 3 de Abril de 2018.

SIDRANSKY, E. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 83, n. 1–2, p. 6–15, 2004.

SIDRANSKY, E. et al. Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson’s Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 17, p. 1651–1661, 2009.

SMITH, L.; MULLIN, S.; SCHAPIRA, A. H. V. Insights into the structural biology of Gaucher disease. **Experimental Neurology**, v. 298, p. 180–190, 2017.

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**, v. 90, n. 1, p. 81–86, 2007.

SONG, M. et al. Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, n. 7, p. 935–941, 2011.

SORGE, J. et al. Complete correction of the enzymatic defect of type I Gaucher disease fibroblasts by retroviral-mediated gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 4, p. 906–9, 1987.

SORGE, J. et al. High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 86, n. 4, p. 1137–1141, 1990.

SOUZA, M. V. DE et al. Medicamentos de alto custo para doenças raras no Brasil: o exemplo das doenças lisossômicas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. suppl 3, p. 3443–3454, 2010.

SPIDEL, J. L. et al. Rapid high-throughput cloning and stable expression of antibodies in HEK293 cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 439, p. 50–58, 2016.

STARZL, T. E. et al. Chimerism after Liver Transplantation for Type IV Glycogen Storage Disease and Type 1 Gaucher’s Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 11, p. 745–749, 1993.

STARZYK, K. et al. The long-term international safety experience of imiglucerase

therapy for Gaucher disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 90, n. 2, p. 157–163, 2007.

STEPHENS, M. C. et al. The Gaucher mouse: differential action of conduritol B epoxide and reversibility of its effects. **Journal of neurochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1023–7, 1978.

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expression and Purification**, v. 84, n. 1, p. 147–153, 2012.

TAKASAKI, S. et al. Structure of the N-Asparagine-linked Oligosaccharide Units of Human Placental B-Glucocerebrosidase. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 259, n. 16, p. 10112–10117, 1984.

TAMARGO, R. J. et al. The role of saposin C in Gaucher disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 106, n. 3, p. 257–263, 2012.

TAN, Y. L. et al. ERdj3 Is an Endoplasmic Reticulum Degradation Factor for Mutant Glucocerebrosidase Variants Linked to Gaucher's Disease. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 8, p. 967–976, 2014.

TYBULEWICZ, V. L. J. et al. Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. **Nature**, v. 357, n. 6377, p. 407–410, 1992.

VAN PATTEN, S. M. et al. Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 467–478, 2007.

VELAYATI, A.; YU, W. H.; SIDRANSKY, E. The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 10, n. 3, p. 190–8, 2010.

VINK, T. et al. A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. **Methods**, v. 65, n. 1, p. 5–10, 2014.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17–18, p. 773–780, 2010.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1241–1252, 2006.

WALTHER, W.; STEIN, U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. **Drugs**, v. 60, n. 2, p. 249–71, 2000.

WANG, C. et al. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. **BMC Immunology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

WENGER, D. A. et al. Synthetic substrate beta-glucosidase activity in leukocytes: a reproducible method for the identification of patients and carriers of Gaucher's disease. **Clinical genetics**, v. 13, n. 2, p. 145–53, 1978.

WILSON, C.; BELLEN, H. J.; GEHRING, W. J. Position effects on eukaryotic gene-expression. **Annual Review of Cell Biology**, v. 6, p. 679–714, 1990.

WINFIELD, S. L. et al. Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease. **Genome research**, v. 7, n. 10, p. 1020–6, 1997.

WOESTE, M. A.; WACHTEN, D. The Enigmatic Role of GBA2 in Controlling Locomotor Function. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 386, 2017.

XIAO, S.; SHILOACH, J.; BETENBAUGH, M. J. Engineering cells to improve protein expression. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 26, p. 32–38, 2014.

XU, Y.-H. et al. Viable mouse models of acid beta-glucosidase deficiency: the defect in Gaucher disease. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 5, p. 2093–101, 2003.

XU, Y.-H. et al. Comparative Therapeutic Effects of Velaglucerase Alfa and Imiglucerase in a Gaucher Disease Mouse Model. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10750, 2010.

XU, Y.-H.; BUSALD, C.; GRABOWSKI, G. A. Reconstitution of TCP80/NF90 Translation Inhibition Activity in Insect Cells. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 70, n. 2, p. 106–115, 2000.

YILDIZ, Y. et al. Functional and genetic characterization of the non-lysosomal glucosylceramidase 2 as a modifier for Gaucher disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 1, p. 151, 2013.

ZIMRAN, A. et al. A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 1, p. 219–222, 1990.

ZIMRAN, A. et al. Long-term safety and efficacy of taliglucerase alfa in pediatric Gaucher disease patients who were treatment-naïve or previously treated with imiglucerase. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 68, p. 163–172, 2018.

ZIMRAN, A.; ELSTEIN, D. Gaucher Disease and Related Lysosomal Storage Diseases. In: KAUSHANSKY K, L. M. P. J. (Ed.). . **Williams hematology**. 9. ed. New York, NY: Williams Hematology. p. xxi, 2,505 pages, 2015.

ZUNKE, F. et al. Characterization of the complex formed by β -glucocerebrosidase and the lysosomal integral membrane protein type-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 14, p. 3791–3796, 2016.

ANÉXOS

ANEXO A – Aprovação pela comissão de ética no uso de animais, *Yale's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)*

Yale University

Institutional Animal Care and Use
Committee (IACUC)
25 Science Park
150 Munson Street
3rd Floor
New Haven, Connecticut 06520
Telephone: 203 785-5992

October 3rd, 2016

IACUC #: 2016-10872
(Please refer to this number when
inquiring about this project)

PRINCIPAL INVESTIGATOR: Pramod Mistry

TITLE OF PROTOCOL: Animal Models of Gauchers Disease

APPROVAL PERIOD: 9-30-16 TO 9-30-19

Yale's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) granted approval for the use of animals in the project referenced above on September 30, 2016. A copy of your approved protocol is attached to this letter.

According to Federal Regulations, approval of this protocol is effective for three years. Annually you will be asked to submit a short progress report. If the project will extend past three years another new protocol application will be required for IACUC review.

You should retain a copy of both your approved protocol and this letter of approval in your files. In accordance with Federal regulations, a copy of the approved protocol is also to be filed in all locations where the project is being conducted.

Approval of the IACUC does not, in and of itself, constitute approval for implementation of this project. Other levels of review and approval may be required (e.g. Environmental Health and Safety, Radiation Safety), and the project should not begin until all required approvals have been obtained.

Yale University has an approved Animal Welfare Assurance (#A3230-01) on file with the NIH Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW). The Assurance was approved May 5, 2015.

If you have any questions, or require any additional assistance, please do not hesitate to phone the IACUC Office at 785-5992.


Elizabeth Eynon

Elizabeth Eynon
IACUC Chair
On behalf of the IACUC

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo *Human Investigation Committee*

Approved - Valid through 24-SEP-2017

HIC# 0209021074

	<p>YALE UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE HUMAN INVESTIGATION COMMITTEE</p> <p>Application to Involve Human Subjects in Research</p>
---	--

<p>Please refer to the HIC website for application instructions and information required to complete this application. The Instructions are available at http://info.med.yale.edu/hic/forms/index.html.</p> <p>Submit the original application and two (2) copies of all materials including relevant sections of the grant which funds this project (if applicable) to the HIC.</p>	HIC OFFICE USE ONLY	
	DATE STAMPED-RECEIVED	PROTOCOL NUMBER

SECTION I: ADMINISTRATIVE INFORMATION

Title of Research Project:			
The natural history of type 1 Gaucher disease, Impact of modifier genes and enzyme replacement therapy with Imiglucerase			
Principal Investigator:		Yale Academic Appointment:	
Pramod K. Mistry, MB, BS, PhD		Professor	
Campus Address:			
Campus Mailing Address: 300 Cedar Street, TAC S227			
Campus Phone: 785 3412	Fax: 785 7273	Pager:	E-mail: Pramod.mistry@yale.edu
Protocol Correspondent Name & Address (if different than PI):			
Ruhua Yang			
Campus Phone: 785-3197	Fax: 785-7273	E-mail: ruhua.yang@yale.edu	
Faculty Advisor: (required if PI is a student, resident, fellow or other trainee) <input checked="" type="checkbox"/> NA		Yale Academic Appointment:	
Campus Address:			
Campus Phone:	Fax:	Pager:	E-mail:

SECTION II: GENERAL INFORMATION

1. **Performing Organizations:** Identify the hospital, in-patient or outpatient facility, school or other agency that will serve as the location of the research. Choose all that apply:

a. **Internal Location[s] of the Study:**

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Magnetic Resonance Research Center (MR-TAC) | <input type="checkbox"/> PET Center |
| <input type="checkbox"/> Yale Cancer Center | <input type="checkbox"/> YCCI/Church Street Research Unit (CSRU) |
| | <input type="checkbox"/> YCCI/Hospital Research Unit (HRU) |

ANEXO C – Dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa

**SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Prezada Dr^a Marcia Guimarães Villanova,

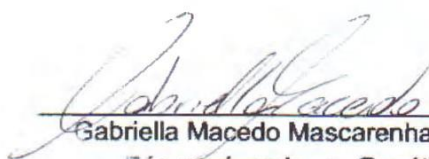
Eu, Gabriella Macedo Mascarenhas Diniz, do departamento de Pós-Graduação de Genética, orientada pela Profa.Dra. Aparecida Maria Fontes, e pesquisadora responsável pelo estudo "Clonagem e caracterização de uma linhagem celular humana com produção permanente da enzima recombinante β -Glucocerebrosidase lisossomal", solicito a dispensa da apresentação do TCLE, considerando o que se segue:

No trabalho em questão, será realizada a análise da quantidade da proteína Glucocerebrosidase na linhagem celular comercial 293-FT (INVITROGEN[®]) e uma linhagem recombinante derivada da 293-FT. Para isso, será utilizado o método de atividade biológica, sendo que, essa técnica usa como referência os leucócitos adquiridos por meio da coleta de sangue fresco de um indivíduo saudável. Dessa forma, eu, Gabriella M M Diniz, me disponibilizo para a coleta de sangue, para obtenção desses leucócitos referência.

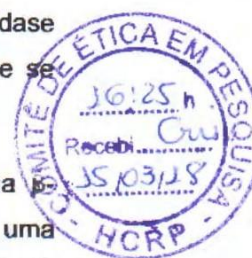
Justificativa quanto dispensa do TCLE: Como descrito, o sangue coletado será utilizado apenas como valor de referência padrão para uma técnica já bem estabelecida. E considerando que não será necessário a coleta de controles e pacientes, apenas o meu, acredito que não há necessidade do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Assim, esclareço que assumo a total responsabilidade pelas informações apresentadas.

Atenciosamente,



Gabriella Macedo Mascarenhas Diniz
Pós-graduanda em Genética
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo



Não há necessidade de

Comitê de Ética em

Ribeirão Preto,

15 de março de 2018



Dra. Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
do HC e FMRP-USP

19/03/2018