**DÉBORA DA SILVA FREITAS**

# Funcionalidade e caracterização das propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais da uricase modificada por *PEGlação*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP / InstitutoButantan / IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2011

**DÉBORA DA SILVA FREITAS**

# Funcionalidade e caracterização das propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais da uricase modificada por *PEGlação*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Abrahão Neto

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Freitas, Débora da Silva.
Funcionalidade e caracterização das propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais da uricase modificada por PEGlação / Débora da Silva Freitas. -- São Paulo, 2011.

Orientador: José Abrahão Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Enzimologia - Biopolímero.

Versão do título para o inglês: Functionality and characterization of physical-chemical, biological and structural properties of uricase modified by PEGlation.

Descritores: 1. Gota 2. Hiperuricemia 3. Imunogenicidade 4. PEGlação 5. Estabilidade físico-química 6. Uricase I. Abrahão Neto, José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB011/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Débora da Silva Freitas.

Título da Tese: Funcionalidade e caracterização das propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais da uricase modificada por PEGlação.

Orientador(a): José Abrahão Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**( ) Aprovado(a)** **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**Dedico este trabalho**

**Aos meus pais**

**Geraldo de Freitas (*in memoriam)* e**

**Terezinha da Silva Freitas**

**meus exemplos de amor, compreensão e**

**determinação.**

**Aos meus queridos sobrinhos**

**Hugo Marques e Mariana Carolina.**

## AGRADECIMENTOS

Obrigada, ***Deus***, pela vida e por seu amparo durante toda a minha caminhada.

E nesse caminhar, agradeço também aos meus pais **Geraldo** e **Terezinha**, e as minhas irmãs **Nilce** e **Zípora** que sempre me apoiaram a dar passos mais largos na vida.

Ao orientador **Prof. Dr. José Abrahão Neto** pela oportunidade do ingresso na Pós-graduação. Obrigada pelos ensinamentos e pela paciência, durante esses anos de trabalho em conjunto, além do suporte financeiro que foi de grande importância para concretização dessa tese.

Ao **Dr. Patrick Jack Spencer** pelo incentivo e pelos ensinamentos em relação à técnica do Elisa e os experimentos de imunização *in vivo*. Agradeço também a colaboração na produção do artigo científico.

À **Dra. Ruth Camargo Vassão** pelo apoio, incentivo e colaboração na produção do artigo científico.

À **Profa. Dra. Ohara Augusto** pelo exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa. Com certeza levarei comigo seus ensinamentos com grande admiração.

À **Graciane Maria Medeiros Caporale** que colaborou com o protocolo e com os experimentos de imunização do coelho.

Ao **Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan** pelo empréstimo do equipamento de Dicroísmo circular.

Ao **Instituto de Química da Universidade de São Paulo e a Central Analítica** pela realização dos experimentos de Infravermelho (FTIR).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro ao projeto.

À **secretaria da Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia** pelo apoio e suporte.

Aos **funcionários do Laboratório de Enzimologia** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, obrigada pelo suporte.

Às **funcionárias do Serviço da Biblioteca e Informação Biomédica** do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela revisão das referências bibliográficas e demais orientações em relação ao aspecto formal desta Tese.

À **Profa. Dra. Ana Clara G. Schenberg** pelo incentivo e colaboração recomendando minha proposta de Pós-doutorado no exterior junto ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão dessa etapa de minha vida.

**“Nada na vida deve ser temido,**
**somente compreendido.**
**Agora é hora de compreender mais,**
**para temer menos.”**
**(Marie Curie, 1867-1934)**

# RESUMO

FREITAS, D. S. **Funcionalidade e caracterização das propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais da uricase modificada por *PEGlação***. 2011. 163 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A *PEGlação* é uma bem sucedida estratégia nano-biotecnológica que envolve a ligação covalente do polietilenoglicol (PEG) a uma droga para melhorar sua farmacocinética, farmacodinâmica e perfil imunológico, e portanto, aumentar seu efeito terapêutico. Atualmente, a *PEGlação* é usada para modificar proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos e fragmentos de anticorpos. A Uricase (EC 1.7.3.3, UC) é uma enzima pertencente à classe das oxidorredutases, responsável pela oxidação do ácido úrico, produzindo alantoína. Essa enzima é encontrada em muitos organismos vivos como: bactérias, leveduras, fungos, vegetais e animais. Entretanto, durante a evolução das espécies o gene da UC tornou-se inativo, por isso, em humanos a UC é inativa. Nesse sentido, a UC adquiriu destaque como um potencial fármaco uricolítico, devido à necessidade do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos no tratamento de hiperuricemia e gota. Neste estudo, a uricase recombinante purificada de *Candida sp* (UC-r) e a de rim bovino (UC-b) foram modificadas por *PEGlação* com mPEG-p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e 2-O-mPEG-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN), produzindo conjugados com considerável atividade enzimática residual UC-r-mPEG-pNP (87%), UC-r-mPEG-CN (75%) e UC-b-mPEG-pNP (75%), UC-b-mPEG-CN (50%). Além disso, os conjugados obtidos com a UC-r e UC-b apresentaram valores de $K_M$ menores do que as enzimas nativas, indicando que a *PEGlação* conferiu uma interessante propriedade aos conjugados, que permitiu um aumento da afinidade da UC-r e UC-b pelo ácido úrico. O efeito do pH e da temperatura sobre a UC-r e UC-b modificadas indicou que os conjugados obtidos foram mais ativos em pH próximo ao fisiológico e mais estáveis do que a respectiva enzima nativa. As formas *PEGladas* da UC-r e UC-b foram mais resistentes à ação de diferentes proteases e mantiveram-se estáveis em soro humano, indicando que a *PEGlação* favoreceu a resistência a degradação proteolítica. Análises espectroscópicas de dicroísmo circular (CD) e infravermelho (FTIR) não apresentaram nenhuma diferença relevante entre a estrutura protéica da UC-r nativa e *PEGlada.* Estudos *in vivo* com coelho e camundongos Balb/c mostraram que a UC-r nativa induziu uma intensa resposta imune sendo altamente imunogênica. Por outro lado, a UC-r *PEGlada* quando injetada cronicamente em camundongos não induziu qualquer resposta detectável de anticorpos. Esses resultados

indicam uma suficiente redução da imunogenicidade dessa enzima, devido à conjugação do mPEG-pNP ou mPEG-CN, tornando-a adequada para um possível uso terapêutico. Portanto, nesse trabalho, os resultados obtidos com a UC-r de *Candida sp*, mostraram que dois conjugados apresentaram interessantes propriedades físico-químicas, biológicas e imunológicas, que permitiram um significativo avanço na transformação de uma enzima de origem fúngica em uma droga, com uma possível aplicação terapêutica no tratamento de hiperuricemia e gota.

Palavras chave: Gota. Hiperuricemia. Imunogenicidade. *PEGlação*. Estabilidade físico-química. Uricase.

## ABSTRACT

FREITAS, D.S. **Functionality and characterization of physical-chemical, biological and structural properties of uricase modified by PEGylation**. 2011. 163 p. Ph.D. Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PEGylation is a successful nanobiotechnology strategy that involves the covalent attachment of polyethylene glycol (PEG) to a drug to improve its pharmacokinetic, pharmacodynamic, and immunological profiles, and thus, enhance its therapeutic effect. Currently, PEGylation is used to modify proteins, peptides, oligonucleotides, antibody fragments, and small organic molecules. Uricase (EC 1.7.3.3, UC) is an enzyme belonging to the class of oxidoreductases responsible for the oxidation of uric acid, producing allantoin. This enzyme is found in many living organisms such as bacteria, yeasts, fungi, plants and animals. However, during the evolution of the species gene became inactive UC, therefore, in humans UC is inactive. Accordingly, UC has acquired prominence as a potential drug uricolytic due to the need of developing new therapeutic agents for the treatment of hyperuricemia and gout. In this study, purified recombinant uricase from *Candida sp* (UC-r) and ox kidney (UC-b) were modified by PEGylation with mPEG-p-nitrophenyl-carbonate (mPEG-pNP) and 2-O-mPEG-4,6-dichloro-s-triazine (mPEG-CN), producing conjugates with considerable residual enzyme activity UC-r-mPEG-pNP (87%), UC-r-mPEG-CN (75%) and UC-b-mPEG-pNP (75%), UC-b-mPEG-CN (50%). In addition, conjugates obtained with the UC-r and UC-b had lower $K_M$ values than native enzymes, indicating that the PEGylation gave an interesting property the conjugate that increased the affinity of UC-r and UC-b by uric acid. The effect of pH and temperature on the modified UC-r and UC-b indicated that the conjugates were more active at pH close to the physiological and more stable than its native enzyme. PEGylated forms of UC-r and UC-b were more resistant to the action of different proteases and remained stable in human serum, indicating that the PEGylation favored resistance to proteolytic degradation. Spectroscopic analysis of circular dichroism (CD) and infrared (FTIR) did not show any relevant difference in protein structure between native and PEGylated UC-r. *In vivo* studies with rabbit and Balb/c mice showed that UC-r native elicited an intense immune response being highly immunogenic. On the other hand, the PEGylated UC-r when chronically injected into mice did not induce any detectable response to antibodies. These results indicate a sufficient reduction of immunogenicity of this enzyme, due to conjugation of mPEG-pNP or mPEG-CN, making it suitable for possible therapeutic use. Therefore, the

results obtained with the UC-r of *Candida sp,* showed that two conjugates have interesting physical-chemical, biological and immunological, which allowed a significant advance in the transformation of an enzyme of fungal origin in a drug with a possible application therapeutic in the treatment of hyperuricemia and gout.

Keywords: Gout. Hyperuricemia. Immunogenicity. PEGylation. Physico-chemical stability. Uricase.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 -** Oxidação do ácido úrico pela UC produzindo alantoína..... 28

**Figura 2 -** Estrutura da UC de *Aspergillus flavus* (a): estrutura monomérica; (b): dímero; (c) e (d): estrutura tetramérica..... 31

**Figura 3 -** Rota esquemática de degradação do ácido úrico a alantoína através do intermadiário 5-hidroxi-isourato..... 32

**Figura 4 -** Mecanismo catalítico da UC. Os intermediários envolvidos estão representados de 1 a 4, em 5 temos a formação do 5-hidroxi-isourato..... 33

**Figura 5 -** Representação estrutural das bases nitrogenadas purínicas..... 34

**Figura 6 -** Representação esquemática da via *de novo* e da via *de recuperação*..... 36

**Figura 7-** Via de degradação dos nucleotídeos purínicos..... 39

**Figura 8 -** Diferentes modos de ação de drogas aplicadas no tratamento de gota e hiperuricemia..... 50

**Figura 9 -** Principais características da proteína *PEGlada*..... 53

**Figura 10 -** Representação da reação de *PEGlação* de grupos $H_2N$-R com alguns derivados de mPEG..... ..... 57

**Figura 11 -** Modelos moleculares do tetrâmero da UC nativa de *A. flavus* [A-C] e do conjugado mPEG-UC, contendo 36 moléculas de mPEG de 10 kDa (em cinza) por tetrâmero de mPEG-UC [D]..... 65

**Figura 12 -** Perfil cromatográfico de purificação da UC-b obtido com frações de 10 mL recolhidas a partir da eluição com gradiente linear crescente de concentração de cloreto de potássio 0,7 M pH 7,5 e Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com resina DEAE Sepharose (-●-) Atividade (UI), (-□-) Absorbância (280 nm)..... 86

**Figura 13 -** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS – PAGE 10%. Perfil protéico das etapas de purificação da uricase extraída de rim bovino (UC-b)..... 88

**Figura 14 -** Representação da estrutura química do ácido úrico (A) e do ligante xantina (B) utilizado para cromatografia de afinidade..... 89

**Figura 15 -** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS – PAGE 10%. Perfil protéico das etapas de purificação da UC-r. P: Padrão de massa molecular; 1: UC-r comercial; 2: UC-r purificada após cromatografia de afinidade..... 90

**Figura 16 -** Curva padrão de BSA para determinação de amino grupos livres empregando o método colorimétrico por TNBS..... 93

**Figura 17 -** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% da BSA modificada com mPEG-pNP ou mPEG-CN em diferentes proporções molares..... 94

**Figura 18 -** Diferentes grupos reativos do PEG..... 96

**Figura 19 -** Curva padrão da uricase recombinante nativa (UC-r) para determinação de amino grupos livres empregando o método colorimétrico por TNBS..... 98

**Figura 20 -** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-r nativa (**A**) e determinação da equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ da UC-r nativa..... 100

**Figura 21-** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-r-mPEG-pNP (**A**) e determinação da equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ da UC-r-mPEG-pNP..... 101

**Figura 22 -** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-r-mPEG-CN (**A**) e determinação da equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ da UC-r-mPEG-CN..... 102

**Figura 23 -** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 7,5% da UC-r nativa e modificada usando dois métodos de visualização. Em (A) temos o gel corado com Gelcolde® esse corante é específico para proteínas. Em (B) o gel corado com solução de iodo para visualização específica do PEG ligado. P: padrão de massa molecular; 1: UC-r nativa; 2: UC-r-mPEG-pNP; 3: UC-r-mPEG-CN..... 105

**Figura 24 -** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-b nativa (**A**) e determinação da Equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ aparente da UC-b nativa..... 108

**Figura 25 -** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-b-mPEG-pNP (**A**) e determinação da Equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ aparente da UC-b-mPEG-pNP..... 110

**Figura 26 -** Efeito do pH sobre a atividade enzimática (%) da uricase recombinante nativa (UC-r) (-▲-) e uricase de rim bovino nativa (UC-b) (-■-) em diferentes tampões (6,0-8,5 Hepes 100 mM e 9,0-10 borato de sódio 100 mM) a 37 °C..... 112

**Figura 27 -** Efeito do pH sobre a atividade enzimática (%)(**A**) UC-r nativa (-○-) e seus conjugados UC-r-mPEG-pN (-■-) e UC-r-mPEG-CN (-□-). **(B)** UC-b nativa (-○-) e seus conjugados UC-b-mPEG-pNP (-■-) e UC-r-mPEG-CN (-□-). A atividade foi determinada em diferentes tampões, variando o pH de 6,0 a 10 (6,0-8,5 Hepes 100 mM e 9,0-10 borato de sódio 100 mM) a 37 °C. Os resultados são média ± S.D. (n=3)..... 113

**Figura 28 -** Perfil de estabilidade (%) da UC-r nativa e seus conjugados UC-r-mPEG-pNP (**A**) e UC-r-mPEG-CN (**B**). As amostras foram incubadas por 2h em pH 6,5; 7,5 e 8,5 em diferentes temperaturas: 37 ºC, 50 ºC e 70 ºC. Ao final desse período foi medida a atividade enzimática de cada amostra. Os resultados são a média ± S.D. (n=3)..... 116

**Figura 29 -** Perfil de estabilidade (%) da UC-b nativa e seus conjugados UC-b-mPEG-pNP (**A**) e UC-b-mPEG-CN (**B**). As amostras foram incubadas por 2h em pH 6,5; 7,5 e 8,5 em diferentes temperaturas: 37 ºC, 50 ºC. Ao final desse período foi medida a atividade enzimática de cada amostra. Os resultados são a média ± S.D. (n=3)..... 117

**Figura 30 -** Comportamento da UC-r nativa e seus conjugados UC-r-mPEG-pNP, UC-r-PEG-CN perante a ação de diferentes proteases. (**A**) Protex 6L [0,2 UI], (**B**) Proteomix [0,2 UI], (**C**) Protease fúngica [20 UI], (**D**) Papaína [20 UI]..... 120

**Figura 31 -** Comportamento da UC-b nativa e seus conjugados UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN perante a ação de diferentes proteases. (**A**) Proteomix [0,2 UI], (**B**) Protex 6L [0,2 UI], (**C**) Papaína [20 UI], (**D**) Protease fúngica [20 UI]..... 122

**Figura 32 -** Estabilidade em soro humano a 37 °C por 2h. Em (**A**) UC-r nativa e seus conjugados (UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN). Em (**B**) UC-b nativa e seus conjugados (UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN)..... 124

**Figura 33 -** Espectro de FTIR da UC-r nativa..... 126

**Figura 34 -** Espectro de FTIR do conjugado UC-r-mPEG-pNP..... 127

**Figura 35 -** Espectro de FTIR do conjugado UC-r- mPEG-CN..... 128

**Figura 36 -** Espectro de FTIR do polímero mPEG-pNP..... 129

**Figura 37 -** Espectro de FTIR do polímero mPEG-CN..... 130

**Figura 38 -** Espectro de FTIR da UC-r nativa e de seus conjugados..... 131

**Figura 39 -** Espectro de CD da UC-r nativa (—) e dos conjugados UC-r-mPEG-pNP (·····),UC-r-mPEG-CN (▬) em diferentes temperaturas (A) 20 °C, (B) 50 °C e (C) 70 °C..... 133

**Figura 40 - (A)** Atividade enzimática residual (%) e **(B)** Avaliação do reconhecimento (%) da UC-r nativa e seus conjugados UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN após incubação com o soro anti-UC-r nativa produzido em coelho..... 137

**Figura 41-** Imunogenicidade da UC-r nativa e de seus conjugados em camundongos. Os resultados são a média ± S.D. obtidos com 5 animais / grupo..... 138

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enzimas como agentes terapêuticos..... 26

Tabela 2 - Diferentes fontes produtoras de UC ..... 29

Tabela 3 - Produtos biofarmacêuticos *PEGlados* disponíveis no mercado..... 71

Tabela 4 - Proporção molar mPEG-pNP/UC-r..... 75

Tabela 5 - Proporção molar mPEG-CN/ UC-r..... 76

Tabela 6 - Proporção em massa mPEG-pNP/UC-b..... 77

Tabela 7 - Proporção em massa mPEG-CN/ UC-b..... 77

Tabela 8 - Etapas de purificação da UC-b..... 87

Tabela 9 - Resumo das etapas de purificação da UC-b..... 87

Tabela10- Proporção molar mPEG-CN/BSA e mPEG-pNP/ BSA..... 92

Tabela 11 - Avaliação do grau de modificação dos amino grupos da BSA nas diferentes proporções molares com mPEG-pNP e mPEG-CN..... 93

Tabela 12 - Principais propriedades da UC-r modificada por *PEGlação*..... 103

Tabela 13 - Avaliação do conteúdo de α-hélice (%) da UC-r nativa e modificada em diferentes temperaturas..... 135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| **Asp:** | Aminoácido aspartato |
| **Arg:** | Aminoácido arginina |
| **CD:** | Dicroísmo circular |
| **Da:** | Dalton |
| **DLS:** | Dinâmica de espalhamento de luz |
| **DO:** | Densidade óptica |
| **ESI:** | Ionização por elétron spray |
| **FTIR** | Infravermelho com transformada de Fourier |
| **g:** | Aceleração da gravidade |
| **Gln:** | Aminoácido glutamina |
| **HIC:** | Cromatografia de interação hidrofóbica |
| **HPLC** | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| **RP-HPLC** | Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa |
| **IEC:** | Cromatografia de troca iônica |
| **IEF:** | Cromatografia de focalização isoelétrica |
| **IgG** | Imunoglobulina G |
| **IgE:** | Imunoglobulina E |
| **IgM:** | Imunoglobulina M |
| **IR:** | Infravermelho |
| **kDa:** | Quilodalton |
| **$K_M$:** | Constante de Michaelis-Menten |
| **MALDI-MS:** | do inglês*Matrix assisted laser desorption/ionization* |
| **MALDI-TOF:** | do inglês*Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight* |
| **mPEG:** | Metoxipolietilieglicol |
| **mPEG-CN:** | 2-O-mPEG-4,6-dicloro-s-triazina |
| **mPEG-pNP:** | Metoxipolietilenoglicol p-nitrofenil carbonato |
| **nm:** | Nanômetro |
| **P:** | Padrão de massa molecular |
| **PEG:** | Polietilenoglicol |
| **pH:** | Potencial hidrogeniônico |
| **pI:** | Potencial isoelétrico |
| **rpm:** | Rotação por minuto |
| **RMN:** | Ressonância Magnética Nuclear |
| **TLS:** | Síndrome de lise tumoral |
| **TNBS:** | Ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico |
| **Thr:** | Aminoácido treonina |
| **UC:** | Uricase |
| **UC-b:** | Uricase de rim bovino |
| **UC-r:** | Uricase recombinante de *Candida sp* |
| **UC-b-mPEG-CN:** | Conjugado Uricase bovina-mPEG-4,6-dicloro-s-triazina |
| **UC-b-mPEG -pNP:** | Conjugado Uricase bovina-mPEG-p-nitrofenil carbonato |
| **UC-r-mPEG-pNP:** | Conjugado Uricase recombinante-mPEG- p-nitrofenil carbonato |
| **UC-b-mPEG-CN:** | Conjugado Uricase recombinante- mPEG-4,6-dicloro-s-triazina |
| **XO:** | Enzima Xantina Oxidase |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO**..... 22

**2 REVISÃO DA LITERATURA**..... 24

**2.1 Uricase (UC)**..... 28

**2.2 Metabolismo das Purinas**..... 34

**2.2.1 Biossíntese dos Nucleotídeos Purínicos**..... 35

**2.2.2 Degradação dos Nucleotídeos Purínicos**..... 37

**2.3 Gota e Hiperuricemia**..... 40

**2.3.1 Tratamento de Gota e Hiperuricemia**..... 44

**2.3.2 Aplicações Terapêuticas da Uricase**..... 48

**2.4 Modificação Química de Biomoléculas com Polietilenoglicol (PEG)**..... 51

**2.4.1 Aspectos Físico-Químicos e Biológicos envolvidos na Tecnologia de *PEGlação***..... 54

**2.4.2 Diferentes Estratégias Empregadas na Reação de *PEGlação***..... 56

**2.4.3 Caracterização do mPEG Conjugado**..... 59

**2.4.4 Caracterização Estrutural do Conjugado mPEG-proteína**..... 61

**2.4.5 Propriedades Imunológicas das Proteínas *PEGladas***..... 63

**3 OBJETIVOS**..... 69

**3.1 Objetivos Gerais**..... 69

**3.2 Objetivos Específicos**..... 69

**4 MATERIAIS E MÉTODOS**..... 71

**4.1 MATERIAIS**..... 71

**4.1.1 Aparelhos**..... 71

**4.1.2 Reagentes**..... 71

**4.2 MÉTODOS**..... 72

**4.2.1 Medida da Concentração de Proteína pelo Método de Bradford**..... 72

***4.2.2*** **Medida de Atividade Enzimática**..... 72

**4.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida**..... 73

**4.2.4 Purificação da Uricase de Rim Bovino (UC-b)**..... 73

**4.2.5 Purificação da Uricase Recombinante de *Candida sp* (UC-r)**..... 74

**4.2.6 Verificação da Influência da Proporção Molar de mPEG-p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN) no Grau de Substituição e na Atividade Enzimática da UC-r**..... 75

**4.2.7 Verificação da Influência da Proporção em Massa de mPEG-p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN) no Grau de Substituição e na atividade enzimática da UC-b**..... 77

**4.2.8 Determinação da Constante de *Michaelis-Menten* ($K_M$) para as Enzimas Nativas (UC-r; UC-b) e seus Respectivos Conjugados**..... 78

**4.3 Ensaios *in vitro***..... 78

**4.3.1 Verificação da atividade e da estabilidade biológica da UC-r, UC-b e de seus respectivos conjugados em função do pH** ..... 78

**4.3.2 Verificação da resistência à ação de proteases da UC-r, UC-b e de seus respectivos conjugados**..... 79

**4.3.3 Verificação da Estabilidade Biológica da UC-r, UC-b e seus Respectivos Conjugados em Soro Humano**..... 79

**4.3.4 Caracterização Estrutural da UC-r Nativa e Modificada por Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**..... 79

**4.3.5 Caracterização Estrutural da UC-r Nativa e Modificada por Análise de Dicroísmo circular (CD)**..... 80

**4.4 Ensaios *in vivo***..... 80

**4.4.1 Produção de Anticorpos Policlonais Anti-Uricase (anti-UC-r) em Coelho**..... 80

**4.4.2 Titulação de Anticorpos por ELISA (Ensaios imunoenzimáticos)**..... 81

**4.4.2.1 Elisa para Quantificar Anticorpos anti-UC-r Nativa Produzido em Coelho e Verificar a Imunorreatividade dos Conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN**..... 81

**4.4.2.2 Elisa para Quantificar Anticorpos anti-UC-r nativa, anti-UC-r-mPEG-pNP e anti-UC-r-mPEG-CN em Camundongos**..... 82

**4.4.3 Ensaio de Imunoreatividade da UC-r Nativa e seus Conjugados**..... 82

**4.4.4 Ensaio de Imunogenicidade da UC-r Nativa e seus Conjugados em camundongos**..... 83

**4.5 Análises Estatísticas**..... 83

**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 84

**5.1 Purificação da Uricase Bovina (UC-b)**..... 84

**5.2 Purificação da Uricase Recombinante de *Candida sp* (UC-r)** ..... 89

**5.3 Efeito da Proporção em Massa do mPEG-pNP e mPEG-CN no Grau de Modificação e na Atividade Enzimática da UC-r**..... 97

**5.4 Efeito da Proporção em Massa do mPEG-pNP e mPEG-CN no Grau de Modificação e na Atividade Enzimática da UC-b**..... 107

**5.5 Verificação da Atividade e Estabilidade Biológica da UC-r e UC-b Modificadas em Função do pH** ..... 111

**5.6 Verificação da Resistência à Ação de Proteases da UC-r e UC-b Modificadas por *PEGlação***..... 119

**5.7 Análise Estrutural da UC-r Nativa e Modificada por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e por Dicroísmo Circular (CD)**..... 125

**5.8 Avaliação da Imunoreatividade da UC-r Nativa e de seus Conjugados**..... 135

**5.9 Avaliação da Imunogenicidade da UC-r Nativa e de seus Conjugados** ..... 138

**6 CONCLUSÕES**..... 141

**REFERÊNCIAS** ..... 143

**ANEXOS**..... 158

**ANEXO A – Folha de Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)**..... 159

**ANEXO B – Artigo Científico Publicado**..... 160

**ANEXO C – Resumo Publicado *on-line* a Convite da Elsevier na Página do *SciTopics Research Summaries by Experts***..... 161

# 1 INTRODUÇÃO

A nanomedicina é uma vertente bastante promissora da nanotecnologia porque utiliza recursos estratégicos como nanodispositivos e nanoestruturas, na reparação, construção e controle de sistemas biológicos humanos em nível molecular, visando a aplicações no diagnóstico, tratamento e prevenção de uma série de doenças. Nesse contexto, a tecnologia de *PEGlação s*urge como uma bem-sucedida estratégia nanotecnológica na medicina devido à sua versatilidade e às suas aplicações.

A *PEGlação* envolve a ligação covalente de polietileno glicol (PEG) ativado a uma molécula alvo, com a finalidade de melhorar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, bem como seu comportamento imunológico. Atualmente, a *PEGlação* é usada para modificar uma ampla variedade de biomoléculas como enzimas, proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos, fragmentos de anticorpos e pequenas moléculas orgânicas para garantir a eficácia terapêutica dessas entidades moleculares.

Considerando que, no Brasil, encontram-se poucos pesquisadores envolvidos no estudo da tecnologia de *PEGlação*, ressalta-se a necesssidade de o país realizar estudos e pesquisas nessa área para aprimorar e desenvolver ferramentas inovadoras e estratégicas no campo da nanobiotecnologia.

Além disso, recentemente, vários trabalhos apontaram um aumento considerável na incidência e na prevalência de gota e hiperuricemia, tanto em países desenvolvidos, por exemplo, Estados Unidos e Reino Unido, como em países em desenvolvimento. Esse fato desencadeou na busca de novos medicamentos e terapias com objetivo de avançar e inovar os tratamentos já existentes para essas patologias.

A enzima uricase (UC) surge, então, como um potencial fármaco a ser utilizado no tratamento de gota e hiperuricemia. Contudo, como os humanos não produzem a UC ativa, a enzima, que é obtida de outras fontes, possui a característica de ser antigênica, e a administração de múltiplas doses da UC resulta em reações alérgicas, o que dificulta sua aplicação como um novo agente terapêutico.

Para superar os fatores limitantes para o uso terapêutico da UC, existem estudos investigando a tecnologia de *PEGlação* como uma estratégia capaz de diminuir a imunogenicidade da UC, prolongar seu tempo de meia-vida e manter sua atividade biológica.

Nesse sentido, o desafio biotecnológico do presente trabalho foi modificar a UC por *PEGlação*, com dois tipos de mPEGs, mPEG-p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN), para determinar a funcionalidade dos conjugados obtidos, verificando possíveis alterações nas propriedades físico-químicas e biológicas, bem como mudanças conformacionais da UC por meio de técnicas espectroscópicas de infravermelho (FTIR) e dicroísmo circular (CD). Adicionalmente, também foi investigado o comportamento imunológico da UC nativa e de seus conjugados obtidos com estudos *in vivo*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O uso de enzimas com finalidade terapêutica remonta ao final do século XIX, quando preparações brutas de enzimas pancreáticas de origem suína eram empregadas como auxiliares digestivos. Desde então, o potencial terapêutico dessas biomoléculas é amplamente investigado. Aquelas destinadas ao uso terapêutico, diagnóstico, analítico, à química fina e à pesquisa são classificadas como "enzimas especiais" (CRUZ et al., 2008).

As enzimas possuem duas importantes propriedades que as distinguem de todos os outros tipos de drogas: elas atuam sobre moléculas alvos com elevada afinidade e especificidade, e, devido à sua função catalítica, converte moléculas alvos em produtos desejáveis. Essas duas propriedades fazem das enzimas potentes drogas específicas que podem executar uma terapia bioquímica no corpo, o que moléculas pequenas não podem fazer (VELLARD, 2003). Assim, a relevância do uso de enzimas como medicamento relaciona-se com o fato de que pequenas quantidades do catalisador biológico podem produzir efeitos altamente específicos em condições fisiológicas. Essas características das enzimas têm resultado no desenvolvimento de muitos medicamentos para uma variedade de doenças (VELLARD, 2003).

Saliente-se que, para essa finalidade, a enzima precisa preencher importantes requisitos, principalmente para uso interno, dentre eles: *(1)* baixa resposta imunológica, *(2)* alta atividade e estabilidade em pH fisiológico, *(3)* alta afinidade pelo substrato, *(4)* baixa taxa de eliminação, *(5)* pouca inibição pelos produtos ou constituintes normais encontrados nos fluidos corporais e *(6)* independência de co-fatores exógenos. Além disso, quando se utilizam microrganismos como fonte destas moléculas, deve-se buscar cepas não patogênicas objetivando evitar a presença de toxinas (ABRAHÃO-NETO, 2001).

Na prática, poucas enzimas possuem todas as propriedades necessárias para esse fim, cuja instabilidade dos biocatalisadores, suscetibilidade ao ataque de proteases, dificuldade de acesso ao órgão-alvo e antigenicidade representam algumas das limitações da terapia enzimática (CALICETI; VERONESE, 2003; CRUZ et al., 2008).

Por outro lado, a aprovação no mercado pelo FDA (repartição do governo americano que testa, controla e inspeciona alimentos e medicamentos) da **Activase®** (1987) e da **Adagen®** (1990) iniciou uma nova era para as enzimas como agente terapêutico. A **Activase®** (alteplase - ativador de plasminogênio tecidual) foi a primeira enzima recombinante usada como medicamento. É aplicada no tratamento de ataque cardíaco causado

por coágulo que bloqueia a artéria coronária. A **Adagen® (**adenosina deaminase bovina modificada com mPEG) é usada no tratamento de imunodeficiência combinada severa. Foi a primeira enzima terapêutica aprovada dentro do programa de drogas órfãs (Orphan Drug Act) lançado em 1983 pelo FDA (VELLARD, 2003).

Atualmente, uma considerável variedade de medicamentos cujos princípios ativos são enzimas está disponível (Tabela 1): anti-inflamatórios, antissépticos, auxiliares digestivos. Existem também enzimas empregadas na reposição de enzimas hemostáticas, na inibição da coagulação, na reposição de enzimas metabólicas, no tratamento da fibrose cística, bem como na terapia contra o câncer (VELLARD, 2003; ZIMMER et al., 2009).

Deve-se ressaltar que várias estratégias estão sendo empregadas para minimizar os fatores limitantes e ampliar o potencial de uso terapêutico de várias enzimas. Entre elas, podemos destacar a manipulação da sequência de aminoácidos para diminuir a imunogenicidade e a degradação proteolítica das enzimas, a fusão ou conjugação de imunoglobulinas e proteínas do soro sanguíneo, como a albumina, a incorporação de veículos para proteção e liberação controlada, a conjugação da proteína a polímeros naturais ou sintéticos e técnicas para alterar quimicamente as proteínas por meio de síntese orgânica (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002).

Tabela 1- Enzimas como agentes terapêuticos

| Enzima | Número E.C. | Fonte | Nome comercial | Uso terapêutico |
|---|---|---|---|---|
| Urato oxidase | 1.7.3.3 | *Aspergillus flavus* | Uricozyme | Gota |
| Superóxido dismutase | 1.15.1.1 | Fígado bovino e eritrócitos | Peroxinorm Oxinorm | Inflamação |
| Lipase | 3.1.1.3 | *Rhizopus arrhizus* | | Auxiliar digestivo |
| Desoxirribonuclease | 3.1.21.1 | Células CHO recombinante | Pulmozyme | Fibrose cística |
| Desoxirribonuclease (streptodornase) | 3.1.21.1 | *Streptococcus haemolyticus* | Varidase | Úlceras gástricas |
| Ribonuclease | 3.1.26.4 | *Rana pipiens* | Onconase | Antiviral e alguns cânceres |
| B-amilase | 3.2.1.1 | *Aspergillus oryzae* | | Auxiliar digestivo |
| Celulase | 3.2.1.4 | *Trichoderma viride* | | Auxiliar digestivo |
| Lisozima | 3.2.1.17 | Clara de ovos | Murazyme Colpistar | Antibiótico |
| Galactosidade | 3.2.1.22 | Células humanas ou CHO recombinantes | Fabrazyme Replagal | Doença de Fabry |
| Lactase | 3.2.1.23 | *Kluyveromyces fragilis, Aspergillus oryzae, A. niger* | Surelac Lactaid | Intolerância a lactose |
| Glicocerebrosidase | 3.2.1.45 | Células CHO recombinantes | Cerezyme | Doença de Gaucher |
| Estreptoquinase | 3.4.21.73 | *Streptococcus* ß hemolitico | Streptase Kabikinase | Coágulo sanguíneo |
| Esfericase | 3.4.21 | *Bacillus sphaericus* | | Bronquite crônica Pneumonia aguda |
| Papaína | 3.4.22.2 | *Carica papaya* | Panafil | Digestão Verminose |
| Colagenase | 3.4.24.3 | *Clostridium histolyticum* | Santyl Kollagenase | Úlceras de pele |
| Serrapeptase | 3.4.24.40 | *Serratia* E15 | Danzen | Inflamação |
| L-asparaginase | 3.5.1.1 | *Escherichia coli, Erwinia carotovora* | Elspar Erwinase | Leucemia linfocítica aguda |

Fonte: Zimmer et al., 2009.

O Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos, uma vez que é inigualável a quantidade e variedade de produtos naturais, incluindo a notável biodiversidade microbiana disponível para transformação em produtos úteis de maior valor agregado. O mercado brasileiro de enzimas foi avaliado no ano de 2005 em 147,2 milhões de dólares, correspondendo a apenas 3,7% do mercado internacional. Das enzimas produzidas em escala industrial, uma fatia significativa do mercado mundial é representada pelas "enzimas especiais". No Brasil, as enzimas diagnósticas são predominantemente importadas. No período de 1998-2005, considerando-se enzimas especiais como um todo, o Brasil importou o equivalente a US$ 516 milhões e exportou US$ 24,5 milhões, o que corresponde a 84% de importação e 16% de exportação. Dentro dessas, as enzimas terapêuticas são responsáveis pela maior parte do mercado nesse período, contando com uma importação de US$ 85 milhões (AEHLE, 2007).

A previsão de crescimento para o mercado mundial de enzimas é de 7,6% ao ano, sendo responsável por esse crescimento tanto a queda no preço e o maior acesso às enzimas de aplicação industrial, quanto a inclusão de novas enzimas especiais, cada vez mais sofisticadas e de alto custo. No período de 2003 a 2005, as indústrias brasileiras que mais importaram e exportaram enzimas especiais foram as de diagnóstico e as farmacêuticas (FERRARA, 2008).

Assim, os inúmeros avanços ocorridos na área de biotecnologia favoreceram a expansão do uso de enzimas como agente terapêutico. A busca de novas estratégias e formulações conferiu interessantes modificações nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das enzimas, além de diminuír sua imunogenicidade, garantindo a manutenção de suas principais funções biológicas como atividade enzimática.

## 2.1 Uricase (UC)

Uricase (EC 1.7.3.3, UC) é uma enzima pertencente à classe das oxidorredutases, também chamada de urato oxidase ou urico-oxidase, e é responsável pela oxidação de ácido úrico, produzindo alantoína.

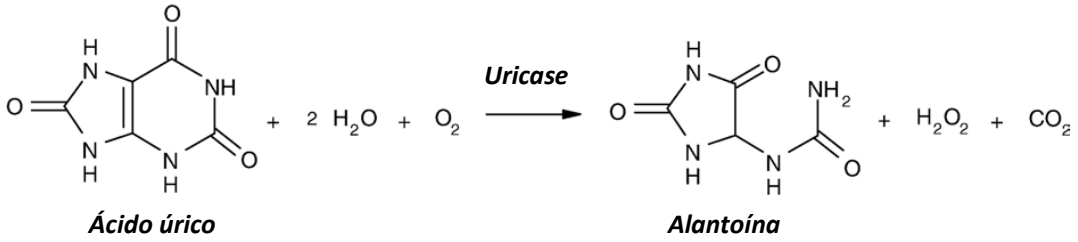



**Figura 1** - Oxidação do ácido úrico pela UC produzindo alantoína
Fonte: Pasut et al., 2008.

A ação oxidativa da UC foi demonstrada por Schittenhelm e Wiechowski (MAHLER, 1963) e desde então essa enzima tem sido encontrada em extratos de tecidos animais e células de microrganismos. Inicialmente, para isolar a UC, foi descrita uma variedade de procedimentos de purificação e muitos utilizavam fígado suíno ou rim bovino como material de partida (MAHLER, 1963).

Embora tradicionalmente associada ao fígado suíno ou rim bovino, a UC é amplamente encontrada na natureza, em muitos organismos vivos, tais como: bactérias, leveduras, fungos, vegetais e animais (Tabela 2). Algumas espécies de mamíferos, aves, répteis, peixes e anfíbios conservaram a UC e são capazes de oxidar o ácido úrico, produzindo alantoína (uma substância dez vezes mais solúvel que o ácido úrico), portanto, facilmente excretada pelos rins (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

Entretanto, durante o processo de evolução das espécies, o gene da UC tornou-se inativo em decorrência de mutações que ocorreram inicialmente no promotor e depois na região codificadora, por isso, em orangotangos, chimpanzés, gorilas e humanos a UC é inativa ou ausente (VARELA-ECHAVARRIA; MONTES DE OCA-LUNA; BARRERA-SALDANA, 1988; WU et al., 1989).

Tabela 2- Diferentes fontes produtoras de UC

| Espécie | Fonte | Referência |
|---|---|---|
| *Mamífero (porco)* | Naturalmente produzida<br>Recombinante | MAHLER, 1963<br>HERSHFIELD; KELLY, 2006 |
| *Mamífero (boi)* | Naturalmente produzida | FARINA; MENNELLA FARAONE, 1979<br>RAJOKA et al., 2006 |
| *Bacillus fastidiosus* | Naturalmente produzida<br>Recombinante | BONGAERTS et al., 1978<br>IMHOFF et al., 2003 |
| *Antrobacter protoformiae* | Naturalmente produzida | CHUA et al., 1988 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Naturalmente produzida | ISHIKAWA et al., 2004 |
| *Candida utilis* | Naturalmente produzida<br>Recombinante | ITAYA et al., 1971<br>KOYAMA; ICHIKAWA; NAKANO, 1996 |
| *Aspergillus flavus* | Naturalmente produzida<br>(Uricozyme®)<br>Recombinante<br>(Rasburicase®) | LABOUREUR; LANGLOIS, 1968<br>LEGOUX et al., 1992<br>BAYOL et al., 2002 |
| Soja (*Glycine max*) | Naturalmente produzida | SARMA et al., 1999 |
| Plantas superiors | Naturalmente produzida | MONTALBINI; REDONDO; CABALLERO, 1997 |

A UC de diferentes espécies é comumente encontrada nos peroxissomos, que são organelas intracelulares especializadas no processamento das reações oxidativas, utilizando oxigênio molecular. Por isso, são encontradas nessa organela enzimas como a UC e a catalase. A UC está exclusivamente localizada no centro cristalóide dos peroxissomos devido à elevada formação de cristais, provocada pela baixa solubilidade dessa enzima (VOGELS; VAN der DRIFT, 1976; USUDA et al., 1988; VOLKL et al., 1988; ANGERMULLER; ISLINGER; VOLKL, 2009). Como os peroxissomos são organelas que possuem elevado pH (8,0-9,5), a maioria das UCs são caracterizadas por um pH ótimo alcalino (8,0-9,5) (VOGELS; VAN der DRIFT, 1976; BOMALASKI et al., 2002).

Outras propriedades que caracterizam a família da UC compreendem o ponto isoelétrico (pI) que varia de 5,4 a 6,3 e a especificidade em relação ao ácido úrico. Apesar de o valor de $K_M$ ser consideravelmente diferente entre as espécies, variando de 6,0 x $10^{-5}$M - 2,0 x $10^{-4}$M, a UC é altamente específica para degradar o ácido úrico. A massa molecular da

UC na maioria das espécies encontra-se na faixa de 70 kDa - 150 kDa, sendo composta por subunidades de 32 - 39 kDa, e a enzima pode apresentar-se como monômero, dímero ou tetrâmero (VOGELS; VAN der DRIFT, 1976; BONGAERTS et al., 1978; FARINA; MEMMELLA FARAONE; LEONE, 1979; RAJOKA et al., 2006).

Dentre as fontes disponíveis, a UC de *Aspergillus flavus* foi a primeira a ter sua estrutura tridimensional determinada (Figura 2) complexada ao inibidor 8-azaxantina (AZA) (COLLOC'H et al., 1997). A UC de *Aspergillus flavous* é uma enzima globular de 135 kDa, homotetramérica, contendo um túnel central (conformação T-fold) comum a grande maioria das espécies de UC (Figuras 2c e 2d). Cada subunidade é formada por 301 aminoácidos composta de dois domínios estruturalmente equivalentes (Figura 2a). Podemos observar também, pela Figura 2b que cada subunidade possui um sítio ativo (RETAILLEAU et al., 2004).

A maioria das UCs é funcionalmente ativa como um tetrâmero, podendo ser um heterotetrâmero como na UC de *Bacillus fastidious* (SCHIAVON et al., 2000) ou um homotetrâmero, como na UC de *Aspergillus flavus* (RETAILLEAU et al., 2004). No entanto, o papel e a importância do túnel central, na estrutura da UC, ainda permanecem desconhecidos (GABISON et al., 2008).

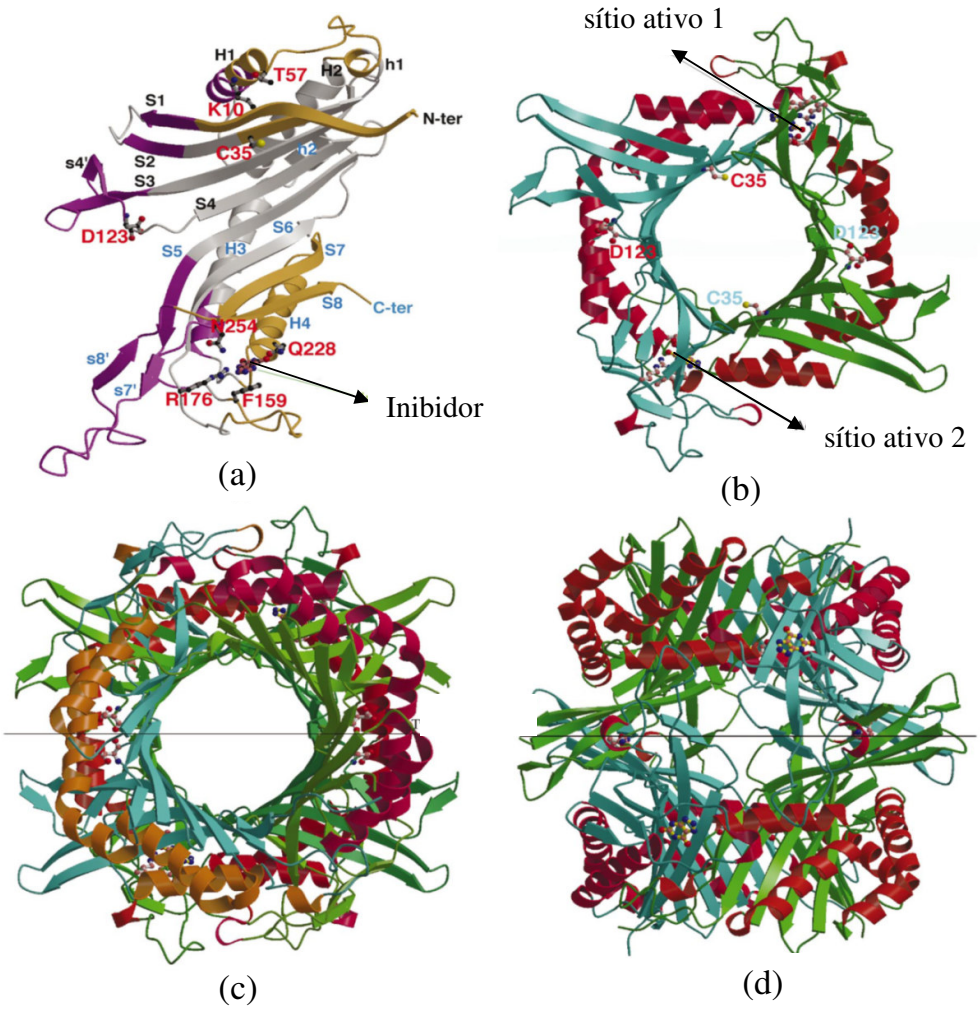



**Figura 2 -** Estrutura da UC de *Aspergillus flavus* (a): estrutura monomérica; (b): dímero; (c) e (d): estrutura tetramérica.
Fonte: Retailleau et al., 2004.

O mecanismo catalítico de oxidação do ácido úrico pela UC é complexo e controverso, pois a maioria das enzimas que utilizam oxigênio molecular como substrato, usualmente, requer um co-fator para mediar a reação com oxigênio (COLLOC'H et al., 2006). As UCs de fígado de camundongo e rim bovino são dependentes de íons $Cu^{2+}$ para catalisar a reação (MOTOJIMA; KANAYA; GOTO, 1988; RAJOKA et al., 2006), entretanto, as UCs de *Candida utilis, Aspergillus flavus* e *Glycine max* não dependem de nenhum co-fator ou grupo prostético para catalisar a reação de oxidação do ácido úrico, o que faz da UC uma enzima bem diferente de outras oxidases (KOYAMA; ICHIKAWA; NAKANO, 1996; COLLOC'H et al., 1997; KAHN; TIPTON, 1998).

O mecanismo de ação da UC tem sido amplamente explorado (COLLOC'H et al., 1997; KAHN; TIPTON, 1998; IMHOFF et al., 2003; RETAILLEAU et al., 2004; GABSON et al., 2008) e chegou-se a importantes informações, como o fato de que independentemente do inibidor da UC empregado para estudar o sítio catalítico da enzima (isso inclui inibidores como 8-azaxantina, xantina, 8-nitroxantina, 9-metil ácido úrico, ácido oxônico e di-aminouracil), o inibidor permanece na mesma posição que o substrato urato. Além disso, foi verificada a formação do 5-hidroxi-isourato (Figura 3) como produto intermediário da reação, que é degradado à alantoína sem a participação da UC.

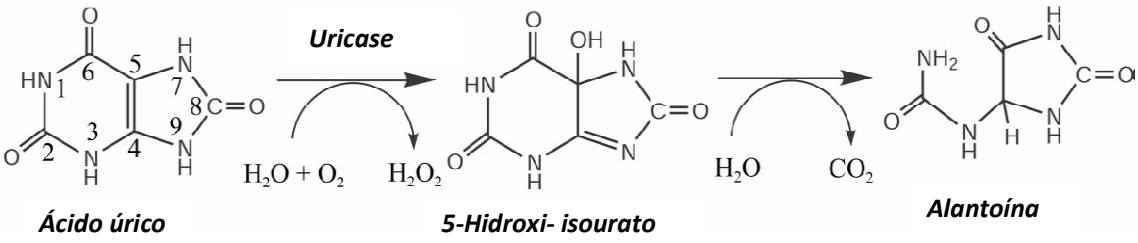



**Figura 3 –** Rota esquemática de degradação do ácido úrico a alantoína por meio do intermadiário 5-hidroxi-isourato. Apenas o primeiro passo da reação é catalisado pela UC.
Fonte: Retailleau et al., 2004.

Como sugerido por Colloc'h e colaboradores, o ácido úrico é estabilizado como um diânion pela UC por meio de ligações de hidrogênio por duas pinças moleculares conservadas, os aminoácidos arginina (Arg 176) e glutamina (Gln 228), que correspondem ao sítio catalítico da enzima. Assim, na presença de um excesso de oxigênio, a transferência do elétron da UC para o oxigênio molecular ocorre ao mesmo tempo que ocorre o ataque nucleofílico da molécula de água, a ligação C4-C5 do anel purínico, formando o intermediário C5 hidroxi-isourato, sendo convertido a alantoína (COLLOC'H et al., 1997).

Baseado em estudos anteriores, Gabson et al. (2008) propôs um mecanismo catalítico para a formação do 5-hidroxi-isourato (Figura 4). O sítio ativo é delimitado pelos resíduos conservados implicados na pinça molecular (Arg 176 e Gln 228), os quais interagem com o substrato. Os aminoácidos aspartato (Asp 58) e treonina (Thr 57) formam outra pinça acima do plano médio do ligante, criando um local onde a transferência eficiente de elétrons pode ocorrer com um baixo nível de energia. A partir dessa etapa da reação ocorre a formação dos intermediários (3 e 4) levando à formação do 5-hidroxi-isourato (5).

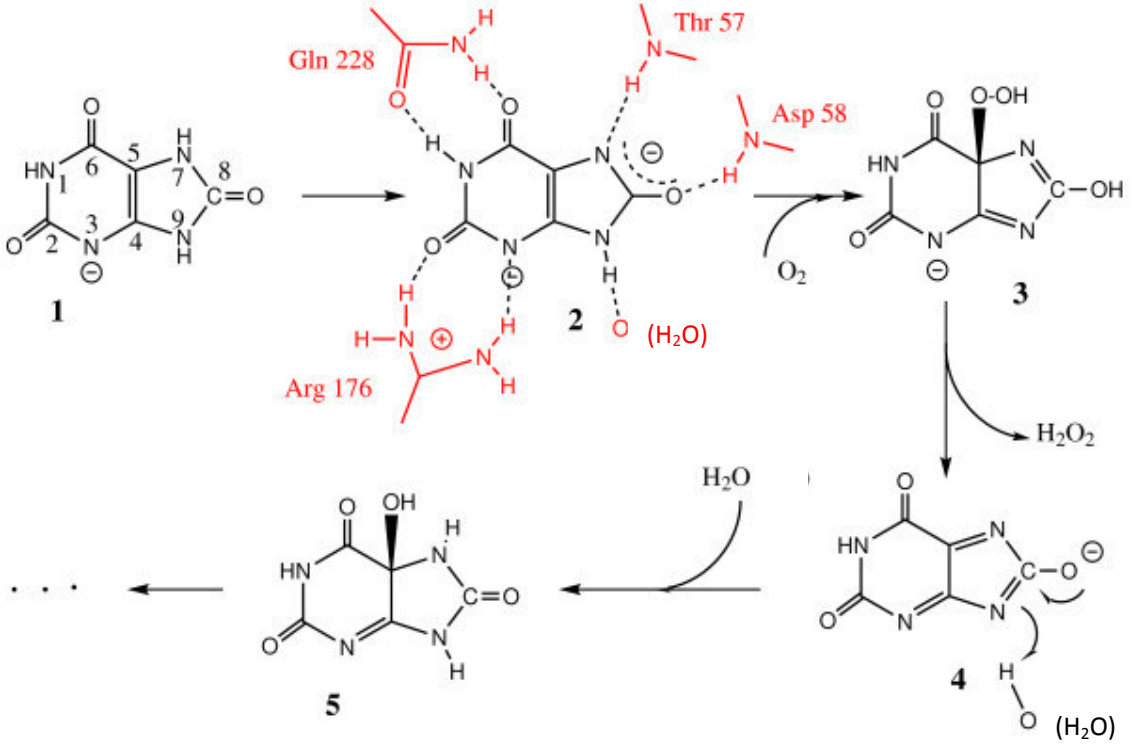



**Figura 4 –** Mecanismo catalítico da UC. Os intermediários envolvidos estão representados de 1 a 4, em 5 temos a formação do 5-hidroxi-isourato.
Fonte: Gabson et al., 2008.

Como citado anteriormente, a UC em humanos não é funcional, assim, o conhecimento das vias do metabolismo das purinas é de extrema importância, pois, nos seres humanos, esse metabolismo determina a produção de ácido úrico, que em elevadas concentrações é gravemente nocivo, ocasionando, hiperuricemia e gota. Portanto, a partir do entendimento das vias do metabolismo das purinas pode-se conseguir controlar a produção de ácido úrico (WU et al., 1989; BOMALASKI et al., 2002; CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

## 2.2 Metabolismo das Purinas

A hidrólise dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) é realizada por enzimas específicas chamadas DNases e RNases e resulta em mononucleotídeos. Esses, por sua vez, sofrem a ação de fosfatases, que os quebram em fosfato ($PO^{4-}$) e nucleosídeos (um açúcar ligado a uma base nitrogenada). Finalmente, os nucleosídeos são quebrados por nucleosidases, resultando em bases púricas e pirimídicas e açúcares D-ribose ou D-desoxirribose (VOET et al., 2005).

As purinas (Figura 5) são cruciais para uma série de funções fisiológicas, sendo essenciais para a construção de ácidos nucléicos (DNA e RNA), mensageiros extra e intracelulares (adenosina trifosfato e acoplada a proteína G), reguladores metabólicos (adenosina monofosfato), coenzimas, antioxidantes e neurotransmissores (CANNELLA; MIKULS, 2005).

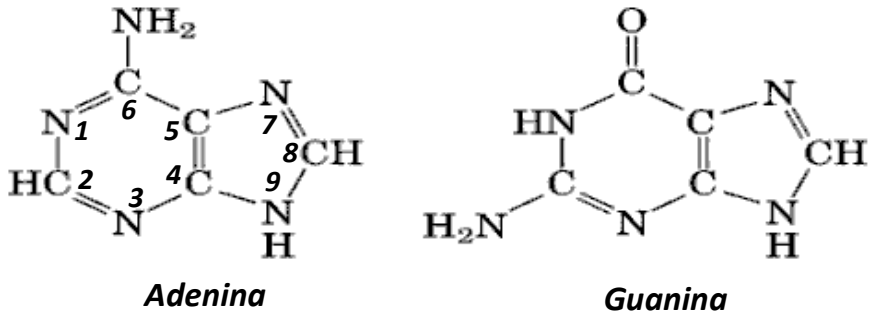



**Figura 5 -** Representação estrutural das bases nitrogenadas purínicas.

Em 1948, John Buchanan obteve os primeiros indícios da síntese *de novo* dos nucleotídeos purínicos estudando a origem dos átomos do anel purínico (Figura 5). Esse anel é sintetizado a partir de aminoácidos como a glicina, que fornece os carbonos C4 e C5 e o nitrogênio N7; o aspartato que fornece o nitrogênio N1, e a glutamina, que fornece os outros dois átomos de nitrogênio N3 e N9, que estão presentes no grupamento amida da cadeia lateral da glutamina. Os derivados ativos do tetra-hidrofolato fornecem dois átomos de carbono —C2 e C8—, enquanto o $CO_2$ fornece o carbono C6 para o anel purínico (ZANG; DIXON, 1992; VOET et al., 2005).

### 2.2.1 Biossíntese dos Nucleotídeos Purínicos

Existem dois mecanismos de biossíntese dos nucleotídeos purínicos: síntese *de novo* e via *de recuperação* ou *de salvamento* das purinas. Os nucleotídeos de purinas são mantidos em "pools" intracelulares por meio de uma combinação da via *de novo* e da via de recuperação (ROLFES, 2006). A via *de novo* inicia-se com a ribose 5-fosfato, formada, principalmente, na via da pentose fosfato, na presença da enzima ribose fosfato pirofosfoquinase e de adenosina trifosfato (ATP), dando origem a 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP). O grupo pirofosfato é transferido do ATP para o carbono 1 da ribose 5-fosfato. Em seguida, um percurso de dez passos da via *de novo* converte o PRPP ao primeiro nucleotídeo de purina, IMP (inosina monofosfato). O IMP é um ponto de ramificação da via biossintética com dois passos adicionais necessários para a produção de AMP (adenosina monofosfato) e GMP (guanosina monofosfato) (Figura 6). Essa capacidade de catalisar a formação de nucleotídeos pela via *de novo* permite uma independência dos organismos das fontes alimentares (ROLFES, 2006).

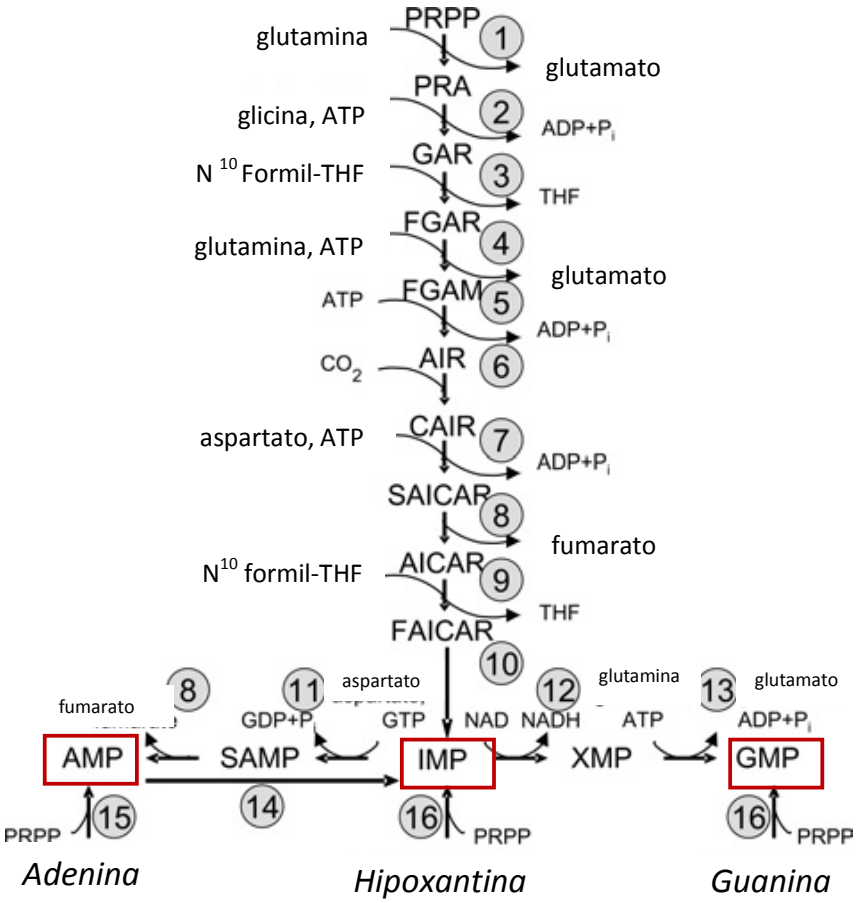



**Figura 6 –** Representação esquemática da via *de novo* e da via *de recuperação*. A via *de novo* para sintetizar o IMP é composta por dez reações (1 a 10). Para sintetizar o AMP a partir do IMP são necessárias duas reações (8 e 11) e a síntese de GMP a partir do IMP consiste de duas reações (12 e 13). O percurso da via *de recuperação* consiste das reações 14, 15 e 16. As enzimas que catalisam as reações estão numeradas de 1 a 16: (1) glutamina fosforibosilpirofosfato amidotransferase; (2) glicinamida ribonucleotídeo sintase; (3) glicinamida ribonucleotídeo transformilase; (4) formilglicinamido sintase; (5) aminoimidazol ribonucleotídeo sintase; (6) aminoimidazol ribonucleotídeo carboxilase; (7) succinilaminoimidazol carboxiamida ribonucleotídeo sintase; (8) adenilsuccinato liase; (9) aminoimidazol carboxiamida ribonucleotídeo transformilase; (10) IMP ciclohidrolase; (11) adenilsuccinato sintase; (12) IMP dehidrogenase; (13) GMP sintase; (14) AMP deaminase; (15) adenina fosforibosiltransferase e (16) hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase.
Os produtos e intermediários da reação compreendem: AIR:5-aminoimidazol ribonucleotídeo; AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo; CAIR: carboxiaminoimidazol ribonucleotídeo; FAICAR: 5-fosforibosil-4-carboxamida-5-formamidoimidazol; FGAM: 5-fosforibosil-*N*-formilglicinamidina; FGAR: *N*-formilaminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo; GAR:glicinamida ribonucleotídeo; PRA: 5-fosfo-$\beta$-ribosilamina; SAICAR: *N*-succinil-5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo; SAMP: adenilsuccinato; THF:tetrahidrofolato; XPM: xantosina 5'monofosfato
Fonte: Rolfes, 2006

Na via *de recuperação* ou de *salvamento*, as purinas livres (adenina, guanina ou hipoxantina) são reconvertidas aos seus nucleotídeos correspondentes. Nesse caso, o PRPP é utilizado para reciclar as bases purínicas com menos gasto de energia do que nas reações da via *de novo* (Figura 6). Os ácidos nucléicos e os nucleotídeos sofrem degradação hidrolítica, liberando as bases purínicas que se ligam à porção da ribose fosfato do PRPP para formar o nucleotídeo correspondente. A enzima adenina fosforribosil transferase na presença de adenina mais PRPP catalisa a formação de adenina 5'monofosfato (AMP) e a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT), na presença de PRPP e hipoxantina ou guanina, catalisa a formação de inosina 5'monofosfato (IMP) e guanina 5'monofosfato (GMP), respectivamente (VOET et al., 2005; ROLFES, 2006).

A via *de novo* é regulada por retroalimentação. O primeiro controle é exercido pela formação de fosforribosilamina a partir de PRPP e de glutamina, sendo essa reação catalisada pela enzima glutamina PRPP amidotransferase. Após a formação de fosforribosilamina, o anel purínico é montado sobre a ribose fosfato. O último átomo do anel purínico é fornecido pelo $N^{10}$-formil-tetra-hidrolato formando o 5-formamidoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo (CRF). Em seguida esse composto sofre desidratação e ocorre o fechamento do anel, formando o IMP. O IMP é precursor do AMP e GMP e os três são retroinibidores da biossíntese de nucleotídeos purínicos porque inibem a 5-fosforribosil-1-fosfato sintetase, regulando assim, os níveis de PRPP (VOET et al., 2005).

O segundo controle é exercido por AMP, GMP e pela formação de ribonucleotídeos purínicos, por meio da inibição da enzima glutamina PRPP amido transferase. Além disso, quando em altos níveis, o IMP liga-se à enzima HGPRT o que promove sua inibição por retroalimentação.

### 2.2.2 Degradação dos Nucleotídeos Purínicos

Os nucleotídeos das purinas são degradados por meio de uma via (Figura 7) na qual o grupo fosfato (Pi) é perdido pela ação da enzima 5'-nucleotidase. Em seguida, a adenosina monofosfato (AMP) libera a adenosina, que é então desaminada para inosina pela enzima adenosina desaminase, e a inosina é hidrolisada para liberar a D-ribose e a base hipoxantina. A hipoxantina é oxidada sucessivamente a xantina e para ácido úrico pela enzima xantina oxidase (XO), uma flavoenzima que contém um átomo de molibdênio e quatro centros ferro-enxofre em seu grupo prostético.

O receptor de elétrons nessa reação complexa é o oxigênio molecular. A guanosina monofosato (GMP) também libera ácido úrico como produto final (Figura 7). O GMP é hidrolisado em guanosina que é clivada para liberar D-ribose e a base guanina. A guanina sofre remoção hidrolítica do seu grupo amino para liberar xantina que é convertida em ácido úrico pela enzima xantina oxidase (NELSON; COX, 2006).

Nos seres humanos, o ácido úrico é o produto final do catabolismo das purinas, originando-se em parte das purinas ingeridas, e em parte pela renovação dos nucleotídeos purínicos dos ácidos nucléicos. Como o ácido úrico é um ácido fraco (pKa 5,8), em pH fisiológico, encontra-se na forma de íon urato, que possui uma estreita faixa de solubilidade (3,3 mg/dL a 6,9 mg/dL). Quando a concentração sérica do urato excede, aproximadamente, 7,0 mg/dL pode ocorrer sua precipitação em forma de cristais de urato monossódico, principalmente, nos espaços articulares dos joelhos, calcanhares e artelhos. Essa deposição de urato desencadeia uma resposta inflamatória, a partir de leucócitos e células sinoviais que disparam a liberação de citoquinas amplificando o local da reação inflamatória. Portanto, a superprodução de ácido úrico é o fator responsável pelo desenvolvimento de hiperuricemia e gota (CANNELLA; MIKULS, 2005; FELS; SUNDY, 2008; SO, 2008).

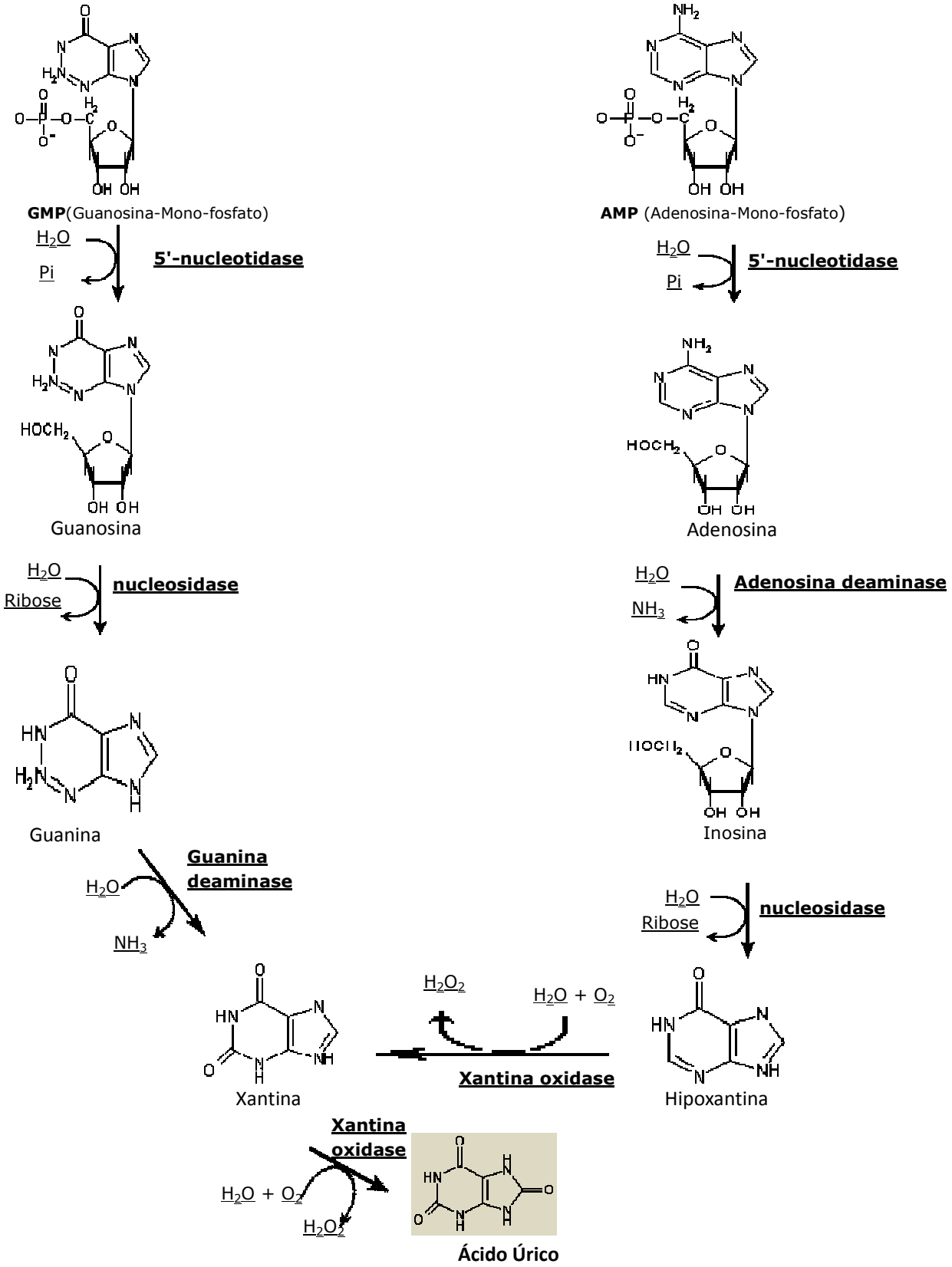



**Figura 7 -** Via de degradação dos nucleotídeos purínicos

## 2.3 Gota e Hiperuricemia

A primeira referência escrita sobre gota data de 2600 a.C., quando os egípcios a descreveram como “podagra” ou artrite gotosa, geralmente no dedão do pé. Em 400 a.C., Hipócrates, postulou seus aforismos sobre a gota. O termo "gota" vem do latim – "gutta" – e traduz o conceito humoral, segundo o qual haveria, nessa enfermidade, um gotejar de humores de uma a outra parte do corpo. Por muito tempo, a gota foi conhecida como “a doença dos reis" devido à sua associação com consumo de alimentos finos e álcool (PILLINGER; ROSENTHAL; ABELES, 2007).

Apesar de ser conhecida desde a Antiguidade, a relação entre a gota e o excesso de ácido úrico circulante demorou a ser descoberta. Em 1679, Anton von Leeuwenhoek, o inventor do microscópio, viu pela primeira vez os cristais de urato. Após centenas de anos, o médico Alfred Garrod afirmou que o urato era a causa da inflamação gotosa, em 1931, Garrod’s son Archibald declarou que a gota era um erro inato do metabolismo. Somente por volta de 1960 com o entendimento sobre a bioquímica da produção de ácido úrico pelo organismo, foi possível explorar de forma mais ampla a causa dessa doença (PILLINGER; ROSENTHAL; ABELES, 2007).

A gota é uma doença inflamatória caracterizada, inicialmente, por ataques recorrentes de artrite aguda, provocados pela precipitação, nos espaços articulares, de cristais de urato monossódico provenientes dos fluidos corporais supersaturados. Em uma descrição clássica de crise aguda de gota, observou-se que a dor frequentemente começa à noite e é intensa o suficiente, para despertar o paciente. Embora qualquer articulação possa ser afetada, mais da metade das crises iniciais afetam as mãos e o hálux, o qual é eventualmente afetado em aproximadamente 90% dos pacientes com gota (RIDER; JORDAN, 2010).

A manisfestação mais comum da gota é uma artrite por inflamação das juntas com dor agonizante e aparecimento repentino. Quando ocorre com muita frequência, tende a se cronificar, podendo ocorrer a deformação das articulações (LIN; LIN; CHOU, 2000). A agressão constante das articulações pela deposição de cristais de urato faz com que ocorram focos inflamatórios conhecidos como tofos, originando a gota tofaceosa que é uma evolução crônica e insidiosa que acontece depois de dez anos ou mais. As lesões das articulações podem fazer com que elas tornem-se funcionalmente incapazes com o passar do tempo. Além disso, depósito de sais de urato pode ocorrer em outros locais, por exemplo, no tecido

subcutâneo, nos rins e na bolsa sinovial (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007; SO, 2008).

O ácido úrico é excretado pelos rins, pela bile e pelo intestino. Nos pacientes com gota, ou com excesso de ácido úrico, podem evoluir para um quadro de insuficiência renal. Isso se deve ao fato de que esse órgão é a mais importante das vias de eliminação do ácido úrico. Os problemas renais decorrem da maior possibilidade de formação de cálculos de urato, prejudicando o seu funcionamento e frequentemente ocorre uma hipertensão concomitante (CANNELLA; MIKULS, 2005).

Embora a hiperuricemia (alta concentração de ácido úrico no sangue) seja fundamental para todas essas alterações teciduais, ela não é a única determinante. Portanto, deve-se fazer uma distinção clara entre a hiperuricemia, que é uma anomalia bioquímica, e a gota, que é uma doença (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

Um nível plasmático de urato acima de 7 mg/dL é considerado elevado, visto que excede o valor de saturação para o urato a 37 °C e pH fisiológico. Por essa definição, de 2 a 18% da população do mundo ocidental apresenta hiperuricemia, mas a frequência de gota varia de 0,13% a 0,37%, portanto, esses indivíduos possuem hiperuricemia assintomática. É pouco conhecido o motivo pelo qual alguns pacientes com taxas elevadas de ácido úrico desenvolvem os sintomas clássicos da artrite gotosa, enquanto outros, por razões diversas, também apresentando taxas elevadas, não desenvolvem a doença (LIN; LIN; CHOU, 2000).

A gravidade da hiperuricemia é devido às amplas consequências patológicas desencadeada nos tecidos subcutâneos, nas juntas, nos rins e no cérebro. Além disso, uma elevação brusca no nível de ácido úrico no sangue pode ser letal (MASERA et al., 1982; SCHIAVON et al., 2000; CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

Outra condição associada com a hiperuricemia é a síndrome da lise tumoral (TLS). A TLS é uma grave complicação que pode ocorrer espontaneamente devido à uma rápida proliferação de células malignas ou durante a quimioterapia agressiva que cause a lise celular. A liberação dos componentes intracelulares pode ocasionar a hipercalemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia (devido à precipitação com fosfato) e a hiperuricemia (devido à degradação de ácidos nucléicos e ao metabolismo das purinas) (DEL TORO; MORRIS; CAIRO, 2005; SOOD et al., 2007).

A hiperuricemia também ocorre com alta frequência após transplante de órgãos, mesmo depois de meses ou anos. Isso porque a função renal e, consequentemente, a excreção de ácido úrico estão comprometidas, devido ao uso de agentes imunosupressores, como a

ciclosporina A, usada para prevenir a rejeição do órgão transplantado, e devido à administração de drogas diuréticas após transplante renal (SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

A gota e hiperuricemia podem estar relacionadas com distúrbios genéticos e, ocasionalmente, podem ser herdadas (RICHES; WRIGHT; RALSTON 2009). Por exemplo, a inativação ou mutações no gene que codifica a enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT) - envolvida na *via de salvamento* das purinas- pode causar hiperuricemia e gota na forma de Lesch -Nyhan. Essa é uma doença recessiva ligada ao X que varia em intensidade, dependendo do tipo de mutação e seu efeito sobre a atividade catalítica de HGPRT. Assim, quando a atividade da HGPRT está grandemente reduzida, a *via de salvamento* torna-se inoperante e as purinas não são reconvertidas a nucleosídeos; em lugar disso, são transformadas em urato, ocasionando hiperuricemia e gota.

Outra forma de gota de origem genética ocorre em pacientes com mutações ativadoras na fosforribosil pirofosfato sintetase, uma enzima que esta envolvida na síntese *de novo*. Nesse caso, ocorre uma desordem que resulta no aumento da produção de purinas com hiperuricemia. Gota e hiperuricemia também podem ocorrer em pacientes com doenças do armazenamento de glicogênio e alguns outros raros erros inatos do metabolismo. Assim, a deficiência de glicose 6–fosfatase ocasiona a doença de von Gierke, que resulta do acúmulo de glicogênio hepático e renal, hipoglicemia em jejum, acidose láctica, hipertrigliceridemia e hiperuricemia promovido pela deficiência da enzima glicose 6-fosfatase. Nesse caso, a hiperuricemia é produzida pela elevação da síntese *de novo* e redução da excreção de uratos em consequência da acidose láctica (RICHES; WRIGHT; RALSTON 2009).

Outros fatores responsáveis pela gota e hiperuricemia são a deficiência na modulação da aminotransferase, baixa excreção renal do ácido úrico ocasionada por uma disfunção renal, além de fatores ambientais como estilo de vida e hábitos alimentares. Uma dieta com excesso de purinas (rica em carnes e frutos do mar), ingestão de álcool (especialmente cerveja), frutose (especialmente refrigerante) aumentam consideravelmente os níveis de ácido úrico (CANNELLA; MIKULS, 2005; RIDER; JORDAN, 2010).

Geralmente, a gota afeta adultos entre 30 e 50 anos de idade, sendo cinco vezes mais comum em homens do que em mulheres (RICHES; WRIGHT; RALSTON 2009). No mundo ocidental, existe uma forte evidência epidemiológica de que a prevalência de gota e hiperuricemia está aumentando. Wallace e colaboradores estimaram que entre 1990 e 1999, houve um aumento de 60% na prevalência de gota para a população acima de 65 anos e uma

duplicação para a população acima de 75 anos. Nos Estados Unidos, encontramos mais de três milhões de doentes (PILLINGER; KEENAN, 2008). No Reino Unido e Alemanha, a prevalência de gota na população adulta foi estimada em 1,4%, com um pico de mais de 7% em homens acima de 75 anos. Isso sugere que a gota é a forma mais comum de artrite inflamatória, principalmente em homens, e está em aumento.

Essa tendência não foi observada somente na população ocidental, mas também em países em desenvolvimento na Ásia. Além disso, existe uma forte associação entre hiperuricemia e síndromes metabólicas (resistência a insulina, hipertensão, obesidade e dislipidemia) que também estão em aumento nesses países (SO, 2008).

Diante dessas considerações, notamos que a elevada concentração de ácido úrico presente nos seres humanos acarreta sérias consequências prejudiciais à saúde. Essa é uma questão intrigante no processo de evolução das espécies, pois a enzima UC tornou-se inativa, nos seres humanos, o que resultou em níveis elevados de ácido úrico na corrente sanguínea quando comparados, principalmente, com outros mamíferos.

Entretanto, de acordo com uma série de estudos, o nível elevado de ácido úrico tem sido associado não só a efeitos negativos à saúde humana, pelo contrário, o excesso de ácido úrico está associado a vantagens estratégicas evolutivas de sobrevivência, principalmente, devido ao seu potente efeito antioxidante e sequestrador de radicais livres (AMES et al., 1981; WU et al., 1989; BERGER et al., 1998; KAHN; TIPTON, 1998; CANNELLA; MIKULS, 2005) o que contribui para uma maior expectativa de vida, e está associado com a diminuição do índice de câncer (PILLINGER; KEENAN, 2008; ANGERMULLER; ISLINGER; VOLKL, 2009). O nível elevado de ácido úrico também protege contra doenças degenerativas neurológicas (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007) e possui propriedades imunoestimulatórias (SO, 2008). Além disso, a inativação da UC pode estar relacionada com o aumento da inteligência e melhora na capacidade dos seres humanos em reter sal (MAZZALI et al., 2001; BLEYER; HURT, 2006).

Contudo, apesar de o ácido úrico conferir certas vantagens biológicas, muitas pessoas ainda sofrem com as doenças associadas à sua elevada concentração plasmática. Portanto, a busca de novas terapias para um tratamento de gota e hiperuricemia eficiente, seguro e que facilite a adesão do paciente deve ser investigada (PILLINGER; ROSENTHAL; ABELES, 2007).

### 2.3.1 Tratamento de Gota e Hiperuricemia

Nas últimas décadas, vários estudos têm relatado o aumento na incidência e na prevalência de gota. É consenso que a manutenção dos níveis de urato no soro abaixo do limite de solubilidade do ácido úrico nos fluidos extracelulares (6,8 mg / dL) por longo tempo, é necessário para o sucesso do tratamento de pacientes com persistente ou progressivo sintomas de gota. De acordo com esses objetivos, estudos clínicos têm indicado como meta manter os níveis de urato em menos de 6,0 mg/dL e diretrizes mais rigorosas em menos de 5,0 mg / dL (CHOHAN; BECKER, 2009).

Existem duas abordagens para redução de urato nos quadros de gota que podem ser classificadas como estratégias não-farmacológicas e farmacológicas. Estratégias não-medicamentosas redutoras do ácido úrico envolvem alterações no estilo de vida tais como: mudanças na composição e quantidade da dieta alimentar, perda de peso, redução do consumo de álcool e suplementação da dieta alimentar com vitamina C (HUANG et al., 2005; HAK; CHOI, 2008).

No entanto, mesmo quando as alterações no estilo de vida podem ser respeitadas, muitas vezes, elas não são suficientes para atingirem a redução de urato estabelecida para o controle da gota. Nesse caso, a terapia farmacológica é em última instância indicada (CHOHAN; BECKER, 2009).

É importante ressaltar que grande parte dos indivíduos com hiperuricemia assintomática não desenvolve gota clínica, por isso, na maioria dos casos, o tratamento farmacológico não é necessário (HARRIS; LLOYD; LEWIS, 1995).

No entanto, a hiperuricemia deve ser vista como um marcador de co-morbidades associadas como diabetes tipo 2, resistência a insulina, hipertrigliceridemia, hipertensão. Essas co-morbidades devem ser avaliadas e tratadas com medicamentos (BECKER; JOLLY, 2006). Além disso, a terapia de redução de ácido úrico é indicada para pacientes com risco de síndrome de lise tumoral, devido ao elevado *turnover* celular, como ocorre nos tratamentos para leucemia (CANNELLA; MIKULS, 2005).

Os tratamentos para gota podem ser divididos em terapias para gota aguda e gota crônica. O objetivo da terapia na crise aguda é a rápida resolução da dor e da inflamação. Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são o tratamento de escolha na maioria dos pacientes com gota aguda e que não apresentam outros problemas de saúde. A dose máxima de AINE deve ser iniciada rapidamente, diminuindo 24h após a completa eliminação dos

sintomas. A escolha do AINE não é tão importante quanto o início da terapia durante uma crise de gota (CANNELLA; MIKULS, 2005).

Infelizmente, o uso de AINE é limitado pelos seus efeitos colaterais e deve ser usado com muita cautela, por pacientes que apresentem insuficiência renal, insuficiência cardíaca, insuficiência hepática, e úlcera gastrintestinal e por pacientes que fazem uso de anticoagulantes orais. É importante destacar que esses efeitos colaterais são agravados nos idosos (CANNELLA; MIKULS, 2005; RIDER; JORDAN, 2010).

Outro medicamento usado para gota aguda é a Colchicina. Esse medicamento é um alcalóide derivado do *autum crocus* (*Colchicum autumnale*). A Colchicina é um agente anti-mitótico utilizado amplamente como substância experimental para estudar a divisão e a função celulares. Ela não influencia a excreção renal de ácido úrico ou a sua concentração no sangue. Em virtude de ligar-se à tubulina, a Colchicina interfere na função dos fusos mitóticos e causa a despolimerização e desaparecimento dos microtúbulos fibrilares dos granulócitos e outras células móveis. Isso faz com que a migração dos granulócitos para a região inflamada seja inibida e ocorra a redução das atividades metabólica e fagocitária dessas células, reduzindo a liberação do ácido láctico e de enzimas pró-inflamatórias, que ocorre durante a fagocitose, rompendo o ciclo que resulta na resposta inflamatória (CHOI; MOUNT; REGINATO, 2005).

O uso da Colchicina por via oral é limitado pelos seus efeitos colaterais como náuseas, vômito, diarreia e dor abdominal. A maior toxicidade da Colchicina está relacionada com neuropatias e miopatias. A Colchicina não deve ser usada em pacientes com leucopenia ou significativa insuficiência renal ou hepática. A Colchicina intravenosa (IV) deve ser usada somente em ambiente hospitalar, por médicos com experiência em seu uso porque existem casos relatados de morte devido ao uso inadequado de Colchicina por via IV (CANNELLA; MIKULS, 2005; RIDER; JORDAN, 2010).

Para o tratamento de gota aguda, os corticosteróides são uma boa alternativa quando o AINE e a Colchicina não podem ser usados. Os corticosteróides são eficazes por causa de seu efeito antiinflamatório e podem ser administrados via oral, intravenosa (IV) e intramuscular (IM) ou indiretamente via corticotropina (ACTH). (CANNELLA; MIKULS, 2005; RIDER; JORDAN, 2010).

Apesar de serem usados por mais de 50 anos no tratamento de crise aguda de gota, o exato mecanismo de ação responsável pela eficácia dos corticosteróides sistêmicos no tratamento de gota é desconhecido. No entanto, não foram encontrados problemas de

segurança a respeito do uso de corticosteróide. Além disso, os corticosteróides, como o Prednisona, apresentam menos efeitos colaterais que outros tratamentos agudos, quando utilizados por curto prazo, especialmente nos idosos (CANNELLA; MIKULS, 2005; RIDER; JORDAN, 2010).

Se, por um lado não há dúvida de que a artrite gotosa aguda deve ser tratada para tentar minimizar a dor e desconforto do paciente, por outro, existem algumas controvérsias sobre quando iniciar a terapia crônica de diminuição de urato (CANNELLA; MIKULS, 2005).

A terapia crônica de redução de urato é custo/efetiva para pacientes que têm duas ou mais crises de gota por ano e possuem concentração de ácido úrico > 13 mg/dL (homens) e > 10 mg/dL (mulheres). Alguns médicos defendem o tratamento da gota em pacientes que sofrem de quatro ou mais crises por ano. O objetivo geral da terapia anti-hiperuricêmica é a redução da concentração de ácido úrico para menos de 6 mg/dL, ou seja, abaixo do nível em que o urato está saturado no fluido extracelular (CANNELLA; MIKULS, 2005).

Existe uma série de medicamentos empregados no tratamento de gota crônica e podemos organizá-los em classes de acordo com seu mecanismo de ação. A classe mais comum empregada para diminuição de urato compreende os agentes uricoestáticos, que atuam inibindo a ação da enzima xantina oxidase (XO), acarretando a diminuição da síntese de ácido úrico.

Durante os últimos 30 anos, o Alopurinol tem sido essencial no tratamento crônico e responde por 90% das terapias de diminuição de urato, sendo a dose recomendada de 200mg a 300 mg diariamente. O Alopurinol é um análogo estrutural da hipoxantina, substrato natural da enzima, diferenciando-se desta na posição do átomo de nitrogênio no anel imidazólico, que passa a ser pirazólico. A mudança faz com que a enzima se associe ao inibidor (Alopurinol) com afinidade 15 a 20 vezes superior, reduzindo sua capacidade de produzir xantina. Além disso, essa reação origina o metabólito do Alopurinol – oxipurinol ou aloxantina –, molécula que inibe a enzima de forma mais eficiente que o precursor, devido à sua meia-vida mais prolongada, 18 a 30 horas, em lugar de apenas 2 a 3 horas (CHOHAN; BECKER, 2009).

Os possíveis efeitos colaterais do Alopurinol incluem erupção cutânea (2%), vasculite, eosinofilia, reações fatais de hipersensibilidade, hepatite, diminuição da função renal e supressão da medula óssea. O Alopurinol exige redução da dose na insuficiência renal, sendo esta a sua rota de excreção (RIDER; JORDAN, 2010).

O Febuxostato é um novo agente, não purínico, que inibe seletivamente a XO independentemente do estado redox e não afeta outras vias enzimáticas no metabolismo de purina/pirimidina. É extensivamente metabolizado por conjugação via glucuronosil transferase uridina difosfato e, em menor medida pelo sistema citocromo P450. A dose recomendada para uma eficiente redução do nível de ácido úrico é 80 mg diariamente (TAKANO et al., 2005; CHOHAN; BECKER, 2009).

Assim, os dois agentes (Alopurinol e o Febuxostato) atuam sobre a xantina oxidase. O Febuxostato apresenta estrutura distinta à das purinas, não competindo com elas na associação ao sítio catalítico da XO. Sua ação envolve bloqueio da passagem de substratos por um canal que dá acesso ao sítio ativo da enzima, mecanismo mais eficiente que o processo competitivo, permitindo ação hipouricemiante mais potente e prolongada que a do Alopurinol (MAYER et al., 2005).

Outra vantagem do Febuxostato é a sua seletividade com relação à xantina oxidase, não interferindo com outras enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos nucléicos. Decorre daí a menor incidência de efeitos colaterais comuns na terapia com Alopurinol, como hipersensibilidade, intolerância gastrintestinal e lesões de pele, que surgem em 20% dos pacientes tratados, obrigando 5% deles a suspender o tratamento. Assim, o Febuxostato parece ser bem tolerado, apresentando como efeitos colaterais mais comuns diarréia, alterações no tecido conjuntivo, rubor, tonturas, confusão, mialgia e taquicardia (SCHUMACHER, 2005).

A segunda classe de drogas empregadas na terapia de diminuição de ácido úrico são os agentes uricosúricos, capazes de aumentar a depuração renal do urato. Eles são usados em 15% dos pacientes com gota (PEREZ-RUIZ et al., 1998). Benzobromarona, sulfinpirazona e probenecida reduzem a reabsorção do ácido úrico. No início da década de 1980 surgiu a benzobromarona, quimicamente similar ao antiarrítmico amiodarona, considerado o uricosúrico mais potente dentre os conhecidos. Agentes cardiovasculares como losartan (anti-hipertensivo antagonista do receptor da angiotensina II) e fenofibrato (hipolipêmico) apresentam propriedades uricosúricas moderadas e vêm sendo receitados no controle da gota (CANNELLA; MIKULS, 2005).

### 2.3.2 Aplicações Terapêuticas da Uricase

Devido à sua elevada especificidade pelo ácido úrico a UC desempenha importantes funções como uma enzima terapêutica. Na área de análises clínicas, essa enzima é empregada em *Kits* laboratoriais de diagnósticos e biosensores para a detecção de urato (KLOSE et al., 1978; MARTINEZ-PEREZ; FERRER; MATEO, 2003; HUANG et al., 2004; ARORA et al., 2007), cujas dosagens no sangue e na urina são responsáveis pelo diagnóstico de hiperuricemia e gota.

Além disso, a capacidade de a UC converter o ácido úrico em alantoína e diminuir rapidamente o nível de ácido úrico no plasma (LONDON; HUDSON, 1957; ALTMAN; SMULL; BARRON, 1959; MASERA et al., 1982) fez com que essa enzima fosse explorada para originar uma possível terapia com objetivo de reduzir os níveis de ácido úrico em humanos (VOGT, 2005; CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

Como descrito anteriormente, as terapias tradicionalmente empregadas para redução de ácido úrico envolvem: a diminuição da síntese de ácido úrico pela inibição da enzima xantina oxidase, indução da diurese forçada e alcalinização urinária. Contudo, essas terapias apresentam vários efeitos colaterais, sendo frequentemente ineficazes, e complicações graves podem ocorrer, como uma elevação brusca no nível de ácido úrico no sangue, o que pode ser fatal (MASERA et al., 1982; SCHIAVON et al., 2000).

Inúmeras tentativas para administrar a UC extraída de várias fontes ou expressa em organismos recombinantes foram realizadas. No início dos anos 1940, Oppenheimer e colaboradores (OPPENHEIMER, 1941; OPPENHEIMER; KUNKEL, 1943) e depois London e Hudson (1957), iniciaram os testes de adminstração de UC em humanos, no entanto, a utilização da UC apresentou sérias limitações, como reações de hipersensibilidade e imunogenicidade (SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

A primeira UC empregada com finalidade terapêutica foi a forma nativa de *Aspergullus flavus* usada para prevenir e tratar hiperuricemia ocasionada por quimioterapia (TSL). A enzima (Uricozyme$^{TM}$, Sanofi-Synthelabo) foi introduzida na França em 1975 e na Itália em 1984 (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

A sua natureza proteica, produção demorada e baixa pureza foram fatores limitantes para uma ampla aplicação dessa enzima, além do fato de que a administração de uma molécula exógena ocasionou reações de hipersensibilidade. O principal fator responsável pelas reações de hipersensibilidade e imunogenicidade foi o grande número de impurezas

presentes na preparação; as reações alérgicas ocorriam dentro de 1 a 7 minutos depois do início da primeira infusão (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007). Contudo, apesar de estar associada a reações de hipersensibilidade agudas, mesmo em pacientes sem histórico de alergias, a Uricozyme™ demonstrou ser um agente uricolítico mais efetivo do que o Alopurinol (MASERA et al., 1982; MASSON et al., 1996).

Desde 1996, a UC que está em uso é a forma recombinante de *Aspergullus flavus* expressa em *Saccharomyces cerevisiae*, Rasburicase (Fasturtec ™ na Europa, Elitek™ nos EUA). A forma recombinante, Rasburicase, é obtida mais rapidamente e em grande quantidade, além de ser obtida com maior grau de pureza e possuir maior atividade que a forma nativa. Do ponto de vista farmacodinâmico, a diferença entre a UC nativa (Uricozyme) e a recombinante (Rasburicase) é a redução dos efeitos colaterais (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007). De acordo com certos estudos, foi demonstrado a presença de anticorpos anti-Rasburicase em alguns pacientes (PUI et al., 2001), enquanto outros trabalhos relatam que não houve desenvolvimento de anticorpos após vários dias de terapia (GOLDMAN et al., 2001).

A Rasburicase (Figura 8) é uma interessante alternativa no tratamento de gota e hiperuricemia, principalmente quando o Alopurinol não pode ser administrado devido à alergia ou por falta de efeito. A grande vantagem da Rasburicase é que ela reduz o volume dos tofos e gera alantoína que é facilmente excretada pelos rins, mesmo em casos de insuficiência renal crônica (VOGT, 2005; CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

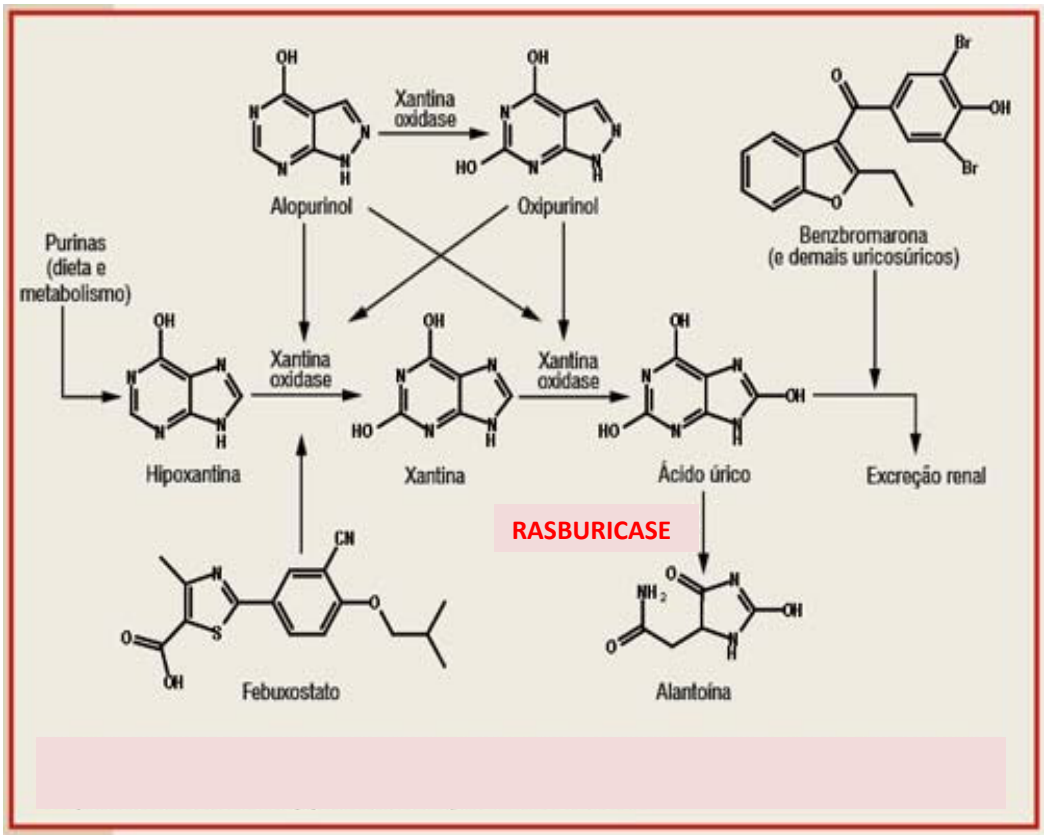



**Figura 8** - Diferentes modos de ação de drogas aplicadas no tratamento de gota e hiperuricemia
Fonte: Nothenberg, M., 2009.

A dose recomendada da Rasburicase é de 0,20 mg / kg diluídos em 50 mL de solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%) administrados intravenosamente durante 30 minutos, diariamente ou duas vezes por dia, durante 5 a 7 dias. Doses menores que a padrão e por um período menor têm sido testadas (HUMMEL et al., 2005).

Uma única dose da Rasburicase demonstrou uma redução rápida da hiperuricemia em pacientes sob tratamento por quimioterapia (LIU; SIMS-MCCALLUM; SCHIFFER, 2005; HUTCHERSON et al., 2006; McDONNEL et al., 2006; TRIFILIO et al., 2006).

A eficácia da Rasburicase na prevenção e tratamento de síndrome da lise tumoral (TLS) tem sido bem demonstrada, apesar do custo elevado. No entanto, reações de hipersensibilidade e o desenvolvimento de anticorpos comprometem a sua eficácia, e o risco aumenta com a frequência de uso. Em outros quadros de hiperuricemia, como na gota crônica, o tratamento é difícil porque a Rasburicase tem um tempo de meia-vida curto o que exige a aplicação diária da enzima (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

Uma vez que os humanos não produzem a UC ativa, todas as formas dessa enzima são altamente antigênicas e a administração de múltiplas doses da UC resulta em reações alérgicas, anafilaxia e pode ser fatal (BOMALASKI et al., 2002; PASUT et al., 2008), restringindo o uso dessa enzima como um agente terapêutico (FITZPATRICK; FITZGERALD; McGEENEY, 1971; BROGARD et al., 1972; SCHIAVON et al., 2000; CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007; SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

Com a finalidade de superar os principais obstáculos para uma aplicação terapêutica da UC, a tecnologia de *PEGlação* mostra-se como uma eficiente estratégia, com o objetivo de diminuir sua imunogenicidade, prolongar seu tempo de meia-vida, além de manter sua atividade biológica (SCHIAVON et al., 2000; BOMALASKI et al., 2002; GANSON et al., 2006; SUNDY et al., 2007; SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

## 2.4 Modificação Química de Biomoléculas com Polietilenoglicol (PEG)

O uso de proteínas, enzimas, peptídeos e fragmentos de anticorpos como agentes terapêuticos tem expandido-se nos últimos anos. Essa nova tendência deve-se principalmente à descoberta de novos peptídeos e proteínas; ao melhor entendimento dos mecanismos de ação *in vivo*; ao aperfeiçoamento de técnicas envolvidas na expressão ou síntese de proteínas e peptídeos semelhantes a dos humanos e ao desenvolvimento de sistemas de liberação de proteínas e peptídeos *in vivo*, visando melhorar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002).

Ao longo dos anos, surgiram várias estratégias para superar os problemas típicos relacionados às proteínas e polipeptídeos terapêuticos como: degradação proteica frente ao pH, temperatura e ação proteolítica associada à baixa solubilidade; curto tempo de meia-vida e sua imunogenicidade (que dificultam sua aplicação principalmente na forma de terapia injetável) (VERONESE; MERO, 2008).

Em vista dos impressionantes resultados demonstrados com a aplicação de proteínas modificadas, a atenção dos pesquisadores voltou-se para a conjugação de proteínas e peptídeos ao polímero sintético polietilenoglicol (PEG). Atualmente, emprega-se para esses compostos o nome de "PEGylated proteins" e para o procedimento envolvido simplesmente "PEGylation" (VERONESE et al., 1985; INADA et al., 1994; ZHANG; HE; GUAN, 1999; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002; MASUMOTO et al., 2002; CALCETI; VERONESE, 2003; ZHANG; SHI; WEI, 2004; HAAG; KRATZ, 2006).

A tecnologia de *PEGlação* pode ser definida como a modificação química de uma biomolécula (proteína, peptídeo, fragmentos de anticorpos, aptâmeros) por meio de ligação covalente a uma ou mais cadeias de polietilenoglicol (PEG), um polímero não tóxico, não imunogênico, usado como uma estratégia para superar desvantagens associadas a alguns produtos biofarmacêuticos (VERONESE; PASUT, 2005).

As propriedades que a biomolécula pode obter com a *PEGlação* (Figura 9) incluem: *(1)* aumento de solubilidade, *(2)* redução à proteólise, *(3)* diminuição da imunogenicidade, *(4)* diminuição da antigenicidade e *(5)* o aumento no tempo de meia-vida do conjugado, devido à redução da filtração renal e maior estabilidade, o que permite a diminuição da frequência de doses do conjugado.

Uma variedade de proteínas, peptídeos, fragmentos de anticorpos, células sanguíneas, além de drogas compostas de pequenas moléculas tem sido *PEGladas*, devido às favoráveis consequências farmacocinéticas, por isso, essa técnica demonstrou resultados importantes para terapias com uso de proteínas e uso em diagnósticos (CALICETI; VERONESE, 2003; VERONESE; PASUT, 2005; CHO et al., 2007; VERONSE; MERO, 2008; JEVSˇEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010).

Por outro lado, geralmente, ocorre uma diminuição da atividade biológica em decorrência da *PEGlação* das proteínas. No entanto, essa diminuição na atividade biológica é compensada pelo substancial aumento no tempo de meia-vida da proteína *PEGlada* (CALICETI; VERONESE, 2003).

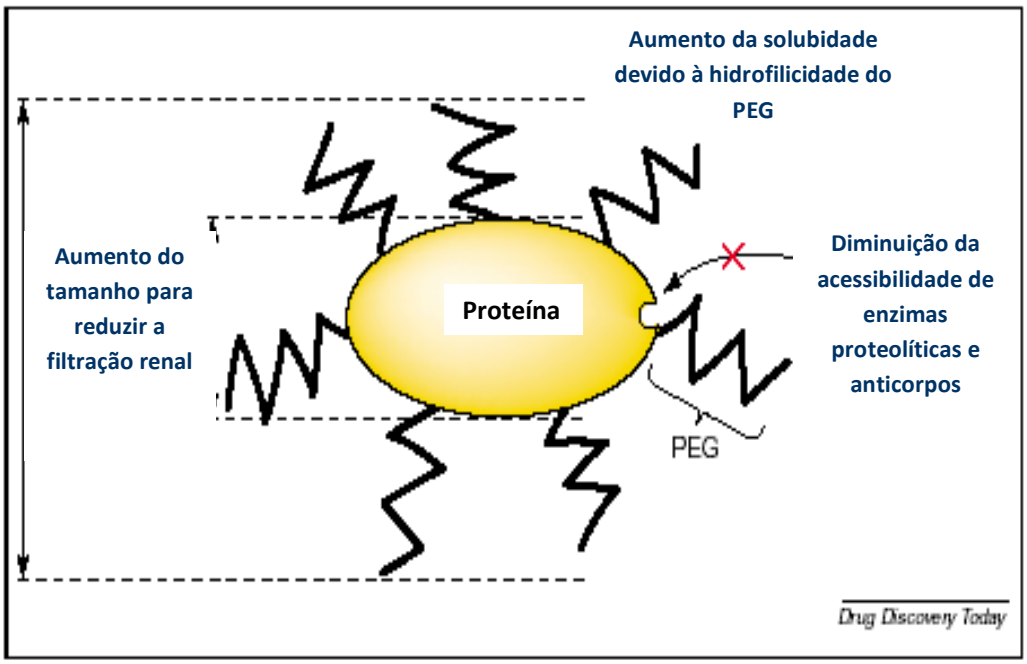



**Figura 9 –** Principais características da proteína *PEGlada.*
Fonte: Veronese; Pasut, 2005.

A tecnologia de *PEGlação* teve início no laboratório do Professor Frank Davis na década de 1970 (DAVIS, 2002) com Abuchowsky, que modificou a albumina e a catalase (ABUCHOWSKI et al., 1977a, 1977b). Até então, nenhuma enzima havia sido modificada tão extensamente, mantendo a atividade enzimática. Naquela época, as proteínas eram consideradas estruturas delicadas e somente modificações suaves e com produtos de baixo peso molecular poderiam ser empregados (VERONESE; PASUT, 2005).

Desde então, a tecnologia de *PEGlação* tem se desenvolvido e expandido e atualmente existem inúmeros métodos químicos e enzimáticos para conjugação de PEG a biomoléculas (ZALIPSKY, 1995; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002; ZHAO et al., 2006; BALAN et al., 2007; FONTANA et al., 2008).

### 2.4.1 Aspectos Físico-Químicos e Biológicos Envolvidos na Tecnologia de *PEGlação*

As principais variáveis estudadas na obtenção de um derivado proteico complexado ao polietilenoglicol (PEG) são o grau de substituição nos resíduos dos aminoácidos-alvo da proteína e o comprimento e as características das cadeias de PEG. Assim, o efeito específico da *PEGlação* sobre as propriedades físico-químicas e biológicas da proteína é determinado pelas propriedades da proteína, do polímero, bem como, pela estratégia de *PEGlação* empregada (CALICETE; VERONESE, 2003).

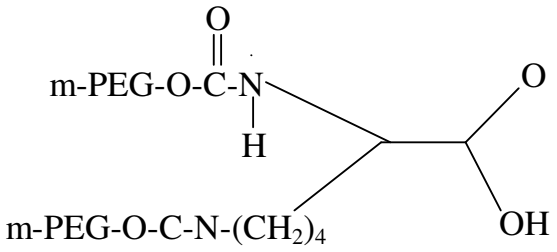
O PEG é um polímero sintético biocompatível podendo ser utilizado como aditivo de medicamentos em xaropes, cremes, pomadas, comprimidos e como veículo de produtos injetáveis, tanto de aplicação intramuscular como endovenosa. O PEG tem sido utilizado em produtos farmacêuticos desde 1970 quando foi aprovado pelo FDA devido à sua baixa toxicidade. Esse polímero pode apresentar vários graus de polimerização, por exemplo, temos o PEG 80, que é líquido, e o PEG 5000, que é sólido (DUCAN; SPREAFICO, 1994; WORKING et al., 1997).

O PEG é comumente encontrado na forma linear ou poliéter ramificado, com grupos hidroxil, tendo a seguinte estrutura geral:

$$HO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}\ CH_2CH_2\text{-}OH \quad \textit{(1)}$$

O PEG mais utilizado para modificação de proteínas e polipeptídeos é o monometoxi-polietilenoglicol (mPEG) que pode apresentar a forma linear ***(2)*** ou ramificada ***(3)*** de diferentes massas moleculares (HARRIS; CHESS, 2003).

$$CH_3O\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}\ CH_2CH_2\text{-}OH \qquad \textit{(2)}$$




***(3)***

Relevantes parâmetros devem ser considerados quando mPEG é conjugado à proteína: a estrutura e massa molecular da proteína, forma do polímero e seu tamanho, além do número de cadeias de polímero ligadas à proteína e a química da conjugação (CALICETI; VERONESE, 2003).

O polímero linear foi o mais utilizado durante vários anos (mPEG 5000 Da), com um grupo metoxila em uma das extremidades e com um grupo hidroxila terminal ***(2)***. Outra forma do polímero é o PEG ramificado (PEG2), caracterizado por duas cadeias de polímero ***(3)*** com um ponto de ligação para conjugação à proteína- alvo. A importância desse produto decorre do fato de que essa forma permite uma maior proteção e encobrimento da superfície da proteína com base no chamado "efeito guarda-chuva" (MONFARDINI et al., 1995; VERONESE et al., 1996). Além disso, o PEG2 permite ligar o dobro da massa do polímero em único resíduo de aminoácido na proteína. Novos formatos de PEG, como PEG bifurcado, multi-braço e em forma de pente, parecem ser a grande promessa para o futuro, pois a estrutura macromolecular do PEG conjugado é crucial para a melhoria das propriedades dos conjugados (JEVSˇEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010).

Comparado com outros polímeros, o PEG apresenta uma estreita faixa de polidispersão (Mw/Mn) de 1,01 para PEGs com pequena massa molecular (< 5 kDa) e de 1,1 para PEGs com elevada massa molecular (> 50 kDa). Esses valores de polidispersão garantem uma maior homogeneidade do polímero (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002).

A mais importante propriedade do PEG é ser anfipático, ou seja, solúvel em água, tolueno,1,1,1-tricloroetano e benzeno. Isso permite que o PEG seja empregado na conjugação de biomoléculas sob condições fisiológicas. Assim, quando o PEG é adequadamente ligado a uma biomolécula, ele modifica muitas de suas características, enquanto suas principais funções biológicas, tais como atividade enzimática ou reconhecimento de receptor são mantidas. A conjugação ao PEG mascara a superfície das proteínas, aumenta a flexibilidade, aumenta o tamanho molecular do composto, reduz sua filtração renal, impede a aproximação de antígenos ou anticorpos e reduz a degradação da mesma por enzimas proteolíticas (VERONESE, 2001; VERONESE; PASUT, 2005).

Por fim, o PEG transfere suas propriedades físico-químicas para moléculas, modificando sua biodistribuição e a solubilidade de drogas. Essas propriedades permitem o surgimento de novas técnicas na biocatálise e na tecnologia farmacêutica, onde muitas drogas insolúveis são solubilizadas por meio da conjugação ao PEG, sendo, dessa forma, mais facilmente administradas (VERONESE et al., 2001; VERONESE; MERO, 2008).

### 2.4.2 Diferentes Estratégias Empregadas na Reação de *PEGlação*

O primeiro obstáculo a ser superado para a realização de um acoplamento bem sucedido de PEG às proteínas foi encontrar uma ligação química suave o suficiente para não danificar a proteína, pois, a maioria das aplicações de conjugação de PEG envolve moléculas lábeis e consequentemente, essa reação requer condições brandas de temperatura e pH (CALICETI; VERONESE; JONAK, 1999). Além disso, para conjugar o polímero (PEG) à cadeia da molécula de proteínas, polipeptídeos, enzimas ou pequenas moléculas orgânicas, é necessário ativar o PEG pela preparação de um derivado de PEG que tenha pelo menos um grupo funcional reativo em sua cadeia. Esse grupo funcional deve atuar como ponto de ligação para a proteína e deve ser escolhido baseando-se no tipo de ligante que estará disponível na molécula proteica (VERONESE; MERO, 2008).

Nas proteínas, os aminoácidos tipicamente reativos que se ligam ao PEG incluem: lisina, cisteína, treonina, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, tirosina, N-terminal e o ácido carboxílico C-terminal. Nos casos de glicoproteínas, grupos hidroxil vicinais podem ser oxidados (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002).

A estratégia amplamente empregada na conjugação do PEG às proteínas tem sido ativar o PEG com grupos funcionais apropriados para reagirem com os radicais de lisinas e N-terminal. Isso porque, a lisina é um dos mais prevalentes aminoácidos nas proteínas e pode até superar 10% de todos os aminoácidos presentes em uma proteína (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002).

Portanto, quando temos o PEG eletrofilicamente ativado, a reação de *PEGlação* vai ocorrer entre o polímero ativado e os aminoácidos com caráter nucleofílico. Nesse caso, é comum acontecer a substituição de vários resíduos de lisina. Essa heterogeneidade na substituição dos resíduos de lisinas e a massa molecular do PEG ativo são responsáveis pelas propriedades físico-químicas e biológicas do conjugado PEG-proteína, pois se o grau de modificação for alto, acarreta um aumento no tempo de meia-vida e reduz a antigenicidade da proteína (CLARK et al., 1996; VERONESE; PASUT, 2005).

Os derivados de PEG mais utilizados para reagirem com aminoácidos de lisina e N-terminal das proteínas estão representados na Figura 10. Eles possuem massa molecular pequena e apresentam pouca seletividade na modificação. Assim, temos como exemplos de PEG derivados: PEG diclorotriazina, PEG tresilato, PEG succinimidil carbonato, PEG benzotriazol, PEG p-nitrofenilcarbonato e PEG succinimidil succinato (VERONESE, 2001; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002).

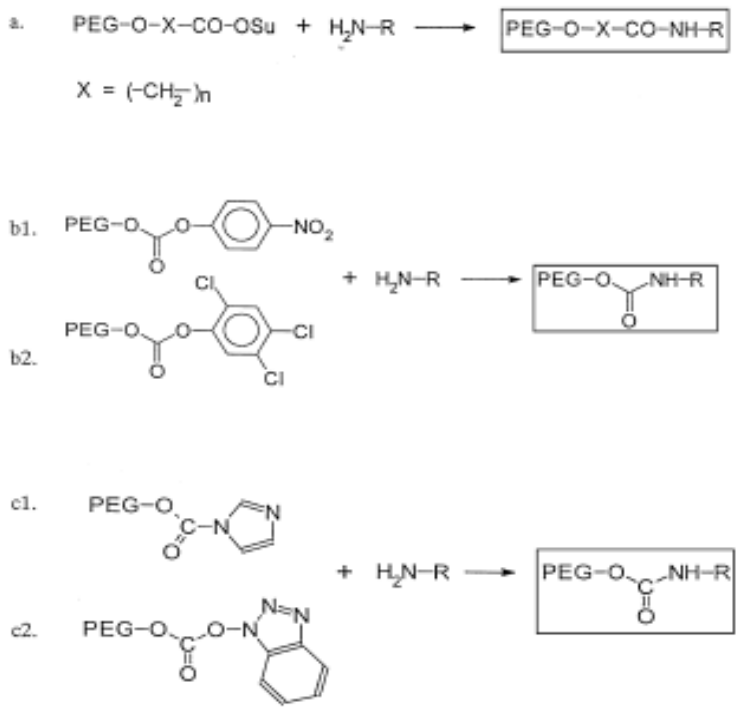



**Figura 10 –** Representação da reação de *PEGlação* de grupos $H_2N$-R com alguns derivados de PEG. (a) ácidos alquila ativados: compostos altamente reativos em direção aos grupos alcenos. (b1) PEG-p-nitrofenilcarbonato; (b2) PEG-triclorofenilcarbonato; (c1) PEG-oxicarbonilimidazol e (c2) PEG-benzotriazol carbonato.
Fonte: Veronese, 2001.

Outras estratégias de conjugação PEG-proteína têm sido exploradas, tais como: conjugação do grupo imidazol da histidina, mas a ligação acil-histidina é pouco estável; reagentes PEG-cisteína podem conjugar as proteínas por meio do tiol presente na cisteína, formando ligações tio-éteres estáveis (por exemplo, PEG maleimida e PEG-vinilsufone) ou ligações dissulfetos (por exemplo, PEG piridildisulfeto). Graças à engenharia genética, que permite a introdução de resíduos de cisteína em diferentes posições na sequência de aminoácidos da proteína, muitas proteínas foram *PEGladas* por esse método (ZALIPSKY, 1995; VERONESE; PASUT, 2005).

Recentemente, foi criada a estratégia de utilizar as cisteínas quando presentes como pontes dissulfeto. Primeiramente a cisteína é liberada por uma reação de redução e a cisteína livre reage com PEG tiol bifuncional ativado para dar uma nova ponte estável com o polímero (BALLAN et al., 2007), visando obter uma *PEGlação* sítio-específica.

A reação de *PEGlação* envolvendo PEGs reversíveis é conhecida há muito tempo, mas só recentemente, a estratégia foi considerada seriamente para permitir a liberação contralada de uma proteína. Esses métodos são geralmente baseados em uma molécula de disparo que, por reação enzimática ou hidrólise, libera um grupo que catalisa a separação do polímero, liberando a proteína nativa (LEE et al., 2001; PELEG-SHULMAN, 2004; ZHAO et al., 2006). Escolhendo cuidadosamente os grupos químicos do PEG ativado, a proteína modificada permanece na corrente sanguínea por longo tempo e uma liberação lenta e controlada da proteína nativa é obtida (ZALIPSKY et al., 2007).

Outra importante estratégia é a ligação sítio-específica do PEG à proteína que pode ser alcançada por métodos químicos (HERSHFIELD et al., 1991; KINSTLER et al., 2002; VERONESE et al., 2001; CAZALIS et al., 2004; NA; LEE; DELUCA, 2005; LEE et al., 2007) ou enzimáticos. No método enzimático ocorre a ligação do PEG amino (PEG-$NH_2$) aos resíduos de glutamina disponíveis na proteína. A conjugação é alcançada por via enzimática com o uso da transglutaminase (essa enzima pode ser de origem animal, que é mais específica, ou obtida a partir de fontes microbianas, que é menos seletiva em relação à posição do aminoácido Gln na cadeia proteica). Trata-se de uma reação transamidase entre a glutamina da proteína e um PEG-NH2 como doador nucleófilo (SATO, 2002; FONTANA et al., 2008).

### 2.4.3 Caracterização do mPEG Conjugado

Dentre os pontos críticos amplamente estudados na caracterização de produtos biotecnológicos *PEGlados* ressalta-se a necessidade de um método analítico de purificação eficiente do conjugado mPEG-proteína; a determinação exata da massa molecular do conjugado obtido e a identificação dos sítios de *PEGlação* na sequência da estrutura primária da proteína.

A remoção de espécies indesejáveis como, proteína não modificada, PEG não reagido e formas multi-*PEGladas* da proteína (devido à sua heterogeneidade dependendo do número e posição das moléculas de PEG ligadas) são os principais obstáculos encontrados. Além disso, a caracterização do conjugado biologicamente ativo é uma exigência requerida pelo FDA para aprovação de novos produtos *PEGlados* (VERONESE; PASUT, 2005; FEE; VANALSTINE, 2006; ZHENG; MA; SU, 2007; PARK; NA, 2008; YU; SHANG; GHOSH, 2010).

O PEG solubilizado é transparente, sem características de fluorescência e não detectável (VERONESE, 2001). Por isso, diferentes métodos são empregados para a caracterização do grau de *PEGlação* de proteínas.

O grau de modificação pode ser estimado espectrofometricamente por titulação colorimétrica com ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Essa técnica, contudo não permite o conhecimento exato dos números de cadeias poliméricas ligadas ao peptídeo ou à proteína, pois esse método detecta apenas lisinas livres (HABEEB, 1966; BALLICO et al., 2005). Outra técnica colorimétrica é a reação do PEG com iodo que pode ser usada por sua avaliação direta, mas possui baixa sensibilidade (BAILON; BERTHOLD, 1998; VERONESE, 2001).

Vários métodos cromatográficos são empregados para tentar determinar o grau de modificação de proteínas e a pureza do conjugado-alvo. Para o isolamento do conjugado PEG-proteína, as diferenças na carga, hidrodinâmica, hidrofobicidade e, em alguns casos, também afinidade são exploradas. A eficiência do processo de purificação que resulta na homogeneidade do produto desejado, normalmente depende da complexidade da mistura *PEGlada* (JEVSˇEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010).

Historicamente, a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), ou gel filtração, tem sido amplamente utilizada para a separação de PEGs conjugados com o aumento da massa molecular, pois essa é uma das mudanças mais evidentes causada pela *PEGlação*. SEC é muito eficiente na remoção de impurezas de baixa massa molecular (subprodutos formados por hidrólise de PEG ativado), bem como a proteína que não reagiu.

SEC tem várias limitações, como a impossibilidade de separar isómeros posicionais com a mesma massa molecular, baixa resolução para PEGs conjugados de proteína e rendimento baixo. Além disso, o PEG é muito bem hidratado e apresenta maior raio hidrodinâmico que as proteínas de mesma massa molecular. Portanto, SEC é geralmente usada em combinação com cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), ou com cromatografia de troca catiônica (FEE; VAN ALSTINE, 2006).

A HIC também pode ser aplicada para a purificação e isolamento de proteína *PEGlada,* embora não seja amplamente usada, devido ao baixo isolamento das espécies *PEGladas* e a ligação do PEG que não reagiu com a coluna. A eluição dos componentes da mistura *PEGlação* depende do grau de modificação da proteína. A proteína não modificada é eluída primeiro, seguido por mono-*PEGlada* e pelos conjugados maiores. No entanto, os conjugados maiores, geralmente não apresentam boa resolução (FEE; VAN ALSTINE, 2006).

Outras abordagens têm sido empregadas para caracterizar conjugados PEG-proteína, tais como cromatografia de troca iônica (IEC) e focalização isoelétrica (IEF), mas são ineficientes para proteínas e PEG de elevada massa molecular (ROBERTS; HARRIS, 1998).

Espectroscopia de massa MALDI-MS *(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)* e MALDI-TOF *(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight)*, ionização por elétron spray (ESI) e dinâmica de espalhamento de luz (DLS) são técnicas úteis para indicar com maior exatidão a massa molecular do conjugado obtido. Contudo, essas técnicas são qualitativas e exigem equipamentos de alto custo e profissionais altamente especializados. Além disso, o emprego dessas técnicas não é eficiente para proteínas e PEG de elevada massa molecular (ZALIPSKY et al., 2007; JEVSˇEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010).

A eletroforese capilar também é outra técnica que tem sido empregada como uma ferramenta complementar para separar os fragmentos de peptídeos de uma mistura de acordo com a relativa migração dos componentes em um campo elétrico (ZHENG; MA; SU, 2007; PARK; NA, 2008).

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC e RP-HPLC) e eletroforese em gel de poliacrilamida são os métodos de análise mais comumente empregados devido à sua disponibilidade, reprodutibilidade e facilidade de uso. A análise de PAGE nativo pode apresentar algumas vantagens ao HPLC, como boa resolução e a capacidade de analisar simultaneamente amostras de proteína nativa e modificada no gel (ZHENG; MA; SU, 2007).

Cada uma dessas técnicas tem o seu mérito e pode ser potencialmente efetiva em determinadas situações específicas, mas, até o presente momento, o isolamento e a caracterização dos conjugados *PEGlados* apresentam obstáculos técnicos não-triviais, por isso, geralmente, são empregadas conjuntamente diferentes técnicas para confirmar o isolamento e o tamanho do conjugado obtido.

### 2.4.4 Caracterização Estrutural do Conjugado mPEG-proteína

As proteínas regulam uma variedade de reações bioquímicas com alta especificidade em condições fisiológicas. Em geral, forças atrativas e repulsivas baseadas em interações não-covalentes, tais como força de van der Waals, ligações de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e interações eletrostáticas, desempenham um papel importante na manutenção da estrutura da proteína. No entanto, apesar de as proteínas evoluírem para adquirir funções biológicas altamente especializadas e serem ideais para diferentes aplicações na medicina e biotecnologia, sua desnaturação, adsorção ou agregação são grandes problemas na química de proteína (LEE; KO; KIM, 2002; DALY; PRZYBYCIEN; TILTON, 2007; GANGULI et al., 2009).

Nesse sentido, a ligação covalente de uma ou múltiplas cadeias poliméricas à proteína é uma área de intensos estudos (VERONESE, 2001; PENNADAM et al., 2004; VERONESE; PASUT, 2005; HAAG; KRATZ, 2006; THORDARSON; LE DROUMAGUET; VELONIA, 2006; VERONESE; MERO, 2008; GANGULI et al., 2009).

A bioconjugação de polímeros tem sido uma estratégia bem sucedida para melhorar a aplicação de peptídeos e proteínas, pois confere às biomoléculas inúmeras vantagens (aumento da solubilidade, estabilidade e do tempo de meia-vida e diminuição do potencial imunogênico) que favoreceram o desenvolvimento de diversos produtos que estão disponíveis no mercado, enquanto outros estão sob avaliação clínica avançada (HAAG; KRATZ, 2006; THORDARSON; LE DROUMAGUET; VELONIA, 2006; JEVSˇEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010 ).

Como as proteínas são macromoléculas anfifílicas e anfóteras sua superfície externa é altamente ativa e capaz de complexar-se a maioria dos biomateriais. Portanto, a exposição das proteínas a um ligante transitório ou permanente (mPEG, por exemplo), empregado em aplicações biotecnológicas e biomédicas, pode resultar em alterações da sua função (LEE; KO; KIM, 2002; DALY; PRZYBYCIEN; TILTON, 2007 ).

Nesse caso, é preciso considerar a estrutura (primária, secundária, terciária e quaternária) da proteína para entender sua função em seu microambiente nativo e poder avaliar possíveis alterações conformacionais após sua modificação. Ressaltando que a conformação da proteína e, consequentemente, sua atividade biológica sofrem influência direta das condições do meio externo (pH, temperatura, tipo de solvente, força iônica) e da complexação com polímero o que pode resultar na desnaturação ou agregação proteica, formando espécies desnaturadas ou agregados que são terapeuticamente inativos e podem causar efeitos colaterais imprevisíveis, como imunogenicidade ou toxicidade (MALZERT et al., 2003; DALY; PRZYBYCIEN; TILTON, 2007; PAI; TILTON; PRZYBYCIEN, 2009).

Para verificar a integridade estrutural da proteína, bem como possíveis alterações conformacionais decorrentes da modificação química por *PEGlação*, o conjugado mPEG-proteína, recentemente, tem sido submetido à análise estrutural por diferentes métodos espectroscópicos como infravermelho (IR), dicroísmo circular (CD), ressonância magnética nuclear (RMN) e fluorescência (PELTON; McLEAN, 2000; CALICETI; SCHIAVON; VERONESE, 2001; MALZERT et al., 2003; HU et al., 2005; DALY; PRZYBYCIEN; TILTON, 2007). Portanto, as técnicas de Infravermelho (FTIR) (VAN de WEERT et al., 2000; MEYER et al., 2004; ELLIS; GOODRACE, 2006; SACHDEVA; CAI, 2009) e dicroísmo circular (CD) (KELLY; JESS; PRICE, 2005; BULHELLER; RODGER; HIRST, 2007) são ferramentas importantes para análise estrutural de proteínas *PEGladas*.

### 2.4.5 Propriedades Imunológicas das Proteínas *PEGladas*

A aplicação terapêutica das proteínas é prejudicada por causa da sua elevada massa molecular, hidrofobicidade e baixa estabilidade, que limitam suas propriedades biofarmacêuticas. Em particular, peptídeos e proteínas sofrem rápida depuração do organismo, ocasionada por uma combinação de eventos, incluindo proteólise, ultrafiltração renal e depuração no fígado. Por isso, para manter uma eficácia terapêutica, é necessário o uso de doses elevadas, favorecendo o desenvolvimento de uma resposta imune adversa (GREENWALD et al., 2003).

Ressalta-se que mesmo com os recentes avanços nas técnicas de DNA recombinante para a produção de proteínas com alta compatibilidade com o sistema imune, o uso de proteínas recombinantes como droga ainda é frequentemente limitado. Isso ocorre devido à imunogenicidade das proteínas, pois quando proteínas ou peptídeos exógenos são injetados isoladamente, eles são rapidamente opsonizados e destruídos, exigindo a administração de repetidas doses, favorecendo o desenvolvimento de respostas específicas produzidas por anticorpos que neutralizam seus efeitos e causam reações alérgicas (SO et al., 1996; CALICETI; VERONESE, 2003).

O efeito benéfico da *PEGlação* sobre a supressão da imunonegenicidade foi confirmado por vários estudos (ABUCHOWSKI et al., 1977a, 1977b; TSUJI et al., 1985; SO et al., 1996; SO et al., 1999; SO et al., 2001; SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008). Em certos casos a conjugação do PEG também foi capaz de transformar proteínas imunogênicas em tolerogênicas, por exemplo, a injeção do conjugado PEG-proteína em um animal adulto foi capaz de impedir resposta imunológica a uma injeção subseqüente da forma nativa da proteína (LANG et al., 1992; MOHAPATRA et al., 1993; SEHON, 1994; LANG; SEHON, 1997).

Nesse caso, proteínas exógenas poderiam ser administradas eficientemente sem ocasionar resposta imune. No entanto, a exploração de um procedimento seguro e eficiente para a produção de conjugados tolerogênicos é uma tarefa que merece avaliações precisas. O desempenho tolerogênico do conjugado depende de uma série de parâmetros como o caráter imunogênico da proteína nativa e o grau de modificação da proteína, além de outros parâmetros que ainda são desconhecidos e devem ser cuidadosamente elucidados a fim de evitar graves complicações farmacológicas (CALICETI; VERONESE; JONAK, 1999).

Além disso, apesar de muitas evidências apontarem para uma diminuição da resposta imune ao antígeno, os resultados relatados na literatura são muitas vezes controversos e o mecanismo subjacente a imunossupressão não foram completamente esclarecidos, provavelmente devido à complexidade do sistema imune, à alta variabilidade individual e aos vários parâmetros que determinam a resposta imune final (LANG et al., 1992; MOHAPATRA et al., 1993; SEHON, 1994; BITOH et al., 1995; LANG; SEHON, 1997; CALICETI; VERONESE; JONAK, 1999).

A maior parte dos trabalhos que verificaram a redução da antigenicidade e conseqüentemente, da imunogenicidade dos conjugados PEG-proteína tem avaliado a não produção de anticorpos anti-proteína. De acordo com Caliceti; Schiavon; Veronese (2001), Caliceti e Veronese (2003) a redução da imunogenicidade da proteína *PEGlada* é devido, por um lado, ao mascaramento dos epítopos da proteína pelo polímero e, por outro lado, ao impedimento estérico ocasionado pelo polímero em torno da proteína, o que dificulta a aproximação de anticorpos. Ambos os eventos estão estritamente relacionados à natureza físico-química do polímero: a disposição dos polímeros na superfície da proteína, que podem estar em uma conformação estendida ou enrolada, fornecendo diferentes formas de esconder os epítopos da proteína.

Adicionalmente, o mPEG possui a capacidade de reter moléculas de água, o que reflete em diferentes volumes hidrodinâmicos dos conjugados. Portanto, a proteína localizada no centro da construção dos polímeros hidratados está diferentemente acessível à interação de anticorpos devido aos polímeros que mascaram seus sítios antigênicos, impedem a aproximação de anticorpos à proteína e previnem a degradação proteolítica.

A Figura 11 [D] demonstra a disposição teórica das moléculas de mPEG em torno da proteína UC de *Aspergillus flavus* modificada por *PEGlação* com mPEG de 10 kDa (SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

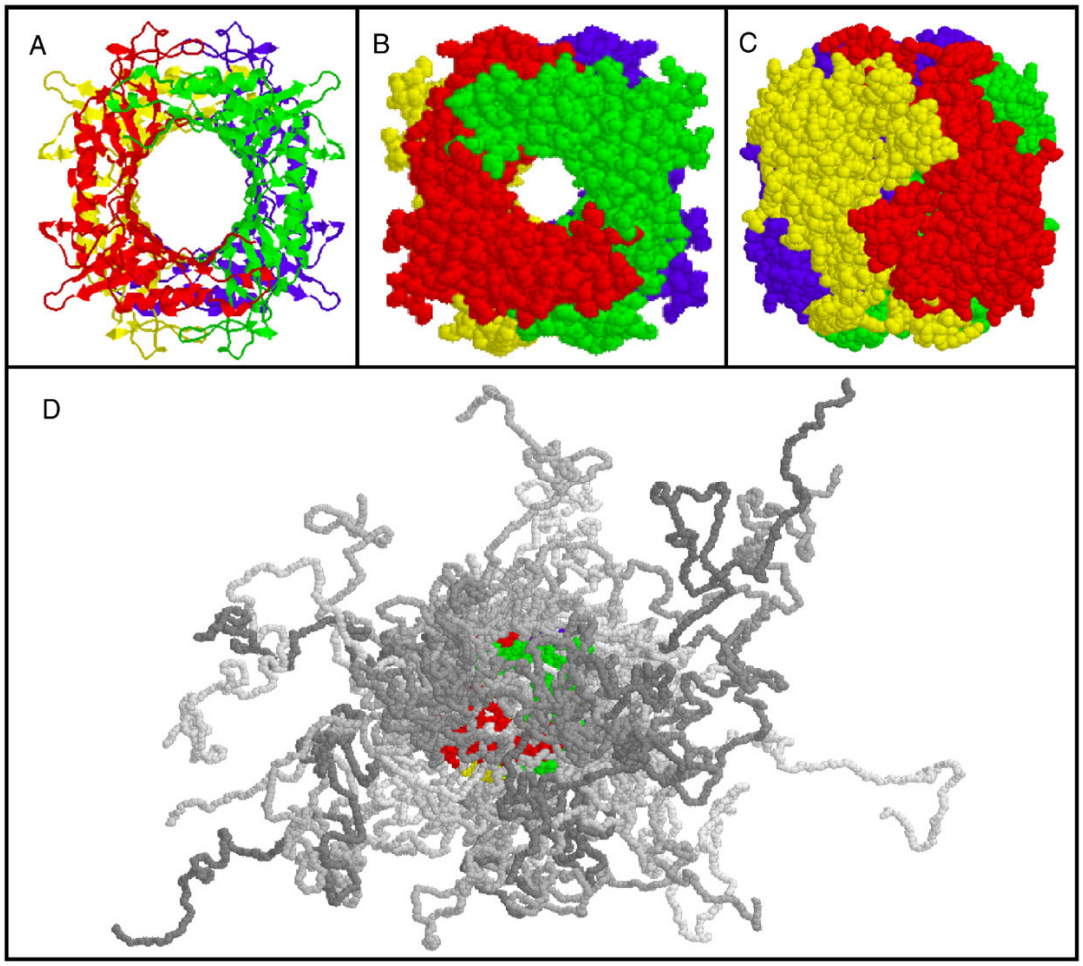



**Figura 11-** Modelos moleculares do tetrâmero da UC nativa de *A. flavus* [A-C] e do conjugado mPEG-UC, contendo 36 moléculas de mPEG de 10 kDa (em cinza) por tetrâmero de mPEG-UC [D].
Fonte: Sherman; Saifer; Perez-Ruiz, 2008.

Apesar de o PEG ser considerado não imunogênico, há estudos mostrando que a administração de proteínas *PEGladas* foram capazes de gerar anticorpos anti-polímero, anti-proteína e anti-conjugado. No entanto, os efeitos clínicos adversos devido à imunogenicidade do PEG não foram relatados, provavelmente, devido à baixa quantidade do polímero que é administrada em uso terapêutico (CALICETI; VERONESE, 2003; SHERMAN; SAIFER, PEREZ-RUIZ, 2008).

O caráter haptogênico do PEG é também influenciado por sua estrutura e massa molecular, pois a mesma enzima modificada com PEG ramificado e linear com a mesma massa molecular mostrou que a forma ramificada ocasionou uma menor resposta imune anti-PEG em termos de IgM e IgG (CALICETI; SCHIAVON; VERONESE, 2001). No entanto, deve-se ressaltar que a fraca imunogenicidade do PEG e a baixa quantidade do conjugado PEG-proteína, usualmente empregada em terapia, faz com que o risco de uma imunoreação severa, devido à produção de anticorpos anti-PEG, seja praticamente desprezível (CALICETI; VERONESE, 2003).

De acordo com estudos de toxicidade em animais, doses muito elevadas do conjugado PEG-proteína (por exemplo: 10, 20 e 40 mg/kg IV) são necessárias para induzir a vacuolização tubular renal que desaparece após o tratamento (BENDELE et al., 1998). Portanto, os conjugados PEG-proteína são considerados não tóxicos. Além disso, as baixas doses necessárias do conjugado PEG-proteína, empregada em tratamentos, reduzem o risco de uma grave resposta imunogênica (RICHTER; AKERBLOM, 1983; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002 ; HARRIS; CHESS, 2003; JEVSˇEVAR; HUNSTEJ; POREKAR, 2010).

A conjugação do PEG pode, às vezes, levar à formação de novos epítopos como consequência, por exemplo, da desnaturação de proteínas após conjugação parcial ou utilização de um espaçador inadequado entre a proteína e a cadeia de PEG. Por isso, é muito importante a escolha adequada da química da reação de *PEGlação* e a seleção cuidadosa do sítio de ligação (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002; CALICETI; VERONESE, 2003; BUKOWSKI et al., 2002; GREGORIADIS et al., 2005).

Os inúmeros benefícios que a *PEGlação* assegura às moléculas biofarmacêuticas, como garantir considerável atividade enzimática, reduzir a imunogenicidade, podendo induzir tolerância imunológica, além de prolongar o tempo de eliminação, fizeram com que várias classes de proteínas terapêuticas como enzimas, citoquinas e anticorpos fossem aplicados no tratamento de certas doenças com melhor desempenho após serem *PEGladas* (VERONESE; PASUT, 2005; HAAG; KRATZ, 2006; JEVSˇEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010).

Existe uma série de produtos *PEGlados* aprovados pelo FDA (Tabela 3), o que comprova a eficácia e segurança da tecnologia de *PEGlação*. As drogas *PEGladas* possuem um prolongado tempo de permanência no organismo, necessitando de uma dosagem mínima para a manutenção da reposta clínica, o que melhora a qualidade de vida dos pacientes e reduz o custo do tratamento (BAILON; BERTHOLD, 1998; JEVSˇEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010).

Tabela 3 - Produtos biofarmacêuticos *PEGlados* disponíveis no mercado

| **Nome** | **Empresa** | **Biomolécula** | **Indicação Terapêutica** | **Propriedades adquiridas** | **Ano** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Adagen®** | Enzon | Adenosina deaminase bovina | Imunodeficiência combinada severa (SCID) | Aumento do tempo de meia vida | 1990 |
| **Oncaspar®** (Pegaspargase) | Enzon | Asparaginase | Leucemia linfoblástica Aguda | Aumento do tempo de meia vida, diminuição de reações alérgicas. | 1994 |
| **PEG-Intron®** (IFN-α2b *PEGlado)* | Schering-Plough/ Enzon | IFN-α2b | Hepatite C | Aumento do tempo de meia vida. | 2001 |
| **Pegasys** (IFN-α2a *PEGlado)* | Hoffmann-La Roche | IFN-α2a | Hepatite C | Aumento do tempo de meia vida | 2002 |
| **Neulasta®** (pegfilgrastim) | Amgen/Nektar | G-CSF | Neutropenia | Aumento do tempo de meia vida | 2002 |
| **Somavert®** (pegvisomant) | Pfizer/Nektar | Hgh | Acromegalia | Antagonista do receptor do Hgh | 2003 |
| **Macugen®** (pegaptanib) | Pfizer | Anti-VEGF aptâmero (oligonucleotídeo de RNA) | Tratamento de doença vascular ocular | | 2004 |
| **MIRCERA®** Epoetina-β *PEGlada* | Hoffmann-La Roche | Epoetina-β | Anemia associada à insuficiência renal crônica | Aumento do tempo de meia vida | 2007 |
| **Certolizumab pegol** (Cimzia®) | UCB | Anti TNF Fab | Artrite reumatóide e doença de Crohn | Aumento do tempo de meia vida | 2008 |

Fonte: Jevsˇevar; Kunstelj; Porekar, 2010.

Outros conjugados estão sendo propostos e rigorosamente avaliados. Como exemplo, temos a hemoglobina conjugada (PEG-hemoglobina), que pode ser utilizada como transportadores de oxigênio acelular para sustentar a capacidade de transporte de oxigênio e restaurar o volume intravascular durante a perda de sangue ou hemodiluição (HU et al., 2005). Resultados promissores também foram obtidos com drogas pequenas após *PEGlação*, especialmente as drogas anti-tumorais, como o taxol, camptotecina, cisplatina e doxorrubicina (PASUT et al., 2004).

A inovação nanotecnológica das formulações farmacêuticas e os sistemas de "delivery" tornaram-se estratégias importantes para tratamentos cada vez mais eficientes e para introdução de novas entidades moleculares na prática clínica. Portanto, devido à sua versatilidade, adaptações e aplicações, a tecnologia de *PEGlação* tem se mostrado útil no tratamento de muitas doenças anteriormente difíceis de serem tratadas e, consequentemente, novas biomoléculas *PEGladas* alcançarão a aprovação nos próximos anos (JEVSˇEVAR; KUNSTELJ; POREKAR, 2010).

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 Objetivos Gerais

1. Modificar a uricase (UC) por *PEGlação* e verificar a funcionalidade dos conjugados obtidos em relação a manutenção e/ou alterações das propriedades físico-químicas e biológicas tais como atividade, estabilidade e resistência a ação de proteases.
2. Realizar análises conformacionais da UC submetida ao processo de *PEGlação* a partir de técnicas espectroscópicas de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e dicroísmo circular (CD).
3. Avaliar o comportamento imunológico da UC nativa e modificada, com estudos *in vivo* utilizando coelho da raça Nova Zelândia e camundongos Balb/c.

## 3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer metodologia de extração e purificação da UC a partir de rim bovino (UC-b) e purificação da UC recombinante de *Candida sp* expressa em *E. coli* (UC-r) comercialmente disponível.
- Estudar aspectos fundamentais dentro do processo de obtenção dos conjugados mPEG-UC como: o tipo de metoxipolietilenoglicol utilizado, avaliação do grau de modificação e especificidade da reação de *PEGlação*.
- Modificar a UC-r e UC-b com metoxipolietilenoglicol p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e metoxipolietilenoglicol 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN) ambos de 5000 Da, visando obter o maior grau de modificação das enzimas, com a menor perda de atividade enzimática.
- Determinar a constante de *Michaelis-Menten* ($K_M$) para as enzimas nativas (UC-r; UC-b) e seus respectivos conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r- mPEG-CN; UC-b-mPEG-pNP e UC-b- mPEG-CN.
- Determinar a atividade e a estabilidade biológica da UC-r e UC-b e seus respectivos conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN; UC-b-mPEG-pNP e UC-b- mPEG-CN em diferentes tampões dentro da faixa de pH de 6,0 a 10.

- Determinar a estabilidade da UC-r e UC-b e de seus respectivos conjugados perante a ação de diferentes proteases tripsina e quimiotripsina, protease bacteriana, papaína e protease fúngica.
- Realizar testes *in vitro* de estabilidade da UC-r e UC-b e de seus respectivos conjugados em soro humano.
- Realizar a caracterização estrutural da UC-r nativa e seus conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN por FTIR e CD para investigar possíveis mudanças conformacionais na enzima decorrentes da *PEGlação.*
- Produzir anticorpos policlonais anti-uricase recombinante de *Candida sp* (anti-UC-r) em coelho.
- Avaliar a imunoreatividade da UC-r nativa e de seus conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN *in vitro*.
- Determinar a imunogenicidade da UC-r nativa e de seus conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN em camundongos.

# 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

## 4.1 MATERIAIS

### 4.1.1 Aparelhos

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Genesys (modelo 5), acoplado a um banho circulante termostatizado. As análises de dicroísmo circular (CD) foram realizadas em espectropolarímeto JASCO J-810 controlado pelo programa Jasco Spectra Manager™ equipado com célula termostatizada do tipo Peltier (CAT/CEPID – Instituto Butantan). Análises de Infravermelho (FTIR) foram realizadas em espectrômetro FTIR Bomem MB 100 equipado com detector DTGS (deuterado triglicina sulfato) na Central analítica do Instituto de Químca IQ/USP. Leitor automático de ELISA Spectra Max 150 (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN).

As centrifugações foram realizadas em centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC-5C. Para pequenos volumes de solução centrifugados, por curtos períodos de tempo, foi utilizada uma microcentrífuga Jouan. As determinações de pH foram realizadas em potenciômetro Radelkis OP-213, munido de microeletrodo. Na preparação de homogenados foi utilizado um homogeneizador Marconi modelo T-120 e *Shaker* (incubador rotativo) TE 240 TECNAL. As cromatografias foram realizadas com sistema Bio Rad acoplado a um coletor de frações ISCO modelo Retriver II. Eletroforese SDS-PAGE foi realizada em suporte Mini-Protean® II Dual Slab cell Bio Rad. As reações de *PEGlação* foram realizadas em estufa B.O.D. TE (TECNAL).

### 4.1.2 Reagentes

Sephadex G-100 foi fornecida pela Amershan Pharmacia Biotec, Uppsala. Padrão de massa molecular Prestained Protein MW Maker foi obtido da Fermentas, Gelcolde® Blue Stain Reagent e reagente corante azul brilhante G-250 foram obtidos da Pierce. Resina aniônica, DEAE-Sepharose fast flow, albumina sérica bovina (BSA), uricase recombinante de *Candida sp*, ácido úrico, ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), resina de cromatografia de afinidade xantina agarose, metoxipolietilenoglicol p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e

metoxipolietilenoglicol 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN) ambos de 5 kDa, conjugado anti-camundongo-peroxidase, conjugado anti-coelho-peroxidase e O-fenilenodiamina (OPD) foram fornecidos pela Sigma Chemical Company. Proteomix (quimiotripsina, tripsina) da Biobrás; Protex 6L (protease bacteriana) e Protease fúngica da Genecor International e papaína da Merck. Soro humano foi fornecido pelo Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP. Rim bovino foi adquirido no comércio local. Todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico.

Animais: camundongos Balb/c machos pesando 18±2g e um coelho macho da raça Nova Zelândia pesando 2 kg mantidos no Biotério do Centro de Biotecnologia do IPEN foram utilizados para os ensaios *in vivo*. O protocolo experimental para os ensaios *in vivo* foi aprovado pela CEPA-IPEN/SP (COMITÊ DE ETICA EM PESQUISA ANIMAL do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares) – ANEXO A

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Medida da Concentração de Proteína pelo Método de Bradford

A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O procedimento de Bradford é baseado na ligação do corante azul brilhante G-250, à proteína que causa uma mudança no pico de absorbância do corante de 465 para 595 nm. A mudança da cor se desenvolve em 2min e se mantém por mais de uma hora. Para análise das amostras foi preparada uma curva padrão de albumina (BSA) a 595 nm.

### 4.2.2 Medida de Atividade Enzimática

A medida da atividade enzimática da uricase foi determinada espectrofotometricamente como descrito por Mahler (MAHLER, 1970), baseada no decréscimo da absorbância a 293 nm em tampão borato de sódio 20 mM pH 8,5 (1,0 mL) contendo 48 μM de ácido úrico em cubeta de quartzo a 25 °C. O coeficiente de extinção molar empregado foi de $\varepsilon = 12{,}6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$. A atividade específica foi definida como μmol de ácido úrico convertido por min. por mg de proteína.

### 4.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As amostras de proteína foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida, em sistema de tampão descontínuo, sob condições desnaturantes (SDSPAGE), com base no método de Laemmli (LAEMMLI, 1970), utilizando géis de poliacrilamida a 7,5% e 10%.

**Revelação do gel com o corante GELCODE® Blue Stain Reagent para proteínas**

Após o término da eletroforese o gel foi colocado em solução fixadora por 15min. Em seguida, o gel foi enxaguado com água por 8min, sendo este procedimento repetido 4 vezes. Finalmente foi colocada a solução corante. Quando as bandas estavam coradas na intensidade desejada, o gel foi colocado em um recipiente com água para posterior visualização.

**Revelação do gel com solução de iodo para polietilenoglicol (PEG)**

Para a visualização de bandas correspondente ao PEG ligado à proteína o gel foi corado de acordo com o procedimento de Kurfurst (KURFURST, 1992) com modificações. Após o término da eletroforese o gel foi enxaguado com água destilada e colocado em solução de nitrato de bário (3%) por 10min. Depois o gel foi enxaguado em água destilada para remover o excesso de nitrato de bário. Em seguida o gel foi colocado em solução de iodo (0,01N) por 10min para revelação das bandas correspondentes ao PEG ligado a proteína. Como esse método é sensível para detecção de PEG ele permite identificar as bandas correspondentes a enzima *PEGlada* a partir da identificação do PEG ligado a proteína.

### 4.2.4 Purificação da Uricase de Rim Bovino (UC-b)

Inicialmente foi realizado um pré-tratamento do rim com n-butanol para extrair e solubilizar a UC. Foi empregado o método descrito por Farina e Mennella Farone, 1979 com modificações. Foram picados e homogeneizados 100 g de córtex do rim congelados em homogeneizador por 5min em tampão borato de sódio 0,1M pH 9,0 e n-butanol na proporção de 350 mL de tampão borato de sódio para 10 mL de n-butanol. O homogenado foi incubado a 37 °C por 2h e então centrifugado a 10.000 x g (8 °C) por 40min. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado ao resíduo tampão borato de sódio e n-butanol sob homogeneização para repetir o processo de extração da enzima. Após centrifugação os sobrenadantes foram misturados obtendo-se 50 mL do extrato com a uricase solúvel. Em seguida foi determinada a quantidade de proteína pelo método Bradford, atividade enzimática do extrato bruto e perfil proteico por eletroforese SDS-PAGE.

Para o próximo passo da purificação foi realizada uma cromatografia de troca iônica com a resina aniônica DEAE-Sepharose. Primeiramente, a resina foi ativada com hidróxido de sódio 0,1 M (100 mL) a temperatura ambiente e lavada com água e tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Foram aplicados 50 mL do extrato à resina que permaneceram sob agitação em *shaker* (140 rpm) por 1h a temperatura ambiente. Em seguida a resina foi lavada (3 vezes) com 100 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Após as lavagens para retirar o excesso de extrato bruto, a resina foi transferida para uma coluna (1,5 cm x 35 cm) e a eluição foi desenvolvida utilizando-se um gradiente linear crescente de concentração de cloreto de potássio até 0,7 M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, monitorado pelo aparelho Econo UV Monitor, Econo Pump (Bio Rad).

Durante a eluição pela coluna foram recolhidas frações em tubos de ensaio em um coletor de frações. Assim, o eluído da coluna foi recolhido em volumes de 10 mL, na vazão de 1,0 mL / min. Em seguida mediu-se, em cada tubo, a absorbância a 280 nm, a quantidade de proteína e atividade enzimática. As frações que apresentaram a enzima foram reunidas para ser feito um "pool" de amostra, mediu-se atividade enzimática, quantidade de proteína e perfil protéico por eletroforese SDS-PAGE. A terceira etapa de purificação da UC bovina foi cromatografia de Gel Filtração. A coluna (1,0 cm x 37 cm) de Sephadex G-100 foi equilibrada com tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,5. Foram aplicados 1,0 mL do pool da etapa anterior. A purificação foi realizada no mesmo tampão, sendo recolhidas frações em volumes de 0,5 mL. Em seguida mediu-se a atividade enzimática, a quantidade de proteína de cada fração recolhida e fez-se o pool das frações que possuíam UC-b e verificou o perfil proteico por SDS-PAGE.

### 4.2.5 Purificação da Uricase Recombinante de *Candida sp* (UC-r)

A UC-r comercial foi purificada por cromatografia de afinidade com resina xantina agarose. Em uma coluna foram empacotados 3,0 mL de xantina agarose. A coluna foi equilibrada com tampão borato 50 mM pH 8,5 a temperatura ambiente e em seguida foram aplicados 500 µL de solução de uricase (10 mg proteína) com fluxo 0,25 mL/min de tampão borato 50 mM pH 8,5. Após a aplicação da amostra a resina foi lavada com 10 mL do mesmo tampão para remoção do excesso de proteína. Em seguida, a eluição específica da uricase foi realizada com o ácido úrico 1,2 mM em tampão borato 20 mM pH 8,5 e foram recolhidas frações de 1,0 mL, o ácido úrico das amostras foi removido por ultrafiltração com membranas

de 30.000 Da. Posteriormente, mediu-se a atividade enzimática, quantidade de proteína de cada fração recolhida e fez-se o pool das amostras que possuíam a enzima e determinou-se a pureza da amostra por eletroforese SDS-PAGE.

### 4.2.6 Verificação da Influência da Proporção Molar de mPEG-p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN) no Grau de Substituição e na Atividade Enzimática da UC-r

Para verificar a influência da proporção em massa de mPEG-pNP e mPEG-CN em relação ao grau substituição e na atividade enzimática da UC-r foram preparados tubos de reações nas proporções propostas segundo as Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente.

Tabela 4 - Proporção molar mPEG-pNP/UC-r

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Branco |
|---|---|---|---|---|---|
| mPEG-pNP (mg) | 13 | 8,6 | 4,3 | 2,15 | - |
| UC-r (mg) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| mPEG-pNP/ UC-r (m/m)[a] | 13 | 8,6 | 4,3 | 2,15 | - |
| mPEG-pNP / $NH_2$[b] | 3 | 2 | 1 | 0,5 | - |

a: proporção massa / massa
b: proporção molar entre o número de moléculas de mPEG-pNP e o número de amino grupos disponíveis na enzima para reação. Cada molécula de UC-r possui 121 amino grupos (120 ε-lisinas e 1 N-terminal) disponíveis.
mPEG-pNP: metoxipolietilenoglicol-p-nitrofenil carbonato
UC-r: Uricase recombinante de *Candida sp*

Tabela 5 – Proporção molar mPEG-CN/ UC-r

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Branco |
|---|---|---|---|---|
| mPEG-CN (mg) | 8,6 | 4,3 | 2,15 | - |
| UC-r (mg) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| mPEG-CN/UC-r (m/m)[a] | 8,6 | 4,3 | 2,15 | - |
| mPEG-CN/$NH_2$[b] | 2 | 1 | 0,5 | - |

a: proporção massa / massa
b: proporção molar entre o número de moléculas de mPEG-CN e o número de amino grupos disponíveis na enzima para reação. Cada molécula de UC-r possui 121 amino grupos (120 ε-lisinas e 1 N-terminal) disponíveis.
mPEG-CN: 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina
UC-r: Uricase recombinante de *Candida sp*

A reação de *PEGlação* foi realizada em tampão borato de sódio pH 8,0 perfazendo um volume final de 1,0 mL. Os tubos foram previamente homogeneizados e incubados a 30 °C por 2 h, em seguida foram transferidos para câmara fria (8 °C), onde permaneceram por 16h. A reação foi interrompida pela adição de um excesso de lisina, 1% (m/m). As amostras foram purificadas em coluna Sephadex G-100 a fim de separar a enzima modificada do eventual excesso de reagente. Posteriormente, mediu-se atividade enzimática de cada amostra. A quantidade de mPEG ligado a UC-r foi estimada pela medida da redução dos amino grupos primários da enzima utilizando um método colorimétrico com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) reagente usado para determinação quantitativa de amino grupos de acordo com procedimento descrito por Habeeb (HABEEB, 1966).

### 4.2.7 Verificação da Influência da Proporção em Massa de mPEG-p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN) no Grau de Substituição e na Atividade Enzimática da UC-b

Para verificar a influência da proporção em massa de mPEG-pNP e mPEG-CN em relação ao grau substituição e sobre atividade enzimática da UC-b foram preparados tubos de reações nas proporções propostas segundo a Tabela 6 e Tabela 7, respectivamente.

Tabela 6 – Proporção em massa mPEG-pNP/UC-b

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Branco |
|---|---|---|---|---|
| mPEG-pNP (mg) | 146 | 76 | 38 | - |
| UC-b (mg) | 34 | 34 | 34 | 34 |
| mPEG-pNP/UC-b (m/m)[a] | 4,3 | 2,15 | 1,1 | - |

a: proporção massa / massa
mPEG-pNP: metoxipolietilenoglicol-p-nitrofenil carbonato
UC-b: Uricase bovina

Tabela 7 – Proporção em massa mPEG-CN/ UC-b

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Branco |
|---|---|---|---|
| mPEG-CN (mg) | 73 | 38 | - |
| UC-b (mg) | 34 | 34 | 34 |
| mPEG-CN/UC-b (m/m)[a] | 2,15 | 1,1 | - |

a: proporção massa / massa
mPEG-CN: 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina
UC-b: Uricase bovina

A reação de *PEGlação* foi realizada em tampão borato de sódio pH 8,0 perfazendo um volume final de 1,0 mL. Os tubos foram previamente homogeneizados e incubados a 30 °C por 2h e foram transferidos para câmara fria (8 °C), onde permaneceram por 16h. A reação foi interrompida pela adição de lisina 1% (m/m) de quantidade de mPEG ativado. As misturas foram purificadas em coluna Sephadex G-100 a fim de separar a enzima modificada do eventual excesso do reagente. Em seguida mediu-se atividade enzimática de cada amostra como descrito na seção 4.2.2.

### 4.2.8 Determinação da Constante de *Michaelis-Menten* ($K_M$) para as Enzimas Nativas (UC-r; UC-b) e seus Respectivos Conjugados

A constante de *Michaelis-Menten* ($K_M$) para cada uma das espécies UC-r nativa e seus conjugados (UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN) e UC-b nativa e seus conjugados (UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN) foram estimados pelo método do duplo recíproco. A atividade enzimática foi determinada em 293 nm a 37 °C com concentrações crescentes do substrato ácido úrico (0,01-0,144 mM). O valor do $K_M$ foi calculado a partir da equação de *Lineweaver-Burk*. $\mathbf{1/v = K_M /Vmax \cdot 1/[S] + 1/Vmax}$ (***Equação de Lineweaver-Burk***). Onde: v = velocidade da reação; $K_M$ = constante de *Michaelis-Menten*; Vmax = velocidade máxima de reação; [S]=concentração de substrato (NELSON; COX, 2006).

## 4.3 Ensaios *in vitro*

### 4.3.1 Verificação da Atividade e da Estabilidade Biológica da UC-r, UC-b e de seus Respectivos Conjugados em Função do pH

A atividade enzimática da UC-r e UC-b nativas ou modificadas com mPEG-pNP e mPEG-CN foi determinada em diferentes tampões, variando o pH de 6,0 a 10, pela adição de quantidade conveniente de cada amostra a 1,0 mL de solução de ácido úrico 48 μM preparada nos tampões (6,0-8,0 Hepes 100 mM e 9,0-10 borato de sódio 100mM) e imediatamente mediu-se a atividade enzimática em espectrofotômetro em 293 nm a 37 °C. O pH no qual cada uma das enzimas, UC-r nativa e seus conjugados (UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN) e UC-b nativa e seus conjugados (UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN) apresentou maior atividade foi considerado 100%.

A estabilidade foi determinada pela incubação das enzimas nativas (UC-r, UC-b) e de seus respectivos conjugados nos tampões (pH 6,5 e 7,5 Hepes 100 mM e pH 8,5 borato de sódio 100 mM) a 37 °C, 50 °C e 70 °C por 2h. Ao final desse período foi medida a atividade enzimática de cada amostra como descrito na seção 4.2.2. O pH no qual cada uma das enzimas UC-r nativa e seus conjugados (UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN) e UC-b nativa e seus conjugados (UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN) apresentou maior atividade foi considerado 100%.

### 4.3.2 Verificação da Resistência à Ação de Proteases da UC-r, UC-b e seus Respectivos Conjugados

Para verificar a ação de proteases sobre a UC-r e UC-b nativas e de seus respectivos conjugados (UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN e UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN) foram utilizadas 4 enzimas proteolíticas: Proteomix (quimiotripsina e tripsina); Protex 6L (protease bacteriana); papaína (origem vegetal) e protease fúngica.

Em 50 µL da solução de UC bovina ou recombinante (0,8 UI) ou 50 µL dos seus conjugados, foram adicionadas 20 UI das diferentes proteases. O volume final de cada amostra foi de 500 µL preparados em tampão fosfato salino pH 7,3. As amostras foram incubadas a 37 °C e foram retiradas alíquotas de 20 µL nos tempos 0, 10, 20, 30, 60 e 120min e mediu-se a atividade enzimática das amostras como descrito na seção 4.2.2.

### 4.3.3 Verificação da Estabilidade Biológica da UC-r e da UC-b e seus Respectivos Conjugados em Soro Humano

A estabilidade biológica da UC-r, UC-b e de seus respectivos conjugados foi determinada em soro humano. Em 900 µL de soro foram adicionados 100 µL de UC-r nativa e de seus conjugados (UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN), da mesma forma, foram acrescidos a 900 µL de soro 100 µl de UC-b nativa e seus respectivos conjugados (UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN). As amostras foram incubadas a 37 °C e foram retiradas alíquotas de 50 µl de cada amostra nos intervalos de tempo 0, 15, 30, 60 e 120min e mediu-se a atividade enzimática das amostras como descrito na seção 4.2.2.

### 4.3.4 Caracterização Estrutural da UC-r Nativa e Modificada por Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Primeiramente, as amostras foram liofilizadas. Alíquotas de 1,0 mL de UC-r nativa (1mg/mL) e UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN (0,3 mg/mL) em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, contendo 2% (w/v) de manitol foram congeladas a -70 °C e liofilizadas em um liofilizador FTS Systems. Após a liofilização foram retirados 1,0 mg do pó de cada amostra, UC-r nativa e dos conjugados, e misturada com um excesso de KBr (brometo de potássio) 100 vezes a massa de cada amostra. Os espectros no infravermelho foram obtidos com um espectrômetro FTIR Bomem MB 100 equipado com um detector DTGS. Os espectros foram

registrados entre 400-4000 $cm^{-1}$ e para cada amostra foram coletados um total de 64 interferogramas com uma resolução de 4 $cm^{-1}$. Os dados obtidos do espectrômetro em transmitância foram convertidos em absorbâncias, e os espectros obtidos foram analisados na região da banda da amida I (1700-1600 $cm^{-1}$). Os espectros de FTIR foram determinados na Central Analítica do Instituto de Química IQ/USP.

### 4.3.5 Caracterização Estrutural da UC-r Nativa e Modificada por Análise Dicroísmo Circular (CD)

As análises de dicroísmo circular (CD) foram realizadas usando soluções de 1 μM de UC-r nativa e dos conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0. Os espectros de CD foram obtidos com um espectropolarímetro JASCO J-810, em cubetas com caminho óptico de 0,1 cm a 20 °C, 50 °C e 70 °C. Os espectros de CD foram gravados na faixa de 185-260 nm a cada 0,1 nm. O espectro de cada amostra em diferentes temperaturas foi obtido a partir da média de 5 scans subtraindo-se o espectro da solução tampão. Os espectros de CD foram determinados no Centro de Biotecnologia CAT/CEPID do Instituto Butantan.

Os espectros de CD a 20 °C, 50 °C e 70 °C também foram analisados em termos de conteúdo de α-hélice, no intervalo de 200-240 nm empregando-se o programa K2D2 disponível on-line (http://www.ogic.ca/projects/k2d2).

## 4.4 Ensaios *in vivo*

### 4.4.1 Produção de Anticorpos Policlonais Anti-uricase (anti-UC-r) em Coelho

Anticorpos anti-UC-r foram preparados em coelho usando UC-r nativa purificada e estéril como antígeno. 500 μL de UC-r (100 μg) foram adicionados a 500 μL da suspensão de tampão fosfato salino (PBS) e hidróxido de alumínio [$Al(OH)_3$] na proporção de 50/50 (v/v). O volume de 1,0 mL dessa mistura foi usado para injeção subcutânea, em cinco pontos diferentes da linha dorsal do coelho.

As imunizações subseqüentes foram realizadas com 100 μg de UC-r adicionada a 500μL de PBS nos dias 7, 14, 21 e 28. No dia 35 foi colhida a amostra de sangue a partir da veia marginal e, em seguida, o sangue foi centrifugado para a obtenção do anti-soro. Posteriormente, o anti-soro foi estocado a -70 °C até a titulação por ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay").

### 4.4.2 Titulação de Anticorpos por ELISA (Ensaios imunoenzimáticos)

#### 4.4.2.1 Elisa para Quantificar Anticorpos anti-UC-r nativa produzido em Coelho e Verificar a Imunoreatividade dos Conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN

Inicialmente, a placa de Elisa com 96 poços foi dividida sistematicamente e a cada poço, previamente estabelecido, foi adicionado 100 μL da UC-r nativa ou UC-r-mPEG-pNP ou UC-r-mPEG-CN diluídos em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 50 mM pH 9,6, contendo 1 μg de UC-r e de cada conjugado como antígeno. Em seguida a placa foi incubada por 18h a 4 °C. Os poços foram então lavados 4 vezes com 200 μL de PBS-T (tampão fosfato salino com 5% de Tween pH 7,2) e bloqueados com 200 μL de leite desnatado (3%) em PBS-T por 1h a 37 °C. Os poços foram novamente lavados, como descritos acima, e foram incubados por 1h a 37 °C com 100 μL de solução do anti-soro do coelho (anticorpos anti-UC-r) serialmente diluído em leite desnatado (3%) em PBS-T. Após as lavagens da placa com 200 μL de PBS-T, foram adicionados aos poços 100 μL do conjugado anti-coelho-peroxidase diluído em leite desnatado (3%) em PBS-T. Após 1h de incubação a 37 °C, a placa foi lavada 4 vezes com 200 μL de PBS-T e foram adicionados a cada poço 100 μL de O-fenilenodiamina (OPD) acrescidos de 5 μL de $H_2O_2$ (30%) que permaneceu reagindo por 20min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida foi adicionado 50 μL/ poço de 200 mM de ácido cítrico para interromper a reação. As absorbâncias foram lidas automaticamente a 450 nm em um leitor Spectra Max 150.

#### 4.4.2.2 Elisa para Quantificar Anticorpos Anti-UC-r Nativa, Anti-UC-r-mPEG-pNP e Anti-UC-r-mPEG-CN em Camundongos

Em uma placa de Elisa com 96 poços, dividida sistematicamente, foi adicionado em cada poço, previamente estabelecido, 100 µL da UC-r nativa ou UC-r-mPEG-pNP ou UC-r-mPEG-CN diluídos em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 50 mM pH 9,6, contendo 1 µg de UC-r nativa e de cada conjugado como antígeno. Em seguida a placa foi incubada por 18h a 4 °C. Os poços foram então lavados 4 vezes com 200 µL de PBS-T (tampão fosfato salino com 5% de Tween pH 7,2) e bloqueados com 200 µL de leite desnatado (3%) em PBS-T por 1h a 37 °C. Os poços foram novamente lavados, como descritos acima, e foram incubados por 1h a 37 °C com 100 µL de solução de cada anti-soro, previamente estabelecidos (anti-UC-r, anti-UC-r-mPEG-pNP e anti-UC-r-mPEG-CN) e serialmente diluídos em leite desnatado (3%) em PBS-T. Após as lavagens da placa com 200 µL de PBS-T, foram adicionados aos poços 100 µL do conjugado anti-camundongo-peroxidase diluído em leite desnatado (3%) em PBS-T. Após 1h de incubação a 37 °C, a placa foi lavada 4 vezes com PBS-T e foram adicionados a cada poço 100 µL de O-fenilenodiamina (OPD) acrescidos de 5 µL de $H_2O_2$ (30%) que permaneceu reagindo por 20min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida foi adicionado 50 µL/ poço de 200 mM de ácido cítrico para interromper a reação. As absorbâncias foram lidas automaticamente a 450 nm em um leitor Spectra Max 150.

### 4.4.3 Ensaio de Imunoreatividade da UC-r Nativa e seus Conjugados

A capacidade dos conjugados em neutralizar o reconhecimento dos anticorpos anti-UC-r nativa em decorrência da *PEGlação* foi determinada pela reação entre o anti-soro produzido em coelho e a UC-r *PEGlada*, como também, pela determinação da atividade enzimática residual da UC-r nativa e de cada conjugado. A capacidade de ligação dos anticorpos (*Binding ability*) anti-UC-r foi determinada por ELISA como descrito na seção 4.4.2.1. Para determinação da atividade enzimática residual o anti-soro, anti-UC-r foi serialmente diluído em tampão fosfato salino (PBS) e incubado com a UC-r nativa e seus conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN por 2h a 37 °C. Após esse período, foi determinada a atividade enzimática da UC-r nativa e de seus conjugados como descrito anteriormente na seção 4.2.2. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 4.4.4 Ensaio de Imunogenicidade da UC-r Nativa e seus Conjugados em Camundongos

Foram utilizados 15 camundongos machos Balb/c, mantidos no Biotério do Centro de Biotecnologia do IPEN. Os camundongos foram divididos em 3 grupos de 5 animais e cada grupo foi tratado durante 21 dias com injeções periódicas a cada 7 dias (0, 7, 14, 21) de UC-r nativa e de seus conjugados, simulando um tratamento crônico (sem a adição de adjuvantes).

Para o grupo 1 foi injetada uma dose de 5 μg da UC-r nativa, grupo 2 foi injetado uma dose de 5 μg do conjugado UC-r-mPEG-pNP e no grupo 3 foi injetada uma dose de 5 μg do conjugado UC-r-mPEG-CN. As soluções foram preparadas pela dissolução da UC-r nativa e seus conjugados em 100 μL de PBS e foram injetadas por via intraperitoneal.

Após o período de tratamento, as amostras de sangue foram colhidas por sangramento retro-orbital e centrifugadas a 1.000 x g por 10min. A quantificação dos anticorpos foi realizada por ELISA como descrito na seção 4.4.2.2. Os ensaios foram conduzidos em triplicata para cada grupo de animais.

## 4.5 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prisma 4.0 (San Diego, CA, E.U.A.). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (S.D.). A comparação dos valores das médias foi realizada usando *one-way* análise de variância (ANOVA). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Importantes propriedades físico-químicas e biológicas da UC, extraída de várias fontes ou expressa em organismos recombinantes, têm sido investigadas, visando sua aplicação no tratamento de hiperuricemia e gota. Nesse sentido, encontramos uma série de estudos com essa enzima de diferentes fontes. UC de *Arthrobacter protoformiae* (CHUA et al., 1988); de *Bacillus subtillis* (SCHIAVON et al., 2000); recombinante de *Candida utilis* (BOMALASKI et al., 2002); recombinante de porco (SUNDY, et al., 2007; SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008 ; BIGGERS; SCHEINFELD, 2008). Ressaltando que a UC de *Aspergillus flavus* nativa (Uricozyme®) está disponível para uso clínico na França e na Itália e a forma recombinante (Rasburicase®) está em estudo para fins terapêuticos nos E.U.A, sendo classificada como droga órfã pelo FDA (CAMMALLERI; MALAGUARNERA, 2007).

Como existem poucos estudos envolvendo UC nativa de mamífero no tratamento de gota e hiperuricemia, esse foi um fator importante para verificarmos a funcionalidade da UC extraída de rim bovino. Considerando, que o Brasil em 2007 foi classificado como segundo maior produtor de rebanho bovino do mundo, de acordo com o USDA (Departamento de agricultura dos Estados Unidos), o rim bovino torna-se uma fonte abundante e de baixo custo para obtenção de UC.

Outra opção encontrada foi a UC recombinante de *Candida sp* expressa em *E.coli*, que é uma enzima disponível comercialmente e possui elevada afinidade por ácido úrico, sendo essa uma interessante propriedade bioquímica dessa enzima (BOMALASKI et al., 2002).

## 5.1 Purificação da Uricase Bovina (UC-b)

Fígado e rim são as fontes preferencialmente utilizadas para purificação de UC de tecidos dos mamíferos. O trabalho mais relevante de obtenção de UC foi feito por Mahler que utilizou fígado de porco como material de partida e obteve uma preparação homogênea de UC. Nesse trabalho, Mahler (MAHLER et al., 1955) mostrou que a UC de origem de mamífero possui o íon cobre ($Cu^{2+}$) como grupo prostético. Outros trabalhos (LEONE, 1953; ALTMAN; SMULL; BARRON, 1959; FARINA; MENNELA FARAONE, 1979; RAJOKA et al., 2006) purificaram a UC a partir de rim bovino. Embora o rim bovino já tenha sido o material de partida de alguns procedimentos de purificação, ainda não foi obtida uma amostra de UC com elevado grau de purificação e rendimento.

Devido aos obstáculos encontrados para a purificação de UC de rim bovino, existem poucos estudos a respeito de sua estrutura primária e tridimensional. Foram encontrados trabalhos que afirmam que a UC de rim bovino apresenta massa molecular de 130 kDa (FARINA; MENNELA FARAONE; LEONE, 1979) e outro afirma que essa enzima possui massa molecular de 70 kDa em gel de SDS-PAGE (RAJOKA et al., 2006). Por esta razão, elaborar um procedimento de purificação da UC a partir de rim bovino torna-se interessante.

A UC de rim bovino está presente nos peroxissomos, que são organelas intracelulares conhecidas por seu elevado pH. A UC forma estruturas cristalinas no interior dos peroxissomos, porque apresenta baixa solubilidade (USUDA et al., 1988; VOLKL; BAUMGART; FAHINI, 1988). Isso dificulta seu processo de extração, sendo esta a principal razão pelo baixo rendimento obtido nos processos de purificação. Por isso, inicialmente para extrairmos a UC do córtex renal utilizamos n-butanol para aumentar a solubilidade da enzima e inibir a ação de proteases. Devido ao ponto isoelétrico da UC-b (pI = 6,6) em pH acima de 7,0, que facilita a solubilidade da enzima, a UC-b apresenta carga negativa, por isso, após a extração com n-butanol utilizamos cromatografia aniônica com DEAE-Sepharose fast flow com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e realizamos a eluição em gradiente com Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e concentrações crescentes de KCl até 0,7 M. O cromatograma de eluição está apresentado na Figura 12.

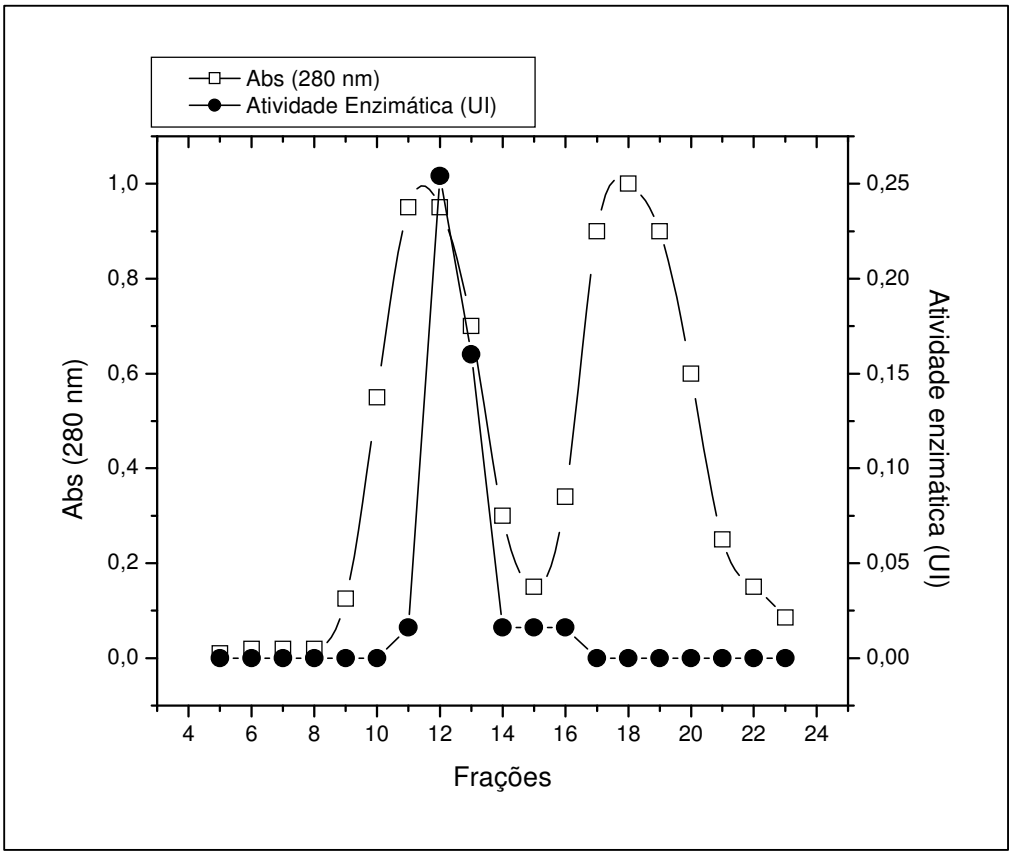



**Figura 12-** Perfil cromatográfico de purificação da UC-b obtido com frações de 10 mL recolhidas a partir da eluição com gradiente linear crescente de concentração de cloreto de potássio 0,7 M pH 7,5 e Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com resina DEAE Sepharose. (-●-) Atividade (UI), (-□-) Absorbância (280 nm).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 8 foram obtidos com esses dois procedimentos 110 mg de proteína com 75% de rendimento e um fator de purificação de 3,6.

Tabela 8 – Etapas de purificação da UC-b

| Etapas | Volume (mL) | Unidades Totais (UI) | Proteína Total (mg) | Atividade Específica (UI/mg) | Rendimento (%) | Fator Purificação |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Extração com n-butanol Sobrenadante | 50 | 58,7 | 534 | 0,11 | 100 | 1 |
| Cromatografia de Troca iônica (DEAE-Sepharose) | 20 | 44 | 110 | 0,4 | 75 | 3,6 |

Como podemos observar a UC-b foi obtida com um considerável rendimento de 75%. Como alternativa para melhorar a purificação foi empregado cromatografia de gel filtração. Assim, a terceira etapa de purificação foi realizada com Sephadex G-100 como descrito em métodos no item 4.2.4. O rendimento alcançado foi de 41% com um fator de purificação de 6,7 (Tabela 9). Resultados semelhantes foram encontrados por Farina e Mennela Faraone (1979), Rajoka et al. (2006).

Tabela 9 - Resumo das etapas de purificação da UC-b

| Etapas | Volume (mL) | Unidades Totais (UI) | Proteína Total (mg) | Atividade Específica (UI/mg) | Rendimento (%) | Fator Purificação |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Extração com n-butanol Sobrenadante | 50 | 58,7 | 534 | 0,1 | 100 | 1 |
| Cromatografia de Troca iônica (DEAE Sepharose) | 20 | 44 | 110 | 0,4 | 75 | 3,6 |
| Cromatografia de Gel Filtração (Sephadex G-100) | 100 | 24 | 32,4 | 0,7 | 41 | 6,7 |

A UC-b obtida a partir de rim bovino foi utilizada nos estudos de modificação química por *PEGlação* e para determinação de parâmentros físico-químicos e enzimológicos da UC-b nativa e modificada.

A Figura 13 representa o perfil protéico da UC-b em eletroforese SDS-PAGE 10% após as principais etapas de purificação. A seta indica a enzima extraída de rim bovino que possui massa molecular em torno de 70 kDa como obtido por Rajoka et al. (2006).

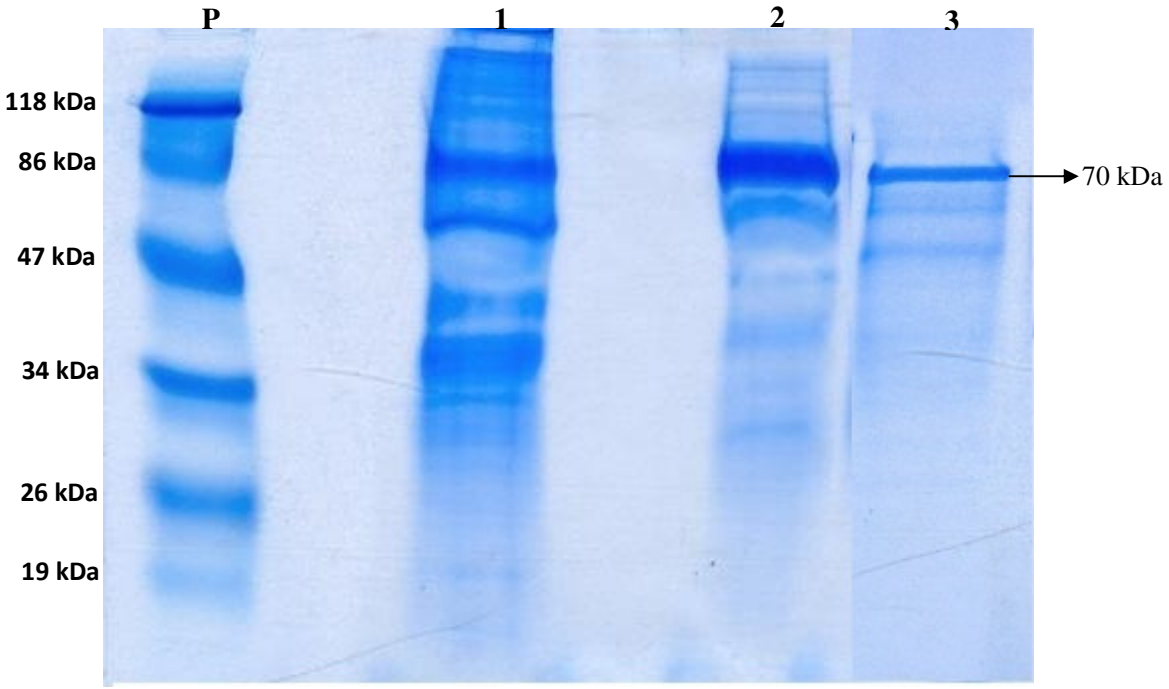


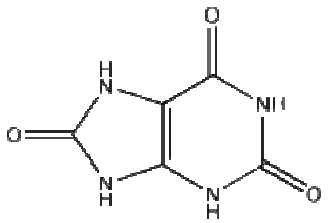

**Figura 13** – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS – PAGE 10%. Perfil protéico das etapas de purificação da uricase extraída de rim bovino. P: Padrão de massa molecular; 1: extrato bruto; 2: eluído obtido da cromatografia de troca iônica (DEAE–Sepharose); 3: amostra obtida após cromatografia de Gel Filtração (Sephadex G-100). A seta ⟶ indica banda em torno de 70 kDa correspondente a UC-b.

## 5.2 Purificação da Uricase Recombinante de *Candida sp* (UC-r)

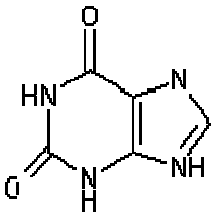
*Candida utilis* é amplamente utilizada para a produção de UC. Vários estudos empregaram *C. utilis* como fonte de obtenção de UC (NISHIMURA et al., 1979; NISHIMURA; MATSUSHIMA; INADA, 1981; CHEN et al., 1981; KOYAMA; ICHIKAWA; NAKANO, 1996; BOMALASKI et al., 2002). Essa enzima foi clonada e expressa em *E. coli*. O gene contém 909 pares de bases sem qualquer íntron e codifica a proteína composta por 303 resíduos de aminoácidos com massa de 34.1463 Da (KOYAMA; ICHIKAWA; NAKANO, 1996). A UC microbiana de *C. utilis* é um tetrâmero de 140 kDa e não requer qualquer cofator para a oxidação enzimática (BONNETE et al., 2001).

A UC recombinante foi adquirida comercialmente com o objetivo de conseguirmos uma UC-r altamente purificada e com um elevado rendimento. Para isso, foi utilizada cromatografia de afinidade, uma técnica de alto desempenho para purificação de proteína, devido à sua capacidade específica de retenção da amostra por afinidade, o que garante uma eluição específica e consequentemente elevada purificação.

A UC-r foi purificada utilizando cromatografia de afinidade com a resina xantina agarose. Essa é uma resina altamente específica para UC-r devido ao tipo de ligante acoplado à resina. A UC-r possui uma elevada afinidade pela xantina que apresenta uma estrutura química semelhante à molécula de ácido úrico, substrato da UC-r como esquematizado na Figura 14.




**(A)**




**(B)**

**Figura 14 -** Representação da estrutura química do ácido úrico (A) e do ligante xantina (B) utilizado para cromatografia de afinidade.

A UC-r foi então altamente purificada com um rendimento de 75%, atividade específica de190 UI/mg e um fator de purificação de 2 vezes. Pelo padrão das amostras na eletroforese SDS-PAGE 10% (Figura 15, poço 2) observa-se a UC-r obtida.

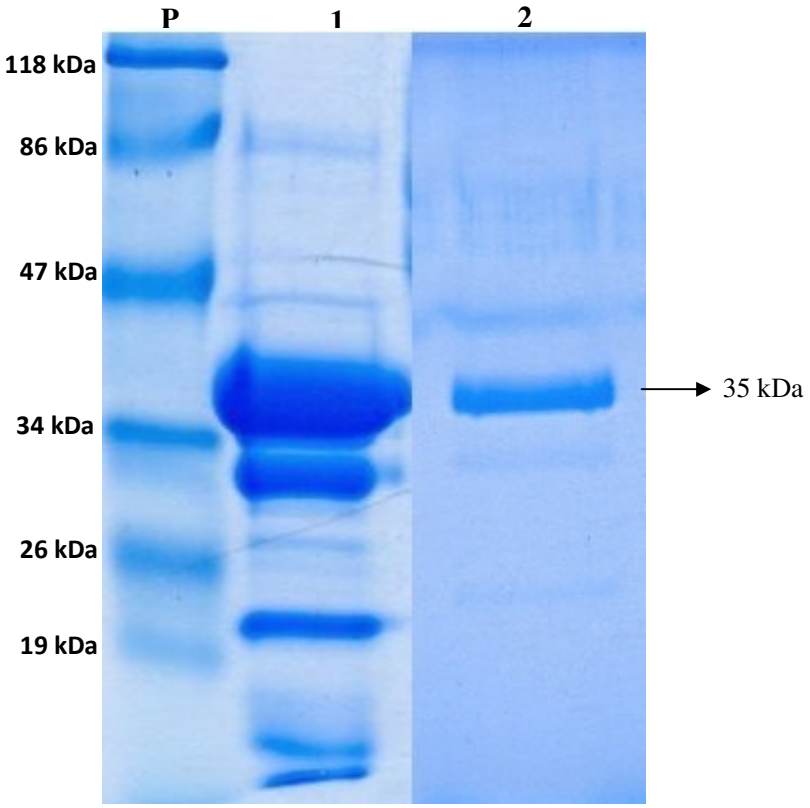



**Figura 15 –** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS – PAGE 10%. Perfil protéico das etapas de purificação da UC-r. P: Padrão de massa molecular; 1: UC-r comercial; 2: UC-r purificada após cromatografia de afinidade. A seta ⟶ indica banda em torno de 35 kDa correspondente a UC-r.

De acordo com as amostras obtidas com a Figura 15 podemos concluir que a massa molecular de cada subunidade da UC-r de *Candida sp* é aproximadamente 35 kDa, valor similar ao descrito na literatura (KOYAMA; ICHIKAWA; NAKANO, 1996).

Após a obtenção da UC purificada de rim bovino (UC-b) e recombinante de *Candida sp* (UC-r), essas enzimas foram modificadas por *PEGlação*.

As principais variáveis estudadas para obtenção de um derivado proteico complexado ao metoxi-PEG compreendem: o grau de substituição nos resíduos dos aminoácidos alvo, o comprimento e características das cadeias de metoxi-PEG e o grupo funcional reativo do polímero. Portanto, o efeito específico da *PEGlação* sobre as propriedades físico-químicas e biológicas da proteína é determinado pelas propriedades da proteína e do polímero, bem como pela estratégia de *PEGlação* (CALICETI; VERONESE, 2003).

Para avaliar as diferenças de reatividade entre os grupos funcionais dos polímeros metoxipolietilenoglicol-p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) e 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina (mPEG-CN) e definir o grau de modificação que poderia ser alcançado com cada enzima (UC-r, UC-b), inicialmente, foram preparados conjugados sob as mesmas condições de reação, para uma proteína modelo cuja estrutura primária é bem conhecida, albumina de soro bovino (BSA), para ser o controle da reação de *PEGlação*. Dessa forma, a modificação química da albumina foi realizada como descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Proporção molar mPEG-CN/BSA e mPEG-pNP/ BSA

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Branco |
|---|---|---|---|---|---|
| mPEG-CN ou mPEG-pNP (mg) | 8,8 | 4,4 | 2,2 | 1,1 | - |
| BSA (mg) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1 |
| mPEG-CN ou mPEG-pNP/BSA (m/m)[a] | 8,8 | 4,4 | 2,2 | 1,1 | - |
| mPEG-CN ou mPEG/$NH_2$[b] | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | - |

a: proporção massa / massa
b: proporção molar entre o número de moléculas de mPEG-CN ou mPEG-pNP e o número de amino grupos disponíveis na enzima para reação. Cada molécula de BSA possui 59 amino grupos (58 ε-lisinas e 1 N-terminal) disponíveis.
mPEG-CN: 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina
mPEG-pNP: metoxipolietilenoglicol p-nitrofenil carbonato
BSA: Albumina de soro bovino

Com a BSA a reação de *PEGlação* foi realizada em tampão fosfato pH 8,0 perfazendo um volume final de 1,0 mL os passos sequintes estão descritos no item 4.2.6. A quantidade de mPEG ligado à BSA foi estimada pela medida da redução dos amino grupos primários da proteína utilizando, o método de TNBS (HABEEB, 1966). Assim, foi preparada uma curva padrão de BSA nativa com TNBS (Figura 16).

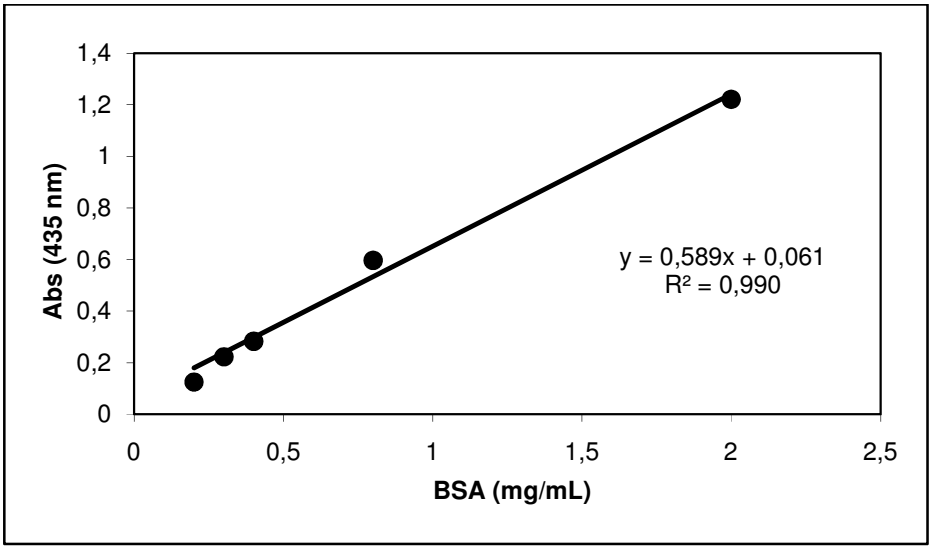



**Figura 16 -** Curva padrão de BSA para determinação de amino grupos livres empregando o método colorimétrico por TNBS.

Após a reação de *PEGlação* da BSA com mPEG-pNP ou mPEG-CN o grau de modificação química da proteína foi estimado por TNBS, sendo que a porcentagem de amino grupos primários na BSA nativa foi considerado 100%. Foi determinado também o perfil proteico dessas amostras em eletroforese SDS-PAGE 10%. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 11 e Figura 17.

Tabela 11 - Avaliação da extensão de modificação dos amino grupos da BSA nas diferentes proporções molares com mPEG-pNP e mPEG-CN.

| Proporção molar mPEG/$NH_2$[a] | Extensão da modificação BSA-mPEG-pNP (%) | Extensão da modificação BSA-mPEG-CN (%) |
|---|---|---|
| 8,8 | 16 | 30 |
| 4,4 | 14 | 27 |
| 2,2 | 9 | 20 |
| 1,1 | 5 | 11 |

a: proporção molar entre o número de moléculas de mPEG-CN ou mPEG-pNP e o número de amino grupos disponíveis na enzima para reação. Cada molécula de BSA possui 59 amino grupos (58 ε-lisinas e 1 N-terminal) disponíveis.
mPEG-CN: 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina
mPEG-pNP: metoxipolietilenoglicol p-nitrofenil carbonato
BSA: Albumina de soro bovino.

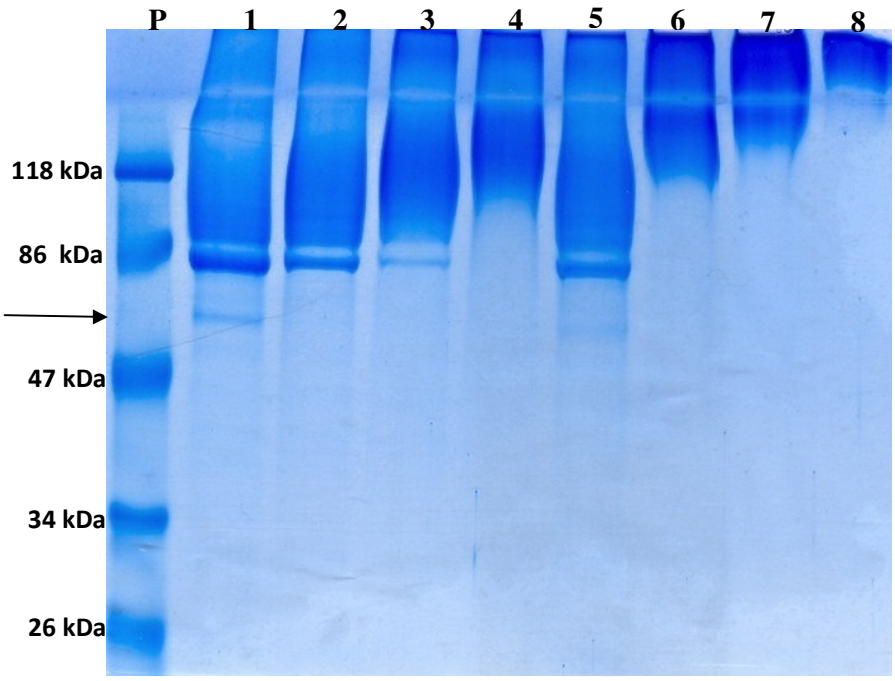



**Figura 17-** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% da BSA modificada com mPEG-pNP ou mPEG-CN em diferentes proporções molares. **P**: padrão de massa molecular **1:**BSA/mPEGpNP=1,1; **2:**BSA/mPEGpNP=2,2; **3:**BSA/mPEG-pNP=4,4**;** **4**:BSA/mPEG-pNP=8,8; **5**:BSA/mPEG-CN=1,1**;** **6**:BSA-mPEG-CN=2; **7**: BSA/mPEG-CN=4,4; **8**: BSA/mPEG-CN =8,8. A seta ⟶ indica BSA nativa banda ao redor de 66 kDa.

De acordo com resultados obtidos (Tabela 11, Figura 17) podemos observar que o grupo reativo ligado químicamente ao metoxipolietileglicol confere diferentes propriedades a reação de *PEGlação*. O mPEG ativado com cloreto de cianúrico nas diferentes proporções molares de mPEG/$NH_2$ (1,1; 2,2; 4,4; 8,8) atingiu o dobro da extensão de modificação química da BSA em relação ao mPEG ativado com o grupo p-nitrofenil carbonato nas mesmas condições. O gel SDS-PAGE (Figura 17) confirma a maior extensão da modificação da BSA alcançada com mPEG-CN.

Quando comparamos o grau de modificação atingindo pela BSA com o mPEG-pNP percebemos que esse polímero é menos reativo, porque podemos observar pelos poços 1, 2 e 3 que existe a formação de um conjugado em torno de 86 kDa e a BSA nativa livre (poço 1). Por outro lado, com mPEG-CN nas mesmas condições, temos apenas no poço 5 a formação do conjugado de 86 kDa e traços de BSA livre. Nos poços 6, 7 e 8, ocorreu um elevado grau de modificação da BSA, o que dificultou a mobilidade das amostras pelo gel.

Esses resultados demonstram que existe uma considerável diferença de reatividade entre os metoxi-PEGs e que o mPEG-CN foi mais reativo que o mPEG-pNP. O mPEG-pNP também se comportou de forma semelhante com a lisozima de clara de ovo (FREITAS; ABRAHÃO-NETO, 2010a). Em geral, o mPEG-pNP apresenta uma menor reatividade, favorecendo uma seletiva modificação de amino grupos da proteína, sendo essa uma interessante característica desse polímero (CHO et al., 2007).

A maioria das aplicações de conjugação de mPEG envolve moléculas lábeis, consequentemente, essa reação requer condições brandas de temperatura e pH (CALICETI; VERONESE; JONAK, 1999). Além disso, para conjugarmos o polímero (mPEG) as cadeias das moléculas de proteínas, polipeptídeos, enzimas ou pequenas moléculas orgânicas, é necessário ativar o mPEG pela preparação de um derivado de mPEG que tenha pelo menos um grupo funcional reativo em sua cadeia. Esse grupo funcional deve atuar como ponto de ligação para a proteína e deve ser escolhido baseando-se no tipo de ligante que estará disponível na molécula proteica.

Nesse estudo foi empregado o mPEG-CN (Figura 18A) e o mPEG-pNP (Figura 18E). Para obtenção do mPEG-CN, o PEG ativado pode ser preparado com o cloro do grupo tricloro triazina (cloreto de cianúrico) o qual contém 2 cloros disponíveis para a modificação da proteína. Assim, o mPEG-diclorotriazina pode reagir com os grupos nucleofílicos da superfície das proteínas tais como: lisina, serina, tirosina, cisteína e histidina. Primeiramente, um átomo de cloro é substituído durante a reação de ligação ao mPEG e o outro átomo de cloro remanescente, menos reativo, torna-se sítio de ligação química do polímero a proteína. O mPEG-pNP é preparado pela reação com o grupo carbonilimidazol, sendo esse derivado usado para produzir conjugados por meio da ligação carbamato entre o mPEG e a proteína. Esse grupo reativo reage mais seletivamente em relação aos resíduos de lisina e N-terminal de outros aminoácidos do que o mPEG-CN. Em geral, o mPEG-pNP apresenta uma menor reatividade, favorecendo uma seletiva modificação de amino grupos da proteína (CHO et al., 2007).

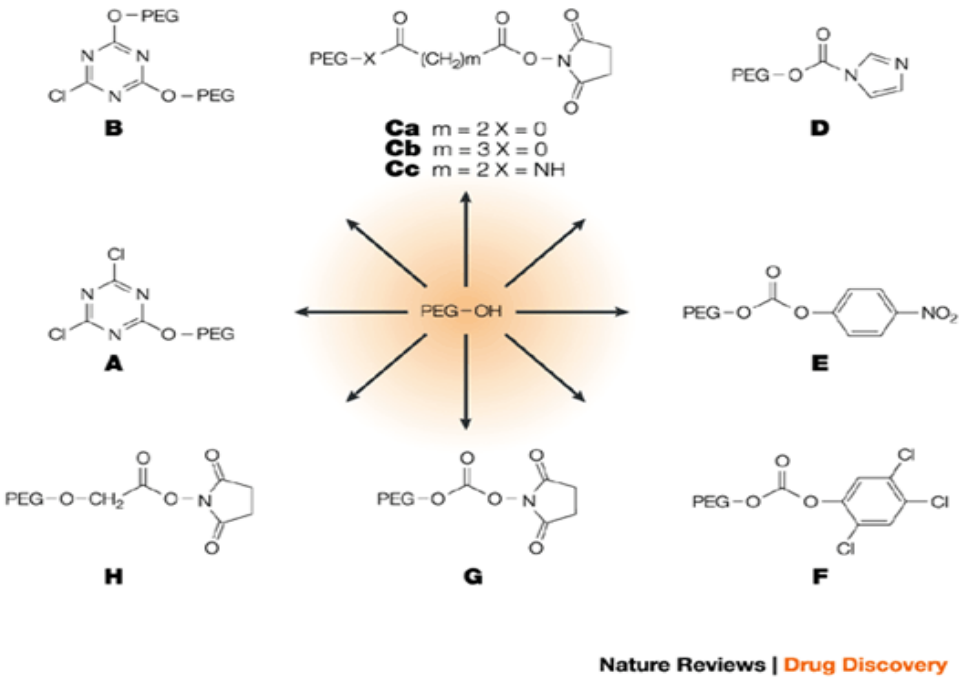



**Figura 18 -** Diferentes grupos reativos do PEG. **A:** Cloreto de cianúrico; **B**: variação do método de obtenção do cloreto de cianúrico; **Ca**: Polietilenoglicol método (PEG)-succinimidil succinato; **Cb**: substituição do resíduo de succinato por glutarato; **Cc:** substituição do éster alifático em Ca por uma ligação amida; **D:** método formato de imidazol; **E** e **F**: PEG usando variações de fenilcarbonatos; **G**: PEG succinimidil carbonato; **H**: PEG ativado com succinimidil éster.
Fonte: CHO et al., 2007.

Portanto, devido ao grupo funcional do mPEG-CN ser menos seletivo em relação aos aminoácidos disponíveis da proteína foi alcançada uma maior extensão de modificação da BSA quando comparamos com o mPEG-pNP. Esses resultados ressaltaram a importância desse parâmetro que deve ser levado em consideração durante a modificação química da uricase que é a proteína-alvo desse estudo.

Para verificarmos a extensão da modificação química sofrida pela uricase (UC-r ou UC-b) com os polímeros mPEG-CN ou mPEG-pNP ambos de 5 kDa, os conjugados foram preparados em diferentes proporções molares. Essa medida foi necessária para superar a diferença de reatividade dos polímeros, que depende tanto do grau de ativação do polímero, como da acessibilidade à superfície da proteína.

## 5.3 Efeito da Proporção em Massa do mPEG-pNP e mPEG-CN no Grau de modificação e na Atividade Enzimática da UC-r

A UC-r foi modificada com mPEG-pNP e mPEG-CN nas proporções estabelecidas nas Tabelas 4 e 5 respectivamente [item 4.2.6]. Apesar de terem sido preparadas 4 proporções em massa diferentes de mPEG-pNP/UC-r e mPEG-CN/UC-r apenas uma proporção em massa foi satisfatória para cada polímero (resultados não mostrados). Tanto com mPEG-pNP como o mPEG-CN a UC-r foi modificada eficientemente apenas com a maior proporção em massa de 13:1 para o mPEG-pNP/UC-r e de 8,6:1 para o mPEG-CN/UC-r.

Para cada conjugado obtido foi determinada a atividade enzimática residual, a extensão da modificação da UC-r (%) por TNBS, além do $K_M$ e a massa em eletroforese SDS-PAGE 7,5 %.

Após a modificação da UC-r com mPEG-pNP e mPEG-CN de 5 kDa os conjugados apresentaram uma interessante propriedade mantendo 87% de atividade enzimática após modificação química com mPEG-pNP e 75% quando modificada com o mPEG-CN (Tabela 12).

Trabalhos anteriores que modificaram a UC com mPEG de 5 kDa com diferentes graus de *PEGlação* mostraram uma atividade enzimática residual de 15% e 45% (NISHIMURA et al., 1979; NISHIMURA; MATSUSHIMA; INADA, 1981). Outros estudos de *PEGlação* também foram realizados com UC-r expressa em *E.* coli, usando PEG ativado com succinimidil succinimida de 5 kDa ou 20 kDa (BOMALASKI et al., 2002) e PEG linear (5 kDa) ou ramificado (10 kDa) contendo um aminoácido terminal nor-leucina or lisina (CALICETI; VERONESE; JONAK, 1999; CALICETI; SCHIAVON; VERONESE, 2001). No trabalho realizado por Bomalaski et al. (2002) o conjugado obtido com mPEG 20 kDa apresentou manutenção de 86% da atividade enzimática quando comparado ao conjugado obtido com mPEG 5 kDa que manteve 50% da atividade enzimática.

O principal fator responsável pela diferença de atividade enzimática entre conjugados obtidos é a extensão do grau de modificação atingido para cada conjugado (CALICETI; VERONESE, 2003; VERONESE; PASUT, 2005). Estudos anteriores verificaram que o grau de modificação da UC de *C. utilis* e UC recombinante de suíno (*porcine like*) está diretamente relacionado com a estrutura tridimensional da enzima que impede a acessibilidade aos resíduos de amino terminal e de lisinas. Além disso, temos o impedimento estérico que ocorre entre as moléculas de mPEG ligadas e as moléculas que

tentam se aproximar do resíduo de lisina vizinho da enzima nativa, o que diminui a acessibilidade dependendo da proximidade entre os resíduos (CALICETI; SCHIAVON; VERONESE, 2001; SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

Assim, apesar da seqüência de aminoácidos de cada subunidade da UC-r de *C. utilis*, ser composta por um amino terminal e 30 resíduos de lisina (KOYAMA; ICHIKAWA; NAKANO, 1996 ) que teoricamente estariam disponíveis para reação de *PEGlação*, apenas 10-12 resíduos de cada subunidade estariam acessíveis na superfície tetramérica da enzima (CALICETI; SCHIAVON; VERONESE, 2001).

No presente estudo, a extensão da modificação química da UC-r com os diferentes polímeros foi estimada pela medida da redução dos amino grupos primários da UC-r utilizando ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Assim, foi preparada uma curva padrão da UC-r nativa com TNBS (Figura 19).

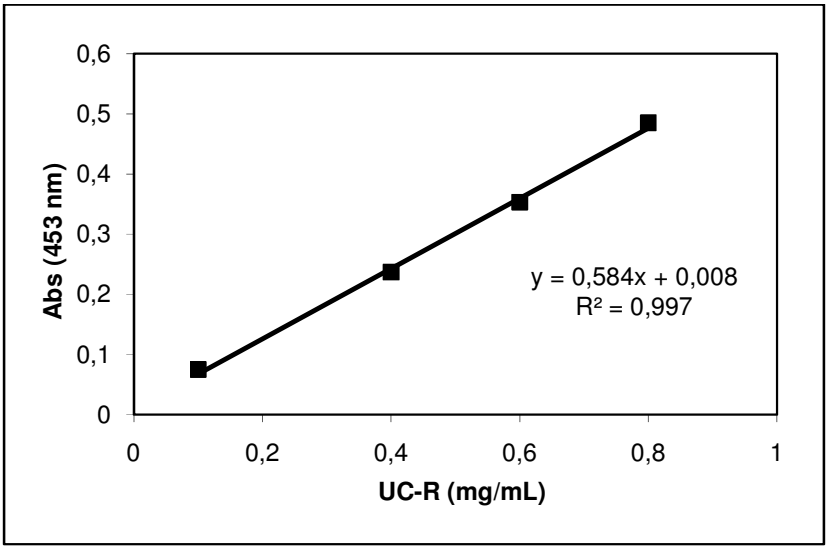



**Figura 19 -** Curva padrão da UC-r nativa para determinação de amino grupos livres empregando o método colorimétrico por TNBS.

A partir da curva padrão da UC-r nativa foi possível estimar a porcentagem de modificação da UC-r com mPEG-pNP e com mPEG-CN. Apesar de ter sido empregada uma proporção molar em excesso entre o mPEG e a UC-r, foi alcançado 20% de modificação da UC-r (aproximadamente 6 resíduos) com ambos os polímeros, de acordo com os resultados obtidos por TNBS (Tabela 12). Esse resultado sugere que a estrutura tridimensional da UC-r promoveu o impedimento estérico entre as moléculas de PEG na superfície da enzima, o que favoreceu a manutenção da atividade enzimática residual de 87% e 75% dos conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN respectivamente.

A diferença de atividade enzimática residual entre os conjugados, também pode estar relacionada com a propriedade que o mPEG-CN possui de se ligar a outros resíduos de aminoácidos, além das lisinas como: serina, tirosina, cisteina e histidina (CHO et al., 2007) que podem estar presentes na superfície da UC-r. Esse fato pode ter ocasionado alterações na enzima suficientes para ocasionar uma diminuição da atividade enzimática residual. Por isso, o conjugado UC-r-mPEG-CN, apesar de possuir 20% de modificação apresentou uma atividade enzimática residual de 75% enquanto que o conjugado UC-mPEG-pNP com o mesmo grau de modificação apresentou uma atividade enzimática residual de 87%.

Visando uma aplicação terapêutica dos conjugados obtidos, outro parâmetro importante que foi estudado para avaliar a funcionalidade dos conjugados foi o $K_M$. Pois, como o objetivo é catalisar a hidrólise do ácido úrico plasmático, é desejável que os conjugados apresentem alta afinidade pelo substrato. Portanto, o $K_M$ de cada espécie (UC-r nativa e seus conjugados) foi calculado a partir da linearização da equação de *Michaelis-Menten*.

Os gráficos da velocidade enzimática em função da concentração do substrato da UC-r nativa e o gráfico de linearização duplo recíproco para determinação do $K_M$ pela equação de *Lineweaver-Burk* estão representados na Figura 20 A e B respectivamente.

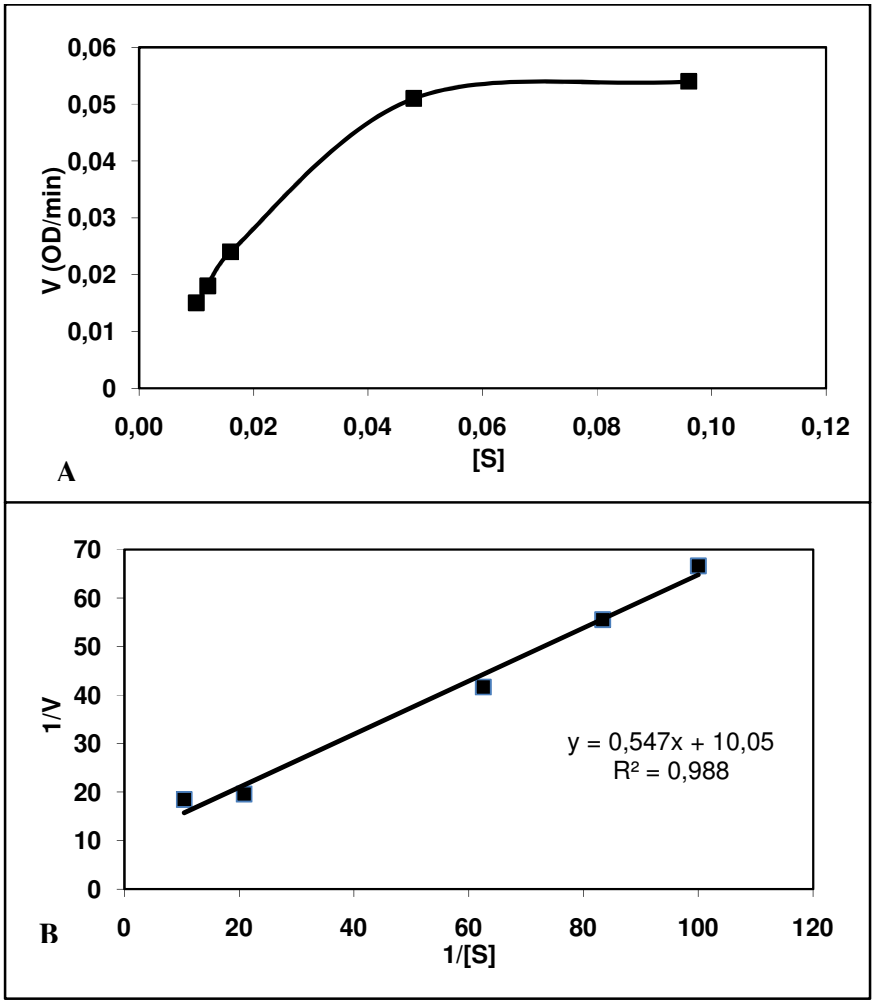



**Figura 20 –** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-r nativa (**A**) e determinação da equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ da UC-r nativa. Os plotes do recíproco da velocidade inicial versus o recíproco da concentração de substrato utilizado para determinar a velocidade inicial gera uma linha cujo intercepto x é -1/ $K_M$ (NELSON; COX, 2006).

A partir da equação do gráfico 20 B foi possível calcular o $K_M$ da UC-r nativa a 37 °C e foi encontrado o valor de $K_M = 5,4 \times 10^{-5}$M. Esse valor é similar ao $K_M$ descrito para UC de outras fontes tais como *Bacillus fastidiosus* e *Arthrobacter protoformiae* cujo $K_M$ é $5,0 \times 10^{-5}$M (SCHIAVON et al., 2000) e *Aspergillus flavus* cujo $K_M$ é de $6,1 \times 10^{-5}$ M. Para UC nativa de *C. utilis* foi determinado um valor de $K_M = 2,0 \times 10^{-5}$ M (BOMALASKI et al., 2002).

Os conjugados obtidos com mPEG-pNP (Figura 21 A e B) ou mPEG-CN (Figura 22 A e B) também tiveram os seus respectivos $K_M$ calculados nas mesmas condições que a UC-r nativa.

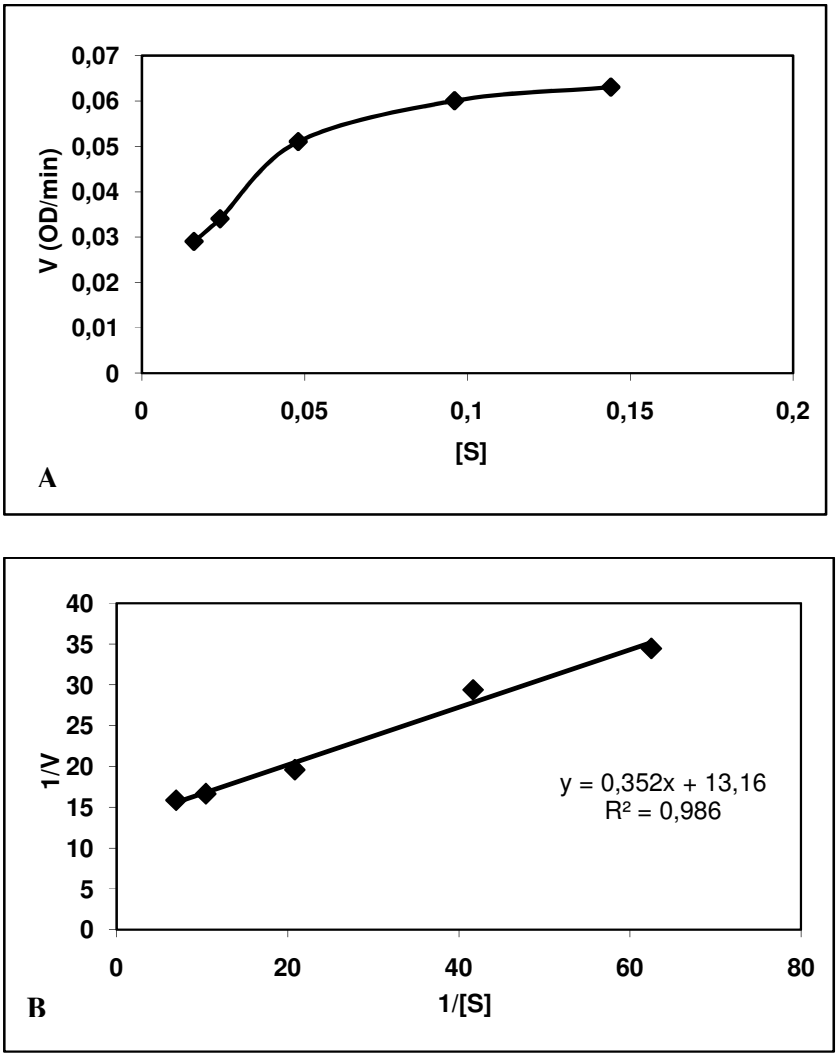
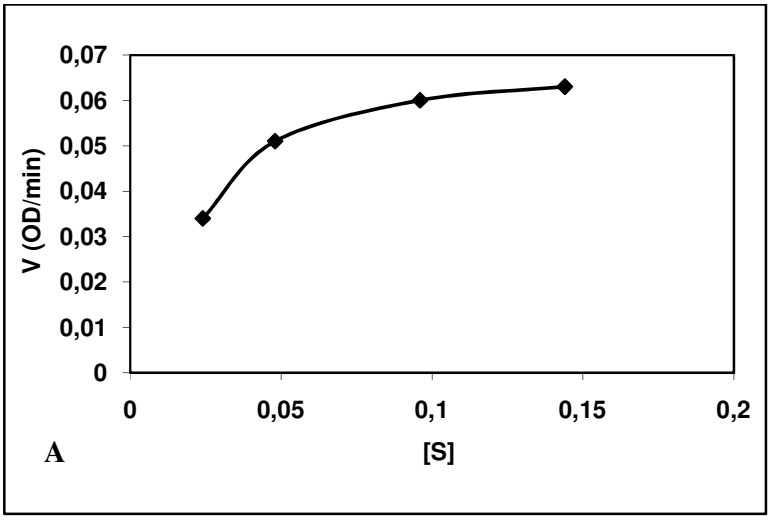



**Figura 21 –** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-r–mPEG-pNP (**A**) e determinação da equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ da UC-r-mPEG-pNP. Os plotes do recíproco da velocidade inicial versus o recíproco da concentração de substrato utilizado para determinar a velocidade inicial gera uma linha cujo intercepto x é -1/ $K_M$ (NELSON; COX, 2006).



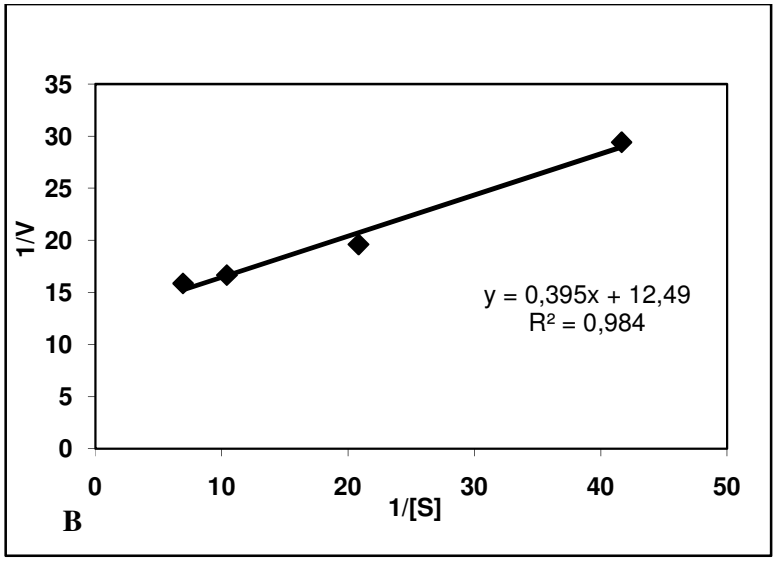




**Figura 22 –** Determinação da velocidade máxima de reação daUC-r–mPEG-CN (**A**) e determinação da equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ da UC-r-mPEG-CN. Os plotes do recíproco da velocidade inicial versus o recíproco da concentração de substrato utilizado para determinar a velocidade inicial gera uma linha cujo intercepto x é -1/ $K_M$ (NELSON; COX, 2006).

Os valores de $K_M$ obtidos para os conjugados UC-r-mPEG-pNP ($K_M = 2,7 \times 10^{-5}$M) e para o conjugado UC-r-mPEG-CN ($K_M = 3,0 \times 10^{-5}$M), indicaram que a reação de *PEGlação* aumentou a afinidade da enzima pelo seu substrato. Provavelmente, esse menor valor de $K_M$ está relacionado com a maior difusibilidade do substrato, ocasionada pelo caráter anfipático do PEG que facilita a ligação da enzima ao substrato que é pouco solúvel (SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

Esses resultados do $K_M$ da UC-r nativa e modificada são de relevância fisiológica e clínica, pois o fato de ocorrer uma diminuição do $K_M$ nos conjugados é um aspecto interessante para uso da UC-r modificada como agente terapêutico. Trabalho anterior verificou também a diminuição do $K_M$ da UC após ser imobilizada (ARORA et al., 2007) e resultado semelhante também ocorreu com a tripsina modificada por *PEGlação* (TREETHARNMATHUROT et al., 2008).

Tabela 12 – Principais propriedades da UC-r modificada por *PEGlação*.

| Amostras | Razão molar mPEG/$NH_2$ [a] | Extenção da modificação da UC-r [b] (%) | Atividade enzimática residual (%) | $K_M$ (M) [c] |
|---|---|---|---|---|
| UC-r nativa | - | - | 100 | $5,4 \times 10^{-5}$ |
| UC-r-mPEG-pNP | 3 | 20 | 87 | $2,7 \times 10^{-5}$ |
| UC-r-mPEG-CN | 2 | 20 | 75 | $3,0 \times 10^{-5}$ |

**a**: Razão molar mPEG/$NH_2$. Cada molécula de UC-r possui 121 amino groups (120 ε-lisina e 1 N-terminal)
**b**: A extensão da modificação da enzima foi calculada de acordo amino grupos livres na UC-r pelo método TNBS
**c:** Parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten foram obtidos por Lineweaver-Burk plots
mPEG-CN: 2-O-metoxipolietilenoglicol-4,6-dicloro-s-triazina
mPEG-pNP: metoxipolietilenoglicol p-nitrofenil carbonato
UC-r: Uricase recombinante de *Candida sp*

Com a finalidade de avaliar uma possível aplicação terapêutica dos conjugados obtidos, além do $K_{M,}$ outro importante parâmetro estudado, relacionado com o grau de modificação da enzima, foi a massa molecular dos conjugados obtidos.

A Figura 23 representa o padrão de migração da UC-r nativa e seus conjugados investigados por eletroforese SDS-PAGE 7,5%. O perfil protéico dos conjugados foram semelhantes (Figura 23 A), indicando que a massa molecular dos conjugados obtidos com ambos os polímeros são de 50 kDa (forma predominante) e 65 kDa aproximadamente. Além disso, como o procedimento de revelação do gel com solução de iodo (Figura 23 B) é específico para o PEG, esse método mostra a ligação do PEG à proteína e indica a massa molecular de cada conjugado (BAILON; BERTHOLD, 1998). Portanto, o perfil apresentado pelos conjugados sugere que 3 e 6 moléculas de PEG foram ligadas a cada subunidade da enzima, formando conjugados de aproximadamente 200 kDa e 260 kDa, respectivamente.

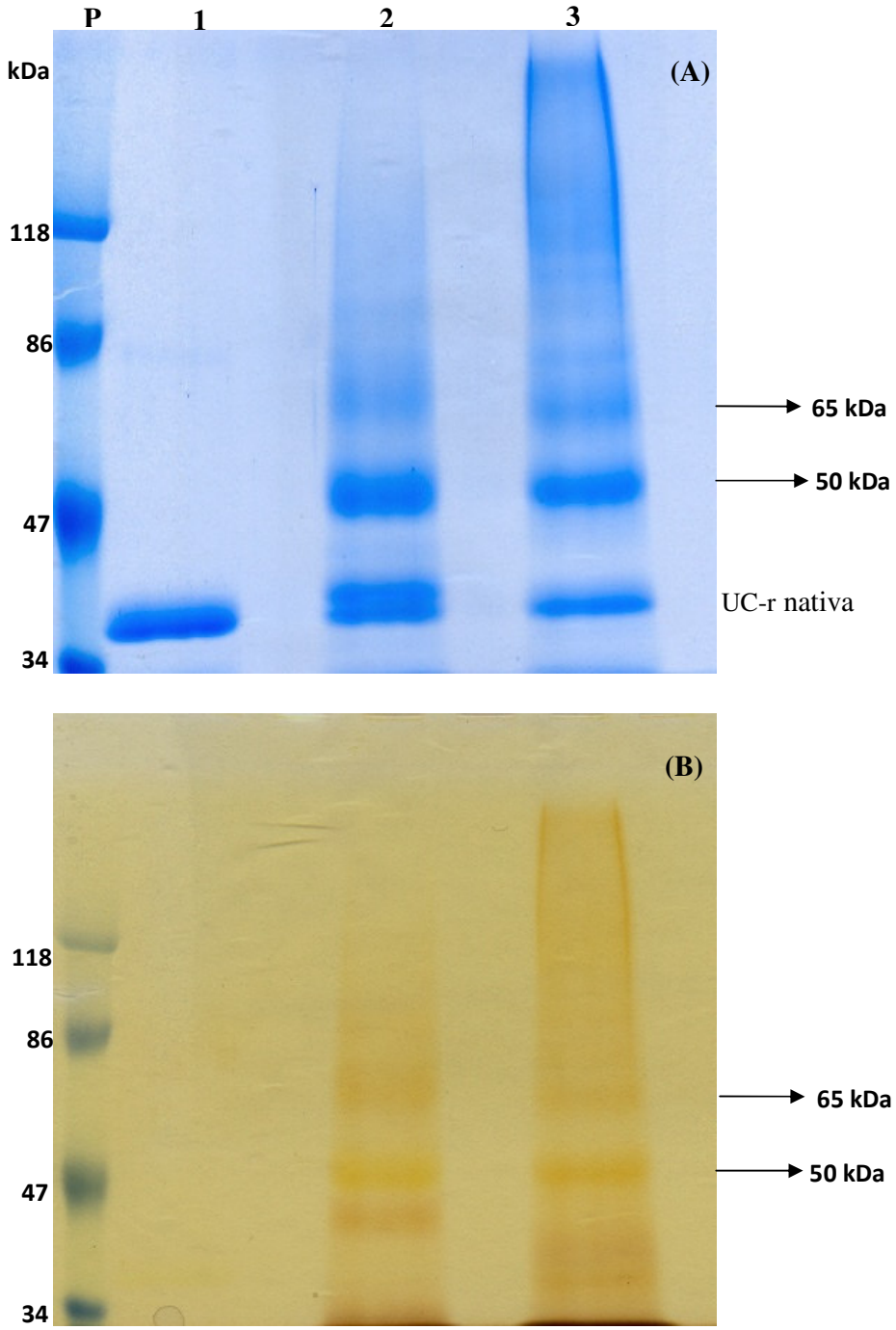



**Figura 23 -** Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 7,5% da UC-r nativa e modificada usando dois métodos de visualização. Em **(A)** temos o gel corado com Gelcolde® esse corante é específico para proteínas. Em **(B)** o gel corado com solução de iodo para visualização específica do PEG ligado. P: padrão de massa molecular; **1**: UC-r nativa; **2**: UC-r-mPEG-pNP; **3**: UC-r-mPEG-CN.

Com o objetivo de acrescentar informações sobre a massa molecular exata dos conjugados obtidos foram realizadas várias tentativas por espectroscopia de massa MALDI-TOF. Contudo, em todas as análises realizadas a UC-r nativa e os seus conjugados não foram detectados, indicando que essa técnica apresenta limitações, principalmente quando envolve proteínas de elevada massa molecular como a UC-r de 140 kDa ou seus conjugados de aproximadamente 200 e 260 kDa. Entretanto, para proteínas menores como a lisozima (14,4 kDa) foi possível determinar a massa molecular da enzima nativa e de seus conjugados por MALDI-TOF (FREITAS; ABRAHÃO-NETO, 2010a).

É importante ressaltar que a reação de *PEGlação* gera um aumento da massa molecular da proteína nativa, proporcional ao número de cadeias de PEG que foram ligadas covalentemente a ela (FREITAS; ABRAHÃO-NETO, 2010b). Esse aumento no tamanho aparente da enzima e de sua massa molecular confere importantes propriedades do conjugado mPEG-proteína. Portanto, proteínas *PEGladas* apresentam alterações em suas propriedades físico-químicas quando comparadas à proteína nativa como: maior impedimento estérico, alterações nas propriedades eletrostáticas, hidrofobicidade, pI e também alterações nas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas da proteína. Essas alterações ocasionam mudanças no sistema de clearance, diminuindo a depuração renal da proteína e consequentemente aumenta seu tempo de meia-vida, o que amplia o potencial de uso da maioria das proteínas (BAILON; BERTHOLD, 1998; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002; VERONESE; PASUT, 2005; ).

Neste sentido, o aumento da massa molecular da UC-r (200-260 kDa) é uma importante propriedade para aplicação terapêutica da UC-r *PEGlada* porque irá aumentar o tempo de meia-vida da UC-r que é um fator limitante para uso terapêutico dessa enzima.

Diante desses resultados, constatamos que a reação de *PEGlação* promoveu uma maior afinidade da UC-r por seu substrato, e devido ao aumento da massa molecular pode-se sugerir um aumento no tempo de meia-vida, além de manter a atividade catalítica da UC-r em 87% (UC-r-mPEG-pNP) e 75% (UC-r-mPEG-CN).

## 5.4 Efeito da Proporção em Massa do mPEG-pNP e mPEG-CN no Grau de Modificação e na Atividade Enzimática da UC-b

Apesar de não terem sido encontradas informações detalhadas sobre a estrutura primária ou tridimensional da UC de rim bovino, foi estudada a modificação química por *PEGlação* da UC-b obtida, para avaliarmos a manutenção e/ou alterações de parâmetros enzimológicos e de propriedades físico-químicas e biológicas da UC-b tais como estabilidade, resistência à ação de proteases e estabilidade em soro humano.

A UC-b perdeu completamente a atividade enzimática quando foi modificada na maior proporção em massa com ambos os polímeros (resultados não mostrados). A modificação química da UC-b com atividade enzimática residual satisfatória foi obtida quando utilizamos uma proporção em massa de 4,3:1 mPEG-pNP/UC-b (Tabela 6) e de 2,15:1 mPEG-CN/UC-b (Tabela 7). Com essas proporções em massa foi possível obter o conjugado UC-b-mPEG-pNP com 75% atividade enzimática residual e o conjugado UC-b-mPEG-CN com 50% de atividade enzimática residual em relação à UC-b nativa. Esses resultados mostram novamente a maior reatividade do mPEG-CN em relação ao mPEG-pNP.

A modificação química da UC-b com o mPEG-CN ocasionou uma queda maior de atividade enzimática, sugerindo que esse polímero pode ter se ligado à aminoácidos próximos ao sítio catalítico da enzima, sendo esse um possível fator responsável pela diferença de atividade enzimática residual entre os conjugados obtidos.

Com o objetivo de avaliar a funcionalidade dos conjugados obtidos, o $K_M$ aparente da UC rim bovino e de seus conjugados UC-b-mPEG-pNP e UC-b-mPEG-CN foram calculados. Os gráficos da velocidade enzimática em função da concentração do substrato da UC-b nativa e o gráfico de linearização duplo recíproco para determinação do $K_M$ aparente pela equação de *Lineweaver-Burk* estão representados na Figura 24 A e B respectivamente.

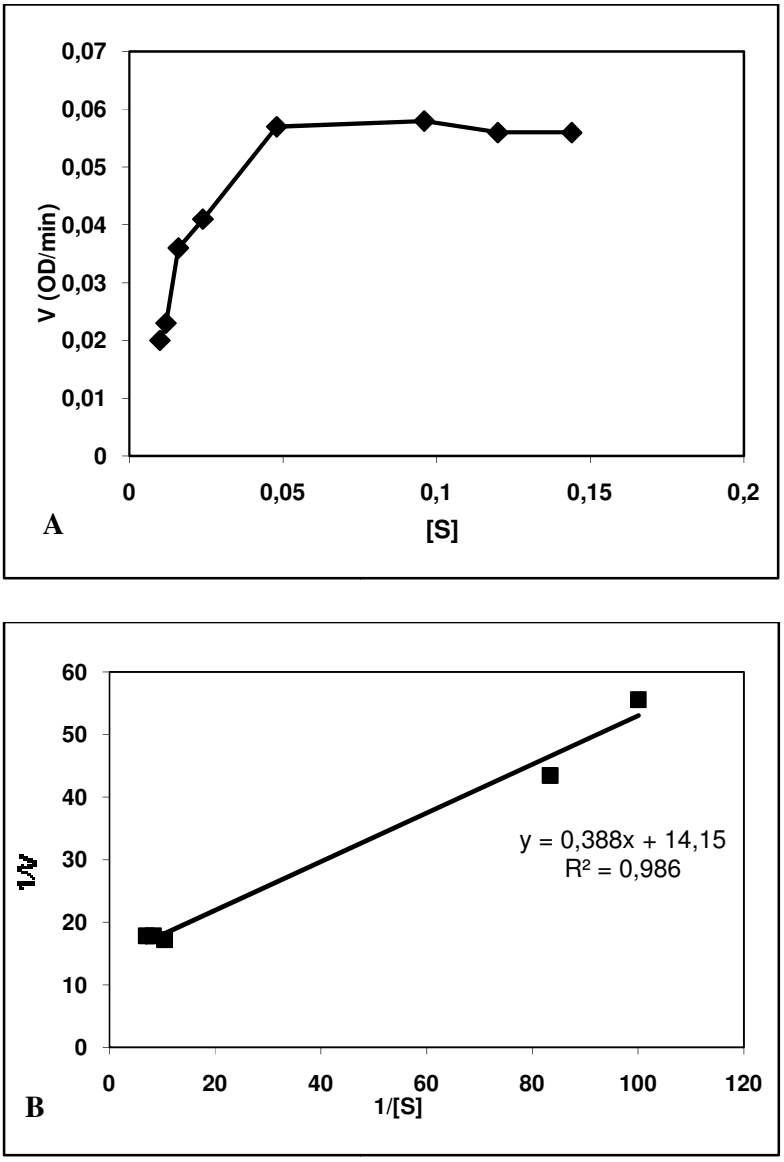



**Figura 24 –** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-b nativa (**A**) e determinação da Equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ aparente da UC-b nativa. Os plotes do recíproco da velocidade inicial versus o recíproco da concentração de substrato utilizados para determinar a velocidade inicial gera uma linha cujo intercepto x é $-1/K_M$ (NELSON;COX, 2006).

O $K_M$ aparente da UC-b nativa foi calculado a partir da equação do gráfico 24 B e o valor encontrado foi de 2,7 x $10^{-5}$M. Outros estudos encontraram valores semelhantes de $K_M$ para UC de rim bovino de 2,5 x $10^{-5}$M (FARINA; MENNELA FARONE; LEONE, 1979) e 1,3 x $10^{-5}$M (RAJOKA et al., 2006).

Os conjugados obtidos com a enzima modificada com mPEG-pNP ou mPEG-CN também teve seus respectivos $K_M$ aparente calculados nas mesmas condições que a UC-b nativa. Os resultados estão apresentados na Figura 25 A e B.

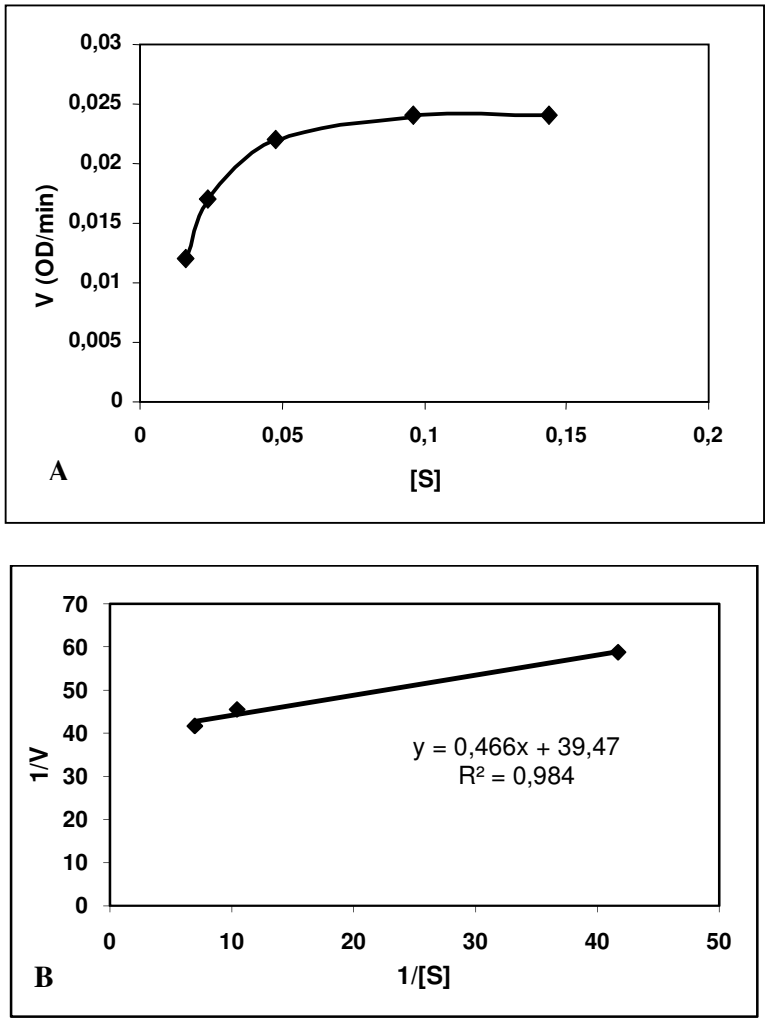



**Figura 25 –** Determinação da velocidade máxima de reação da UC-b-mPEG-pNP (**A**) e determinação da Equação duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para cálculo do $K_M$ aparente da UC-b-mPEG-pNP. Os plotes do recíproco da velocidade inicial versus o recíproco da concentração de substrato utilizados para determinar a velocidade inicial gera uma linha cujo intercepto x é $-1/K_M$ (NELSON;COX, 2006).

O $K_M$ aparente do conjugado UC-b-mPEG-pNP foi de $K_M = 1,2 \times 10^{-5}$M e resultado muito próximo foi obtido para o conjugado UC-b-mPEG-CN $K_M = 1,5 \times 10^{-5}$M (resultado não mostrado). Assim, podemos concluir a reação de *PEGlação* da UC-b nativa com mPEG também pode ter favorecido a degradação catalítica do ácido úrico pela enzima modificada e essa diminuição do valor do $K_M$ aparente pode ser um resultado interessante, pois indica um aumento da afinidade da enzima modificada em relação ao ácido úrico.

Assim, como discutido anteriormente para a UC-r, provavelmente, este menor valor de $K_M$ está relacionado com o substrato da enzima. Pois, como o ácido úrico é uma molécula pequena e capaz de difundir através das moléculas de mPEG, devido ao caráter anfipático do PEG, isso facilita a ligação da enzima ao substrato que é pouco solúvel (SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008). Essas informações a respeito do $K_M$ da UC-b modificada têm uma importante relevância, pois indica que a funcionalidade biológica da enzima foi mantida, com um aumento de afinidade pelo ácido úrico, o que é um interessante aspecto para um potencial agente terapêutico.

## 5.5 Verificação da Atividade e Estabilidade Biológica da UC-r e UC-b Modificadas em Função do pH

A atividade enzimática e a estabilidade da UC-r nativa e de seus derivados (UC-r-mPEG-pNP; UC-r-mPEG-CN) e UC-b nativa e de seus derivados foram determinadas em diferentes tampões, variando o pH de 6,0 a 10 como descrito no item 4.3.1. Primeiramente, foi realizado um estudo da atividade catalítica das enzimas nativas nos diferentes pH. Os resultados obtidos referentes aos ensaios da determinação da atividade enzimática da UC-r e UC-b nativas estão representados pela Figura 26.

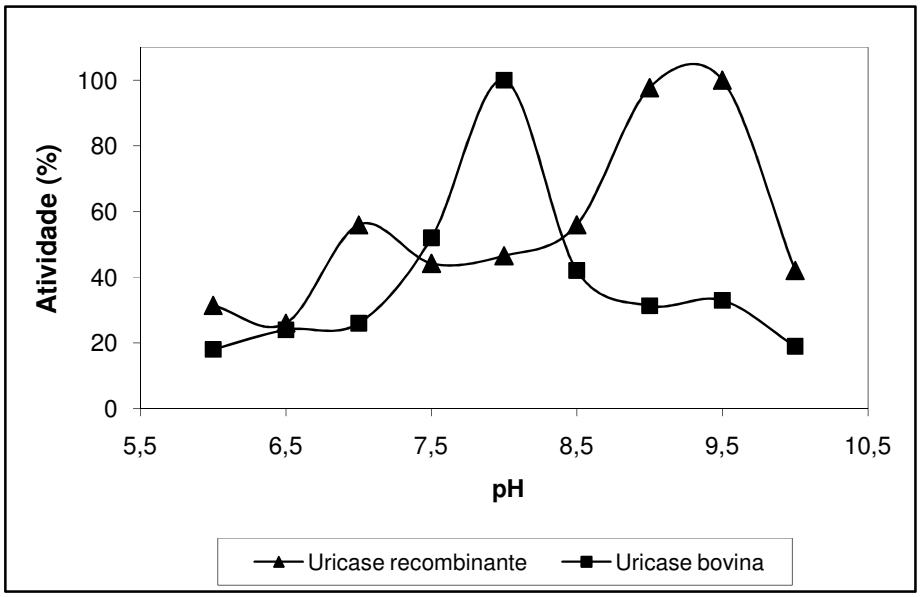



**Figura 26 -** Efeito do pH sobre a atividade enzimática (%) da uricase recombinante nativa (UC-r) (-▲-) e uricase de rim bovino nativa (UC-b) (-■-) em diferentes tampões (6,0-8,5 Hepes 100 mM e 9,0-10 borato de sódio 100 mM) a 37 °C.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 26) podemos concluir que nas condições do ensaio que o pH ótimo da UC-b é 8,0 e o pH ótimo da UC-r está entre 9,0-9,5. Portanto, ambas as enzimas apresentam pH ótimo em meio alcalino. Essa é uma propriedade característica da UC de diferentes fontes.

O pH ótimo de uma enzima é dependente de vários parâmetros experimentais, incluindo tempo de reação, temperatura, natureza e concentração do substrato, natureza e concentração do tampão, força iônica do meio e pureza da enzima (WHITAKER, 1994). Além disso, o efeito do pH da solução sobre a proteína promove sua adsorção que interfere com sua atividade enzimática. Essa adsorção pode estar relacionada com as propriedades físico-químicas da proteína como: tamanho, dimensão e carga eletrostática (LEE et al., 2002).

Para verificar os efeitos decorrentes da *PEGlação* sobre as propriedades físico-químicas e biológicas da UC-r e UC-b foram realizados ensaios de atividade e estabilidade em diferentes pH, nas mesmas condições, com os respectivos conjugados UC-r-mPEG-pN, UC-r-mPEG-CN e UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN. Os resultados estão apresentados na Figura 27 A e B.

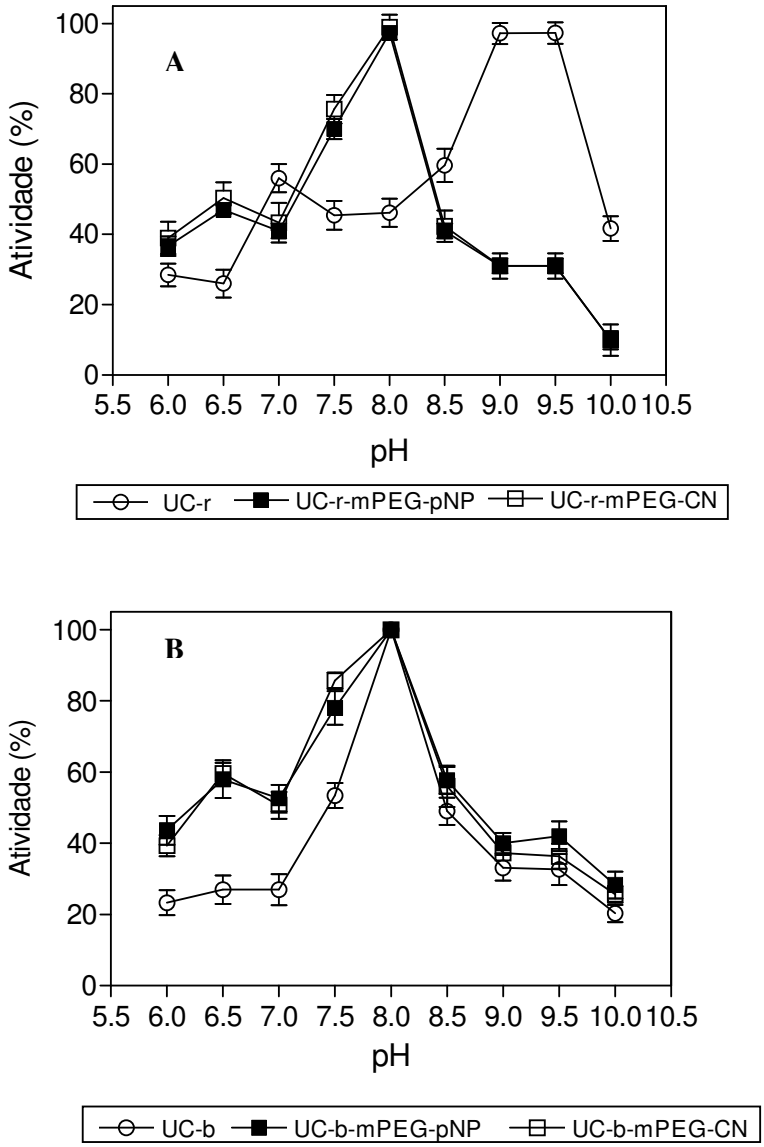



**Figura 27 -** Efeito do pH sobre a atividade enzimática (%) **(A)** UC-r nativa (-○-) e seus conjugados UC-r-mPEG-pN (-■-) e UC-r-mPEG-CN (-□-). **(B)** UC-b nativa (-○-) e seus conjugados UC-b-mPEG-pNP (-■-) e UC-b-mPEG-CN (-□-). A atividade foi determinada em diferentes tampões, variando o pH de 6,0 a 10(6,0-8,5 Hepes 100 mM e 9,0-10 borato de sódio 100 mM) a 37 °C. Os resultados são média ± S.D. (n=3).

De acordo com os resultados obtidos com a UC-r modificada (Figura 27 A) notamos que ocorreu um deslocamento do pH ótimo de atividade de 9,0-9,5 (que corresponde ao pH ótimo da UC-r nativa) para pH ótimo igual a 8,0 que corresponde ao pH ótimo do conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN. Dessa forma, o perfil de atividade dos conjugados obtidos foi alterado, indicando que a complexação da UC-r com os polímeros empregados causou alterações na enzima que refletiram em mudanças no perfil de atividade dos derivados frente ao pH.

Com a UC-b podemos observar que não ocorreu um deslocamento do pH ótimo ele manteve-se igual a 8,0 para os conjugados UC-b-mPEG-pNP e UC-b-mPEG-CN (Figura 27 B). Porém, mesmo sem alteração no pH ótimo, nota-se um aumento de atividade nos pHs entre 6,0 e 7,5.

Outro aspecto muito interessante das enzimas modificadas está relacionado com o fato de que a atividade enzimática dos conjugados (UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-pNP) em pH próximo ao fisiológico (pH = 7,4) é maior que a atividade enzimática relativa das respectivas enzimas nativas. O conjugado UC-r-mPEG-pNP apresentou em torno de 70% (70 ± 5%) da atividade enzimática em pH 7,5 enquanto que a UC-r nativa apresentou em torno de 40% (40 ± 6%) (Figura 27 A). Os conjugados UC-b-mPEG-pNP e UC-b-mPEG-CN apresentaram em torno de 80% da atividade enzimática em pH 7,5, enquanto que a UC-b nativa apresentou em pH 7,5 em torno de 50% (50 ± 8%) da atividade enzimática (Figura 27 B).

Quando este ensaio de atividade em diferentes pH foi realizado em solução fisiológica (NaCl 0,9%; pH 7,4) os resultados obtidos (não mostrados) reforçaram que em pH próximo ao fisiológico os conjugados apresentaram 90% da atividade enzimática relativa e que a enzima nativa apresentou 80%. Estas observações são de grande relevância porque indicam uma importante propriedade da enzima modificada que favorece sua aplicação terapêutica.

A atividade catalítica da UC de outras fontes foi estudada anteriormente em pH fisiológico (pH 7,4) e foi observado que UC nativa de *C. utilis* é a que possui maior atividade enzimática quando comparada com a UC de *Aspergillus flavus*, *A. protoformiae* e fígado de porco (BOMALASKI et al., 2002). Assim, dentre as UC disponíveis, a forma nativa ou recombinante de *C. utilis* são uma opção interessante para modificação e, consequentemente, para uma aplicação terapêutica.

É importante ressaltar que além do aumento da atividade catalítica em pH próximo ao fisiológico, os resultados obtidos (Figura 27 A e B) mostram que a modificação química por *PEGlação* aumentou a atividade lítica da UC-r e UC-b na faixa de pH 6,5-8,0.

A estabilidade biológica da UC-r e seus conjugados, e da UC-b e seus conjugados foi estudada em pH 6,5; 7,5 e 8,5, sob temperaturas de 37 °C, 50 °C e 70 °C. Assim, foram obtidos os perfis de estabilidade representados na Figura 28 (A e B) e Figura 29 (A e B) respectivamente.

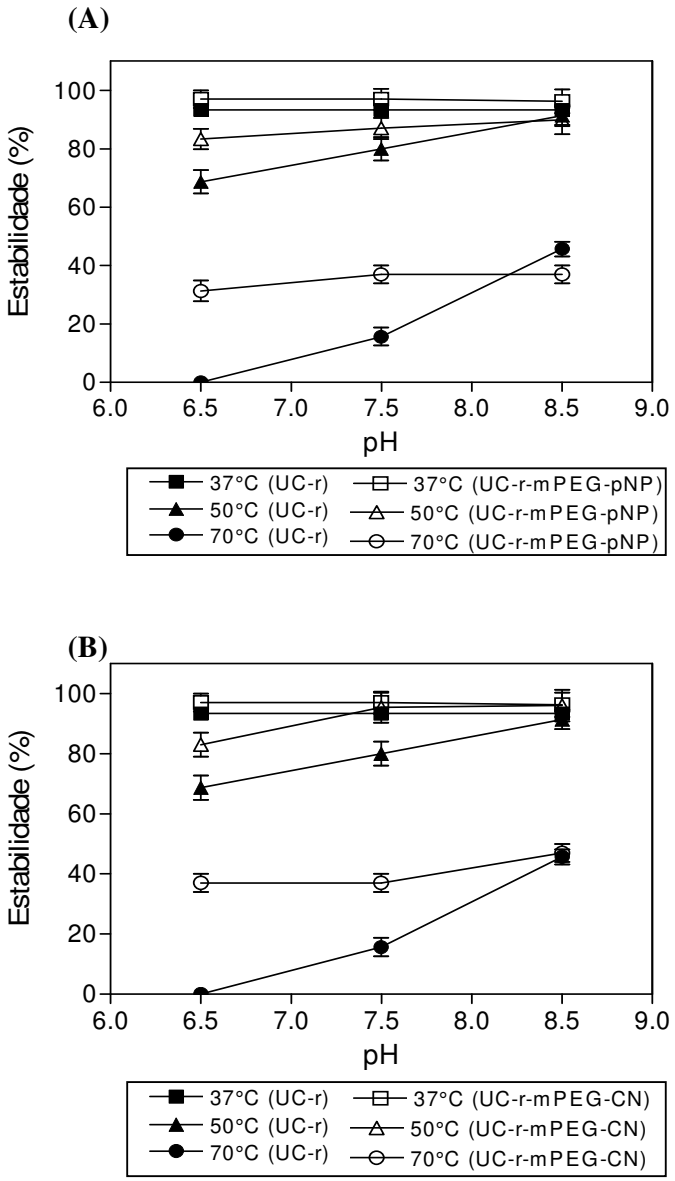



**Figura 28** - Perfil de estabilidade (%) da UC-r nativa e seus conjugados UC-r-mPEG-pNP (**A**) e UC-r-mPEG-CN (**B**). As amostras foram incubadas por 2h em pH 6,5; 7,5 e 8,5 em diferentes temperaturas: 37 ºC, 50 ºC e 70 ºC. Ao final desse período foi medida a atividade enzimática de cada amostra. Os resultados são a média ± S.D. (n=3).

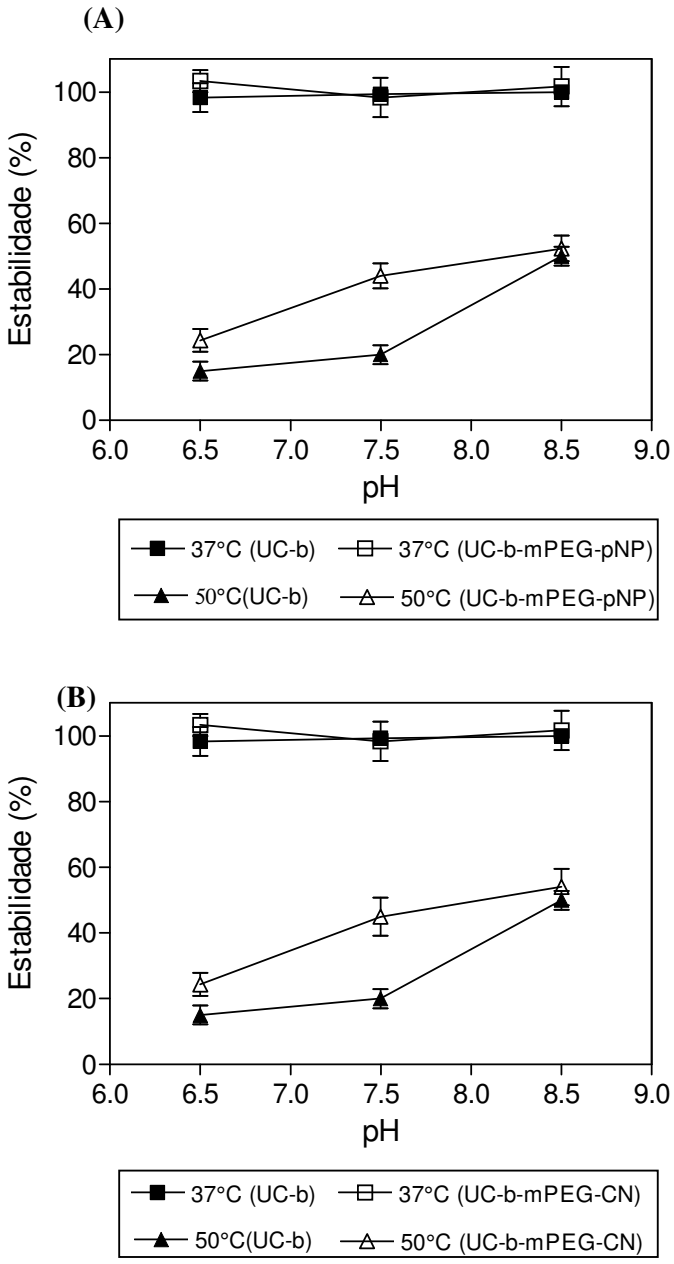



**Figura 29 -** Perfil de estabilidade (%) da UC-b nativa e seus conjugados UC-b-mPEG-pNP **(A)** e UC-b-mPEG-CN **(B)**. As amostras foram incubadas por 2h em pH 6,5; 7,5 e 8,5 em diferentes temperaturas: 37 ºC, 50 ºC. Ao final desse período foi medida a atividade enzimática de cada amostra. Os resultados são a média ± S.D. (n=3).

A partir da Figura 28 podemos observar que a UC-r nativa e de seus conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN permaneceram 100% estáveis por 2h a 37 °C independentemente do pH. Elevando-se a temperatura para 50 °C e 70 °C as formas conjugadas demonstraram uma maior estabilidade, principalmente próximo do pH fisiológico (pH 7,4). Portanto, nota-se que os conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN possuem elevada estabilidade em pH 7,5 a 37 °C, 50 °C e 70 °C com uma significativa diferença ($P < 0,0001$) entre a enzima nativa e modificada. Essa é uma propriedade interessante desses conjugados, pois além de possuírem atividade enzimática superior à UC-r nativa, em pH próximo ao fisiológico (Figura 27 A), esses conjugados também são consideravelmente estáveis.

Um possível mecanismo responsável pela estabilização da enzima, causando um aumento da estabilidade enzimática pode ser explicado pela proteção do sítio ativo pelas moléculas de PEG que confere maior rigidez estrutural a enzima. Sem esse efeito protetor, a estrutura do sítio ativo da enzima nativa é mais susceptível (SOARES et al., 2002) principalmente, em pH abaixo de 8,5.

Quando esse mesmo ensaio de estabilidade foi realizado com UC-b nativa e seus conjugados UC-b-mPEG-pNP e UC-b-mPEG-CN (Figura 29) estes também permaneceram 100% estáveis por 2h a 37 °C independentemente do pH. Na temperatura de 50 °C as formas conjugadas demonstraram uma maior estabilidade, principalmente, próximo do pH fisiológico (pH 7,4). Portanto, nota-se que os conjugados UC-b-mPEG-pNP e UC-b-mPEG-CN possuem elevada estabilidade em pH 7,5 a 37 °C (100%) e a 50 °C (45 ± 8%). A temperatura de 70 °C a UC-b nativa e seus conjugados perderam completamente a atividade enzimática.

Outros estudos de termoestabilidade foram realizados com UC de *B. fastidiosus*. Essa enzima quando incubada por 15min em diferentes temperaturas demonstrou que tanto a enzima nativa, como a enzima modificada com mPEG linear ou ramificado são completamente inativadas a 65-67 °C (SCHIAVON et al., 2000) e segundo Rajoka et al. (2006), a UC bovina nativa foi ativa no intervalo de 35-40 °C.

Como as proteínas são moléculas anfifílicas constituídas por α- hélices e folhas β sua superfície externa está diretamente envolvida com sua função e atividade. Assim, propriedades moleculares das proteínas como interações eletrostáticas, superfície de hidrofobicidade, estabilidade estrutural, massa molecular caracterizam sua função (LEE; KO; KIM, 2002). Portanto, a obtenção de uma enzima *PEGlada* com elevada

estabilidade (em diferentes temperaturas e pH) que mantenha a atividade catalítica, aumenta significativamente seu potencial de uso.

### 5.6 Verificação da Resistência à Ação de Proteases da UC-r e UC-b Modificadas por *PEGlação*

Para verificarmos a resistência à ação de proteases dos conjugados obtidos com a modificação da UC-r ou UC-b foi estudada a ação de diferentes proteases sobre as enzimas nativas e seus conjugados como descrito no item 4.3.2. Nesse ensaio foram utilizadas proteases de origem bacteriana (Protex 6L), origem vegetal (Papaína), protease fúngica e protease de origem animal, Proteomix (quimotripsina e tripsina). Essas proteases apresentam pH ótimo no intervalo de 6,0 a 8,0 e podem atuar inespecificamente, sendo a Proteomix a protease mais específica que atua sobre os aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano.

Inicialmente, verificamos a resistência à ação das diferentes proteases com a UC-r nativa. Com essa enzima percebemos que quando realizamos os ensaios enzimáticos com papaína e protease fúngica a enzima nativa foi susceptível a ação dessas proteases quando utilizamos 20 UI de cada protease. Contudo, essa mesma quantidade (20 UI) de Proteomix ou Protex 6L inativou completamente a atividade enzimática da UC-r nativa (resultado não mostrado).

Nesse sentido, foram realizados novos testes para ajustar a quantidade (UI) das proteases quimiotripsina e tripsina, e da protease bacteriana que deveriam ser aplicadas sobre a UC-r nativa e seus conjugados. Portanto, foi determinado experimentalmente que para Proteomix (quimiotripsina e tripsina) e Protex 6L (protease bacteriana) seriam utilizadas 0,2 UI. Provavelmente, essa maior inativação ocasionada por essas proteases sobre a UC-r nativa deve-se a maior especificidade de atuação dessas enzimas.

Os resultados obtidos em relação à resistência a degradação proteolítica da UC-r e seus respectivos conjugados estão representados pela Figura 30. Os resultados obtidos com o conjugado UC-r-mPEG-CN foram similares aos obtidos com o conjugado UC-r-mPEG-pNP.

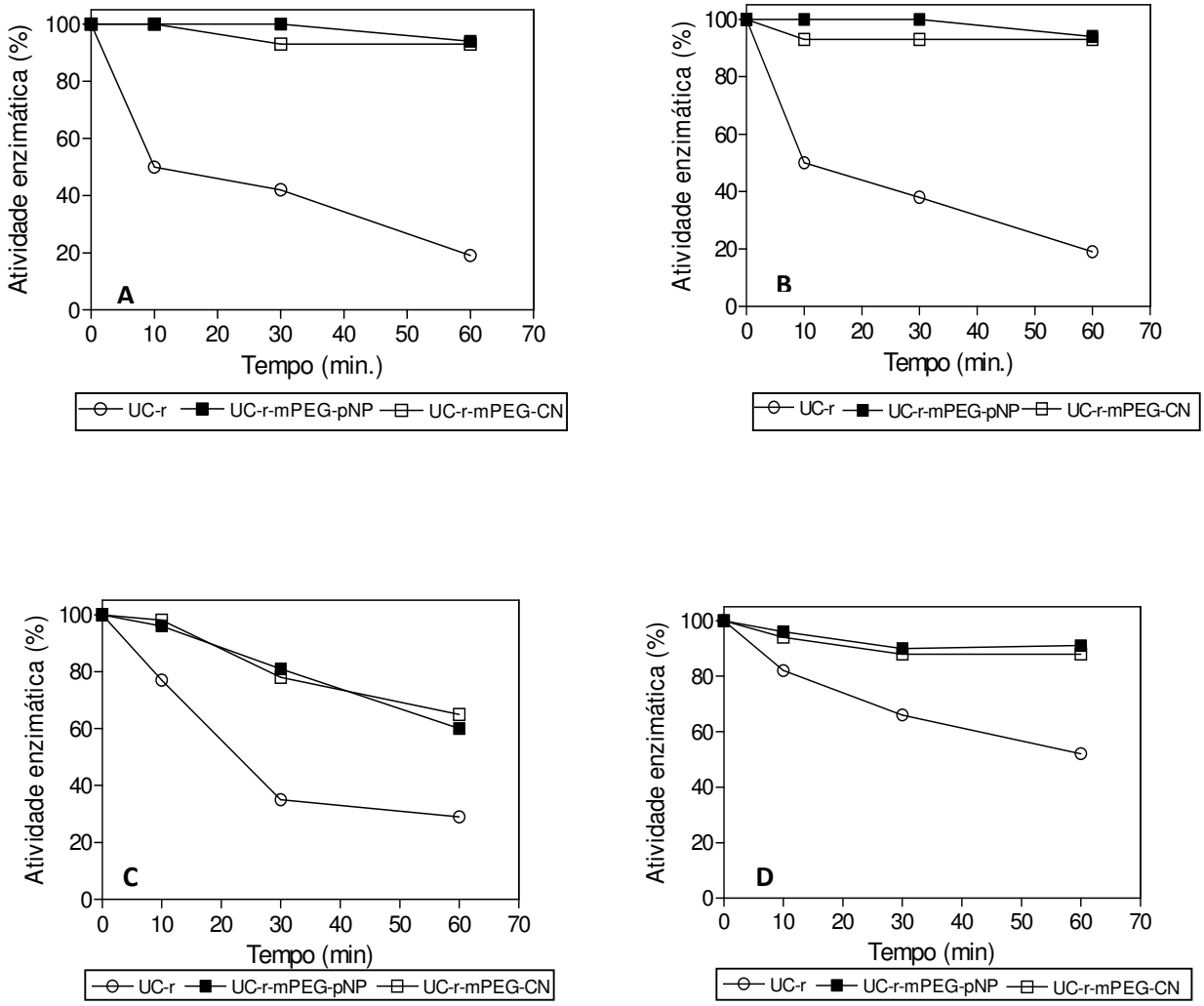



**Figura 30 -** Comportamento da UC-r nativa e seus conjugados UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN perante a ação de diferentes proteases. (**A**) Protex 6L [0,2 UI], (**B**) Proteomix [0,2 UI], (**C**) Protease fúngica [20UI], (**D**) Papaína [20UI].

De acordo com os resultados obtidos (Figura 30) podemos concluir que a UC-r foi susceptível a ação de proteases de origens diferentes. Contudo, as proteases Protex 6L (protease bacteriana) (**A**) e Proteomix (tripsina + quimiotripsina) (**B**) atuaram mais especificamente sobre a UC-r nativa e inibiu significativamente sua atividade enzimática. A atividade enzimática residual da UC-r nativa ficou em torno de 20% após ser incubada com 0,2 UI dessas proteases por 1h a 37 °C. Entretanto, quando a UC-r nativa foi colocada na presença de protease fúngica (**C**) e papaína (**D**), a enzima nativa foi mais resistente, mantendo uma atividade enzimática residual de aproximadamente de 20% quando incubada com 20 UI de protease fúngica (**C**) e 50% quando incubada com 20 UI papaína (**D**). Portanto, foi necessário um excesso dessas enzimas, para percebemos a atuação dessas proteases sobre a atividade enzimática da UC-r nativa. Além disso, podemos perceber que a protease de origem vegetal foi a que menos atuou sobre a UC-r.

A UC-r *PEGlada* foi mais resistente à ação de proteases. Assim, como podemos observar pela Figura 30, temos que os conjugados permaneceram com atividade enzimática residual em torno de 100% após a atuação das proteases Protex 6L (**A**) e Proteomix (**B**) por 1h a 37 °C. E mesmo estando em excesso a protease fúngica (**C**) e a papaína (**D**) a UC-r modificada foi mais resistente à degradação proteolítica permanecendo com atividade enzimática resídual de 60% e 90% respectivamente. Nesse caso, notamos também que a papaína foi a protease de menor atuação sobre a atividade da enzima modificada.

Essa menor resistência à ação de proteases observada para UC-r nativa sugere que enzima nativa pode possuir alguns resíduos de aminoácidos disponíveis como potenciais sítios de digestão enzimática. Além disso, a conjugação ao PEG mascarou a superfície da proteína, aumentando seu tamanho molecular, impedindo a degradação da mesma por enzimas proteolíticas (VERONESE et al., 2001; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002; PASUT et al., 2008).

Portanto, nesse caso a *PEGlação* protegeu consideravelmente a UC-r nativa da degradação proteolítica. Outras enzimas como Ribonuclease, Catalase, Tripsina, L-asparaginase após serem modificadas por *PEGlação* também apresentaram maior resistência a degradação proteolítica (MONFARDINI et al., 1995; TREETHARNMATHUROT et al., 2008).

Os ensaios de resistência à degradação proteolítica também foram realizados com a UC-b nativa e seus conjugados. Os resultados obtidos com os conjugados UC-b-mPEG-pNP e UC-b-mPEG-CN, estão representados na Figura 31.

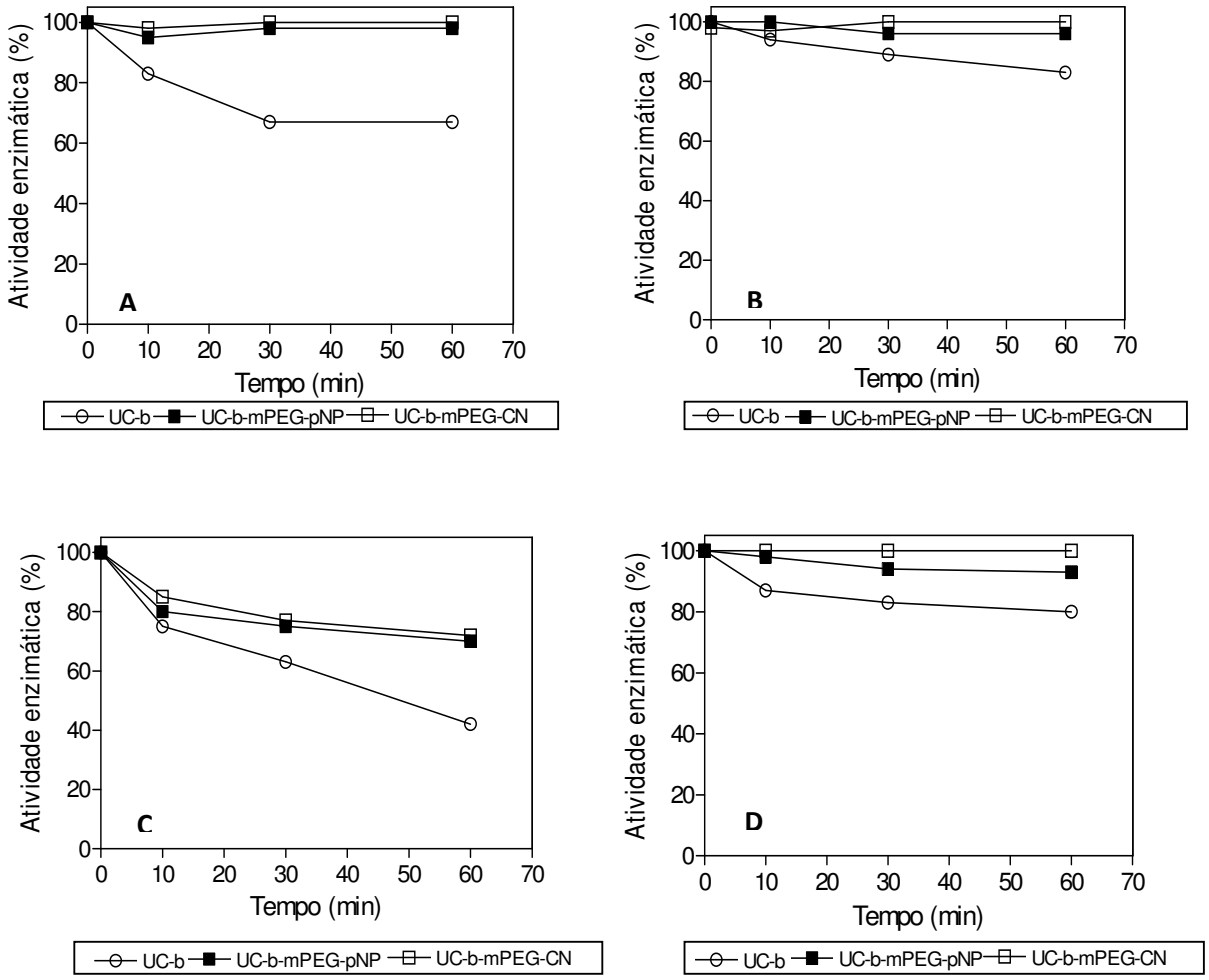



**Figura 31 -** Comportamento da UC-b nativa e seus conjugados UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN perante a ação de diferentes proteases. (**A**) Proteomix [0,2 UI], (**B**) Protex 6L [0,2UI], (**C**) Protease fúngica [20UI], (**D**) Papaína [20UI].

A UC-b nativa, bem como, a UC-r foi susceptível a ação de proteases de origens diferentes. Contudo, a UC-b nativa apresentou uma maior resistência à degradação proteolítica em relação à UC-r. Como podemos observar pela Figura 31, as proteases Proteomix (tripsina + quimiotripsina) (**A**) e Protex 6L (protease bacteriana) (**B**) atuaram de forma menos especifica sobre a UC-b porque a enzima permaneceu com atividade enzimática residual de 67% e 83% respectivamente, após ser incubada com 0,2 UI dessas proteases por 1h a 37 °C.

Além disso, quando a UC-b nativa foi colocada na presença de protease fúngica (**C**) e papaína (**D**), a enzima também foi resistente ao excesso dessas enzimas [20 UI], mas com uma diferença: a protease fúngica foi mais ativa sobre a UC-b (**C**) porque a atividade enzimática residual da UC-b nativa foi 42% enquanto que na presença da papaína (**D**) a atividade enzimática residual foi de 80%. Portanto, como aconteceu com a UC-r, a protease de origem vegetal foi a que menos atuou sobre a enzima nativa.

A maior resistência à degradação proteolítica da UC-b nativa em relação à UC-r pode estar relacionada com a estrutura tridimensional dessa enzima. Anteriormente, foi sugerido que a UC-bovina é um monômero de 70 kDa (RAJOKA et al., 2006) enquanto que a UC-r de *Candida sp* é tetrâmero formado por 4 subunidades de 35 kDa, portanto, qualquer alteração na estrutura tridimensional da UC-r provocada pela ação dessas proteases, pode ocasionar de forma mais significativa a perda da atividade enzimática, o que pode ser minimizado na UC-b que provavelmente, possui uma estrutura tridimensional mais rígida. Contudo, são necessárias maiores informações para esclarecerem essas diferenças observadas.

De acordo com a Figura 31, notamos também, que os conjugados foram mais resistentes a ação dessas proteases. Os conjugados permaneceram com atividade enzimática em torno de 100% após a atuação das proteases Proteomix (**A**), Protex 6L (**B**) e papaína (**D**), sendo a protease fúngica (**C**) a que mais atuou sobre a UC-b modificada permanecendo, com atividade enzimática resídual de 83%. Portanto, essa é uma interessante propriedade conferida pela reação *PEGlação* à UC-b como foi discutido anteriormente para a UC-r.

Quando amostras de UC-r e UC-b nativas e seus respectivos conjugados foram submetidos à incubação em soro humano *in vitro* como descrito no item 4.3.3 notamos que todas as amostras permaneceram estáveis, com atividade enzimática acima de 90% (Figura 32). Isso indica que não ocorreram alterações em relação ao reconhecimento imunogênico, bem como, em relação à degradação proteolítica inespecífica ocasionada por proteases presentes no soro ao atuarem sobre UC-r e UC-b nativas e seus derivados.

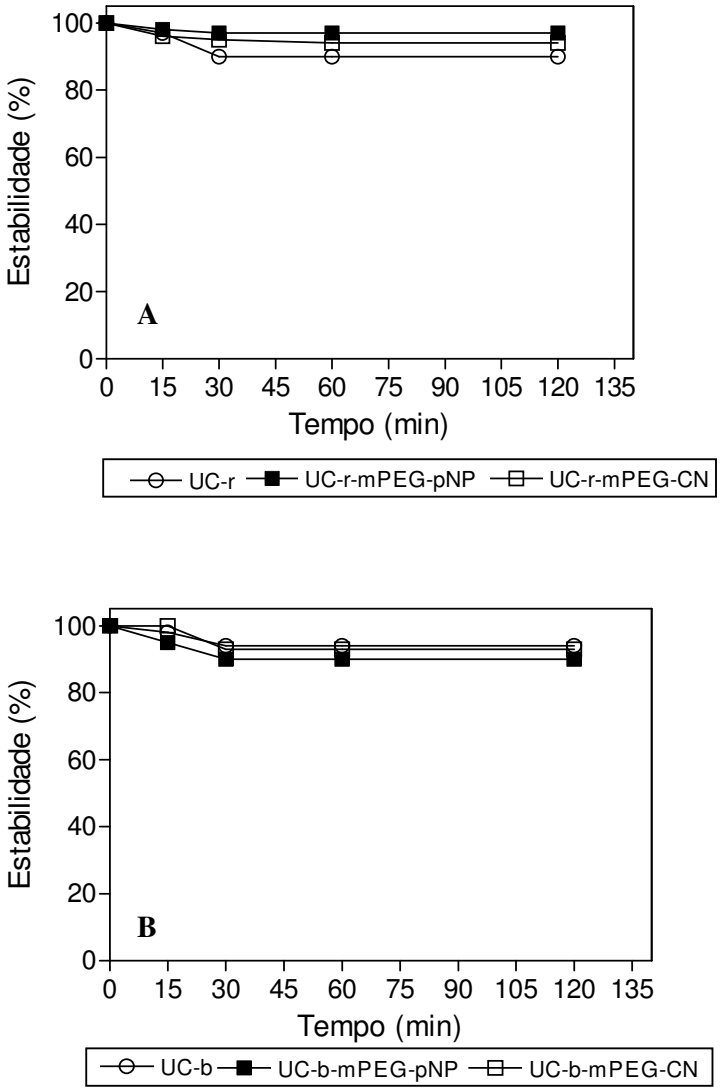



**Figura 32 –** Estabilidade em soro humano a 37 °C por 2 horas. Em (**A**) UC-r nativa e seus conjugados (UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN). Em (**B**) UC-b nativa e seus conjugados (UC-b-mPEG-pNP, UC-b-mPEG-CN).

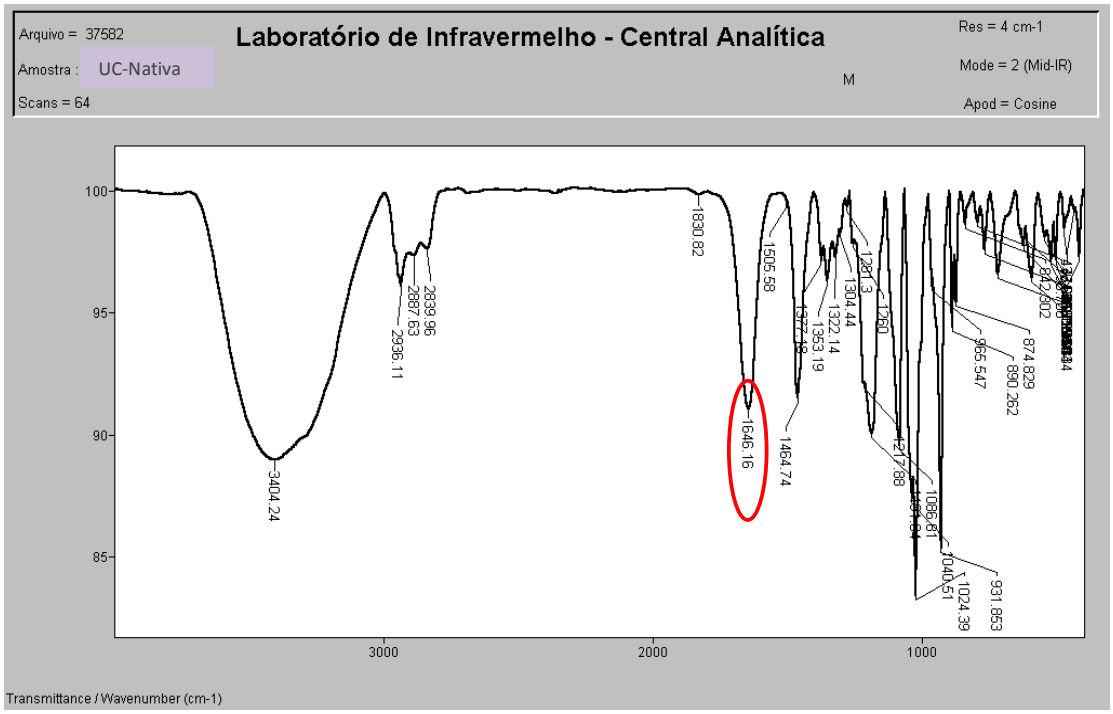
Todos os resultados apresentados até momento, tomados em conjunto, elucidaram importantes características da UC proveniente de duas fontes diferentes. A UC recombinante de *Candida sp* (UC-r) apresenta distintas propriedades físico-químicas e biológicas quando comparadas com a UC proveniente de mamífero (rim bovino) que são peculiares a cada enzima. Além disso, a modificação química dessas enzimas por *PEGlação* colaborou notavelmente, para melhorar o desempenho de ambas, principalmente em condições fisiológicas.

Com a finalidade de aprofundarmos os estudos de funcionalidade e caracterização da UC modificada por *PEGlação*, a enzima que foi obtida com maior grau de pureza, a uricase recombinante de *Candida sp* (UC-r) e os seus conjugados foram submetidos a análises espectroscópicas de FTIR e CD. Foram realizados também ensaios biológicos *in vivo* com o objetivo de avaliar o comportamento imunológico da UC-r nativa e modificada.

## 5.7 Análise Estrutural da UC-r Nativa e Modificada por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e por Dicroísmo circular (CD)

Estudos espectroscópicos de FTIR e CD foram realizados para estimar a estrutura secundária da UC-r nativa e investigar possíveis alterações conformacionais decorrentes da modificação por *PEGlação*.

Para as análises de FTIR os espectros da UC-r nativa, dos conjugados e de cada polímero mPEG-pNP, mPEG-CN foram registrados entre 400-4000 $cm^{-1}$ com uma resolução de 4 $cm^{-1}$. O espectro de cada amostra está representado, respectivamente, pela Figura 33 (UC-r nativa), Figura 34 (UC-r-mPEG-pNP), Figura 35 (UC-r-mPEG-CN), Figura 36 (mPEG-pNP) e Figura 37 (mPEG-CN). Os espectros obtidos foram analisados na região da banda da amida I (1700-1600 $cm^{-1}$).



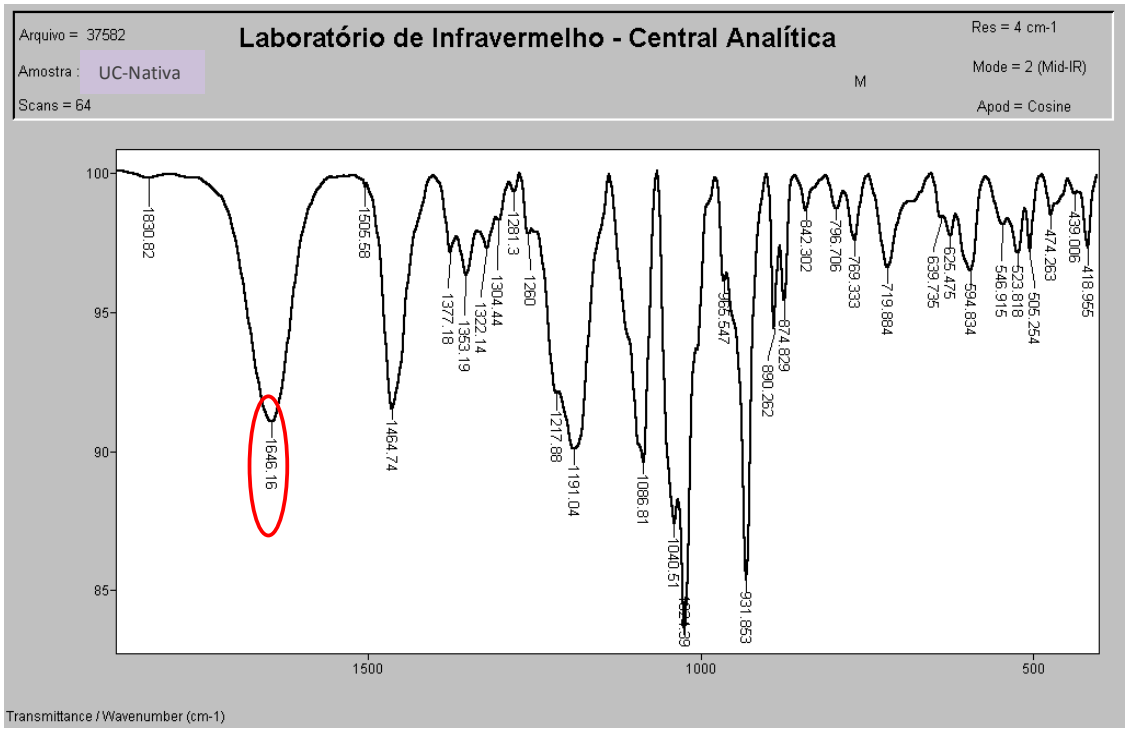




**Figura 33 -** Espectro de FTIR da UC-r nativa

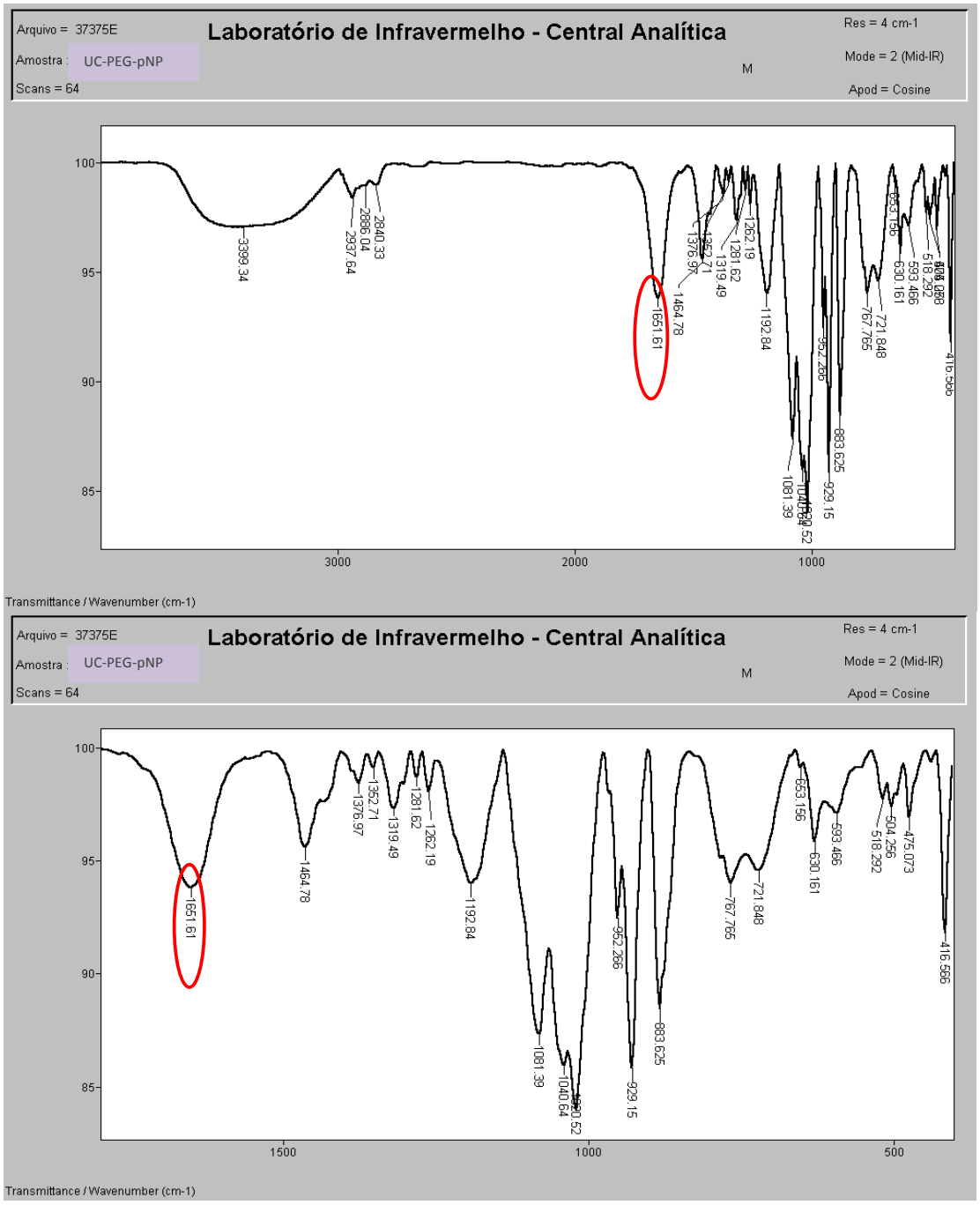



**Figura 34 -** Espectro de FTIR do conjugado UC-r-mPEG-pNP

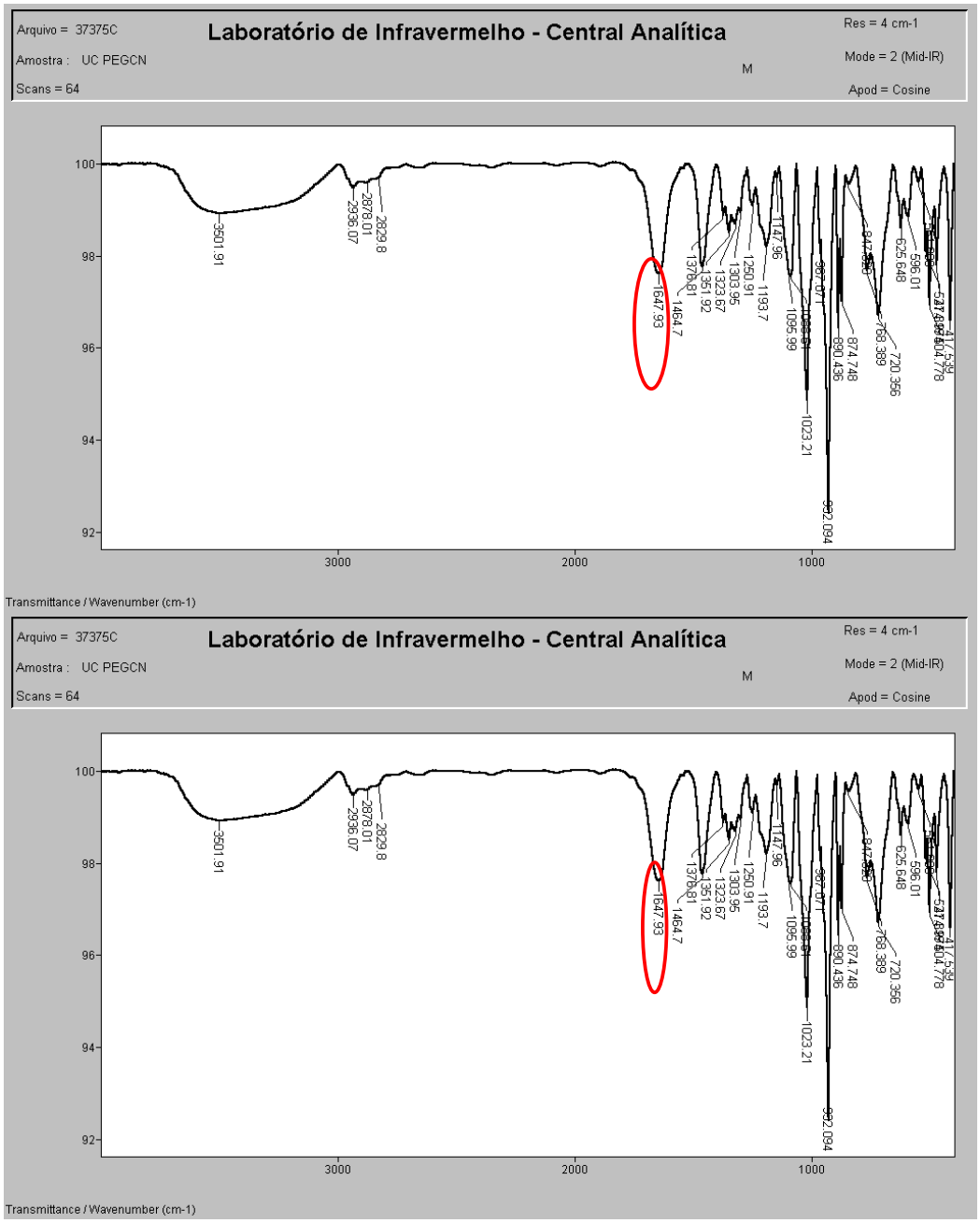



**Figura 35 -** Espectro de FTIR do conjugado UC-r-mPEG-CN

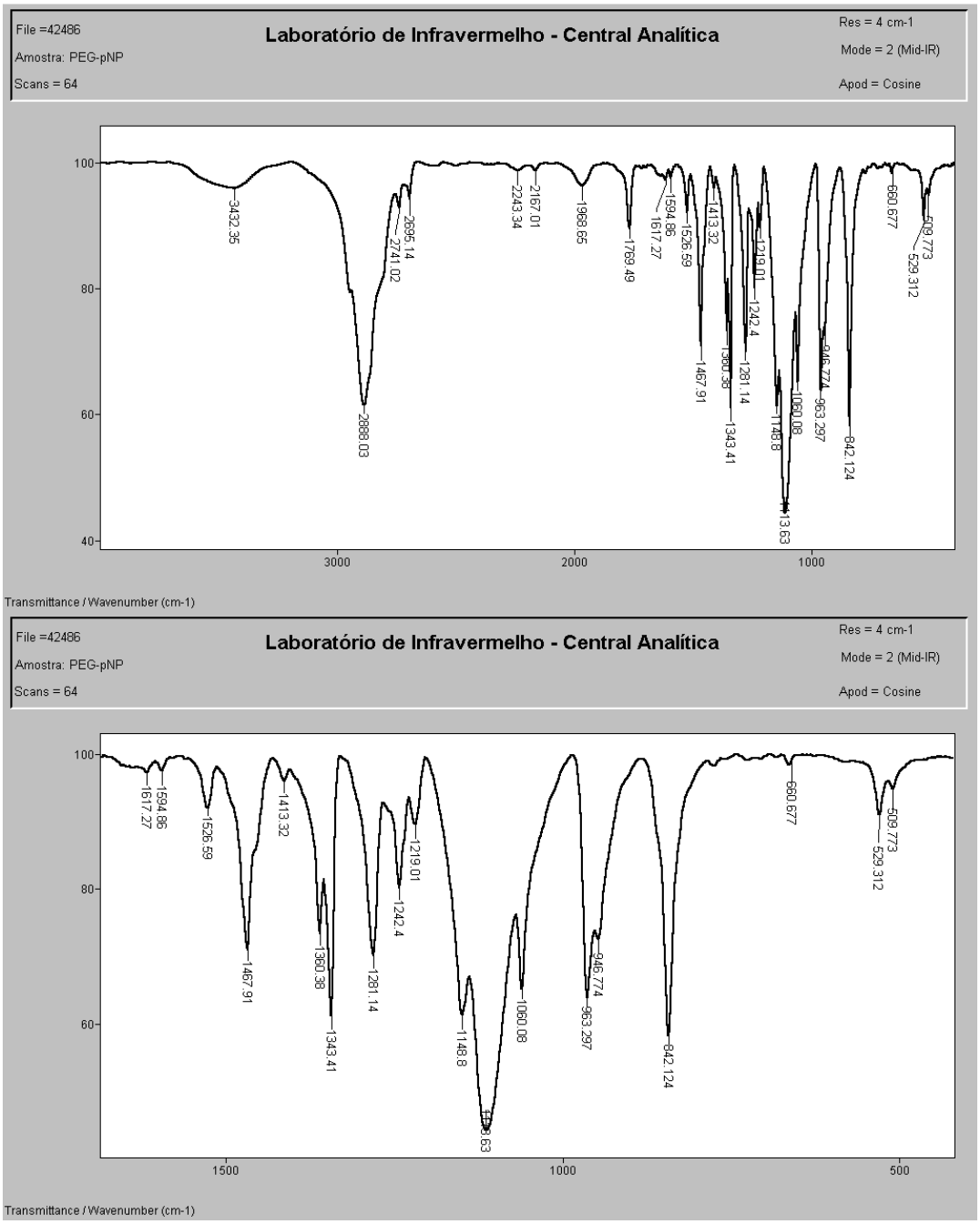



**Figura 36-** Espectro de FTIR do polímero mPEG-pNP

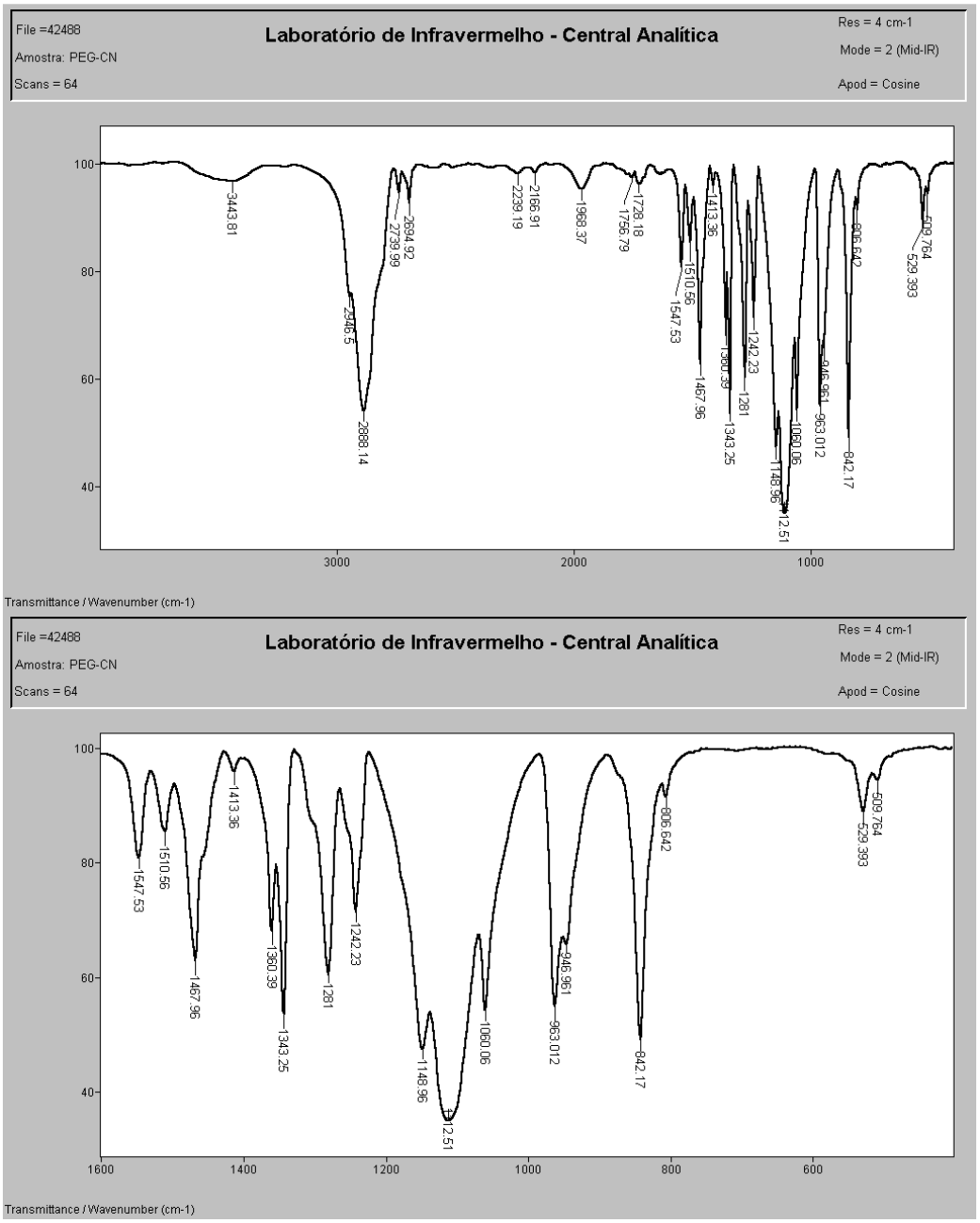



**Figura 37-** Espectro de FTIR do polímero mPEG-CN

A partir dos espectros obtidos foi possível identificar os picos de cada amostra na região da banda da amida I. Portanto, para UC-r nativa observamos um pico no comprimento de onda de 1646,16 $cm^{-1}$ (Figura 33), para o conjugado UC-r-mPEG-pNP encontramos um pico em 1651,61 $cm^{-1}$ (Figura 34) e para o conjugado UC-r-mPEG-CN observamos um pico em 1647,93 $cm^{-1}$ (Figura 35). Os polímeros mPEG-pNP (Figura 36) e mPEG-CN (Figura 37) não apresentaram picos no intervalo de 1645-1657 $cm^{-1}$ na região da amida I, como a UC-r nativa e seus conjugados, por isso podemos desconsiderar a interferência do mPEG nessa região do espectro do FTIR.

Para compararmos o perfil da UC-r nativa e modificada, os dados obtidos em transmitância foram calculados em absorbância pela fórmula A= - log (T/100). Os resultados estão representados na Figura 38.

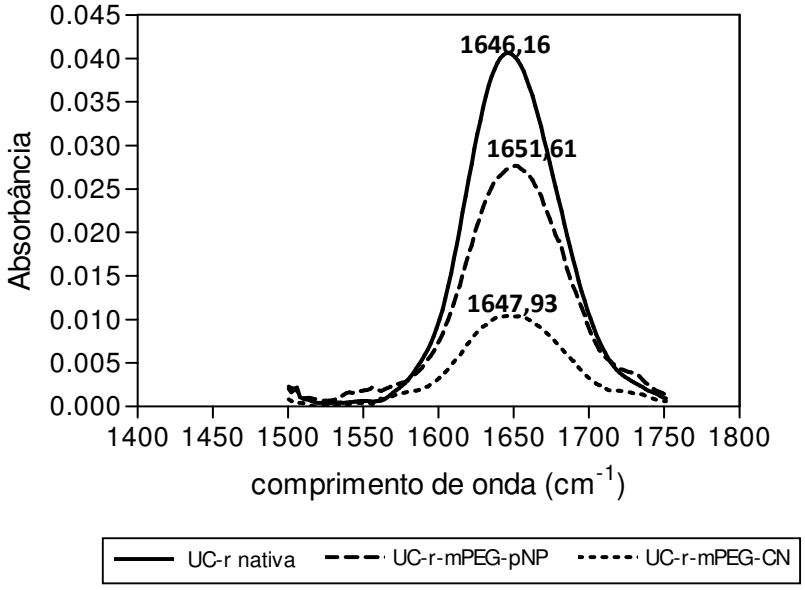



**Figura 38 –** Espectro de FTIR da UC-r nativa e de seus conjugados.

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que o pico principal obtido de 1651,61 $cm^{-1}$ para o conjugado UC-r-mPEG-pNP e de 1647,93 $cm^{-1}$ para o conjugado UC-r-mPEG-CN são valores muito próximos ao pico principal obtido para UC-r nativa de 1646,16 $cm^{-1}$. Teoricamente a região correspondente a α-hélice no espectro de FTIR varia de 1647 $cm^{-1}$ a 1654 $cm^{-1}$ (PELTON; McLEAN, 2000), portanto, podemos afirmar que não ocorreu alteração no conteúdo de α-hélice entre a UC-r nativa e seus conjugados e conseqüentemente, a estrutura secundária da UC-r nativa foi mantida após *PEGlação.*

Não há descrito na literatura espectros de FTIR, preparados com KBr, para a UC-r nativa ou modificada por *PEGlação*, ressaltando que esses resultados representam uma significativa contribuição dessa tese para estudos que envolvem caracterização estrutural de proteínas modificadas por *PEGlação.*

Os resultados de FTIR obtidos com a UC-r nativa e modificada foram muito semelhantes aos encontrados para lisozima da clara de ovo, reforçando que a modificação química por *PEGlação* não induz qualquer alteração estrutural na proteína (FREITAS; ABRAHÃO-NETO, 2010a).

Além das análises de FTIR foram realizadas análises de CD, que são mais precisas para determinar o conteúdo de α-hélice de amostras de proteína em solução. Os espectros de CD da UC-r nativa e de seus conjugados em diferentes temperaturas estão representados na Figura 39.

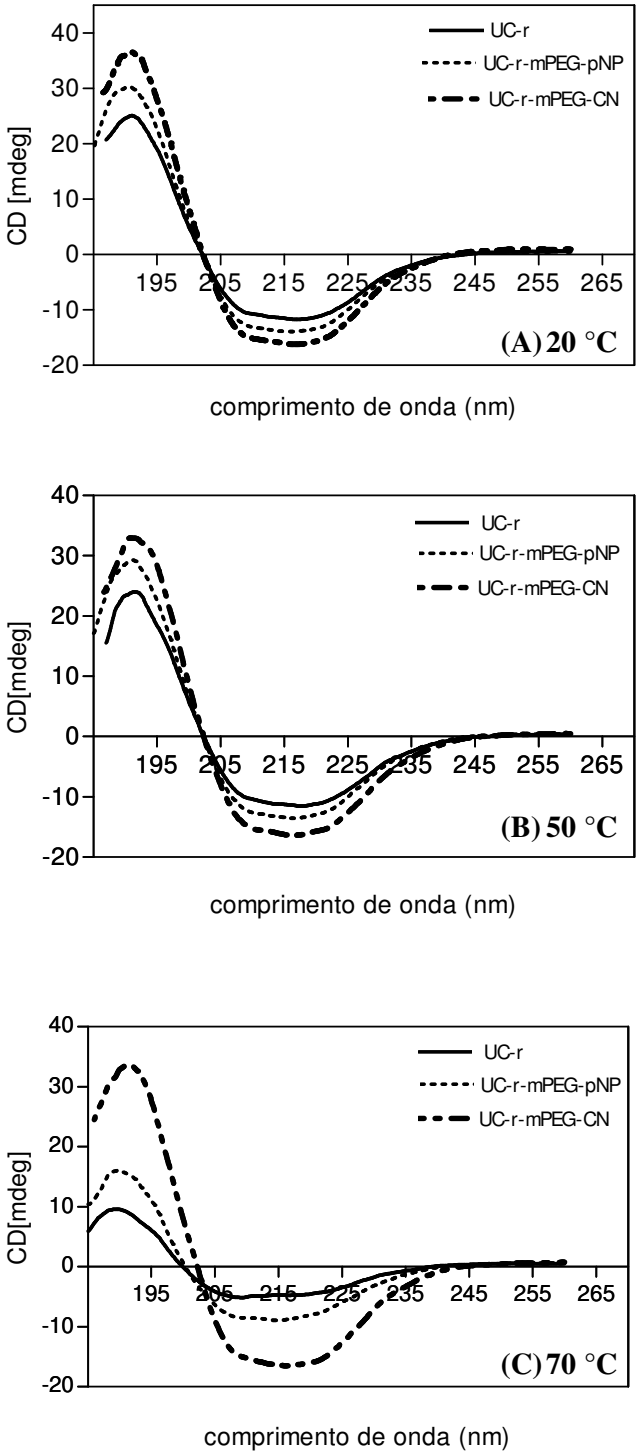



**Figura 39 –** Espectro de CD da UC-r nativa (—) e dos conjugados UC-r-mPEG-pNP (·····), UC-r-mPEG-CN (▬) em diferentes temperaturas (A) 20 °C, (B) 50 °C e (C) 70 °C.

Quando comparamos os espectros obtidos a 20 °C e 50 °C não observamos nenhuma diferença no espectro de CD entre a UC-r nativa e modificada (Figura 39 A, B). Resultados semelhantes foram obtidos com a UC modificada de outras fontes, indicando que a estrutura secundária da proteína não foi afetada pela conjugação com mPEG (CALICETI; SCHIAVON; VERONESE, 2001). Com outra proteína, lisozima, também não foi observada nenhuma diferença no espectro de CD da enzima nativa e *PEGlada* (MALZERT et al., 2003, FREITAS; ABRAHÃO-NETO, 2010a).

Por outro lado, a 70 °C (Figura 39 C) a UC-r nativa sofreu desnaturação, como indicado pela alteração na estrutura secundária, enquanto seus conjugados mostraram maior estabilidade térmica, principalmente o conjugado UC-r-mPEG-CN que permaneceu sem qualquer alteração estrutural detectável até 70 °C. Corroborando, com os resultados apresentados na Figura 28.

Para calcular as frações correspondentes a cada elemento estrutural (α-hélice, folhas β e conformação desordenada) os dados dos espectros obtidos experimentalmente foram analisados com o programa K2D2 que calculou a porcentagem dos elementos estruturais da enzima nativa e modificada em cada temperatura. Baseado no conteúdo de α-hélice, (Tabela 13) a UC-r nativa sofreu modificação estrutural com o aumento da temperatura, apresentando uma perda de 58% no conteúdo de α-hélice a 70 °C, indicando a desnaturação da enzima. Com o conjugado UC-r-mPEG-pNP ocorreu um pequeno decréscimo no conteúdo de α-hélice (26%) a 70 °C, portanto a *PEGlação* promoveu uma parcial resistência a desnaturação térmica da enzima. O conjugado UC-r-mPEG-CN não apresentou qualquer diminuição no conteúdo de α-hélice, sugerindo que essa conjugação conferiu maior proteção e rigidez à molécula de UC-r.

Tabela 13 – Avaliação do conteúdo de α-hélice (%) da UC-r nativa e modificada em diferentes temperaturas

| Amostras | Conteúdo de α-hélice | | |
|---|---|---|---|
| | 20 °C (%) | 50 °C (%) | 70 °C (%) |
| UC-r nativa | 36 | 32 | 15 |
| UC-r-mPEG-pNP | 35 | 35 | 26 |
| UC-r-mPEG-CN | 40 | 40 | 40 |

UC-r: Uricase recombinante de *Candida sp* nativa
UC-r-mPEG-pNP: Conjugado uricase recombinante-mPEG-p-nitrofenil carbonato
UC-r-mPEG-CN: Conjugado uricase recombinante-2-O-mPEG-4,6-dicloro-s-triazina

Considerando os resultados de FTIR e CD em conjunto, podemos afirmar que a *PEGlação* é uma estratégia eficiente de modificação química de proteína, que confere maior estabilidade a proteína, em diferentes temperaturas, sem ocasionar qualquer alteração na sua estrutura secundária. Como mencionado anteriormente, a manutenção da integridade estrutural da proteína é de suma importância para sua função e, consequentemente, para sua aplicação, principalmente, com finalidade terapêutica. Portanto, o desafio biotecnológico inicial dessa tese de obter conjugados *PEGlados* a partir da enzima UC com elevado potencial de uso foi superado.

Outro aspecto de grande relevância que foi investigado nesse trabalho refere-se ao comportamento imunológico da UC-r nativa e de seus conjugados, principalmente, devido ao seu potencial terapêutico, como biofármaco, no tratamento de hiperuricemia e gota.

## 5.8 Avaliação da Imunoreatividade da UC-r Nativa e de seus Conjugados

Inicialmente foram realizados experimentos para produção de anticorpos policlonais para avaliar a imunoreatividade da UC-r nativa e seus conjugados. Como descrito no item 4.4.1 um coelho foi imunizado com a UC-r nativa, com o objetivo de produzir anticorpos anti-UC-r. A enzima nativa foi altamente imunogênica, apresentando um anti-soro com um título de 1:512.000. Os anticorpos obtidos (anti-UC-r) foram usados para reagirem com a UC-r nativa e com seus conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN [ item 4.4.3].

Foi observado que mesmo em elevadas concentrações de IgG, a atividade catalítica foi quase totalmente preservada, até na UC-r nativa (Figura 40 A). Entretanto, de acordo com resultados obtidos em relação à porcentagem de reconhecimento (Figura 40 B) verificamos que ocorreu a ligação dos anticorpos tanto na UC-r nativa como em seus conjugados.

Esses resultados sugerem que o sítio ativo da UC-r é pouco acessível e de acordo com a estrutura 3D da UC de outra fonte, o domínio catalítico é profundamente enterrado em uma estrutura de forma circular, o que dificultaria muito o acesso dos anticorpos (COLLOC'H et al. 1997; RETAILLEAU et al., 2004), por isso, ocorreu a manutenção da atividade enzimática.

Várias tentativas de cristalizar a UC-r de *Candida sp* e resolver a sua estrutura foram realizadas, mas, em todas as condições analisadas, a enzima precipitou e não foi possível a obtenção de cristais adequados.

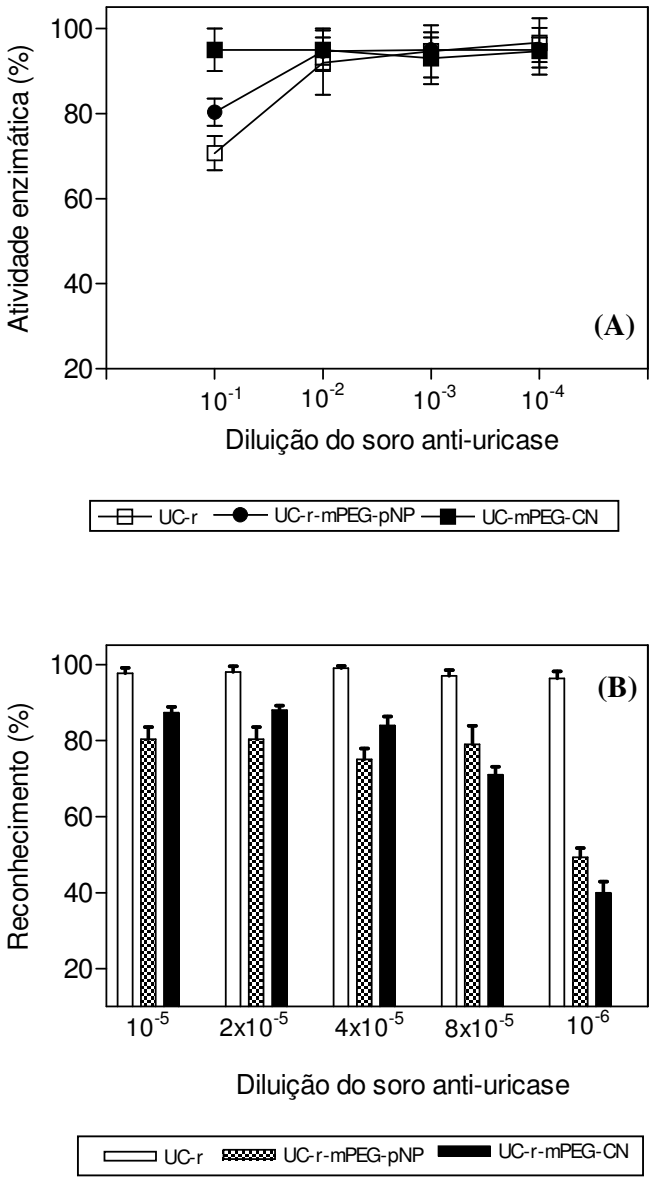



**Figura 40 –** **(A)** Atividade enzimática residual (%) e **(B)** Avaliação do reconhecimento (%) da UC-r nativa e seus conjugados UC-r-mPEG-pNP, UC-r-mPEG-CN após incubação com o soro anti-UC-r nativa produzido em coelho.

## 5.9 Avalição da Imunogenicidade da UC-r Nativa e seus Conjugados

A UC-r nativa e seus conjugados (UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN) foram injetados em camundongos como descrito no item 4.4.4, simulando uma exposição crônica a UC-r (sem adjuvantes), como ocorreria se a enzima fosse utilizada como agente terapêutico.

A concentração da UC-r nativa e modificada empregada nesse ensaio foi similar a concentração descrita por Sherman; Saifer; Perez-Ruiz (2008) com a UC recombinante de porco (*porcine like*) que está na fase 2 de testes clínicos.

Após três semanas de tratamento, amostras de sangue foram recolhidas e foi investigada a presença de anticorpos anti-UC-r no soro dos camundongos. Enquanto o grupo tratado com UC-r nativa apresentou títulos elevados de IgG (> 1:50.000), os grupos tratados com a UC-r *PEGlada* não induziram qualquer resposta detectável de anticorpos (Figura 41).

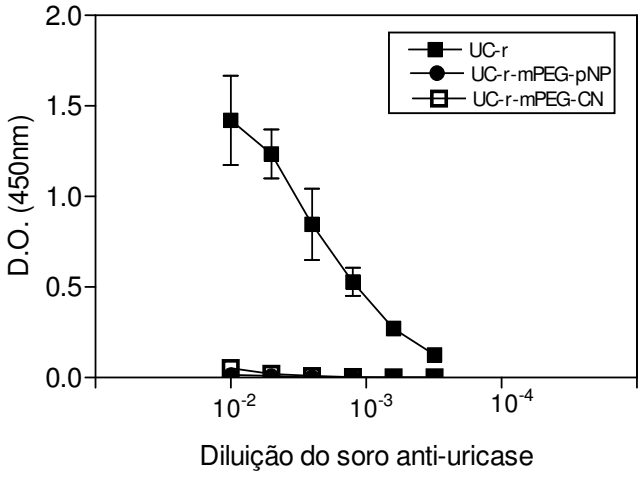



**Figura 41 -** Imunogenicidade da UC-r nativa e de seus conjugados em camundongos. Os resultados são a média ± S.D. obtidos com 5 animais / grupo.

Análise estatística dos resultados obtidos com a UC-r e seus conjugados (UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN) confirmou esta diferença significativa ($P < 0,0001$) entre as amostras. Isto sugere que ocorreu redução suficiente da imunogenicidade dessa proteína não-humana, um requisito básico para seu uso como um agente terapêutico (SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

É importante ressaltar que a significativa redução da imunogenicidade dos conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN em relação à UC-r nativa foi conferida pela *PEGlação*, pois, provavelmente, essa estratégia permitiu o mascaramento dos epítopos da proteína pelo polímero, promovendo o impedimento estérico ocasionado pelo polímero em torno da proteína (o que dificultou a aproximação de anticorpos), além da capacidade que o mPEG possui de reter moléculas de água, dificultando o reconhecimento por anticorpos anti-UC-r (CALICETI; SCHIAVON; VERONESE, 2001; CALICETI; VERONESE, 2003).

Portanto, a proteína localizada no centro da construção dos polímeros está diferentemente acessível à interação de anticorpos, devido aos polímeros que mascaram seus sítios antigênicos e impede a aproximação de anticorpos, como também, previne a degradação proteolítica (VERONESE; PASUT, 2005; SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008).

Apesar dos resultados obtidos serem bastante promissores com relação aos conjugados obtidos com a UC-r de *Candida sp*, é importante salientar que tem sido crescente o interesse em investigar a imunogenicidade do polímero mPEG. Trabalhos anteriores verificaram a produção de anticorpos anti-mPEG quando a UC *PEGlada*, nativa de *Candida utilis* e recombinante de porco, foram injetadas em camundongos (CALICETI; SCHIAVON; VERONESE, 2001; SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008). Inesperadamente, foi sugerido que essa produção de anticorpos ocorre devido ao grupo metoxi ligado a cadeia de PEG.

Os trabalhos de Ganson et al. (2006) e Sundy et al. (2007) relataram a formação anticorpos anti-mPEG em alguns pacientes na Fase 1 dos testes clínicos em uso da UC recombinante de porco modificada com mPEG.

No trabalho de Ganson et al. (2006), o conjugado mPEG-UC apresentou um prolongado tempo de meia-vida no plasma e injeções subcutâneas de 4 a 12 mg corrigiu a hiperuricemia por até três semanas em pacientes com grave gota refratária. Contudo, foi observado pela primeira vez, em um ensaio clínico, que uma proteína *PEGlada* induzia a produção de anticorpos IgG contra o mPEG, em um determinado grupo de pacientes.

No entanto, como os títulos de anticorpos foram relativamente baixos, é possível preservar a eficácia da UC *PEGlada* e limitar as reações adversas através do ajuste da dose, da adequação da via de administração e do cronograma de aplicação. Além disso, com a continuidade do tratamento os anticorpos contra o conjugado mPEG-UC pode resolver-se espontaneamente, e em alguns estudos com animais têm demonstrado que proteínas *PEGladas* são tolerogênicas.

Nesse sentido, diferentes abordagens na estratégia de *PEGlação* podem ser elaboradas para minimizar a resposta imune do conjugado PEG-uricase, pois, atualmente, a UC *PEGlada* é alternativa mais eficaz para tratar a gota refratária que está disponível e sua ação uricolítica representa o meio mais rápido e eficiente de impedir a formação de tofos (GANSON et al., 2006; SHERMAN; SAIFER; PEREZ-RUIZ, 2008). Além disso, a UC *PEGlada* tem sido aplicada nos casos de síndrome de lise tumoral (TLS).

Deve-se considerar também que para pacientes que não respondem ou não aderem ao tratamento com a terapia tradicional de redução do ácido úrico, a UC *PEGlada* surge como uma nova e emergente opção terapêutica. Consequentemente, o desenvolvimento dessa nova terapia pode aumentar o número de pacientes tratados por especialistas, o que pode ter vários benefícios secundários (RIDER; JORDAN, 2010).

De acordo com o exposto acima, os resultados obtidos nessa tese, com a UC-r de *Candida sp*, mostraram que foi possível obter dois conjugados com interessantes propriedades físico-químicas, biológicas e imunológicas, que permitiram um significativo avanço na transformação de uma enzima de origem fúngica em uma droga terapêutica útil.

Acrescenta-se que os conjugados obtidos também preenchem importantes requisitos, segundo Sherman; Saifer; Perez-Ruiz (2008), para serem utilizados como drogas: *(1)* suficiente redução da imunogenicidade da proteína não-humana, o que permite a aplicação de repetidas doses; *(2)* suficiente retenção da atividade enzimática UC-r-mPEG-pNP (87%) e UC-r-mPEG-CN (75%); *(3)* suficiente solubilidade e biodisponibilidade em condições fisiológicas; *(4)* reprodutibilidade na síntese dos conjugados com adequada estabilidade sendo, portanto uma interessante opção para tratamento de hiperuricemia e gota.

# 6 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas nesse trabalho foram:

- A enzima uricase foi extraída e purificada a partir de rim bovino (UC-b) com um rendimento de 41% e um fator de purificação de 6 vezes.
- A enzima uricase recombinante de *Candida sp* (UC-r), obtida comercialmente, foi altamente purificada por cromatografia de afinidade com um rendimento de 75%.
- O mPEG ativado com cloreto de cianúrico (mPEG-CN) é inespecífico e altamente reativo o que ocasiona um maior grau de modificação, enquanto que o mPEG ativado com o grupo p-nitrofenil carbonato (mPEG-pNP) reage lentamente com maior especificidade.
- As enzimas UC-r e UC-b foram eficientemente modificadas por *PEGlação* com mPEG-pNP e mPEG-CN, produzindo conjugados com considerável atividade enzimática residual UC-r-mPEG-pNP (87%), UC-r-mPEG-CN (75%) e UC-b-mPEG-pNP (75%), UC-b-mPEG-CN (50%).
- Os conjugados obtidos com a UC-r e UC-b apresentaram menores valores de $K_M$ do que as enzimas nativas indicando que a *PEGlação* conferiu uma interessante propriedade aos conjugados que permitiu um aumento da afinidade da UC-r e UC-b pelo ácido úrico.
- O perfil de atividade da UC-r e UC-b sobre o ácido úrico em diferentes pH foi modificado, indicando que a *PEGlação* aumentou a atividade lítica dessas enzimas em pH próximo ao fisiológico, sendo este um requisito muito importante para um possível uso terapêutico da enzima.
- De acordo com método colorimétrico TNBS o grau de modificação atingido pelos conjugados obtidos UC-r-mPEG-CN e UC-r-mPEG-pNP foi de aproximadamente 20%. E pela análise de eletroforese SDS-PAGE 7,5% o perfil dos conjugados obtidos foram semelhantes, indicando que a massa molecular dos conjugados obtidos com ambos os polímeros são de 200 kDa e 260 kDa aproximadamente.
- Os conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN foram mais estáveis que a UC-r nativa, principalmente, em pH próximo ao fisiológico, pH 7,5 a 37 °C, 50 °C e 70 °C com uma significativa diferença ($P < 0,0001$) entre a UC-r nativa e modificada.

- Os conjugados UC-b-mPEG-pNP e UC-b-mPEG-CN foram mais estáveis que a UC-b nativa em pH 7,5 a 37 °C e a 50 °C. A temperatura de 70 °C a UC-b nativa e seus conjugados perderam completamente a atividade enzimática.
- As formas *PEGladas* da UC-r e UC-b foram mais resistentes à ação de diferentes proteases e mantiveram-se estáveis em soro humano, indicando que *PEGlação* favoreceu na resistência à degradação proteolítica em relação à enzima nativa.
- Análises espectroscópicas de FTIR e CD mostraram que estrutura secundária da UC-r não foi afetada pela reação de *PEGlação*.
- A UC-r nativa provocou uma intensa resposta imune em coelho e camundongos Balb/c sendo, portanto, uma enzima altamente imunogênica.
- Os conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN quando injetados em camundongos Balb/c não induziram qualquer resposta imune detectável, indicando que a *PEGlação* promoveu a redução da imunogenicidade da UC-r nativa.
- Os conjugados UC-r-mPEG-pNP e UC-r-mPEG-CN apresentaram interessantes propriedades físico-química, biológicas e imunológicas, que permitiram um significativo avanço na transformação de uma enzima de origem fúngica em uma droga terapêutica útil.

# REFERÊNCIAS*


ABRAHAO-NETO, J. Purificação de Enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDEL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. v.3, p.377-389.

ABUCHOWSKI, A., PAULCZUK, N.C., DAVIS F.F. Alteration of Immunological propeties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **J. Biol. Chemistry**, v. 11, p. 3578-3581, 1977a.

ABUCHOWSKI, A.; MCCOY, J. R.;PAULCZUK, N. C.; VAN ES, T.; DAVIS, F.F. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase, **J. Biol. Chemistry**, v. 252, p. 3582-3586, 1977b.

AEHLE, W. **Enzymes in Industry**.Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 2007.

ARORA, K.; SAXENA, S.V.; GUPTA, R. K.; YAKHMI J.V.; PANDEY, M.K.; CHAND, S.; MALHOTRA, B.D. Improved performance of polyaniline-uricase biosensor. **Anal. Chim. Acta**, v. 594, p. 17-23, 2007.

ALTMAN, K. I.; SMULL, E. S.; BARRON, G. A new method for the preparation of uricase and the effect of uricase on the blood uric acid levels of the chickens. **Arch. Biochem. Biophys**., v. 21, p. 1158-1165, 1959.

AMES, B.N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 78, p. 6858-6862, 1981.

ANGERMÜLLER, S.; ISLINGER, M.; VÖLKL, A. Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. **Histochem. Cell. Biol**., v. 131, p. 459-463, 2009.

BAILON, P.; BERTHOLD, W. Polyethylene glycol-conjugate pharmaceuticals proteins. **Pharm. Sci. Tecnol. Today**, v.1, p. 352-356, 1998.

BALAN, S.; CHOI, J. W.; GODWIN, A.; TEO, I.; LABORDE, C. M.; HEIDELBERGER, S.; ZLOH, M.; SHAUNAK, S.; BROCCHINI, S. Site specific PEGylation of protein disulfide bonds using three-carbon bridge. **Bioconjug. Chem**.,v. 18, p. 61-76, 2007.

BALLICO, M., DRIOLI, S., BONORA, G. MultiPEGS: High molecular weight multifunctional poly(ethylene glycols) assembled by dendrimer-like approach. **J. Organ. Chem**., v.1, p. 2064-2073, 2005.


---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAYOL, A.; CAPDEVIELLE, J.; MALAZZI, P.; BUZY, A.; CLAUDE BONNET, M.; COLLOC'H, N.; MORNON, J. P.; LOYAUX, D.; FERRARA, P. Modification of a reactive cysteine explains differences between rasburicase and Uricozyme®, a natural *Aspergillus flavus* uricase. **Biotechnol. Appl. Biochem**., v. 36, p. 21-31, 2002.

BECKER, M.A.; JOLLY, M. Hyperuricemia and associated diseases. **Rheum. Dis. Clin.North. Am**., v. 32, p. 275-293, 2006.

BENDELE, A., SEELY, J., RICHEY,C. SENNELLO G, SHOPP G. Short communication: Renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. **Toxicol. Sci.**, v. 42, p.152-157, 1998.

BERGER, H.M; MOLICKI, J.S.; MOISON, R.M.W.; Van ZOEREN-GROBBEN, D. Extracelluar defence against oxidative stress in the newborn. **Semin. Neonatol**., v. 3, p. 183-190, 1998.

BIGGERS, K.; SCHEINFELD, N. Pegloticase, a polyethylene glycol conjugate of uricase for the potential intravenous treatment of gout. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v.9, p. 422-429, 2008.

BITOH, S.; WAKEFIELD, R.; LANG, G. M.; SEHON, A. H. Inhibition of the effector phase of IgE mediated allergies by tolerogenic conjugates of allergens and monomethoxypolyethylene glycol. **Int. Arch.Allergy Immunol**., v. 107, p.316–318, 1995.

BLEYER, A.; HURT, T.C. Genetic factors associated with gout and hyperuricemia. **Adv. Chronic Kidney Dis**., v. 13, p. 124-130, 2006.

BOMALASKI, J.S.; HOLTSBERG, F. W.; ENSOR, C. M.; CLARK, M. A. Uricase formulated with polyethylene glycol (Uricase-PEG 20): Biochemical rationale and preclinical studies. **J. Rheumatol**., v.29, p. 1942-1948, 2002.

BONGAERTS, G. P. A.; UITZETTER, J.; BROUNS, R.; VOGELS, G. D. Uricase of *Bacillus fastidiosus*. Properties and regulation of synthesis, **Biochim. Biophys**. **Acta**, v. 527, p. 348–358, 1978.

BONNETE, F.; VIVARES, D.; ROBERT, C.H.; COLLOCH, N. Interactions in solution and crystallization of *Aspergillus flavus* urate oxidases. **J. Cryst. Growth**, v. 232, p. 330-339, 2001.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of MicrogramQuantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem**., v. 72, p. 248-254, 1976.

BROGARD, J.M.; COUNAROS, D.; FRANKHAUSER, J.,STAHL, A.; STAHL, J. Enzymatic uricolysis: a study of the effect of fungal urate oxidase. **Eur. J. Clin. Biol. Res**., v.17, p. 890-895, 1972.

BULHELLER, B. M.; RODGER, A.; HIRST, J. D. Circular and linear dichroism of proteins. **Phys. Chem**., v.9, p. 2020-2035, 2007.

BUKOWSKI, R.;ERNSTOFF,M. S.; GORE, M. E.; NEMUNAITIS, J. J.; AMATO, R. GUPTA, S.K.; TENDLER, C. L. Pegylated interferon alfa-2b treatment for patients withsolid tumors: A phase I/II study. **J. Clin. Oncol**., v. 20,p. 3841–3849, 2002.

CALICETI, P.; VERONESE, F.M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethyleneglycol) protein conjugates. **Adv. Drug. Deliv. Rev**.,v. 55, p.1261-1277, 2003.

CALICETI, P.; VERONESE, F.M.; JONAK, Z. Imunogenic and tolerogenic properties of monomethoxypoly(ethylene glicol) conjugate proteins. **IL Farmaco Paiva**. v.54, p. 430-437, 1999.

CALICETI, P.; SCHIAVON O.; VERONESE, F. M. Immunological Properties of Uricase Conjugated to Neutral Soluble Polymers. **Bioconjug. Chem**.,v. 12, p. 515-522, 2001.

CAMMALLERI, L.; MALAGUARNERA, M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. **Int. J. Med. Sci**., v. 4, p. 83-88, 2007.

CANNELLA, A.C.; MIKULS, R.M. Understanding Treatments for Gout. **Am. J. Manag.Care**, v. 11, p. 451-458, 2005.

CAZALIS, C.S.; HALLER, C.A.; SEASE-CARGO, L.; CHAIKOF, E.L. C- terminal site-specific Pegylation of a truncated thrombomodulin mutant with retention of full bioactivty. **Bioconjug. Chem**., v. 15, p. 1005-1009, 2004.

CHEN, R.H.-L.; ABUCHOWSKI, A.; VAN ES, T.; PALCZUK, N. C.; DAVIS, F.F. Properties of two urate oxidase modified by the covalent attachment of poly(ethylene glycol). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 660, p. 293-298, 1981.

CHO, Y. W.; PARK, J.H.; PARK, J.S.; PARK, K. **PEGylation: Camouflage of proteins, cells, and nanoparticles against recognition by the body's defense mechanism**. In: SHAYNE, C.G. Handbook of pharmaceutical biotechnology. North Carolina:John Wiley & Sons, Inc., 2007.

CHOHAN, S.; BECKER, M. A. Update on emerging urate-lowering therapies. **Curr. Opin. Rheumatol**., v. 21, p.143–149, 2009.

CHOI, H. K.; MOUNT, D. B.; REGINATO, A. M. Pathogenesis of gout. **Ann. Intern. Med**., v. 143, p. 499–516, 2005.

CHUA, C. C.; GREENBERG, M. L.; VIAU, A. T.; NUCCI, M.; BRENCKMAN, W. D. JR.; HERSHFIELD, M. S. Use of polyethylene glycol-modified uricase (PEG-uricase) to treat hyperuricemia in a patient with non-Hodgkin lymphoma. **Ann. Inter. Med.**, v. 109, p. 114-117, 1988.

CLARK, R.; OLSON, K.; FUH, G.; MARIAN, M.; MORTENSEN, D.; TESHIMA, G.; CHANG, S.; CHU, H.; MUKKU, V.; CANOVA-DAVIS, E.; SOMMERS, T.; CRONIN, M.; WINKLER, M.; WELLS, J. A. Long-acting growth hormones procedure by conjugation with polyethylene glycol**, J. Biol**.**Chem**., v. 271, p. 21969-21977, 1996.

COLLOC'H, N.; EL HAJJI, M.; BACHET, B.; L'HERMITE, G.; SCHILTZ M.; PRANGÉ, T.; CASTRO, B.; MORNON, J. P. Crystal structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 Å resolution. **Nat. Struct. Biol**., v. 4, p. 947-952,1997.

COLLOC'H, N.; GIRARD, E.; DHAUSSY, A-C.; KAHN, R.; ASCONE, I.; MEZOUAR, M.; FOURME, R. High pressure macromolecular crystallography: The 140-MPa crystal structure at 2.3 Å resolution of urate oxidase, a 135-kDa tetrameric assembly. **Biochem. Biophysi. Acta**., v. 1764, p.391-397, 2006.

CRUZ, M. E. M.; MARTINS, M. B.; CARMO,M. L. GASPAR, M. M.; OLIVEIRA, E. M. M.; FERRARA, M. A. Enzimas em Medicamentos e Diagnóstico. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia:** produção, aplicação e mercado.Rio de Janeiro:Editora Interciência, 2008. p. 307-331.

DALY, S.M.;PRZYBYCIEN, T.M.; TILTON, R.D. Aggregation of lysozyme and of poly(ethylene glycol)-modified lysozyme after adsorption to silica. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.57, p.81-88, 2007.

DAVIS, F.F. The origin of pegnology. **Adv.Drug. Deliv. Rev**., v. 54, p. 457-458, 2002.

DEL TORO, G.; MORRIS, E.; CAIRO, M. S. Tumor lysis syndrome: pathophysiology, definition, and alternative treatment approaches. **Clin. Adv. Hematol.Oncol.**, v.3, p.54-61, 2005.

DUNCAN, R.; SPREAFICO, F. Polymer conjugates. Pharmacokinetic considerations for design and development. **Clinical. Pharm**.,v. 27, p. 290-306, 1994.

ELLIS, D.I.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy**. Analyst**., v.131, p. 875-885, 2006.

FARINA, B.; MENNELLA FARAONE, M.R. Ox kidney uricase: a new method of purification. **Ital. J. Biochem**., v. 28, p. 261-269, 1979.

FARINA, B.; MENNELLA FARAONE, M.R., LEONE, E. Main properties of ox kidney uricase. **Ital. J. Biochem**., v. 28, p. 270-279, 1979.

FEE, C. J.; VAN ALSTINE, J. M. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. **Chem. Eng. Sci**., v. 61, p. 924–939, 2006.

FELS, E.; SUNDY, J.S. Refractory gout: what is it and what to do about it? **Curr. Opin. Rheumatol**., v. 20, p. 198-202,2008.

FERRARA, M. A. Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais noBrasil. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia:** produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 433-488.

FITZPATRICK, D. A.; FITZGERALD, O.; McGEENEY, K. F. Immunoenzymology of purified urate oxidase. **Biochem J**., v.125, p. 114, 1971.

FONTANA, A.; SPOLAORE, B.; MERO, A; VERONESE, F. M. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. **Adv. Drug. Deliv. Rev**., v. 60, p.13-28, 2008.

FREITAS, D. da S.; ABRAHÃO-NETO, J. Biochemical and biophysical characterization of lysozyme modified by PEGylation. **Int. J. Pharm**., v. 392, p.111-117, 2010a.

FREITAS, D. da S.; ABRAHÃO-NETO, J. Batch purification of high-purity lysozyme from egg white and characterization of the enzyme modified by PEGylation. **Pharm. Biol.**., v. 48, p.554-562, 2010b.

GANGULI, S.; YOSHIMOTO, K.; TOMITA, S.;SAKUMA, H.; MATSUOKA, T.; SHIRAKI, K.; NAGASAKI, Y. Regulation of Lysozyme Activity Based on Thermo tolerant Protein/Smart Polymer Complex Formation. **J. Am. Chem. Soc**., v. 131, p. 6549–6553, 2009.

GANSON, N.J.; KELLY, S.J.; SCARLETT, E.; SUNDY, J. S.; HERSHFIELD, M. S. Control of hyperuricemia in refractory gout, and induction of antibody against poly(ethylene) glycol(PEG), in a phase 1 trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase. **Arthritis Res. Ther**., v. 8, p. R12, 2006.

GABISON, L.; PRANGÉ T.; COLLOC'H, N.; EL HAJJI, M.; CASTRO, B.; CHIADMI, M. Structural analysis of urate oxidase in complex with its natural substrate inhibited by cyanide: Mechanistic implications. **BMC Struct. Biol.,** v. 8, p.32-40, 2008.

GOLDMAN, S. C.; HOLCENBERG, J. S.; FINKLESTEIN, J. Z.; HUTCHINSON, R.; KREISSMAN, S.; JOHNSON, F. L.; TOU, C.; HARVEY, E.; MORRIS, E.; CAIRO M. S. A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumour lysis. **Blood**, v. 97, p. 2998-3003,2001.

GREENWALD, R.B.; CHOE, Y.H.; MCGUIRE, J.; CONOVER, C.D. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. **Adv. Drug. Deliv. Rev**.,v. 55, p. 217-259, 2003.

GREGORIADIS, G.; JAIN, S.; PAPAIOANNOU, I.; LAING, P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids. **Int. J. Pharm**., v. 300, p. 125–130, 2005.

HAAG, R.; KRATZ, F. Polymer therapeutics: concepts and applications. **Angew. Chem. Int. Ed**., v. 45, p. 1198-1215, 2006.

HABEEB, A.F.S.A. Determination of free amino grupos in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid**. Anal. Biochem**., v. 14, p. 328-336, 1966.

HAK, A.E.; CHOI, H.K. Lifestyle and gout. **Curr. Opin. Rheumatol**., v. 20, p. 179-186, 2008.

HARRIS, C. M.; LLOYD, D. C.; LEWIS J. The prevalence and prophylaxis of gout in **England. J. Clin. Epidemiol.**, v. 48, p. 1153-1158, 1995.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nat. Rev. Drug Discov**., v. 2, p. 214–221, 2003.

HERSHFIELD, M.; CHAFFEE, S.; KORO-JOHNSON, L.; MARRY A.; SMITH, A. A.; SHORT, S.A. Use of site–directed mutagenenesis to enchance the epitope-shielding effect of covalent modification of proteins with polyethylene glycol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 7185-7189, 1991.

DUCKE UNIVERSITY. M. S. Hershfield; S. J. Kelly. **Urate oxidase.** US Patent 7.056.713B1, 2006.

HU, T.; PRABHAKARAN, M. A.; ACHARYA, S. A.; MANJULA, B. N. Influence of the chemistry of conjugation of poly(ethylene glycol) to Hb on the oxygen-binding and solution properties of the PEG-Hb conjugate. **Biochem. J**., v.392, p.555–564, 2005.

HUANG, H.; APPEL, J. L.; CHOI, M. J.; GELBER, A. C.; CHARLESTON, J.; NORKUS E. P.; MILLER, E. R. The effects of vitamin C supplementation on serum concentrations of uric acid. **Arthritis Rheum**., v. 52, p.1843–1847, 2005.

HUANG, S.H.; SHIH, Y.C.; WU, C. Y.; YUAN C.J.;YANG, Y.S.;LI, Y. K.;WU, T. K.Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system. **Bios. Bioel**., v. 19, p. 1627–1633, 2004.

HUMMEL, M.; BUCHHEIDT, D.; REITER, S.; BERGMANN, J.; ADAM, K.; HEHLMANN, R. Recurrent chemotherapy-induced tumor lysis syndrome (TLS) with renal failure in a patient with chronic lymphocytic leukaemia – successful treatment and prevention of TLS with low-dose rasburicase. **Eur. J. Haematol**., v.75, p. 518-521, 2005.

HUTCHERSON, D. A.; GAMMON, D. C.; BHATT, M. S.; FANEUF, M. Reduced-dose rasburicase in the treatment of adults with hyperuricemia associated with malignancy. **Pharmacotherapy**, v. 26, p. 242-247, 2006.

IMHOFF, R. D.; POWER, N. P.; BORROK, M. J.; TIPTON, P. A. General base catalysis in the urate oxidase reaction: evidence for a novel Thr-Lys catalytic diad. **Biochemistry**, v. 42, p. 4094-4100, 2003.

INADA, Y.; KODERA, Y. Modification of proteins with Polyethylyne Glycol. **Met. Enzymol**., v. 242, p. 65-90, 1994.

ISHIKAWA, J.; YAMASHITA, A.; MIKAMI, Y.; HOSHINO, Y,; KURITA, H.; HOTTA, K.; SHIBA, T.; HATTORI, M. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 14925-14930, 2004.

ITAYA, K.; FUKUMOTO, J.; YAMAMOTO, T. Studies onurate oxidase of *Candida utilis:* Some physical and chemical properties of the purified enzyme. **Agric. Biol. Chem**., v. 35,p. 813-821, 1971.

JEVSˇEVAR, S.; KUNSTEL, J. M.; POREKAR, V. G. PEGylation of therapeutic proteins. **Biotechnol.J.**, v. 5, p.113-128, 2010.

KAHN K.;TIPTON P.A. Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction.**Biochemistry**, v. 37, p. 11651-11659, 1998.

KATAYAMA, D. S.; CARPENTER, J .F.; MENARD, K. P.; MANNING, M. C.; RANDOLPH, T. W. Mixing properties of lyophilized protein systems: a spectroscopic and calorimetric study. **J. Pharm. Sci**., v. 98, p. 2954-2969, 2009.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim. Biophys. Acta**., v.1751, p.119-39, 2005.

KINSTLER, O.; MOLINEUZ, G.; TREUHEIT M.; LADD, D.; GEGG, C.Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates. **Adv. Drug Deliv. Rev**., v. 54, p. 477-485, 2002.

KLOSE, S.; STOLTZ, M.; MUNZ, E.; PORTENHAUSER, R. Determination of uric acid on continuous-flow (AutoAnalyzer II and SMA) systems with a uricase/phenol/4 aminophenazone color test. **Clin. Chem**.,v. 24, p. 250-255, 1978.

KOYAMA, Y.; ICHIKAWA, T.; NAKANO, E. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the gene enconding the *Candida utilis* urate oxidase (uricase). **J. Biochem**. v. 120, p. 969-973, 1996.

KURFURST, M. M. Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrphoresis. **Anal Biochem**., v. 200, p. 244-248, 1992.

LABOUREUR, P.; LANGLOIS, C. Urate oxydase d'*Aspergillus flavus* I. - Obtention, purification, propriétiés. **Bull. Soc. Chim. Biol**, v.50,p. 811–825, 1968.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.**Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LANG, G. M.; JASZCUK, J. K.; RECTOR, E.S.; MILTON, A. D.; EMMRICH, F.; SEHON, A. H. Suppression of antibody response in mice toanti-murine anti-CD4 monoclonal antibodies by conjugates with monomethoxypolyethylene glycol. **Immunol. Lett**., v.32, p.247–252, 1992.

LANG, G. M.; SEHON A. H. Analysis of T cell receptor alfa beta chains of CD8+ suppressor T cells induced by tolerogenic conjugates ofantigen and monomethoxypolyethylene glycol: involvement ofTCR a CDR3 domain in immunosuppression, **J. Immunol**., v. 158, p. 1984, 1997.

LEE, B. K.; KWON, J. S.; KIM, H. J.; YAMAMOTO, S.; LEE, E. K.Solid-phase PEGylation of recombinant interferon alpha-2a for site-specific modification: process performance, characterization and in vitro bioactivity. **Bioconjug. Chem**., v. 18, p. 1728-1734, 2007.

LEE, S.; GREENWALD, R.B.; MCGUIRE, J.; YANG, K.; SHI, C. Drug delivery systems employing 1,6-elimination: releasable poly (ethylene glycol) conjugates of proteins. **Bioconjug Chem**., v. 12, p.163-169, 2001.

LEE, W-K; KO, J-S; KIM, H-M. Effect of electrostatic on the adsorption of globular proteins on octacalcium phosphate crystal film. **J. Colloid and Inter. Science**, v. 276, p. 70-77, 2002.

LEGOUX, R.; DELPECH, B.; DUMONT, X.; GUILLEMOT, J. C.; RAMOND, P.; SHIRE, D.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; LOISON, G. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Gene Encoding *Aspergillus flavus* Urate Oxidase. **Am. Soc. Biochem. Mol. Biol**., v.267, p. 8565-8570, 1992.

LEONE, E. Preparation of uricase. **Biochem. J**., v. 54, p. 393-396, 1953.

LIN, K.C.; LIN, H.Y.; CHOU, P. The interaction between uric acid level and other risk factors on the development of gout among asyntomatic hyperuricemic men in a prospective study. **J. Rheumatol**., v. 27, p.1501-1505, 2000.

LIU, C.Y.; SIMS-MCCALLUM, R.P.; SCHIFFER, C.A. A single dose of rasburicaseis sufficient for the treatment of hyperuricemia in patientsreceiving chemotherapy. **Leuk Res**., v. 29, p. 463-465, 2005.

LONDON, M.; HUDSON, P.B. Uricolytic activity of purified uricase in two human beings. **Science**, v. 125, p. 937-938, 1957.

MAHLER, H.R.Uricase. In:BOYER,P.D.;LARDY,H.A.;MYRBACK,K. **The Enzymes.**New York: Academic Press, 1963. v.8, p.285.

MAHLER, H.R.; HUBSCHER, G.; BAUM, H. Studies on uricase. 1.Preparation, purification and properties of a cupro-protein. **J. Biol. Chem**., v. 216, p.625-641, 1955.

MAHLER, J.L. A new bacterial uricase for uric acid determination. **Anal. Biochem**., v. 38, p. 348-358, 1970.

MALZERT, A.; BOURY, F.; RENARD, D.; ROBERT, P.; LAVENANT, L.; BENOIT, J. P.; PROUST, J.E.Spectroscopic studies on poly(ethylene glycol)-lysozyme interactions. **Int. J. Pharm.,** v. 260, p. 175-176, 2003.

MARTINEZ-PÉREZ, D.; FERRER, M. L.; MATEO, C. R. A reagent less fluorescent sol-gel biosensor for uric acid detection in biological fluids. **Anal.Biochem**., v. 322, p. 238-242, 2003.

MASERA, G.; JANKOVIC, M.; ZURLO, A.; LOCASCIULLI, A.; ROSSI, M. R.; UDERZO, C.; RECCHIA, M.Urate-oxidase prophylaxias of uric acid-induced renal demange in childhood leukemia. **J. Pediatriac**.,v. 100, p. 152-155, 1982.

MASSON, E.; SYNOLD, T.W.; RELLING, M.V.; SCHUETZ, J. D.; SANDLUND, J. T.; PUI, C. H.; EVANS, W. E. Allopurinol inhibits de novo purine synthesis in lymphoblasts of children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 10, p. 56-60, 1996.

MASUMOTO, K.; UEDA, T.; NAGATA, M.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, Y.; HASHIMOTO,Y.T. Effects of stereochemistry of sugars on protein stabilities. **Protein Pept.Lett.,** v. 9, p. 435-439, 2002.

MAYER, M.D.; KHOSRAVAN R.; VERNILLET, L.; WU, J. T.; JOSEPH-RIDGE, N.; MULFORD, D. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of febuxostat, a new non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase, in subjects with renal impairment. **Am. J. Ther**., v. 12, p. 22-34, 2005.

MAZZALI, M.; HUGHES, J.; KIM, Y. G.; KANG, D. H., GORDON, K. L.; LAN, H.Y.; KIVLIGHN, S.; JOHNSON, R. J.Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. **Hypertension**, v. 38, p. 1101-1106, 2001.

McDONNEL, A.M.; LENZ, K.L.; FREI-LAHR, D.A.; HAYSLIP, J.; HALL, P. D. Single-dose rasburicase 6mg in the management of tumor lysis syndrome in adults. **Pharmacotherapy**, v. 26, p. 806-812, 2006.

MEYER, J. D.; JUN BAI, S.; RANI, M.; SURYANARAYANAN, R.; NAYAR, R.; CARPENTER, J. F.; MANNING, M. C. Infrared spectroscopic studies of protein formulations containing glycine. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, p.1359-1366, 2004.

MOHAPATRA, S. ; CHEN, Y.; TAKATA, M.; MOHAPATRA, S.S.; SEHON, A. H. Analysis of T-cell receptor alfa beta chains of CD8 suppressorT cells induced by tolerogenic conjugates of antigen and monomethoxypolyethylene glycol. **J. Immunol**., v. 151, p. 688–698, 1993.

MONFARDINI, C.; SHIAVON, O.; CALICETI, P.;MOPURGO, M.; HARRIS, J. M.; VERONESE, F.M. A branched Monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification. **Bioconjug. Chem**.,v. 6, p. 62-69, 1995.

MONTALBINI, P.; REDONDO, J.; CABALLERO, J. L. Uricase from leaves: its purification and characterization from three different higher plants. **Planta**, v. 202, p.277-283, 1997.

MOTOJIMA, K.; KANAYA, S.; GOTO, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat liver uricase. **J. Biol. Chem**., v. 32, p. 16677-16681, 1988.

NA, D. H.; LEE, K.C.; DELUCA, P.P. PEGylation of Octreotide: II. Effect of N-terminal of Mono-PEGylation on biological activity and pharmacokinetics. **Pharm. Research**., v. 22, p.743-749, 2005.

NELSON, D.L.; COX, M.W. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: Wiley Publishers, 2006.

NISHIMURA, H.; ASHIHARA,Y.; MATSUSHIMA, A; .; INADA, Y. Modification of yeast uricase with polyethylene glycol: disappearance of binding ability towards anti-uricase serum. **Enzyme**, v.24, p. 261-264, 1979.

NISHIMURA, H.; MATSUSHIMA, A.; INADA, Y. Improved modification of yeast uricase with polyethylene glycol, accompanied with nonimmunoreacyivity towards anti-uricase serum and high enzymatic activity. **Enzyme**, v.26, p. 49-53,1981.

NOTHENBERG, M. Febuxostato reforça arsenal antigota. Disponível em: http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd483/biofarma/biofarma.html acesso em: 15 de fevereiro de 2010.

OPPENHEIMER, E.H. The lowering of blood uric acid by uricase injections. **Bull. Johns Hopkins Hosp**., v. 68, p. 190-195, 1941.

OPPENHEIMER, E.H.; KUNKEL, H.G. Further observations on the lowering ofblood uric acid by uricase injections, **Bull. Johns Hopkins Hosp**., v. 73, p. 40-53, 1943.

PAI, S. S.; TILTON, R.D.; PRZYBYCIEN, T.M. Poly(ethylene glycol)-Modified Proteins: Implicationsfor Poly(lactide-co-glycolide)-Based Microsphere Delivery. **AAPS J**., v. 11, p. 88-98, 2009.

PARK, E.J.;NA, D.H.Optimization of octreotide PEGylation by monitoring with fast reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Anal.Biochem.**, v.380, p.140-142, 2008.

PASUT, G.; GUIOTTO, A.; VERONESE, F.M. Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic applications. **Exp. Opin.Ther.Pat**., v.14, p. 859-894, 2004.

PASUT, G.; SERGI, M.; VERONESE, F.M. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach.**Adv. Drug. Deliv.Rev**., v.60, p. 69-78, 2008.

PELEG-SHULMAN, T.; TSUBERY, H.; MIRONCHIK, M.; FRIDKIN, M.; SCHREIBER, G.; SHECHTER Y. Reversible PEGylation: a novel technology to release native interferon alpha2 over a prolonged time period. **J. Med. Chem.,** v.47, p. 4897-904, 2004.

PELTON, J.T.; McLEAN, L.R. Spectroscopic Methods for Analysisof Protein Secondary Structure. **Anal. Chem.**, v.277, p. 167–176, 2000.

PENNADAM, S.S.; FIRMAN, K.; ALEXANDER, C.; GÓRECKI, D. C. Protein-polymer nano-machines. Towards synthetic control of biological processes. **J. Nanobiotechnol**.,v. 2, p.8, 2004.

PEREZ-RUIZ, F.; ALONSO-RUIZ, A.; CALABOZO, M.; HERRERO-BEITES, A.; GARCÍA-ERAUSKIN, G.; RUIZ-LUCEA. Efficacy of allopurinol and benzbromarone for the control of hyperuricaemia. A pathogenic approach to the treatment of primary chronic gout. **Ann. Rheum.Dis**., v. 57, p. 545-549, 1998.

PILLINGER, M. H.; KEENAN, R. Update on the Management of Hyperuricemia and Gout. **Bull. NYU Hosp. Jt. Dis**., v. 66, p. 231-239, 2008.

PILLINGER, M. H.; ROSENTHAL, P.; ABELES, A.M. Hyperuricemia and Gout. News insights into pathogenesis and treatment.**Bull. NYU Hosp. Jt. Dis**., v. 65, p. 215-221, 2007.

PUI, C.H.; MAHMOUD, H.H.; WILEY, J.M., WOODS, G.M.; LEVERGER, G.; CAMITTA, B.; HASTINGS, C.; BLANEY, S.M.; RELLING, M.V.; REAMAN, G.H. Recombinant urate oxidase for the prophylaxis or treatment of hyperuricemia in patients with leukemia or lymphoma. **J. Clin.Oncol**., v. 19, p. 697-704, 2001.

RAJOKA, M. I.; REHMAN, K.; MERA, J. M.; AKHTAR, M. W.; ZIA, M. A. Purification, and properties of a bovine uricase. **Protein. Pept. Lett**., v. 13, p.363-368, 2006.

RETAILLEAU, P.; COLLOC'H, N.; VIVARÈS, D.; BONNETÉ, F.; CASTRO, B.; EL-HAJJI, M.; MORNON, J.P.; MONARD, G.; PRANGÉ, T. Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from *Aspergillus flavus*: a reassignment of the active-site binding mode. **Acta Crystallogr.D Biol. Crystallogr**., v. 60, p. 453-462, 2004.

RICHES, P.L.; WRIGHT, A.F.; RALSTON, S. Recent insights into the pathogenesis of hyperuricaemia and gout. **Hum. Molec. Genet**. v. 18, p. 177–184, 2009.

RICHTER, A. W.; AKERBLOM, E. Antibodies against polyethyleneglycol produced in animals by immunization with monomethoxy polyethylene glycol modified proteins. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol**.,v.70, p. 124–131, 1983.

RIDER, T.G.; JORDAN, K.M. The modern management of gout. **Rheumatology**, v. 49, p. 5-14, 2010.

ROBERTS, M.J.; HARRIS, M. Attachment of degradable poly(ethylene glycol) to proteins has the potential to increase therapeutic efficacy. **J. Pharmc. Sci**., v. 87, p.1440-1445, 1998.

ROBERTS, M.J.; BENTLEY, M.D.; HARRIS, J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Adv. Drug. Deliv. Rev**., v. 54, p. 459-476, 2002.

ROLFES, R.J. Regulation of purine nucleotide biosynthesis:in yeast and beyond. **Biochem. Soc. Trans**.,v. 34, p. 786-790, 2006.

SACHDEVA, A.; CAI, S. Structural Differences of Proteins Between Solution State and Solid State Probed by Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy **Appl Spectr**., v. 63, p. 458-464, 2009.

SARMA, A.; SERFOZO, P.; KAHN, K.; TIPTON, P.A.Identification and Purification of Hydroxyisourate Hydrolase, a Novel Ureide-metabolizing Enzyme.**J. Biol. Chem**., v. 274, p. 33863–33865, 1999.

SATO, H., Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins. **Adv. Drug Deliv. Rev**., v. 54, p. 487-504, 2002.

SCHIAVON, O.; CALICETI, P.; FERRUTI, P.; VERONESE, F. M. Therapeutic proteins: a comparison of chemical and biological properties of uricase conjugate to linear or branched poly(ethylene glycol) and poly(N-acryloylmorpholine). **IL Farmaco**, v. 55, p. 264-269, 2000.

SCHUMACHER, H. R. Febuxostat: a non-purine, selectiveinhibitor of xanthine oxidase for the management ofhyperuricaemia in patients with gout. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 14, p. 893–903, 2005.

SEHON, A. H. The suppressor factor of T suppressor cellsinduced by tolerogenic conjugates of ovalbumin andmonomethoxypolyethylene glycol is serologically and physico–chemically related to the ab heterodimer of the T cell receptor. **J. Immunol**., v. 152, p. 3–11,1994.

SHERMAN, M. R.; SAIFER, M. G. P.; PEREZ-RUIZ, F. PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia. **Adv. Drug Deliv Rev**., v.60, p. 59-68, 2008.
SO, A. Developments in the scientific and clinical understanding of gout. **Arthritis Res. Ther.**, v. 10, p.221-227, 2008.

SO, T.; ITO, H.-O.; HIRATA, M.; UEDA, T.; IMOTO, T. The molecular weight ratio of monomethoxypolyethylene glycol (mPEG) to protein determines the immunotolerogenicity of mPEG proteins**. Protein Engen**., v. 12, p. 701-705, 1999.

SO, T.; ITO, H.-O.; HIRATA, M.; UEDA, T.; IMOTO, T. Contribution of conformational stability of hen lysozyme to induction of type 2 T-helper immune responses**. Immunology**, v. 104, p. 259-268, 2001.

SO, T.; ITO, H.-O.; KOGA, T. UEDA, T.; IMOTO, T.Reduced immunogenicity of monomethoxypolyethyleneglycol-modified lysozyme for activation of T cells. **Immunol. Lett.**, v. 49, p.91-97, 1996.

SOARES, A.L.; GUIMARAES, G.M.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R.N.M.; ABRAHAO-NETO, J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase**. Int. J. Pharm**., v. 237, p. 163-170, 2002.

SOOD, A. M.; BURRY, L. D.; CHENG, D.F.Clarifying the Role of Rasburicasein Tumor Lysis Syndrome. **Pharmacotherapy**, v. 27, p.111-121, 2007.

SUNDY, J.S.; GANSON, N. J.; KELLY, S. J.; SCARLETT, E. L.; REHRIG, C.D.; HUANG, W.; HERSHFIELD, M. S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous PEGylated recombinant mammalian urate oxidase in patients with refractory gout. **Arthritis Rheum**., v. 56, p.1021–1028, 2007.

TAKANO, Y.; HASE-AOKI, K.; ORIUCHI, H.; ZHAO, L.; KASAHARA, Y.; KONDO, S.; BECKER, M. A. Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. **Life Sciences**, v.76, p. 1835-1847, 2005.

THORDARSON, P.; LE DROUMAGUET, B.; VELONIA, K. Well-defined protein-polymer conjugates synthesis and potential applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 73, p. 243-254, 2006.

TREETHARNMATHUROT, B.; OVARTLARNPORN C.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; DUNCAN, R.; WIWATTANAPATAPEE, R. Effect of PEG molecular weight and linking

chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin. **Int. J. Pharm**., v. 357, p. 252-259, 2008.

TRIFILIO, S.; GORDON, L.; SINGHAL, S.; TALLMAN, M.; EVENS, A.; RASHID, K.; FISHMAN, M.;MASINO, K.; PI, J.; MEHTA, J. Reduced-dose rasburicase (recombinant xanthine oxidase) in adult cancer patients with hyperuricemia. **Bone Marrow Transplant**., v. 37, p. 997-1001, 2006.

TSUJI, J.;HIROSE, K.; KASAHARA, E.; NAITOH, M.; YAMAMOTO, I. Studies on antigenicity of the polyethylene glycol (PEG)-modified uricase. **Int. J. Immunopharmacol**., v. 7, p. 725-730, 1985.

USUDA, N.; USMAN, M.I.; REDDY, M.K.;HASHIMOTO, T.; REDDY, J.K.;RAO, M.S.Immunocytochemical localization of urate oxidase, fatty acyl-CoA oxidase, and catalase in bovine kidney peroxisomes. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 36, p.253-258, 1988.

VAN DE WEERT, M.; HENNINK, W.E.; JISKOOT, W. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. **Pharm. Res**., v.17.p.1159-1167, 2000.

VARELA-ECHAVARRIA, A.; MONTES DE OCA-LUNA, R.; BARRERA-SALDAÑA, H.A. Uricase protein sequences:conserved during vertebrate evolution but absent in humans. **FASEB J**. v.2, p.3092-3096, 1988.

VELLARD, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Curr. Opin. Biotechnol**., v. 14, p. 444-450, 2003.

VERONESE, F.M. peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. **Biomaterials**, v. 22 p. 405-417, 2001.

VERONESE, F.M.; LARGAJOLLI, R.; BOCCU, E.; BENASSI, C.A.; SCHIAVON, O. Surface modification of proteins. Activation of monomethoxy-polyethylene glycols by phenychloroformates and modification of ribonuclease and superoxide dismutase. **Appl. Biochem. Biotecnol**., v.11, p. 141-152, 1985.

VERONESE, F.M.;MERO, A. The impact of PEGylation on biological therapies. **Bio Drugs**, v. 22, p. 315-329, 2008.

VERONESE, F.M.; MONFARDINI, C.; CALICETI, P.;SCHIAVON, O.; SCRAWEN, M.D.; BEER, D. Improvement of pharmacokinetic, immunological and stability properties of asparaginase by conjugation to linear and branched monomethoxy poly (ethylene glycol). **J. Cont. release**, v. 40, p. 199-209, 1996.

VERONESE, F.M.; PASUT, G. Pegylation, successful approach to drug delivery.**Drug Disc Today**, v. 10, p. 1451-1458, 2005.

VERONESE, F. M.; SACCA, B.; LAURETO, P.P. SERGI, M.; CALICETI, P.; SCHIAVON, O.; ORSOLINI, P. New PEGs for peptide and protein modification, suitable for identification of the PEGylation site. **Bioconjugate Chem**., v. 12,p. 62-67, 2001.

VOET, D. et al. **Biochemistry**. New York: Wiley Publishers, 2005.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms,**Bacteriol. Rev**., v. 40, p. 403–468, 1976.

VOGT, B. Urate oxidase (rasburicase) for treatment of severe tophaceous gout.**Nephrol DialTransplant**.,v. 20, p. 431–433, 2005.

VOLKL, A.; BAUMGART, E.; FAHIMI, D. Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. **J. Histochem Cytochem**., v. 36, p.329-336, 1988.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2nd ed. Nova York: Marcel Dekker, 1994.

WORKING, P.K.; NEWMAN, M.S.; JOHNSON et al. Safety of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene glycol) derivatives, In: HARRIS, J. M.; ZALIPSKY, S.**Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications**.ACS Books,1997. p. 45-57.

WU, H.; LEE, C.C.; MUZNY, D.M.; CASKEY, T. Urate oxidase: Primary structure and evolucionary implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.9412-9416, 1989.

YU, D.; SHANG, X.; GHOSH, R. Fractionation of different PEGylated forms of a protein by chromatography using environment-responsive membranes. **J. Chromatograf A**, v. 1217, p. 5595-5601, 2010.

ZALIPSKY, S. Chemistry of poly(ethylene glycol) conjugates with biological active molecules. **Adv. Drug Deliv Rev**., v. 16, p. 157-182, 1995.

ZALIPSKY, S.; MULLAH, N.; ENGBERS, C.; HUTCHINS, M.U.; KIWAN, R. Thiolytically Cleavable Dithiobenzyl Urethane-Linked Polymer–Protein Conjugates as Macromolecular Prodrugs: Reversible PEGylation of Proteins. **Bioconjug. Chem**., v. 18, p. 1869–1878, 2007.

ZHANG, J-F., SHI, L-Y., WEI, D-Z. Chemical modification of L-asparaginase from *Escherichia coli* with a modified polyethyleneglycol under substrate protection conditions. **Biotechnol. Letters**., v. 26, p. 753-756, 2004.

ZHANG, Z.; HE, Z.; GUAN, G. Thermal stability and thermodynamic analysis of native and methoxypolyethylene glycol modified trypsin. **Biotechnol. Technol**., v.13, p.781-786, 1999.

ZHANG, Z.; DIXON, J.E. *De novo* purine nucleotide biosynthesis. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol**., v. 42, p. 259-287, 1992.

ZHAO, H.;YANG, K.; MARTINEZ, A.; BASU, A.; CHINTALA, R.; LIU, H. C.; JANJUA, A.; WANG, M.; FILPULA, D. Linear and branched bicine linkers for releasable PEGylation of macromolecules: controlled release in vivo and in vitro from mono- and multi-PEGylated proteins. **Bioconjug. Chem**., v. 17, p.341-51, 2006.

ZHENG, C.; MA, G,; SU, Z. Native PAGE eliminates the problem of PEG-SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation. **Electrophoresis**, v. 28, p. 2801-2807, 2007.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J.Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, p. 123-137, 2009.