



Universidade de Brasília - UnB  
Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Molecular

# *Mestrado*

## PRODUÇÃO DE GLUCAGON RECOMBINANTE: EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Autora: Angelina Maria Moreschi Basso

Orientadora: Dra. Maria Fatima Grossi de Sá

Coorientadoras: Dra. Fernanda Mulinari e Dra. Patricia Pelegrini

Brasília, DF

2012

**ANGELINA MARIA MORESCHI BASSO**

**PRODUÇÃO DE GLUCAGON RECOMBINANTE:  
EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Dra. Maria Fatima Grossi de Sá

Coorientadoras: Dra. Fernanda Mulinari e Dra. Patrícia Pelegrini

Brasília, DF

2012

Dissertação de autoria de Angelina Maria Moreschi Basso intitulada “PRODUÇÃO DE GLUCAGON RECOMBINANTE: EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA”, apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, em 03 de Abril de 2012, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Dra. Maria Fatima Grossi de Sa  
Universidade de Brasília – UnB  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Orientadora

Dra. Fernanda Mulinari  
Faculdades Integradas – UPIS  
Coorientadora

Dra. Patricia Barbosa Pelegrini  
Faculdade Alvorada de Brasília  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Coorientadora

Dra. Maria Sueli Soares Felipe  
Universidade de Brasília – UnB  
Examinadora

Dr. Thales Lima Rocha  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Examinador

Brasília, DF  
2012

*“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória, é Dele a vitória alcançada em minha vida”*

Tudo é do Pai - Banda Dom

Dedico este trabalho a Deus, minha *excepcional* mãe Angela e a Tiago.

## *Agradecimentos*

*Agradeço primeiramente a Deus, meu protetor, amigo, Pai e grande orientador nas horas difíceis desta jornada. Este trabalho é o que é hoje graças a Ele. Seja feita sempre a Tua vontade em minha vida, Pai!*

*A minha querida mãe, Angela. Minha amiga incansável, sempre pronta a me escutar pacientemente a qualquer momento. Obrigada pelo apoio incondicional. Por doar sua vida, seu amor, sua força, todo o seu ser em ajudar a me tornar quem sou hoje: UMA MESTRE! TE AMO!*

*A meu namorado Tiago. Nos encontramos nesta estrada da ciência e jamais poderíamos imaginar que nossos caminhos seriam entrelaçados pelo amor. Gatinho, agradeço por toda a paciência, disposição incondicional e ajuda. Sua alma está neste trabalho! Jamais me esquecerei dos momentos científicos que passamos juntos! Obrigada! TE AMO!*

*A meu querido pai, Bruno e meus irmãos. Por todo o carinho e apoio, apesar da distância.*

*A minha amada família! A todos aqueles que vibraram comigo desde o primeiro momento em que passei no exames de seleção do mestrado na pizzaria, até a reta final. Em especial minha avó, Maria Antonia e minha tia Marcia. Obrigada!*

*A minha querida madrinha científica, tia Glaucia, por todos os conselhos valiosos em minha carreira científica. Espero poder proporcionar muitos orgulhos à senhora. Obrigada!*

*A Dra. Fatima Grossi, um agradecimento especial pela grande oportunidade em minha carreira.*

*Para as minhas coorientadoras Fernanda Mulinari e Patricia Pelegrini. Obrigada pela oportunidade de trabalhar*

*com vocês, dividir seus conhecimentos comigo, ajudar no meu crescimento profissional. Muito obrigada! E desculpe pelos momentos de teimosia da minha parte...rs*

*A minhas queridas amigas Lecir, Sineide e Vivian. Apesar de não trabalharmos mais juntas, vocês sempre alegravam meu dia com um sorriso, uma palavra amiga. Deus abençoe abundantemente vocês. Obrigada!*

*A minha "chara" Angélica, minhas amigas Sheiska e Edna. Pelo carinho, gargalhadas e amizade sincera.*

*A TODOS os amigos de labuta do Laboratório Interação Molecular Planta Praga - LIMPP, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.*

*Tenho e sinto que devo ser justa para com estes amigos: Antonio Américo (pela ajuda na clonagem), Brunild's (por sua ajuda no HPLC e conhecimento em proteômica), Carol e Léo (pelo carinho e ajuda no resultado do seqüenciamento), Glauber (ajuda no início das corridas de HPLC), Vanessa (ajuda no Western blot), Eduardo pela ajuda na tabela de custo, Michelle e Fabiana (ajuda nos bioensaios de atividade), Dr. Andre Melro (ajuda na Enteroquinase e coluna C18), Dr. Luciano e seu aluno Zé (ajuda na EM e análises adicionais) e a Dra. Joseane pela ajuda nas análises estatísticas.*

*Ao Dr. Thales Lima Rocha, por toda a ajuda, carinho e dedicação em todos os momentos, porém de crescimento, deste trabalho. Muito sucesso amigo, você merece!*

*A Dra. Simoní Campos, pela ajuda com o westeren blot.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela contribuição financeira.*

*E a todos que ajudaram de alguma forma e infelizmente não mencionei....*

*Minha sincera GRATIDÃO.*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 – Histórico .....	1
1.2 – Peptídeo glucagon.....	2
1.2.1 – Expressão do gene .....	4
1.2.2 – Mecanismos de secreção do glucagon .....	7
1.2.3 – Mecanismos de ação intracelular do glucagon.....	8
1.2.4 – Ações fisiológicas do glucagon .....	11
1.2.5 – Metabolismo e degradação .....	15
1.2.6 – Relevâncias do glucagon nas patologias humanas e suas aplicações.....	16
1.3 – Medicamentos especializados .....	17
1.4 – Patentes expiradas e biofármacos .....	21
1.5 – Patentes em <i>pipeline</i> e medicamentos.....	25
1.6 – Biofármaco glucagon .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1 Objetivo geral .....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 – Clonagem e estratégia para o gene glucagon .....	34
3.2 – Preparação do vetor <i>pGEX-4T-3</i> e ligação.....	35
3.3 – Eletroporação da ligação à cepa bacteriana <i>XLI-Blue</i> .....	36
3.4 – Seleção de colônias bacterianas <i>XLI-Blue</i> por sequenciamento.....	37
3.5 – Transformação por choque térmico da cepa bacteriana <i>BL21(DE3)</i> .....	37
3.6 – Expressão de glucagon recombinante .....	38
3.7 – Identificação da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína glucagon fusionada e avaliação da massa molecular .....	40
3.8 – Definição do perfil de expressão da proteína glucagon .....	40
3.9 – Avaliação do crescimento de células bacterianas induzidas e não induzidas .....	41
3.10 – Definição do nível de expressão da proteína glucagon.....	42
3.11 – Purificação do peptídeo glucagon fusionada a GST por afinidade.....	42

3.12 – Confirmação da presença do peptídeo glucagon fusionada a GST por <i>Western blot</i> .....	42
3.13 – Reação de digestão com enzima enteroquinase para liberar o peptídeo glucagon da fusão a GST.....	44
3.14 – Purificação do peptídeo glucagon por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa RP-HPLC .....	45
3.15 – Sequenciamento do peptídeo glucagon por espectrometria de massa ...	45
3.16 – Avaliação do rendimento da produção de glucagon por litro de expressão.....	46
3.17 – Teste de atividade biológica do peptídeo glucagon <i>in vivo</i> .....	47
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1 – Clonagem do gene glucagon no vetor <i>pGEX-4T-3</i> .....	49
4.2 – Confirmação da ligação do gene glucagon ao vetor <i>pGEX-4T-3</i> .....	52
4.3 – Sequência de resíduos de aminoácidos e massa molecular do peptídeo glucagon fusionado .....	57
4.4 – Expressão de glucagon recombinante fusionado.....	57
4.5 – Definição do perfil de expressão do peptídeo glucagon fusionado .....	59
4.6 – Comparação da curva de crescimento antes e após indução com indutor IPTG .....	64
4.7 – Purificação do glucagon fusionado a GST utilizando cromatografia de afinidade .....	65
4.8 – <i>Western blot</i> do peptídeo glucagon fusionado usando anticorpo anti-GST.....	67
4.9 – <i>Western blot</i> do peptídeo glucagon fusionado usando anticorpo anti-glucagon.....	68
4.10 – Digestão utilizando enzima enteroquinase para liberação da fusão glucagon-GST .....	69
4.11 – Sequenciamento do peptídeo glucagon por espectrometria de massa ...	70
4.12 – Teste de atividade biológico <i>in vivo</i> .....	73
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
5.1 – Produção de biossimilares no Brasil e glucagon.....	76
5.2 – Expressão do peptídeo glucagon .....	77
5.2.1 – Expressão .....	77
5.2.2 – Solubilidade.....	79



5.2.3 – Purificação Parcial.....	80
5.3 – Análise do crescimento celular antes e após a indução com IPTG .....	81
5.4 – Digestão usando enteroquinase para liberar a fusão glucagon – GST.....	82
5.5 – Confirmação da presença do peptídeo glucagon semi purificado e sequenciamento parcial de resíduos de aminoácidos.....	84
5.6 – Análise por cromatografia de alta eficiência em fase reversa RP-UFLC .....	85
5.7 – Teste de atividade biológica .....	86
5.8 – Estimativa de custo de glucagon com valor da produção embutida.....	89
5.9 – Síntese química de glucagon ou produção em <i>E.coli</i> de glucagon.....	93
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>96</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>108</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácidos  
AMPc – Monofosfato Cíclico de Adenosina  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
Asp-9 – Asparagina na Posição 9  
ATP – Adenosina Trifosfato  
bHLH – Hélice Básica-Hélice de Alça  
bZip – Zíper Básico de Leucina  
°C – Graus Celsius  
cm – Centímetros  
CPI – Código de Propriedade Intelectual  
CREB – Elementos de Resposta a Ligação  
DTT – Ditionitrito  
EMA – Agência de Medicina Europeia  
FBP1 – Frutose-1,6-Difosfatase  
FDA – Food and Drug Administration  
F6P – Frutose-6-Fosfato  
F(1,6)P2 – Frutose -1, 6-Bifosfato  
F(2,6)P2 – Frutose-2,6-Bifosfato  
g – Gramas  
GLPs – Peptídeos Semelhantes ao Glucagon  
GH – Hormônio de Crescimento  
GS – Glicogênio Sintase  
GST – Glutathione S-transferase  
G-6-P – Glicose-6-Fosfato  
G6PC – Glicose-6-fosfatase  
H – Horas  
His-1 – Histidina da Posição 1  
HNF – Fator Nuclear dos Hepatócitos  
INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial  
IPTG – *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*  
LB – Luria & Bertani

mA – Miliampere  
mg – Miligramas  
mg/dL – Miligramas por Decilitro  
mL – Mililitro  
mm – Milímetros  
mM – Milimolar  
MPB – *Maltose-binding-protein*  
ng – Nanogramas  
ng/μl – Nanogramas por Microlitro  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PACAP – Peptídeo Ativador de Adenilil Ciclase da Pituitária  
Pax – Fatores de Transcrição do Homeodomínio Pareado  
pb – Pares de Base  
PBS - *Phospahte Buffered Saline*  
PHB – Poli(3-hidroxibutirato)  
PTH – Hormônio Paratireóide  
PCK2 – Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase  
PCR – Reação em Cadeia Polimerase  
PKA – Proteína Kinase A  
PKLR – Piruvato Quinase  
PMSF – *Phenylmethanesulfonylfluoride*  
PPARGC1A – Receptor  $\gamma$ -Coativador -1  
PI – Propriedade Intelectual  
q.s.p – Quantidade Suficiente Para  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RNA – Ácido Ribonucléico  
RPM – Rotações por Minuto  
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
Ser-16 – Serina na Posição 16  
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TBS – *Tris Buffered Saline*  
TEMED - N, N, N', N'- Tetrametiletilenediamina  
TFA – Ácido Trifluoracético

TFN – Fator de Necrose Tumoral

Trx – Tioredoxina

U/ $\mu$ l – Unidades por Microlitro

V – Volt

VIP – Peptídeo Intestinal Vasoativo

$\mu$ g/mL – Microgramas por Mililitro

$\mu$ g/ $\mu$ L – Microgramas por microlitro

$\mu$ g – Microgramas

$\mu$ l – Microlitros

$\mu$ m – Micrometros

$\mu$ M – Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotomicrografia de um corte do pâncreas que mostra uma ilhota de Langerhans cercada de células acinodas do pâncreas.....	2
<b>Figura 2.</b> Ilhota de Langerhans .....	3
<b>Figura 3.</b> Estrutura do glucagon .....	4
<b>Figura 4.</b> Sequência de resíduos de aminoácidos ilustrativa do hormônio glucagon .....	4
<b>Figura 5.</b> Processamento alternativo pós-tradução do pró-glucagon no pâncreas, intestino e cérebro .....	6
<b>Figura 6.</b> Modelo esquemático da regulação da secreção de glucagon dependente de glicose em células $\alpha$ de camundongos.....	8
<b>Figura 7.</b> Papel do glucagon e seu receptor no fígado .....	11
<b>Figura 8.</b> Biofármaco GlucaGen® (Novartis) .....	29
<b>Figura 9.</b> Glucagon® (Eli Lilly) .....	29
<b>Figura 10.</b> Esquema ilustrativo do vetor de expressão <i>pGEX-4T-3</i> incluindo genes FLAG e Glucagon.....	37
<b>Figura 11.</b> Alinhamento entre sequências do gene glucagon e após troca de códons raros.....	49
<b>Figura 12.</b> PCR usando <i>Taq High Fidelity</i> e <i>primers</i> para o gene glucagon .....	50
<b>Figura 13.</b> Figura esquemática do vetor de expressão <i>pGEX-4T-3</i> .....	51
<b>Figura 14.</b> Digestão do vetor de expressão <i>pGEX-4T-3</i> usando <i>NotI</i> e <i>SalI</i> .....	51
<b>Figura 15.</b> Esquema ilustrativo da ligação do fragmento glucagon e tag FLAG ao vetor de expressão <i>pGEX-4T-3</i> .....	52
<b>Figura 16.</b> PCR de colônia e plasmídeo usando <i>primers</i> para o gene glucagon .....	53
<b>Figura 17.</b> Análise da sequência da amostra 5 feita pelo banco de dados <i>ORF Finder</i> do NCBI.....	55
<b>Figura 18.</b> Análise por BLAST das sequências do sequenciamento (amostra 5) e a sequência do mapa da ligação, demonstrando a homologia de 100% da região Glucagon e FLAG.....	56
<b>Figura 19.</b> Sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo glucagon (vermelho) fusionada aos <i>Tags</i> GST (preto) e FLAG(laranja) .....	57
<b>Figura 20.</b> Análise da presença de glucagon fusionado (31,44 kDa) na fração	

solúvel e insolúvel .....	58
<b>Figura 21.</b> Expressão do peptídeo fusionado glucagon (34,44 kDa) nas temperaturas de 25, 30 e 37°C nas concentrações de 0,25 , 0,5 e 1 mM de IPTG no tempo de 5 horas após a indução .....	59
<b>Figura 22.</b> Expressão do peptídeo glucagon fusionado a 25°C em gel SDS-PAGE 12% .....	61
<b>Figura 23.</b> Expressão do peptídeo glucagon fusionado a 30°C em gel SDS-PAGE 12% .....	62
<b>Figura 24.</b> Expressão do peptídeo glucagon fusionado a 37°C em gel SDS-PAGE 12% .....	63
<b>Figura 25.</b> Gel de SDS-PAGE 12% demonstrando a eficiência da purificação .....	66
<b>Figura 26.</b> Gel SDS PAGE 12% usado como espelho para <i>Western blot</i> .....	67
<b>Figura 27.</b> <i>Western blot</i> usando anti-GST .....	67
<b>Figura 28.</b> Gel SDS PAGE 12% usado como espelho para <i>Western blot</i> .....	68
<b>Figura 29.</b> <i>Western blot</i> usando anti-glucagon .....	68
<b>Figura 30.</b> Gel de Tris-Tricina 16% demonstrando a liberação da fusão entre glucagon e o tag GST.....	69
<b>Figura 31.</b> Sequenciamento por espectrometria de massa usando MALDI-TOF/TOF (modo LIFT) .....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Gastos diretos com medicamentos e insumos. Período 2006 – 2011 .....	20
<b>Tabela 2.</b> Gastos anuais do ministério da saúde com medicamentos do programa de medicamentos de dispensação em caráter excepcional. Brasil, 2000 - 2007.....	20
<b>Tabela 3.</b> Medicamentos mais importantes da atualidade .....	24
<b>Tabela 4.</b> Países produtores do peptídeo glucagon e respectivos preços .....	28
<b>Tabela 5.</b> Classificação dos medicamentos que geraram mais de 30 processos, princípio ativo em grupos.....	30
<b>Tabela 6.</b> Promotores mais utilizados para produção de moléculas terapêuticas em <i>E.coli</i> .....	78
<b>Tabela 7.</b> Moléculas utilizadas no processo de obtenção de glucagon recombinante .....	89
<b>Tabela 8.</b> Aparelhos utilizados para a produção de glucagon recombinante e respectivos gastos para expressão de 1 litro .....	89
<b>Tabela 9.</b> Produtos utilizados para produção de glucagon recombinante e respectivos gastos para expressão de 1 litro .....	90
<b>Tabela 10.</b> Cotação de custo da síntese de glucagon e respectivas empresas .....	94

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Gastos do Ministério da Saúde com medicamentos. Período 2003 - 2011.....	19
<b>Gráfico 2.</b> Avaliação da expressão do peptídeo fusionado glucagon nas temperaturas de 25, 30 e 37°C e concentrações de 0,25, 0,5 e 1mM de IPTG utilizando densitometria.....	60
<b>Gráfico 3.</b> Leitura das OD <sub>600</sub> das cepas <i>BL21(DE3)</i> contendo o vetor <i>pGEX-4T-3</i> , Glucagon induzido, não induzido e cepa <i>BL21(DE3)</i> vazia .....	64
<b>Gráfico 4.</b> Cromatografia do peptídeo fusionado glucagon e GST .....	66
<b>Gráfico 5.</b> Cromatograma dos picos coletados durante cromatografia.....	71
<b>Gráfico 6.</b> Teste de atividade biológica <i>in vivo</i> .....	73
<b>Gráfico 7.</b> Análise estatística do tratamento do controle negativo .....	74
<b>Gráfico 8.</b> Análise estatística do tratamento do controle positivo .....	75
<b>Gráfico 9.</b> Análise estatística do tratamento do glucagon recombinante .....	75



## RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde – OMS, um terço da população mundial não tem acesso a medicamentos (NWOBKE, 2006). No Brasil, o Sistema Único de Saúde – SUS disponibiliza a aquisição gratuita destas drogas para a população. Estes fármacos são classificados em três categorias: componentes básicos, componentes estratégicos e componentes especializados da assistência farmacêutica. Dentre estas categorias, esta última se destaca devido aos medicamentos serem de alto custo, importados e utilizados em tratamentos prolongados. O Ministério da Saúde criou em 1993, o Programa de Medicamentos Especializados, anteriormente denominado excepcionais. Este programa fornece fármacos de alto custo e acesso restrito. No primeiro ano, o programa ofereceu 31 apresentações em 15 diferentes itens. Atualmente, a lista de medicamentos oferece 150 itens sob 310 apresentações distintas. O aumento da disponibilidade destes fármacos e a importação dos mesmos acarretaram em uma sobrecarga de gastos ao Ministério da Saúde. Durante o ano de 2011, foram gastos R\$ 3 bilhões com estes fármacos. Os componentes especializados incluem fármacos para o tratamento de diversas doenças, tais como hepatites virais, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e diabetes. Desde 2008, o fármaco glucagon está incluído na lista deste componente, utilizado principalmente em casos de hipoglicemia em diabéticos. Porém, este fármaco pode ser utilizado para diversas finalidades, como em diagnósticos e emergências hospitalares. Para reduzir o alto custo com estes medicamentos, o Governo Federal criou, em 2004, a Lei de Inovação Tecnológica. De acordo com o decreto número 6.041 de Fevereiro de 2007, foram instituídas a Política Nacional de Biotecnologia e a criação do Comitê Nacional de Biotecnologia, com o desenvolvimento da biotecnologia na área da saúde humana, cujo foco na indústria farmacêutica brasileira foi priorizado. A produção de glucagon pela bioindústria brasileira está inserida neste contexto. Desta forma o objetivo deste trabalho é desenvolver um processo de produção, expressão, purificação e avaliação da atividade biológica de um peptídeo glucagon recombinante. O peptídeo foi expresso em sistema heterólogo usando *Escherichia coli*, utilizando um vetor de expressão com a tecnologia de fusão do tag GST ao glucagon. A estratégia escolhida visou obter o peptídeo na fração solúvel, o que correspondeu a 50% da expressão total de proteínas na bactéria, na presença de 0,25 mM de IPTG, a 30°C. A purificação ocorreu através de cromatografia de afinidade e o glucagon fusionado foi obtido com 90% de pureza, que posteriormente

foi clivado para liberação da fusão utilizando a enzima enteroquinase. A sequência dos primeiros 16 resíduos de aminoácidos, a partir da porção N-terminal, foi obtida por meio de espectrometria de massa e a avaliação da atividade biológica confirmou a atividade do peptídeo. Neste ensaio ratos Wistar hipoglicêmicos foram utilizados para monitorar a glicemia após aplicação de glucagon recombinante, onde o mesmo apresentou desempenho semelhante ao controle positivo ( $p < 0,00001$ ).

**Palavras chave:** glucagon recombinante, sistemas heterólogos, *tag* GST, enteroquinase, medicamentos especializados, Sistema Único de Saúde – SUS.

## ABSTRACT

According to the World Health Organization - WHO, one third of the world population does not have access to therapeutic drugs. In Brazil, the Brazilian National Health System - SUS is the Policy Strategy for Pharmaceutical Assistance, which aiming to make available drugs for the treatment of specific diseases. The pharmaceutical drugs are classified into three categories: basic compounds, strategic compounds and specialized compounds. Among those categories, the last one is special because they present high-cost-drugs, imported and prolonged treatment. In 1993, the Ministry of Health created a program for distributing these drugs to the population for free. In the first year, the program offered 31 presentations in the 15 different drugs. The program includes, nowadays, 150 drugs in 310 presentations. The increased disponibility of these drugs and the import resulted in overhead costs to the Ministry of Health. During the year of 2011, the Brazilian Government spent R\$ 3 billion on the acquisition of such therapeutic drugs. Some of the drugs are included in the list of specialized medicines, in order to treating various diseases, such viral hepatitis, Alzheimer's disease, multiple sclerosis and *diabetes mellitus*. The glucagon peptide was added to the list in 2008 aiming to be used in on the control of recurring blood glucose falls in diabetics patients. It can also be used for other purposes, such in diagnostic procedures and emergency rooms. To reduce the high cost on the acquisition of drugs, the Government created the law of technological innovation in 2004. According to the decree 6.041 of February, 2007, in which was instituted the National Biotechnology Policy and created de National Committee of Biotechnology, the development of the Human Health Biotechnology Area, with focus on Biopharmaceutical was prioritized. The glucagon production by brazilian industry is inserted in this context. The purpose of this work is the development of a methodology for the production, expression, purification, and evaluation of biological activity of recombinant glucagon. The peptide was expressed in a heterologous system using *Escherichia coli*. The vector used has a fusion system and GST tag was previously selected to obtain most of the peptide in the soluble fraction, thereby resulting in lower production costs. The expression level obtained was 50% of the total expression of the bacterium, using 0.25 mM IPTG. The purification of the fused peptide was performed on affinity chromatography, showing 90% purity. The partial sequence of the peptide was confirmed by mass spectrometry and the peptide

was separated from the fusion using the enzyme *enterokinase*. In order to confirm the activity of glucagon, a biological assay was done using hypoglycemic Wistar rats, whose blood glucose was monitored after application of recombinant glucagon. The test confirmed the activity of the peptide ( $p < 0,00001$ ).

**Key words:** recombinant glucagon, heterologous systems, tag GST, *enterokinase*, specialized components, health care system.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

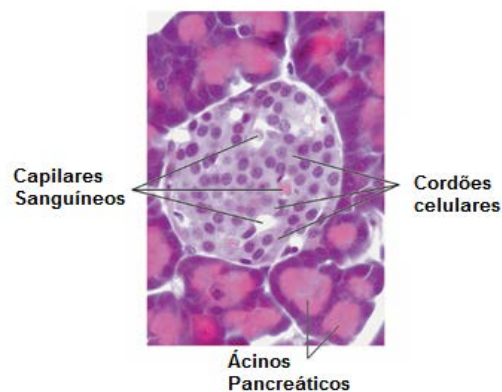
Em 1902 foi descoberto um fator intestinal, postulado por Bayliss e Starling, que poderia atuar sobre o pâncreas endócrino em resposta a nutrientes orais (MARTIN, et al., 2011). No ano seguinte, Kimball e Murlin descobriram o papel primário do glucagon por meio de estudos fisiológicos, que definiram a ação antagônica da insulina na regulação da glicose na circulação sanguínea (HEPPNER et al., 2010; VUGUIN & CHARRON, 2011). Posteriormente, estudos iniciais de Banting (1921) e Murlin (1923), indicavam a existência de um hormônio indutor de hiperglicemia no pâncreas. Estes pesquisadores perceberam que cães que recebiam extratos pancreáticos ricos em insulina tinham uma resposta bifásica da glicose no sangue, pois havia um aumento inicial na glicose seguido por uma redução. Houve a suspeita de que o aumento inicial no nível de glicose fosse devido a uma contaminação nos extratos, que posteriormente demonstrou ser a ação do glucagon. A disponibilidade do glucagon cristalino, obtido em 1953, proporcionou o estabelecimento de suas propriedades hiperglicêmicas, por meio da estimulação da glicogenólise e gliconeogênese no fígado, músculo esquelético e lipólise na gordura. As ações glicogenolíticas e lipolíticas do glucagon no fígado e gordura, respectivamente eram mediadas pela estimulação da formação do “mensageiro secundário” celular monofostato cíclico de adenosina (AMPC), ações demonstradas posteriormente por estudos de Sutherland e DeDuve, que serão abordadas posteriormente. Em 1957, Bromer e colaboradores definiram a sequência parcial do glucagon e sua composição de resíduos de aminoácidos. No mesmo ano, Unger e colaboradores desenvolveram o radioimunoensaio para detectar o glucagon no plasma. Este ensaio proporcionou numerosos outros estudos celulares e fisiológicos demonstrando que o glucagon é um hormônio crítico para a manutenção dos níveis de

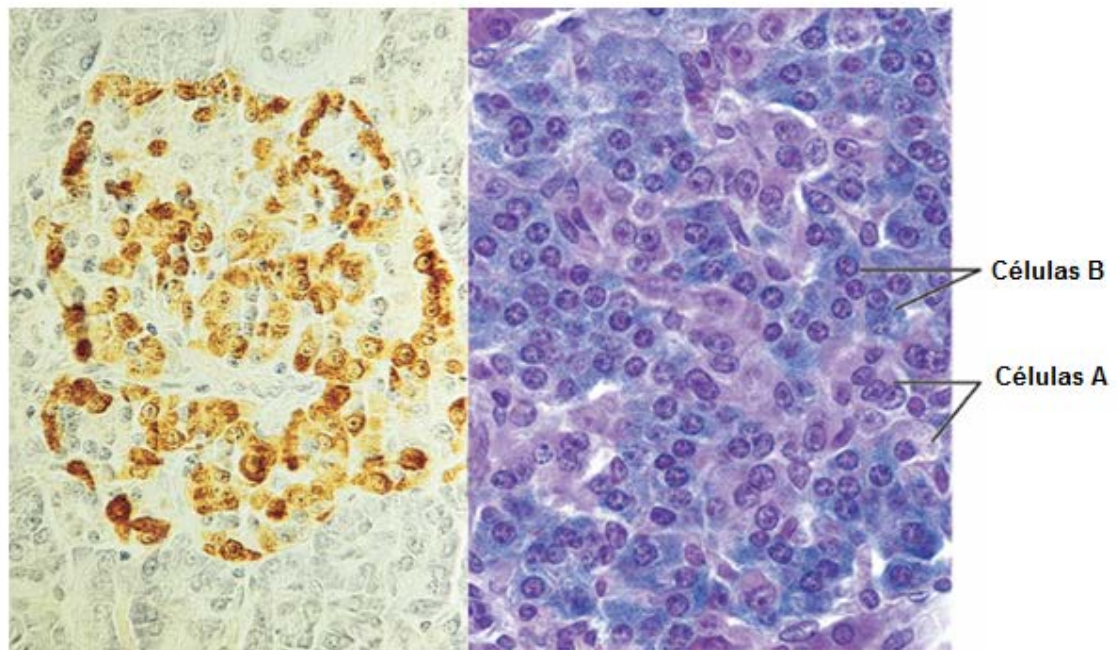
glicose no sangue durante o jejum. Além disso, o acesso a um antisoro específico para o glucagon e o radioimunoensaio, permitiram a identificação da produção de glucagon pelas células  $\alpha$  das ilhotas pancreáticas (KAHN et al., 2009; HABEGGER, 2010).

## 1.2 Peptídeo glucagon

A palavra glucagon deriva das palavras gluco, que significa glicose, e agon que significa agonista para glicose. O hormônio peptídico glucagon é produzido nas ilhotas de Langerhans do pâncreas (Figura 1), especificamente secretado pelas células  $\alpha$  (20 a 25% do total de ilhotas) (Figura 2). Estima-se que existam mais de um milhão de ilhotas no pâncreas humano, medindo aproximadamente de 100 a 500 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) e totalizando de 1 a 2% da massa total pancreática (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; QUESADA et al., 2008; RORSMAN et al., 2011). Elas apresentam um importante papel na manutenção da homeostasia da concentração de glicose juntamente com a insulina, exercendo uma função fisiológica pela ligação a um receptor específico na membrana plasmática de células alvo (KIMBALL, 2004). A ligação do glucagon a receptores induz o aumento da concentração de AMPc, que, em seguida desencadeia uma série de reações resultando na glicogenólise e gliconeogênese, abordadas posteriormente (WHEN et al., 2001; KAHN et al., 2009).

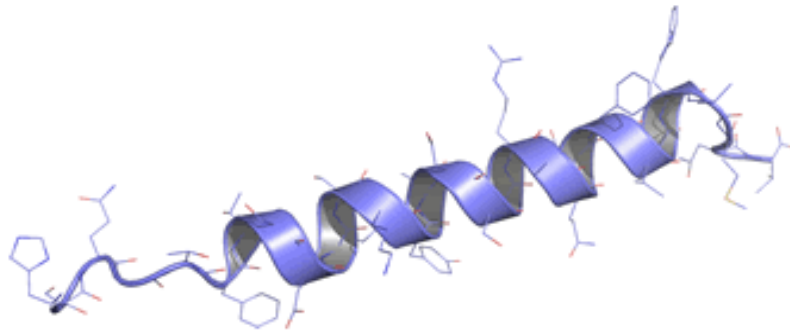
**Figura 1. Fotomicrografia de um corte do pâncreas que mostra uma ilhota de Langerhans cercada de células acinosas do pâncreas. As células de ilhota formam cordões separados por capilares, aqui vistos como espaços claros. HE, médio aumento. Retirada de (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).**





**Figura 2. Ilhota de Langerhans.** À direita, fotomicrografia de uma ilhota de Langerhans que mostra células alfa (A) e beta (B). Tricrômico de Gomori (1000X). À esquerda, detecção por imunocitoquímica do glucagon em uma ilhota de Langerhans, por microscopia de luz em células A (100X). Com modificações (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

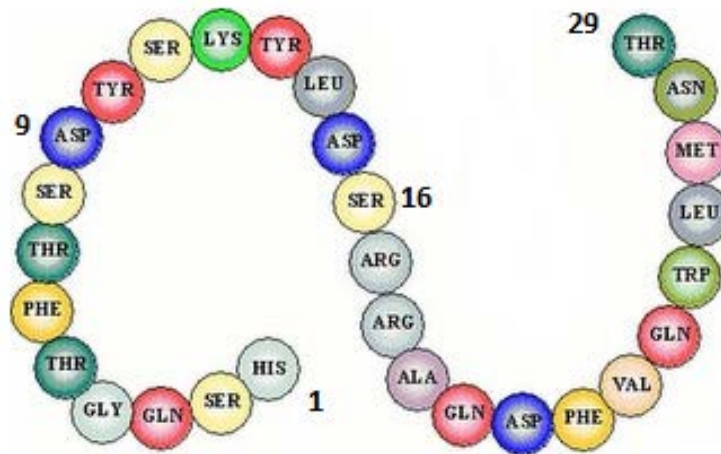
Através de análises por raio-x de glucagon cristalizado, obteve-se a estrutura (Figura 3) do hormônio, na qual os grupos N-terminal e C-terminal consistem de  $\alpha$ -hélices (GHODKE, 2012). Os estudos de Wagman e colaboradores (1980) demonstraram que a porção N-terminal do hormônio é crítico para a ativação da via de transdução de sinais mediada pelo AMPc, embora o domínio C-terminal seja requerido para a ligação de alta afinidade ao receptor de glucagon. O hormônio glucagon é formado por 29 resíduos de aminoácidos (Figura 4), onde histidina (His-1), Asparagina (Asp-9) e Serina (Ser-16) da porção N-terminal, indicam uma importância para a ligação ao receptor e para sua ativação (WRIGHT & RODBELL, 1979; UNSON et al., 1989; STURM et al., 1997; KAHN et al., 2009).



**Figura 3. Estrutura do glucagon.**

Retirada de

(Fonte: <http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/G-index.cfm?definition=glucagon>)



**Figura 4. Sequência de resíduos de aminoácidos ilustrativa do hormônio glucagon.**

Com Modificações

(Fonte: <http://bioquimica-obesidade.blogspot.com/2010/08/glucagon.html>).

### 1.2.1 Expressão do gene

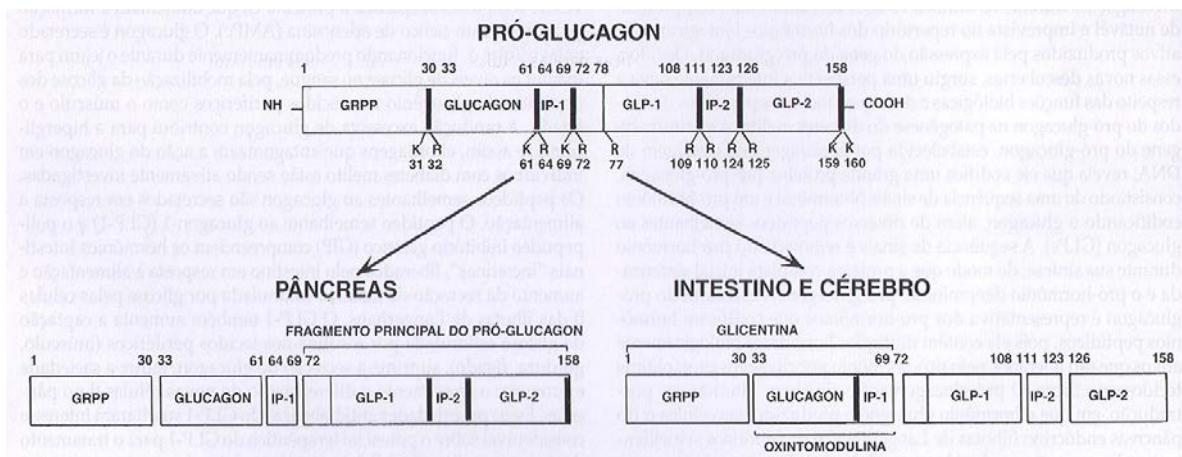
Nos últimos 15 anos alguns estudos revelaram uma notável complexidade no repertório dos hormônios biologicamente ativos produzidos pela expressão do gene pró-glucagon (cromossomo 2q36-q37 em seres humanos). A estrutura do gene do pró-glucagon, estabelecida por abordagens de clonagem de DNA, revela uma codificação para uma grande proteína denominada pré-pró-glucagon, que consiste de uma sequência



de sinais N-terminal e um pró-hormônio codificando o glucagon, além de diversos peptídeos semelhantes ao glucagon GLP-1, GLP-2 (GLPs), oxintomodulina e glicentina (HEBEGGER et al., 2010). A sequência de sinais é removida do pró-hormônio durante sua síntese, de modo que a proteína completa inicial sintetizada é o pró-hormônio denominado pró-glucagon. A estrutura da proteína pró-glucagon é apenas representativa uma vez que apresenta os hormônios peptídicos em sequência, pois contém múltiplos hormônios biologicamente ativos. Estes hormônios são liberados pelo pró-hormônio por clivagens proteolíticas tecido-específicas. No caso do glucagon a clivagem ocorre por pró-hormônios convertases ou PCSK2, encontrado nas células  $\alpha$  do pâncreas, células L do intestino delgado distal e cólon e nas regiões do cérebro hipotalâmico e núcleo do trato solitário (QUESADA et al., 2008). Na etapa de pós-tradução o pró-glucagon sofre clivagens alternativas, em que o hormônio glucagon é produzido nas células  $\alpha$  do pâncreas endócrino e os GLPs são produzidos nas células L do intestino. Ambos glucagon e GLPs são membros de uma superfamília de peptídeos, semelhantes na sequência de resíduos de aminoácidos e estruturalmente relacionados. Estão incluídos neste grupo o peptídeo intestinal vasoativo, secretina, polipeptídeo inibitório gástrico, hormônio liberador do hormônio de crescimento, oxintomodulina e glicentina. Cada um desses hormônios relacionados ao glucagon está envolvido na regulação do crescimento, desenvolvimento ou da homeostasia dos nutrientes, agindo através de receptores acoplados a proteína G, que aumentam a formação de AMPc (HEPPNER et al., 2010; HABEGGER, 2010; SAFINA et al., 2011). Atualmente, a regulação da expressão do gene do pró-glucagon ocorre em dois níveis de expressão: processamento pós-tradução do pró-glucagon e transcrição do gene do pré-pró-glucagon.

O pró-glucagon, sintetizado nas células  $\alpha$  das ilhotas, é processado por clivagens proteolíticas específicas em um padrão que difere marcadamente do processamento nas

células L do intestino e nos neurônios peptidérgicos no cérebro (Figura 5). Nas células  $\alpha$ , as convertases de pró-hormônio específicas clivam e liberam o glucagon do pró-glucagon, deixando para trás a fração inerte biologicamente “fragmento principal do pró-glucagon” e o fragmento N-terminal do pró-glucagon. Em contraste, nas células L e nos neurônios peptidérgicos, as clivagens do pró-glucagon por um conjunto diferente de enzimas conversoras de pró-hormônio resulta predominantemente na formação de GLPs, constituindo o grupo GLP-1 de isopeptídeos e o GLP-2. O processamento em pares específicos de resíduos básicos produz outros hormônios peptídicos multifuncionais, envolvidos no metabolismo dos nutrientes. Os principais hormônios bioativos processados são o glucagon nas células  $\alpha$  do pâncreas e o GLP-1 nas células intestinais e no cérebro (FURATA, 2001; QUESADA et al., 2008; TONG & SANDOVAL, 2011).

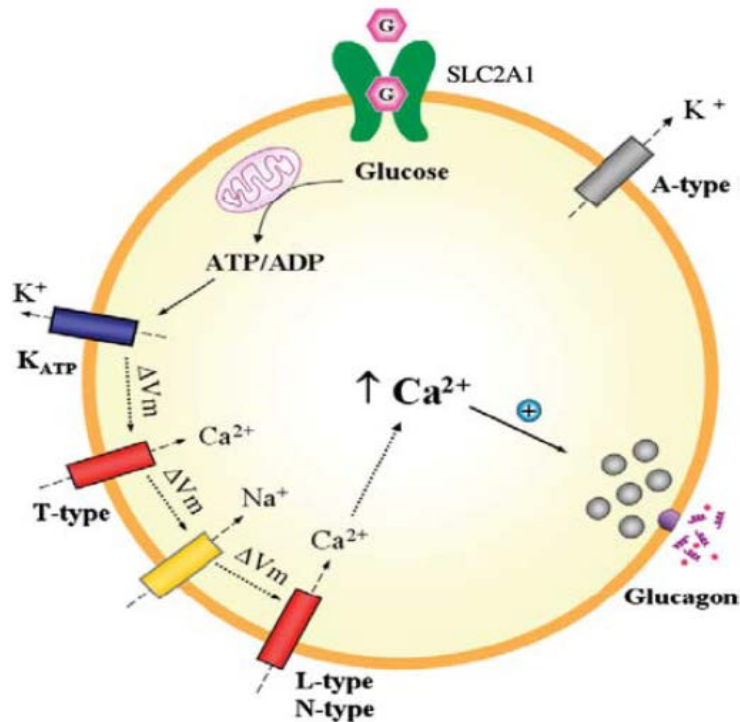


**Figura 5. Processamento alternativo pós-traducional do pró-glucagon no pâncreas, intestino e cérebro.** Os números sob o pró-glucagon denotam as posições dos resíduos de aminoácidos. K, lisina, R, arginina; GRPP, peptídeo pancreático relacionado à glicemia; IP-1 e IP-2, peptídeos intervenientes; GLP-1 e GLP-2, peptídeos semelhantes ao glucagon. Retirada de (KAHN et al., 2009).

### 1.2.2 Mecanismo de secreção do glucagon

Os mecanismos intracelulares de sinalização das células  $\alpha$ , que culmina na secreção do glucagon são complexos (Figura 6). Atualmente, duas hipóteses são estudadas para explicar este mecanismo: mecanismos intrínsecos às células  $\alpha$  ou sob o controle parácrino das células vizinhas  $\beta$  e  $\delta$ , porém não está claro qual destes é o correto (BRAUN & RORSMAN, 2010). Ensaio de hibridização *in situ* de células  $\alpha$  de rato demonstraram a presença de RNAs mensageiros codificando as subunidades *Kir6.2* e *rSUR1* do canal de  $K^+_{atp}$ . Estudos anteriores (Figura 8, A), datados até o ano de 2010, demonstraram que células  $\alpha$  de camundongos em ilhotas apresentavam expressão dos canais iônicos nas células  $\alpha$  similar à das células  $\beta$  e células  $\delta$ , porém com respostas diferentes a glicose. As células  $\alpha$  se diferenciam das células  $\beta$  e  $\delta$  pela presença de uma grande corrente de  $Na^+$  sensível à tetrodotoxina, um bloqueador de canais de sódio, uma corrente de  $K^+$  resistente à trietilamina, e duas correntes de  $Ca^{2+}$  cineticamente separáveis: canais de  $Ca^{2+}$  de limiar baixo (tipo T) e alto (tipo L). Em contraste com as células  $\beta$ , as células  $\alpha$  são eletricamente silenciosas em presença de concentrações de glicose liberadoras de insulina. Os potenciais de ação gerados na ausência da glicose são inibidos pela tetrodotoxina, nifedipina e tolbutamina (bloqueadores de canais de sódio, cálcio e potássio respectivamente). Estes achados sugerem que, a atividade elétrica e a secreção de glucagon das células  $\alpha$  são dependente da geração de potenciais de ação dependentes  $Na^+$ . Adicionalmente, o bloqueador do canal de  $K^+_{atp}$  diazoxida inibe a atividade elétrica e aumenta a condutância celular total ao  $K^+$ , elevando a secreção de glucagon. Assim, a secreção de glucagon depende de uma baixa atividade do  $K^+_{atp}$  para manter uma negatividade suficiente do potencial de membrana, prevenindo a inativação voltagem-dependente das correntes de membrana com portas de voltagem. Foi postulado que a glicose inibe a liberação de glucagon despolarizando a célula  $\alpha$ , com a

inativação resultante dos canais iônicos que participam na geração dos potenciais de ação (MARQUES-DA-SILVA et al., 1997; QUESADA et al., 2008; HEBEGGER et al., 2010).



**Figura 6. Modelo esquemáticos da regulação da secreção de glucagon dependente de glicose em células α de camundongo.** A glicose é incorporada dentro das células α pelo transportador *SLC2A1*. Em concentrações baixas de glicose; a atividade moderada dos canais de K<sub>ATP</sub> situa um potencial de membrana das células α em um intervalo que permite a abertura de voltagem de canais tipo T dependente e canais voltagem dependente Ca<sup>2+</sup> tipo N. Sua ação desencadeia potenciais de ação, influxo de Ca<sup>2+</sup> e excitose de grânulos de glucagon. A abertura de canais A tipo K<sup>+</sup> é necessário como repolarização do potencial de ação. Entretanto, concentrações de glicose elevada em razões ATP/ADP intracelular, bloqueiam os canais de K<sup>ATP</sup> e a despolarização do potencial de membrana para uma faixa onde a inativação de canais voltagem dependente ocorre. A inibição da atividade elétrica resulta em influxo de Ca<sup>+</sup> e secreção de glucagon. A função de canais tipo L predomina quando os níveis de AMPc está elevado (QUESADA et al., 2008)..

### 1.2.3 Mecanismo de ação intracelular do glucagon

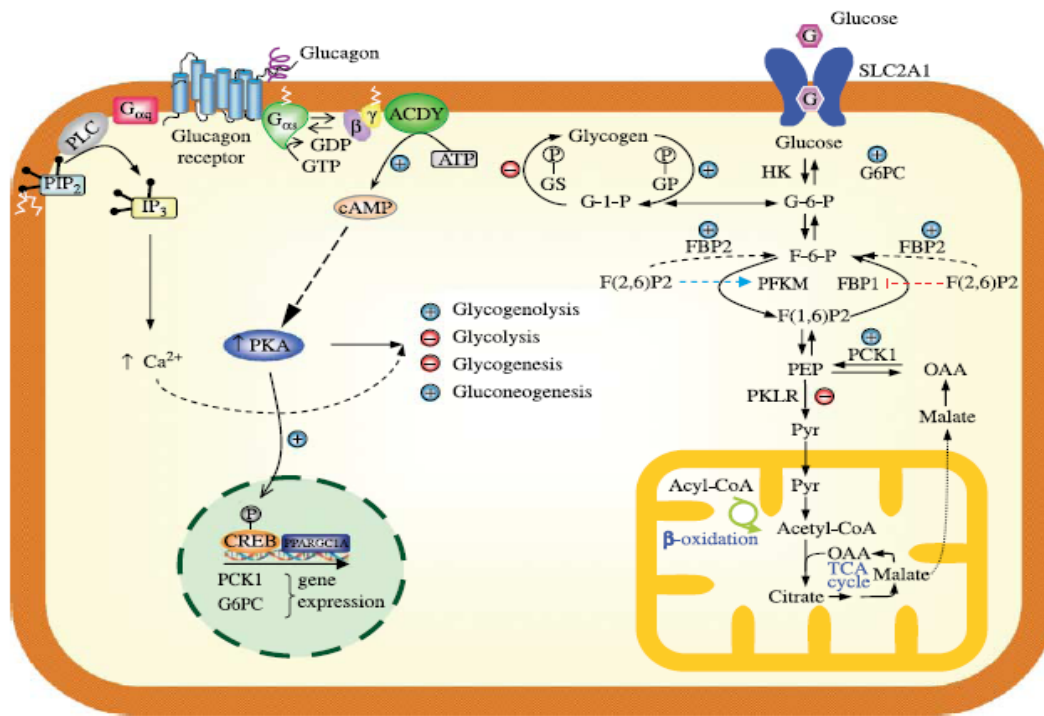
O receptor do glucagon, encontrado principalmente em células de *Kupffer* do fígado, pertence ao grupo IV da família “B” ou II dos sete receptores acoplados à proteína G que atravessa a membrana. Está localizado, em humanos, no cromossomo 17 e apresenta uma quantidade de aproximadamente 200 X 10<sup>3</sup> receptores no fígado. Podem ser de dois tipos: um receptor principal (localizado no fígado com 63 kDa) e um

secundário (33 kDa). Essa família de receptores inclui aqueles para os hormônios glucagon, GLP-1, GLP-2, GIP, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo ativador de adenilil ciclase da pituitária (PACAP), secretina, calcitonina, hormônio paratireóide (PTH) e hormônio liberador do hormônio do crescimento (GH). Uma característica do receptor do glucagon e destes receptores estruturalmente relacionados é seu acoplamento com a proteína G, pois esta se acopla à proteínas G heterotriméricas da ligação de GTP a  $G\alpha_s$  (figura 7), ativando a adenililciclase, que produz AMPc celular e ativa PKA (proteína kinase A) (figura 9). O AMPc é sintetizado a partir da molécula armazenadora de energia ATP (adenosina trifosfato), por uma reação de ciclização, catalisada pela enzima adenilil ciclase, na qual são removidos dois grupos fosfato na forma de pirofosfato. A síntese é impulsionada por uma pirofosfatase que hidrolisa o pirofosfato produzido. O AMPc é instável na célula, pois é hidrolisado por uma fosfodiesterase específica, formando 5'-AMP (HAYASAKI et al., 1998; VARDANEGA-PEICHER et al., 2003; ALBERTS, 2004; QUESADA et al., 2008).

A expressão do receptor de glucagon foi demonstrada em um grande número de tecidos diferentes, incluindo não somente os tecidos-alvo, mas também o rim, coração, pulmão, tecido adiposo, tecido muscular liso do intestino, cérebro, intestino, glândula adrenal, ovário, tireóide, células  $\beta$  e  $\delta$  das ilhotas pancreáticas (e não células  $\alpha$  como esperado) e células linfóides do baço e timo. Porém, apresenta uma modesta afinidade para GLPs. Com base nesses achados, conclui-se que o glucagon tem amplas ações metabólicas sobre as funções de muitos órgãos no corpo. Notavelmente as ações fisiológicas do glucagon podem ser reguladas a partir do nível de expressão dos seus receptores. Em ratos, por exemplo, a expressão do receptor de glucagon no tecido adiposo marrom é regulada para menos após a exposição ao frio, sob o controle do sistema nervoso simpático. A expressão hepática do receptor de glucagon aumenta

progressivamente, do primeiro dia de vida até o estágio adulto em roedores, porém a expressão pode estar aumentada em condições nas quais o metabolismo intra-hepático da glicose está ativado, como durante o jejum ou no diabetes. Os níveis celulares de AMPc aumentados são capazes de regular para menos a expressão dos receptores de glucagon nos hepatócitos e posteriormente sua atividade (ABRAHAMSEN et al, 1995). Assim a regulação, a nível de expressão de receptores de glucagon, indica ser outro processo pelo qual as ações do glucagon são moduladas (QUESADA et al, 2008; HEBEGGER et al., 2010).

O peptídeo glucagon regula a gliconeogênese, controlando enzimas chave (Figura 9) como glicose-6-fosfatase (G6PC) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK2) através de proteínas de resposta como elementos de resposta a ligação (CREB) e proliferação peroxissomal ativada pelo receptor  $\gamma$ -coativador-1 (PPARGC1A) à ativação de AMPc. Outros, como fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK2) e glicose-6-fosfato (G6PC), juntamente com frutose-1,6-fosfatase (FBP1) apresentam um papel chave na gliconeogênese. O PCK2 age como intermediário na conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato enquanto o G6PC regula a produção de glicose a partir de glicose-6-fosfato (G-6-P). FBP1 é responsável pela conversão de frutose-1, 6-bifosfato (F(1,6)P2) em frutose-6-fosfato (F6P). Esta atividade é regulada pelo glucagon, que diminui os níveis intracelulares de frutose-2,6-bifosfato (F(2,6)P2), um inibidor alostérico de FBP1. A via glicolítica é inibida por glucagon quando há níveis de piruvato quinase (PKLR). O metabolismo do glicogênio é principalmente determinado pela atividade do glicogênio sintase (GS) e glicogênio fosforilase (GP). O glucagon é importante para a fosforilação e ativação de GP, porém inibe a função de GS por fosforilação e o converte em uma forma inativa de enzima (QUESADA et al., 2008).



**Figura 7. Papel do glucagon e seu receptor no fígado.** A sinalização do glucagon regula positivamente (+) ou negativamente (-) os múltiplos passos do metabolismo da glicose no fígado. Esta modulação afeta a expressão e/ou a atividade de uma série de enzimas do metabolismo da glicose. ADCY, adenilato ciclase; CREB, elemento de resposta a ligação ao AMPc; F(1,6)P2, frutose-1, 6-bifosfato; F(2,6)P2, frutose-2,6-bifosfato; G-1-P, glicose 1-fosfato; G-6-P, glicose 6-fosfato; G6PC, glicose-6-fosfato; GP, glicogênio fosforilase; GS, glicogênio sintase; IP3, inositol 1,4,5-trifosfato; OAA, oxaloacetato; PC, piruvato carboxilase; PEP, fosfoenolpiruvato; PCK2, fosfoenolpiruvato carboxiquinase; PFKM, fosfofrutoquinase-1; PPARGC1A, proliferação peroxissomal ativado por coativador-1 receptor-  $\gamma$ ; PIP-2, fosfatidilinositol 4 5 bifosfato; PKLR, piruvato quinase; PLC, fosfolipase C; Pyr, piruvato; Linha tracejada vermelha, inibição; Linha tracejada azul, estimulação. Retirada de (QUESADA et al., 2008).

#### 1.2.4 Ações fisiológicas do glucagon

Nos seres humanos, o cérebro necessita de aproximadamente 6 gramas de glicose por hora, apesar de outros órgãos utilizarem 4 gramas por hora no estado de repouso. De forma coletiva, o fígado deve fornecer 10 gramas de glicose para manter os níveis glicêmicos normais. A glicose é o combustível obrigatório usado pelo cérebro, porém o cérebro não pode sintetizar glicose mesmo apresentando depósitos de glicogênio para alguns minutos. Desta forma, a glicose requerida pelo cérebro deve ser fornecida pela circulação sanguínea. A importância da manutenção de níveis adequados

de glicemia resultou na evolução dos hormônios contra regulatórios da insulina, entre os quais o glucagon é crítico, cuja redução de síntese e ação resulta em hipoglicemia (baixa quantidade de glicose no sangue). A insulina e o glucagon são hormônios fisiológicos antagonistas, uma vez que a insulina remove a glicose da circulação, estimulando a captação de glicose no fígado e músculo, e o glucagon estimula a formação e a liberação de glicose para a circulação, particularmente no fígado (HEPPNER et al., 2010) Assim, em contraste direto com a secreção de insulina, a secreção do glucagon está aumentada durante períodos de jejum, e é suprimida por níveis plasmáticos elevados de glicose. As ações contrabalanceadas da insulina e de glucagon mantêm a glicemia em uma faixa relativamente estreita (aproximadamente 120 miligramas por decilitro (mg/dL) durante as refeições e 60 mg/dL durante o jejum (ROHDEN, 2009).

O regulador mais efetivo da secreção do glucagon é a glicose, que suprime a secreção do glucagon. Alguns resíduos de aminoácidos e ácidos graxos podem estimular a secreção de glucagon, como arginina, alanina e glutamina, outros podem inibir as células  $\alpha$ , como isoleucina e ácido palmítico, que atua de forma dose dependente. No entanto, outros apresentam um efeito duplo podendo estimular e inibir em concentrações muito elevadas, como a leucina (QUESADA et al., 2008). A ingestão de gordura por via oral também pode influenciar na secreção de glucagon, porém de forma negativa. Diversos hormônios regulam as funções das células  $\alpha$  e coordenam a secreção do glucagon durante mudanças da disponibilidade de nutrientes. Estes incluem os hormônios gastrointestinais, como GLP-1 e os hormônios de ilhotas pancreáticas insulina e somatostatina. Em condições de estresse metabólico, como a hipoglicemia, hormônios adicionais são liberados, como glicocorticóides e endorfinas, todos os quais aumentam a secreção e ações do glucagon nos tecidos periféricos, para assegurar a manutenção de níveis adequados de glicose no sangue. O estresse glicopênico (níveis



baixos de glicose) também ativa o estímulo neural autonômico parassimpático para as ilhotas, aumentando a secreção de glucagon (HAVEL et al., 1996).

A mais importante ação fisiológica do glucagon ocorre durante os estados pós-absortivo e jejum. Através de suas ações em enzimas-chave, o glucagon induz a gliconeogênese (DAY et al., 2009), cetogênese pelo fígado, a glicogenólise no músculo, para mobilizar a energia armazenada, e, em alguma extensão a lipólise no tecido adiposo.

Em mamíferos, alguns tecidos dependem quase completamente da glicose para suprir sua energia metabólica. A glicose retirada do sangue é a fonte principal, ou mesmo única, de energia para o cérebro humano e demais partes do nosso sistema nervoso (QUESADA et al., 2008), para os eritrócitos, testículos, medula renal e tecidos embrionários. Sozinho o cérebro consome 120 gramas de glicose por dia – mais da metade de toda glicose armazenada como glicogênio no fígado e nos músculos. No entanto, a quantidade de glicose fornecida por esses estoques não é sempre suficiente; entre as refeições e durante períodos de jejum mais longos ou depois de exercícios vigorosos o glicogênio esgota-se. Durante essas ocasiões o organismo necessita de processos de produção da glicose como a glicogenólise, onde o glicogênio é convertido em glicose 6-fosfato, e em processos que utilizam precursores que não são carboidratos, via metabólica chamada de gliconeogênese (criação de açúcar novo), que em mamíferos ocorre principalmente no fígado. Esta via anabólica é um processo ubíquo onde o piruvato ou um composto semelhante com três átomos de carbono (lactato, alanina) é convertido em glicose. Em casos de jejum rigoroso e prolongado, ou *diabetes mellitus* não tratado, ocorre à produção de corpos cetônicos, a cetogênese. Neste caso, observa-se a incapacidade do tecido extra-hepático em capturar glicose de forma eficiente, resultando na produção de acetil-Coa que é processado por intermediários do ciclo do

ácido cítrico na gliconeogênese. Quando uma célula ou organismo apresenta pouca disponibilidade de combustível metabólico para suprimir as necessidades energéticas, ocorre a hidrólise de triacilgliceróis armazenados no fígado, a lipólise. Este processo libera ácido graxo, que será convertido em AMPc principalmente para os músculos e o coração (NELSON & COX, 2006).

No estado de jejum, o fígado é o órgão essencial que fornece o “combustível glicose” para o cérebro. Em seres humanos, o cérebro necessita de 6 gramas de glicose por hora, embora todos os outros tecidos utilizem 4 gramas de glicose por hora no estado de repouso. Coletivamente, o fígado deve fornecer 10 gramas de glicose por hora para manter a euglicemia (níveis normais de glicose). As ações do glucagon no fígado respondem por aproximadamente 75% da produção de glicose em jejum. O combustível adicional é derivado da mobilização dos ácidos graxos do tecido adiposo metabolizado no fígado até corpos cetônicos. Este processo é particularmente importante durante os períodos de estresse ou jejum, pois estas cetonas podem ser usadas pelos tecidos, particularmente o cérebro, para gerar ATP (BORG et al., 1994; BORG et al., 1997). O glucagon é um importante contribuinte para as respostas imediatas de “luta-ou-fugir”. Durante momentos de esforço físico súbito e intenso, um aumento instantâneo no combustível para o músculo esquelético é necessário, sem redução do suprimento de combustível ao cérebro. Os músculos contêm um suprimento restrito de glicogênio e lipídeos, que podem fornecer energia para os músculos por um curto período de tempo. A atividade muscular contínua requer um aumento nos níveis de glicose circulante e ácidos graxos livres. As catecolaminas, que são neurotransmissores, desempenham um papel crítico nessa situação de “lutar-ou-fugir”. As catecolaminas estimulam a secreção de glucagon e diminuem os níveis de insulina durante os períodos de estresse e exercício. O aumento nos níveis de glucagon, estimulado pelo aumento das

catecolaminas, estimula o aumento da gliconeogênese e glicogenólise (no fígado e na gordura, para elevar ainda mais os níveis circulantes de glicose e ácidos graxos livres respectivamente (KAHN et al., 2009).

#### 1.2.5 Metabolismo e degradação

O glucagon é eliminado relativamente rápido da circulação, com uma meia-vida de cinco a dez minutos (GEETHING et al., 2010). Ambos, rim e o fígado, removem o glucagon da circulação respondendo por 30 e 20% da eliminação, respectivamente. Notavelmente, os 50% restantes do glucagon são eliminados da circulação sanguínea por enzimas, incluindo serina e cisteína proteases, catepsina B e primariamente DPP-IV, que cliva o glucagon em fragmentos proteolíticos (KAHN et al., 2009). Nem todas as clivagens do glucagon estão em sua via de eliminação. A clivagem após as argininas 17 e 18 por uma endopeptidase isolada de membrana de fígado de rato resulta na formação de um subtipo de glucagon com 19-29 resíduos de aminoácidos, o assim chamado *miniglucagon* (MALLAT et al., 1987). Descobriu-se que o *miniglucagon* é um ativador altamente potente dos canais de  $Ca^{2+}$  nas células do coração e do fígado. Nas células cardíacas estimula o acúmulo de  $Ca^{2+}$  nos depósitos reticulares sarcoplasmáticos, que são alvos da liberação de  $Ca^{2+}$  por glucagon. Ao contrário do glucagon, o *miniglucagon* não ativa a adenilciclase. As ações independentes de AMPc do *miniglucagon* nas células cardíacas são mediadas pela liberação do ácido araquidônico, que age sinergicamente com a formação de AMPc induzida por glucagon para desencadear respostas inotrópicas (frequência cardíaca). Também há evidências de que o *miniglucagon* pode inibir a secreção de insulina induzida pela glicose das células  $\beta$  em níveis picomolares. Os papéis fisiológicos de outros peptídeos truncados da família do

glucagon com potencial biológico permanecem a ser elucidados (GROMADA et al., 2007).

#### 1.2.6. Relevâncias do glucagon nas patologias humanas e suas aplicações

Existem várias patologias associadas tanto ao aumento quanto à diminuição de níveis de glucagon. Níveis excessivos de glucagon no sangue são encontrados em casos raros de desenvolvimento de neoplasias das células  $\alpha$  do pâncreas (glucagonomas). Acredita-se que os glucagonomas se originem de células progenitoras das ilhotas nos dutos pancreáticos e que 80% são malignos com uma alta frequência de metástase no fígado. O tratamento de maior eficácia é a remoção cirúrgica do tumor do pâncreas antes que ocorra metástase (MALLISON et al., 1974; KAHN et al., 2009).

A deficiência de glucagon é ocasionalmente uma consequência de lesões extensas do pâncreas, causada por uma doença inflamatória ou por neoplasia, uma vez que a deficiência hormonal pode ocorrer nestas circunstâncias. Exemplos de deficiências hereditárias de células  $\alpha$  (no caso do glucagon) são extremamente raros. Alguns casos de deficiência isolada de glucagon descrevem indivíduos que manifestam hipoglicemia severa. Outros relatos descrevem hipoglicemia recorrente e glucagon plasmático indetectável por radioimunoensaio (KAHN et al., 2009).

Acredita-se que a doença *diabetes mellitus* é uma doença que apresenta uma deficiência na secreção de dois hormônios: insulina e glucagon. O primeiro encontra-se em níveis extremamente baixos ou não é secretado e o segundo apresenta uma secreção alta. Esta alteração gera uma hiperglicemia nos indivíduos diabéticos. A inibição das ações do glucagon no diabetes é uma abordagem racional para reduzir a glicose no sangue. Esta inibição poderia ser obtida neutralizando os níveis de glucagon ou ainda

antagonizando, ou seja, utilizando um antagonista no receptor de glucagon às ações deste no fígado (QUESADA et al., 2008; RORSMAN et al., 2011).

O glucagon é usado principalmente em: prontos socorros para uso terapêutico no tratamento agudo da hipoglicemia (em adultos, crianças, grávidas), consumo excessivo de álcool, medicamentos, jejum, exercícios, diurético, broncodilatador, redução do nível de lipídeos de colesterol do sangue (FARINAS, 2001), dor no trato biliar, obstrução esofágica, anafilaxia para casos de bradiarritimias sintomáticas secundárias à overdose de betabloqueador ou bloqueador dos canais de cálcio (HO & GILBALDI, 2003; LOPES, 2011). Além disso, pode ser utilizado em diagnósticos, como em procedimentos radiológicos gastrointestinais, testes de estímulo ao hormônio do crescimento e diagnóstico de insulinoma (tumor pancreático) (MICMACHER, 2009; SECCO, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2010; AGARWAL et al., 2012).

### 1.3 Medicamentos especializados

O acesso a medicamentos é fundamental para garantir o direito constitucional à saúde individual. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial não apresenta acesso regular a medicamentos essenciais (NWOBIKE, 2006; BLATT et al., 2012). No Brasil, o Ministério da Saúde, através do Sistema Único de Saúde (SUS), disponibiliza a aquisição de medicamentos para a população. Estes medicamentos, de acordo com a portaria GM/MS nº 2.891 de 26 de Novembro de 2009, estão classificados em três categorias: componentes básicos da assistência farmacêutica, componentes estratégicos da assistência farmacêutica e componentes especializados, que antes da portaria GM/MS 2.891 de 2009 era denominado como medicamentos excepcionais da assistência farmacêutica (VIEIRA,

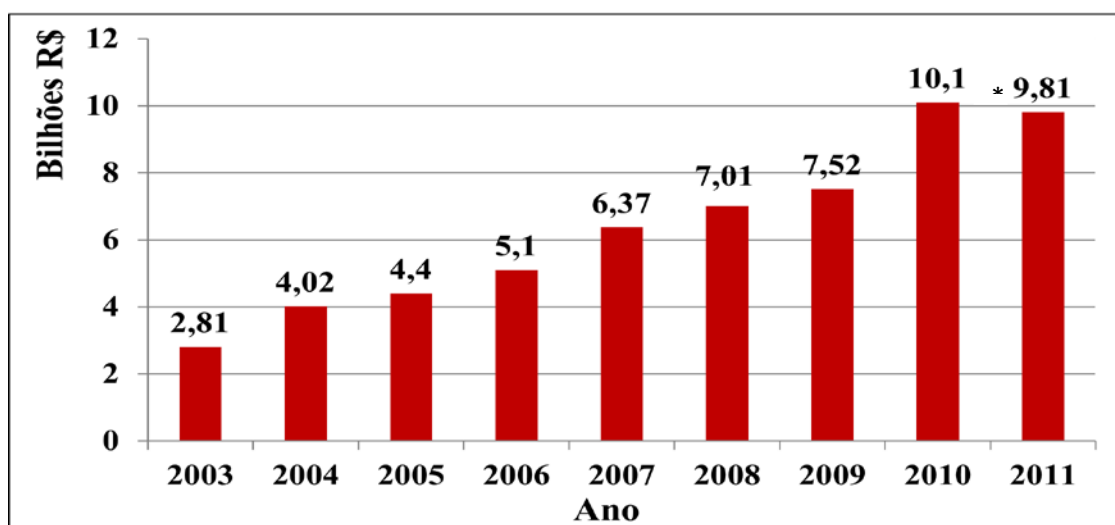
2010; PÚBLIO, 2011). Estes medicamentos foram inicialmente aprovados como parte da Política Nacional de Assistência Farmacêutica do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Dentre as categorias, os medicamentos especializados se destacam, pois são fármacos cujo valor é extremamente elevado impossibilitando a aquisição do paciente de forma privada, principalmente da população de baixa renda. Para solucionar este problema o Governo Federal criou, em 1993, o Programa de Medicamentos Especializados. Além de fornecer medicamentos de alto custo, o programa inclui a disponibilização de fármacos usados no tratamento de doenças crônicas. O programa naquele ano oferecia 15 medicamentos em 31 apresentações farmacêuticas (CARIAS et al., 2011). Atualmente a lista apresenta 150 itens sob 310 apresentações, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012) atendendo a uma demanda de milhares de usuários para diversas patologias, incluindo insuficiência renal crônica, hepatites virais, doença de Alzheimer, síndrome da imunodeficiência adquirida- SIDA, esclerose múltipla, diabetes, dentre outras.

O glucagon foi incluído na lista de medicamentos especializados na Portaria 978 do Ministério da Saúde de 16 de Maio de 2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Em 2011, o peptídeo glucagon passou a fazer parte da lista de medicamentos essenciais pela OMS (WHO, 2012). Grande parte dos fármacos pertencentes à lista de medicamentos é importada de outros países, gerando uma grande despesa para o governo brasileiro. Estes processos de obtenção de biofármacos foram patenteados por empresas de biotecnologia em diversos países, visto que seu processo de produção agrega elevado valor comercial. Assim, a importação destes medicamentos pelo Brasil gera elevados custos ao Governo Federal.

Entretanto, o país não é único atingido com o aumento contínuo de gastos relacionados a medicamentos. Uma estimativa internacional apresentada pelo Fórum Global para a Pesquisa em Saúde, em 2006, indicou que a saúde respondeu por 20% da despesa mundial de setores públicos e privados, cujas atividades de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico claramente indicaram uma das áreas mais dinâmicas do mundo (ÍNTEGRA BRASIL, 2011). A evolução de gastos com medicamentos em geral (Gráfico 1) e especializados (Tabela 1) no Brasil demonstra o nível crescente e alarmante de gastos com a aquisição de medicamentos ao longo dos anos (GADELHA, 2011). Em 2007, um estudo brasileiro constatou divergências nos gastos entre serviços e outros materiais relacionados à saúde (9,6%) e medicamentos (123,9%) no período de 2002 a 2007 (VIEIRA, 2009). Aumento nos gastos com medicamentos também ocorreu em outras regiões do mundo, como Reino Unido e Canadá, cujos valores gastos aumentaram de 10% e 6% respectivamente (VIEIRA, 2009). Nos Estados Unidos estima-se que gastos referentes a medicamentos aumentarão, de US\$ 184 bilhões, gastos em 2003, para US\$ 519 bilhões em 2013 (CARIAS et al., 2011).

**Gráfico 1.** Gastos do Ministério da Saúde com medicamentos. Período 2003 - 2011.



Fonte: GADELHA. **Evolução dos gastos com medicamentos.** A perspectiva do complexo industrial da saúde: o desenvolvimento industrial e científico do setor e rumos para a assistência farmacêutica. \* Dado de 2011 até mês de abril. [http://www.interfarma.org.br/site2/images/carlos\\_gadella.pdf](http://www.interfarma.org.br/site2/images/carlos_gadella.pdf), 2011. Com alterações.

**Tabela 1.** Gastos de medicamentos diretos e insumos. Período 2006 - 2011.

<b>Ano</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>
<b>Estratégicos</b>	690.000.000	721.050.000	125.576.948	133.981.559	150.000.000	162.000.000
<b>Básico</b>	290.000.000	316.910.000	893.000.000	955.000.000	1.030.000.000	1.060.000.000
<b>Excepcional</b>	1.355.000.000	1.956.332.706	2.307.984.000	2.645.200.000	3.277.486.000	3.052.496.999
<b>Aids</b>	960.000.000	984.000.000	1.013.000.000	1.084.000.000	608.100.000	846.720.000
<b>Coagulopatias</b>	244.000.000	280.000.000	300.000.000	256.745.384	326.295.569	412.565.000
<b>Farmácia Popular</b>	23.150.000	134.000.000	344.135.299	358.044.223	348.550.000	470.550.000
<b>Imunobiológicos (soros + vacinas)</b>	478.709.206	832.726.581	799.596.829	807.572.177	2.504.593.639	1.500.000.000
<b>Oncológicos</b>	370.000.000	400.000.000	450.000.000	500.000.000	1.000.000.000	1.300.000.000
<b>Estados e Municípios</b>	684.500.000	744.633.270	779.798.400	781.000.000	859.100.1000	1.000.000.000
<b>TOTAL (R\$)</b>	<b>5.095.359.206</b>	<b>6.369.652.557</b>	<b>7.013.091.476</b>	<b>7.521.543.343</b>	<b>10.104.125.208</b>	<b>9.804.331.999</b>

Fonte: GADELHA. **Evolução dos gastos com medicamentos.** A perspectiva do complexo industrial da saúde: o desenvolvimento industrial e científico do setor e rumos para a assistência farmacêutica. [http://www.interfarma.org.br/site2/imagens/carlos\\_gadelha.pdf](http://www.interfarma.org.br/site2/imagens/carlos_gadelha.pdf), 2011. Com alterações.

De acordo com o SUS, em 2008 foram gastos R\$2,3 bilhões de reais com medicamentos especializados, um valor quatro vezes maior se comparado desde o ano de 2003 (VALADARES, 2009). Dentre as regiões que mais utilizam recursos destinados a medicamentos especializados, a região Sudeste lidera, com gastos de 891 milhões de reais somente no ano de 2007 (Tabela 2) (CARIAS et al., 2011).

**Tabela 2.** Gastos anuais do ministério da saúde com medicamentos do programa de medicamentos de dispensação em caráter excepcional. Brasil, 2000 - 2007.

<b>Ano</b>	<b>Sul</b>	<b>Sudeste</b>	<b>Centro-Oeste</b>	<b>Norte</b>	<b>Nordeste</b>
2000	104.817.692,56	410.741.526,05	47.552.221,78	14.046.757,45	107.817.206,59
2001	120.528.803,29	457.251.347,51	54.956.538,57	17.011.299,85	127.869.285,73
2002	93.869.543,33	394.142.302,29	45.935.763,14	14.115.272,52	103.779.724,36
2003	111.273.242,24	479.256.021,31	59.860.324,08	25.267.937,59	121.832.684,46
2004	133.560.804,03	671.807.424,06	81.788.890,67	35.673.551,61	161.829.346,32
2005	179.506.051,30	843.959.392,99	99.479.041,48	32.028.264,33	188.280.266,51
2006	208.243.302,91	859.757.646,44	93.962.595,88	34.321.184,78	210.152.270,29
2007	188.087.361,95	891.405.156,62	94.663.474,38	27.606.463,81	208.419.143,98

Nota: Valores deflacionados pelo Índice Geral de Preços – “Disponibilidade interna” da Fundação Getúlio Vargas. Fonte: CARIAS et al., P. et al. Medicamentos de dispensação excepcional: histórico e gastos do Ministério da Saúde do Brasil. **Rev Saúde Pública.** V. 45, n. 2. p.233-240.2011.



Em 2009, o Governo gastou com medicamentos especializados R\$ 2,6 bilhões de reais. E em 2010, o custo total alcançou mais R\$ 3,2 bilhões de reais. Somente até o mês de abril do ano de 2011 o valor gasto com especializados já alcançava o mesmo patamar do ano anterior, com R\$ 3 bilhões de reais (GADELHA, 2011).

A dependência brasileira reflete diretamente na balança comercial e na saúde pública. Muitos avanços foram obtidos nos últimos anos, como o desenvolvimento da cadeia de produtos para a saúde. O Governo está direcionando esforços para apoiar e criar produtos que levem a agregação de valor e densidade tecnológica às exportações brasileiras. A partir da Lei de Inovação Tecnológica nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004, o desenvolvimento de produtos e processos inovadores pelas empresas brasileiras ganharam destaque, com grande impacto sobre a competitividade do país, o que é considerado um grande avanço (ÍNTEGRA BRASIL, 2011). O Governo brasileiro atualmente investe em empresas que possuem a tecnologia da produção de medicamentos, apostando no caráter estratégico da biotecnologia e na possível diminuição do déficit da balança comercial de medicamentos (PIMENTA, 2008). O país se tornou um grande importador de biofármacos e a produção destes reduziria gastos, a dependência externa e supriria parte da demanda interna.

#### 1.4 Patentes expiradas e biofármacos

A necessidade de produzir proteínas com atividade terapêutica em larga escala surgiu na segunda guerra mundial, quando houve uma grande procura por proteínas derivadas do sangue (WALLS et al., 2011). O termo biofármaco se refere às proteínas recombinantes terapêuticas (FERRO, 2010) produzidas através da biotecnologia. A importância dos biofármacos é irrefutável, porém muitas proteínas com atividade terapêutica eram purificadas a partir de fontes animais, acarretando em riscos potenciais

alergênicos para a saúde. O primeiro biofármaco produzido, a insulina, foi obtido através da purificação do pâncreas de animais (FERRO, 2010). Atualmente os biofármacos são produzidos através de técnicas envolvendo a biotecnologia, o que resulta em proteínas mais seguras e eficazes.

Recentemente, alguns destes biofármacos apresentam patentes expiradas (AZEVEDO, 2010). O medicamento líder (Lípitor® – Pfizer) em vendas no mundo, que atingiu no ano de 2009 US\$ 13 bilhões de dólares, teve sua patente expirada em 2011 (BARREIRO & PINTO, 2010). Com o acúmulo de patentes expiradas para medicamentos, o desenvolvimento de uma segunda geração de produtos, denominados biossimilares (medicamentos semelhantes) (NIEDERWIESER & SCHMITSZ, 2011) e genéricos (medicamentos idênticos, porém identificados com o nome do princípio ativo) estão em amplo desenvolvimento (UTZIG et al., 2010).

De acordo com a legislação europeia (2004/27/EC), os biossimilares são distintos dos genéricos pelo tamanho, complexidade e estabilidade, devendo ser avaliados individualmente através de ensaios pré-clínicos, clínicos, incluindo a avaliação farmacovigilância. Entre 2005 e 2006, autoridades regulatórias do comitê de produtos médicos humanos da EMEA publicaram um guia específico para os biossimilares, cujo foco é avaliar a segurança e eficácia destes fármacos (ALMEIDA et al., 2011).

A extensão pela qual os medicamentos biossimilares e genéricos substituem os medicamentos de marcas originais, além do preço, varia em cada país (ROSENBERG et al., 2010). No Brasil, as patentes de medicamentos estão sob o regime do Código de Propriedade Intelectual - CPI/96, que introduziu as patentes *pipeline* ou patente de revalidação, destinado a corrigir a falta de patentes para processos e produtos químicos, farmacêuticos e alimentares na legislação anterior (art. 230 e 231 da Lei 9.279/96)

(BARBOSA, 2006). Os medicamentos genéricos entraram no mercado através da Lei dos Genéricos (9.787/99), em que se estabeleceu que o valor destes medicamentos seria 40% menor comparado aos originais. Atualmente, 14% dos medicamentos vendidos nos países são genéricos (BLATT et al, 2012). Qualquer empresa farmacêutica pode produzir, distribuir e comercializar medicamentos desde que esteja de acordo com as normas da ANVISA (BARREIRO & PINTO, 2010). A ANVISA criou em dezembro de 2010, através da RDC nº55, normas para o registro de medicamentos similares usando a comparabilidade a outros medicamentos biológicos similares (ANVISA, 2010a). Em 2005, a Agência de Medicina Européia (EMEA) também emitiu uma série de esboços no marco da lei estabelecida pela União Européia que instituem os padrões científicos para assistir aos laboratórios no processo de aprovação de biossimilares (EMEA, 2005).

O surgimento da doença de *Creutzfeldt-Jacob* (desordem cerebral degenerativa) em pacientes que receberam hormônio de crescimento da hipófise de cadáveres estimulou a pesquisa e o desenvolvimento de um hormônio recombinante. O Hormônio de crescimento somatotropina, conhecido como Omnitrope® (Sandoz Biopharmaceuticals), foi o primeiro biossimilar a ser liberado para uso pelas agências reguladoras da Europa, em abril de 2006 (VANZ, 2008). Porém, alguns biossimilares causaram efeitos adversos, como a geração de anticorpos contra o próprio medicamento, em muitos pacientes, tais como insulinas, anti-TNF (Fator de necrose tumoral), fator VIII recombinante e eritropoietina, o caso mais conhecido na literatura. Apesar de o hormônio proteico recombinante apresentar similaridade ao hormônio endógeno, três indivíduos apresentaram anticorpos contra a proteína endógena e exógena, resultando na perda da tolerância do sistema imunológico (THORPE & SWANSON, 2005; LEE et al., 2010). Porém, ressaltando os problemas mencionados, a literatura não indica quais efeitos adversos relacionados à biossimilares são maiores do que medicamentos

tradicionais. Desta forma, discutir sobre a interação de cada biossimilar e seus efeitos, seria uma alternativa viável para a questão, uma vez que a avaliação de novos fármacos também é feita “caso a caso” (CALDERON & ESCALANTE, 2010; DECLERCK, 2012). Um processo de aprovação, que requer a comprovação de dados adicionais comparados a genéricos, é exigido pelas autoridades regulatórias (AZEVEDO, 2010).

Atualmente, mais de 350 medicamentos elaborados utilizando o uso da biotecnologia, estão em fase de aprovação para o tratamento de mais de 100 doenças, entre as quais se encontram desordens autoimunes, doenças infecciosas e câncer (FERRO, 2010). Os biofármacos mais importantes dos últimos anos estão demonstrados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Medicamentos mais importantes da atualidade

<b>Medicamento</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Hormônios</b>	Diabetes, Primeiros Socorros
Fatores de Crescimento Hematopoiéticos	Anemias
Interferons	Leucemias, Esclerose Múltipla, Hepatite C
Anticorpos Monoclonais	Várias doenças
Vacinas	Prevenção de doenças (Dengue, Tuberculose)
Outros (Enzimas Terapêuticas, Fatores de Necrose Tumoral)	Doenças Autoimunes, Artrite Reumatóide

Fonte: FERRO, E.S. **Biotecnologia Translacional: Hemopressina e Outros Peptídeos Intracelulares**. Estudos Avançados. v.24, n.70, p. 109-121. 2010. Com Adaptações.

No Brasil, o Governo criou a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, através decreto 6.041, de 8 de Fevereiro de 2007, incentivando empresas brasileiras a produzir biossimilares, obtendo assim a produção para a redução de custos e fortalecimento da bioindústria brasileira (ÍNTEGRA BRASIL, 2011).

Desta forma, a produção de biossimilares e biofármacos por uma empresa de biotecnologia brasileira é de extrema importância, uma vez que estabelecerá uma alternativa aos medicamentos importados de alto custo.

## 1.5 Patentes em *pipeline* e medicamentos

No âmbito das pesquisas e desenvolvimento de fármacos, a principal forma de garantir a exclusividade da criação é através das patentes farmacêuticas e propriedades industriais. O termo patente mantém a prevenção temporária para que outros competidores não haja plágio ou venda do produto a um preço inferior ao original. Isso permite que a invenção ou a criação industrializável se torne um investimento rentável (INPI, 2011a).

Em 19 de março de 1474, foi promulgada, em Veneza, a primeira lei de patentes, que surgiu da necessidade de relações comerciais mais estreitas entre as cidades, estados e reinos medievais. No Brasil, a primeira patente concedida ocorreu em 1752, para uma máquina que apresentava a capacidade de descascar arroz. Porém, a primeira lei de patentes brasileira só viria a ser promulgada seis décadas depois, com o alvará do príncipe regente, D. João VI, em 28 de abril de 1809. Após a primeira patente brasileira, uma série de novas leis e decretos ocorreu ao longo dos anos, com o intuito de aprimorar ou revogar alguns benefícios (FILHO, 2006). Dentre elas, em 1971 foi criada, através da lei número 5.648 uma autarquia federal vinculada ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior; o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI. O objetivo do Instituto é o registro de marcas, programas de computador, desenhos industriais, indicações geográficas, topografias de circuitos integrados e a concessão de patentes (INPI, 2011a).

A lei número 9.279, de 14 de maio de 1996, buscou atender às exigências do Acordo Sobre Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio e introduziu as patentes em *pipeline*. Este mecanismo permitiu a solicitação de patentes relativas a processos e às substâncias, matérias ou produtos químicos e farmacêuticos, para assim gerar uma proteção garantida no exterior ou nacionalmente,

sendo que estes não estejam à venda em nenhum outro mercado mundial (FILHO, 2006). As patentes em *pipeline* visa trazer diretamente ao sistema jurídico brasileiro as patentes solicitadas no exterior ou no Brasil (BARBOSA, 2006).

Após o pedido de patente *pipeline* e a análise e permissão do INPI, a mesma é concedida. No caso de um produto estrangeiro, a patente é concedida tal qual está no país de origem, desde que comprovada a concessão da patente onde foi depositada. A vigência da patente destes produtos no Brasil inicia-se na data de depósito da patente do país de origem até o prazo de vinte anos, prazo concedido a patentes nacionais (BARBOSA, 2006).

Exemplos de medicamentos que se beneficiaram com a lei de patentes em *pipeline* são comuns. O medicamento Viracept®, produzido pela empresa Roche, utilizou a lei de *pipeline* para garantir a patente do medicamento em 7 de março de 1997 no Brasil, sendo que a patente depositada no país de origem, Estados Unidos, ocorreu em 1993 (FILHO, 2006). É comum observar fármacos que também se beneficiaram dos *pipelines* e que perderam suas patentes recentemente. Caso da patente do medicamento Viagra® (Pfizer), que permaneceu doze anos no mercado brasileiro foi revogada em 2010 pelo Superior Tribunal de Justiça. Atualmente com um preço 60% inferior, o medicamento é produzido de forma genérica pela empresa EMS (MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO PARANÁ, 2010).

O direito à saúde conduz à necessidade e direito do acesso a medicamentos. Porém, atualmente fármacos essenciais não estão ao alcance da população, principalmente devido ao preço elevado. Desta forma, a importância em estabelecer uma discussão sobre o impacto das patentes farmacêuticas para países em desenvolvimento, como o Brasil, é fundamental (SPAREMBERGER, 2010).

## 1.6 Biofármaco glucagon

Em 2010, um dos maiores alvos para produção de drogas terapêuticas estava relacionada ao grupo de receptores ligados a proteínas G, onde o peptídeo glucagon se encontra. Naquele ano 40% de todas as prescrições médicas feitas para pacientes envolvia proteínas terapêuticas deste grupo (TITTMANN, et al., 2010).

O biofármaco glucagon foi patenteado pela primeira vez pela empresa NovoNordisk em 1989 (patente nº4,826,763) na Dinamarca, Suíça e países baixos. Em seguida, um novo pedido foi feito em 1993 (FILHO, 2006), uma prática conhecida como *evergreening*. Esta prática de extensão e legalidade de patentes atualmente é bastante questionada por alguns autores, por não atender ao requisito de novidade previsto em lei. Porém, outros países afirmam que um novo processo de produção ou aplicação garante a validade da patente. Os laboratórios farmacêuticos afirmam que estas inovações são necessárias e importantes, agregando melhorias aos produtos anteriores (LOURENÇO, 2010). Em 1994, a empresa Eli Lilly patenteou, nos Estado Unidos, outra metodologia de produção, descrita a seguir (CHEN, 1996).

A agência Food and Drug Administration – FDA autorizou, em 1998, a comercialização de glucagon. Posteriormente, Canadá e Reino Unido autorizaram a comercialização do mesmo (AGARWAL et al., 2012). De acordo com a OMS, atualmente 19 países produzem o peptídeo glucagon, tanto medicamentos biossimilares quanto originais (Tabela 4).

**Tabela 4. Países produtores do peptídeo glucagon e respectivos preços.**

Produto	Quantidade	Pacote	País	Empresa	Preço
Glucagen	1 mg	-	Austrália	-	33 AUD
Glucagen Hypokit	1 mg	1 unidade	Áustria	-	27,88 euro
Glucagen Hypokit	1 mg	1 unidade	Tchecoslováquia	-	22,44 euro
GlucaGen	1 mg	1 unidade	Dinamarca	Novonordisk	28,73 euro
Glucagen	1 mg	10 unidades	Dinamarca	Novonordisk	218,76 euro
Glucagen	1 mg	1 unidade	Finlândia	-	28,90 euro
Glucagen	1 mg	10 unidades	Finlândia	-	205,90 euro
Glucagen Kit	1 mg	Cloridrato	França	-	19,07 euro
Glucagen Hypokit	1 mg	1 unidade	Hungria	-	19,76 euro
Glucagen Hypokit	1 mg	1 unidade	Irlanda	-	22,58 euro
Glucagen Hypokit	1 mg	1 unidade	Letônia	-	22,63 euro
Glucagen Hypokit	1 mg	-	Lituânia	-	24,72 euro
Glucagon	1 mg	1 unidade	Noruega	Novonordisk	23,08 euro
Glucagon	1 mg	10 unidades	Noruega	Novonordisk	15,59 euro
Glucagen Hypokit	1 mg	1 unidade	Polônia	-	15,91 euro
Glucagen Hypokit	1 mg	1 unidade	Eslováquia	-	27,37 euro
Glucagen Hypokit	1 mg	1 unidade	Eslovênia	-	20,78 euro
Glucagon	1 mg	1 unidade	África do Sul	-	-
Glucagon	1 mg	1 unidade	Barbados	-	-

Fonte: AGARWAL, D. R. et al. **Application to add glucagon to the model list of essential medicines.** Medicamentos biossimilares e originais produzidos em 19 países. Disponível em: <[http://www.who.int/selection\\_medicines/committees/expert/18/applications/Glucagon/en/](http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/applications/Glucagon/en/)> Acesso em: 19 de fev de 2012. Com adaptações.



A produção do mesmo pode ocorrer através da expressão em células de leveduras (*Saccaromyces cerevisiae*), sendo denominado comercialmente GlucaGen®, injetável, 1 miligrama (mg), (NovoNordisk) (Figura 8) ou em procariotos (*E. coli*), denominada Glucagon®, injetável, 1mg, (Eli Lilly Laboratories) (Figura 9). As proteínas terapêuticas são moléculas mais complexas do que drogas tradicionais quimicamente produzidas, por exigir uma produção elaborada e apresentar propriedades altamente dependentes do processo utilizado, caso do peptídeo glucagon. Assim, se torna um produto de valor elevado, no qual está embutido um processo tecnológico de produção oneroso.

Os pacientes que necessitam do uso contínuo de glucagon não conseguem comprar o fármaco de forma privada, pois uma única unidade do fármaco custa em média R\$ 160,00 reais. Através do Programa de Medicamentos Especializados, o governo brasileiro distribui a usuários cadastrados o medicamento Glucagen® da empresa Novartis. O governo do Distrito Federal não apresenta o fármaco em estoque. Afirma haver processo de aquisição em andamento, porém sem previsão para distribuição apesar da demanda (Anexo 1).



**Figura 8. Biofármaco GlucaGen® (Novartis)**  
Retirado de  
(Fonte:<http://www.walterminicucci.com.br/glucagon-glucagen/>).



**Figura 9. Biofármaco Glucagon® (Eli Lilly)**  
Retirado de (Fonte:  
[http://diabetes.wikia.com/wiki/Glucagon\\_rescue](http://diabetes.wikia.com/wiki/Glucagon_rescue)).

O mercado de medicamentos nos planos privados de saúde no Brasil é pouco desenvolvida ou praticamente inexistente. A cobertura do fornecimento de medicamentos especializados pelos planos privados para uso domiciliar não ocorre (PUBLIO, 2011). E a regulamentação e a distribuição pelo Governo Federal não significa a obtenção do mesmo, gerando a falta do medicamento na rede pública por grandes períodos. Vários estados apresentam este problema, como por exemplo, o estado do Rio de Janeiro, que em 2008 não distribuiu medicamentos necessários, dentre eles glucagon, apesar de apresentação de mandado judicial (PAUTA DO DIA, 2011). Nestes casos, o usuário crônico recorre à justiça para obter o fármaco, uma vez que necessita do uso contínuo e ininterrupto. Uma pesquisa feita em 2009 constatou que o biofármaco glucagon (Tabela 5) está na lista dos medicamentos que mais geraram processos no estado de São Paulo (CHIEFFI & BARATA, 2009).

**Tabela 5** Classificação dos medicamentos que geraram mais de 30 processos, princípio ativo em grupos.

<b>Características</b>	<b>Medicamentos</b>
Insulinas fornecidas nas unidades básicas de saúde	Insulina Humana NPH, Insulina Regular
Medicamentos não disponíveis para venda no mercado nacional em 2006 (oncológicos)	Bevacizumabe, Cetuximabe, Erlotinibe
Insulinas Especiais	Insulina Aspart, Insulina Glagirna, Insulina Lispro
Medicamentos de Dispensação Excepcional	Sinvastatina 10mg, Levotiroxina Sódica 100 mcg
Medicamentos oncológicos	Anastrozol, Imatinibe 100mg, Rituximabe, Temozolomida
Medicamentos Imunobiológicos	Adalimumabe, Etanercepte
Outros medicamentos	Aripiprazol 15mg, Enalapril, Glucagon, Losartana Potássica 50mg, Metformina, Omeprazol 20mg, Palivizumabe, Teriparitida, Timolol, Brometo de Tiotrópio

Fonte: CHIEFFI, A.L. & BARATA, R.B. **Judicialização da política pública de assistência farmacêutica e equidade.** Caderno de Saúde Pública. v. 25, n.8, p.1839-1849, Ago, 2009.

A escassez ou impossibilidade em adquirir medicamentos onerosos, também estimulam a falsificação dos mesmos. Na última década significativas apreensões foram realizadas pela ANVISA, onde medicamentos para tratamento de impotência sexual e anabolizantes foram os mais apreendidos. Nos Estados Unidos, a venda de medicamentos falsificados gerou \$75 bilhões de dólares, um aumento de 92% quando comparado a 2005. De acordo com OMS, os principais motivos para a falsificação são legislação inadequada, maior demanda do que oferta, preços elevados, dentre outros (AMES & SOUZA, 2012).

O medicamento Glucagen® apresentava sua patente *pipeline* válida até o ano de 2006. Porém em 2010, a extensão da patente foi solicitada à justiça brasileira, através do processo sob o número de propriedade intelectual - PI 1100238-7. Neste processo a extensão da patente foi solicitada até o ano de 2013, período em que a patente original depositada na Dinamarca e demais países completará 20 anos.

A segunda turma do Tribunal Regional Federal e a trigésima sétima turma da Justiça Federal do Estado do Rio de Janeiro aprovaram a extensão da patente, porém a trigésima sétima turma do Supremo Tribunal de Justiça e o Supremo Tribunal Federal ainda não havia manifestado seus pareceres (INPI, 2010b). Consultando o número do processo (2009/0060475-1)(INPI, 2010b), foi descoberto que o processo encontra-se suspenso, o que permite atualmente a validade da patente no Brasil.

No entanto, muitos tribunais revogaram pedidos de extensão de patentes, através da licença compulsória (artigos 68 a 74, lei nº9.279/96). Esta lei é uma autorização concedida que resulta na suspensão temporária no direito de exclusividade da patente, e acarreta na perda do direito de impedir que terceiros produzam, vendam ou importem o produto objeto da patente (AZOLINO, 2009). Vários fármacos atualmente se encontram nesta situação, inclusive com a quebra de patente de forma definitiva; como o caso dos

medicamentos Lipitor® e Viagra® (Pfizer) que perderam suas patentes no Brasil em 2010 (ESTADÃO, 2010). Em outros casos a própria agência reguladora ANVISA, pediu a autorização para liberação da comercialização de um produto genérico que seria mais vantajoso do que o medicamento original, caso do medicamento Lexapro® (Lundbeck) (PORTAL DE EDUCAÇÃO, 2011). Desta forma o medicamento Glucagen® poderia perder sua patente, uma vez que a patente *pipeline* está próxima do prazo limite de prorrogação.

Assim, o desenvolvimento de um processo de produção do peptídeo glucagon seria de grande interesse para o Brasil, pois diminuiria o gasto com importações, atenderia a demanda interna e fortaleceria a bioindústria.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é expressar, purificar e testar a atividade biológica do peptídeo glucagon produzido em *Escherichia coli*, visando o desenvolvimento de um processo de produção de um biossimilar nacionalmente.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Subclonar o gene glucagon no vetor de expressão *pGEX-4T-3* com sucesso, avaliando e substituindo a presença de códons raros;
2. Expressar o peptídeo glucagon avaliando tempo, concentração de indutor e temperatura ideal para o processo;
3. Purificar o peptídeo glucagon em níveis de pureza acima de 95%, exigido pelos órgãos regulamentares;
4. Avaliar a atividade biológica do peptídeo glucagon *in vivo*;
5. Estimar a viabilidade do custo de produção, em níveis de bancada;
6. Comparar a síntese do peptídeo glucagon e a produção em sistema heterólogo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Estratégia para a clonagem do gene glucagon

A sequência contendo 128 pares de base (pb) do gene glucagon foi obtida através de um vetor sintetizado anteriormente no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF, utilizando a sequência de glucagon humano depositada no banco de dados (GenBank GI:30582464). Para amplificar o gene de interesse, visando clonagem no vetor de *E.coli* foram desenhados oligonucleotídeos ou *primers* (*Integrated DNA Technologies*) adicionando-se ao *primer Forward* (GGGGGTCGACGATTACAAAGATGATGATG) o sítio de restrição *Sall* e ao *primer Reverse* (TTTTGCGGCCGCTCAGGTGTTTCATCAGCCAC) o sítio de restrição *NotI*, regiões de ligação ao vetor de expressão *pGEX-4T-3* (GE). Por último, a sequência codificante do *tag* FLAG também foi adicionado aos *primers* para produzir uma sequência alvo de clivagem da enzima enteroquinase, visando liberar a proteína da fusão ao GST (Glutathione S-Transferase), usado para a purificação, gerando então um *amplicon Sall-FLAG-GLUCAGON-NotI*.

A reação em cadeia polimerase (PCR) foi feita utilizando 5 nanogramas (ng) de DNA glucagon, *primers* mencionados anteriormente (0,2 micromolar -  $\mu\text{M}$ , cada um), *Taq High-Fidelity FUSION* (Finnzymes) (1 unidades por microlitro -  $\text{U}/\mu\text{l}$ ), tampão *HF FUSION* (1X), dNTP (0,2 milimolar - mM) e água ultra pura em quantidade suficiente para (q.s.p.) totalizar um volume final de 25 microlitros ( $\mu\text{l}$ ). O fragmento gerado foi de 128 pb observado em gel de agarose 1%.

O produto obtido pela PCR foi purificado utilizando o kit *QIAquick Gel Purification* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Foi obtido DNA em uma concentração de 36 nanogramas por microlitro ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ).

Após a purificação, o 558 ng do fragmento foi digerido durante 3 horas (H), bem como *NEBIII* (1X), *BSA* (1 micrograma por microlitro -  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) e as enzimas *Sall* (4U/ $\mu\text{l}$ ) e *NotI* (2U/ $\mu\text{l}$ ), todos Biolabs, para expor seus sítios de recombinação ao vetor *pGEX-4T-3*. O DNA foi precipitado com acetato de amônia. Foi adicionado 10% do volume total da digestão de acetato de amônio, 3 volumes de isopropanol gelado. A amostra foi homogeneizada por inversão e agitação em vortex (2 *Genie, Scientific Industries*), 13386 x g por 1 minuto. Em seguida, foi deixado no freezer em repouso por 30 minutos e a amostra foi centrifugada a 9184 x g por 15 minutos a 4 graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%, 9184 x g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após o pellet estar seco, o DNA foi ressuspenso em 40  $\mu\text{L}$  de água ultra pura esterilizada obtendo concentração de 8,7 ng/ $\mu\text{l}$ .

### 3.2 Preparação do vetor *pGEX-4T-3* e ligação

O vetor *pGEX-4T-3* já estava inserido na cepa bacteriana *BL21-DE3*. Para obtenção do vetor, foi feito um inóculo utilizando meio de cultura líquido *Luria & Bertani* (LB) (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, pH 7,0) e o antibiótico de seleção ampicilina (100 microgramas por mililitro -  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a  $37^{\circ}\text{C}$ , 200 rotações por minuto (RPM), durante 16 horas. A obtenção do plasmídeo purificado fora da célula foi feita por meio de miniprep usando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, obtendo a concentração de 100 ng/ $\mu\text{l}$  de vetor. Posteriormente, uma digestão foi feita para expor os sítios de recombinação do vetor para a ligação usando 3 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de DNA, *NEBIII* (1X), *BSA* (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), *Sall* (3U/ $\mu\text{l}$ ), *NotI* (3U/ $\mu\text{l}$ ), todos Biolabs, q.s.p. de água, totalizando um volume final de 20  $\mu\text{L}$  de reação.

A reação de ligação do fragmento de ***Sall*-FLAG-GLUCAGON-*NotI*** ao vetor *pGEX-4T-3* foi feita utilizando 52,2 ng de DNA do *amplicon* digerido, 300 ng de DNA do vetor digerido, enzima *T4 ligase* (1U/  $\mu$ l) (Invitrogen), tampão TP (1X) (Invitrogen), ATP (1,3mM) (Sigma) em um volume final de reação de 15  $\mu$ l. A ligação foi incubada à 16°C *overnight*.

Após o período de incubação da ligação, a amostra foi dialisada utilizando uma membrana 0,05  $\mu$ M (VMWP, Millipore) de acordo com as instruções do fabricante em uma placa pequena de 35 X 10 mm (Corning). Após a diálise, o DNA foi concentrado em speedvac (Labconco) até secar e foi ressuscitado em 5  $\mu$ l de água ultra pura esterilizada.

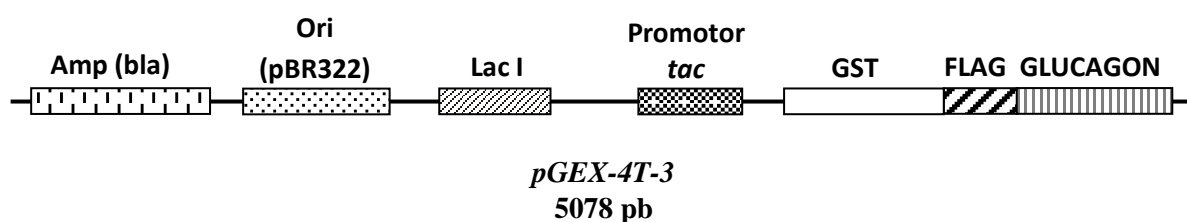
### 3.3 Eletroporação da ligação à cepa bacteriana *XLI-Blue*

Para transformar a cepa bacteriana *XLI-Blue* foi utilizado o método de eletroporação. Uma alíquota de célula competente de *XLI-Blue* foi usada, adicionando rapidamente após descongelar, 2  $\mu$ l de ligação ressuscitada e misturada rapidamente. Posteriormente, as células misturadas à ligação foram transferidas para a cuveta (*E.coli* Pulser® Cuvette – Bio-rad) previamente deixada no gelo, e inseridas no eletroporador (*MicroPulser* Bio-Rad). Logo após a eletroporação, foram adicionados 500  $\mu$ l de meio LB líquido e as células foram ressuscitadas e transferidas para um microtubo de 1,5 mL. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 1 mililitro (mL) de volume total, sendo posteriormente transferido para estufa a 37°C por 1 hora. Após este período, 100  $\mu$ l foram plaqueados em meio LB ágar contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e transferido para estufa a 37°C por 16 horas.



### 3.4 Seleção de colônias bacterianas *XLI-Blue* por sequenciamento

Para a seleção, o aparelho 3130XL *Genetic Analyzer HITACHI* (Applied Biosystem) foi utilizado para o sequenciamento, utilizando os vetores purificados das colônias potencialmente positivas. Além disso, para o sequenciamento foram desenhados *primers* que amplificam regiões antes do início do sítio de recombinação de *Sall* (*Forward* - CCAGCAAGTATATAGCATGGCC) e após o sítio de recombinação de *NotI* (*Reverse* - GTCAGCGGGTGTGGCGGGTG) (produzidos pela Invitrogen). As amostras foram preparadas para uma concentração de 100 ng/μl em um volume de 5 μl, e encaminhadas para a plataforma de sequenciamento da Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen. As sequências obtidas (Figura 10) foram processadas no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga pelo *software Staden Package* versão 1.5. As sequências foram analisadas pelo banco de dados *ORF Finder* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>).



**Figura 10.** Esquema ilustrativo do vetor de expressão *pGEX-4T-3* incluindo genes FLAG e Glucagon.

### 3.5 Transformação por choque térmico da cepa bacteriana *BL21(DE3)*

Após confirmação da colônia positiva, foi feita uma miniprep utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), conforme instruções do fabricante, para obtenção de massa do vetor para posterior transformação.

A transformação utilizada foi por choque térmico usando a cepa bacteriana *BL21 (DE3)*. A amostra de vetor plasmidial foi preparada para um volume de 20 µl na concentração de 10 ng/µl, que foi adicionada a uma alíquota de células competentes. Em seguida, foi incubada em gelo por 30 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas em banho maria à de 42° por 90 segundos e retornou ao gelo por 5 minutos. Após este período foi adicionado 900 µl de meio LB a amostra e incubado a 37°C por 1 hora. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 6048 x g por 5 minutos e 500 µl de meio LB líquido foram descartados. Após isso, 100 µl do restante foi plaqueado a 37°C em meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina.

### 3.6 Expressão de glucagon recombinante

Da colônia *BL21(DE3)* positiva número 5, confirmada por sequenciamento, foi feito um *staby* (700 µL de glicerol 80% + 300 µL de meio LB contendo a colônia 5) e armazenado a -20°C. Em seguida o pré-inóculo, utilizando 5µL este *staby*, foi feito em 5 mL em meio LB líquido, contendo 100 µg/mL de ampicilina, a 37°C, 200 RPM durante 16 horas. Após este período dois inóculos, de 10 mL de meio líquido LB, contendo 100 µg/mL de ampicilina, foram feitos a partir de diluição 1:10 do pré-inóculo, e incubados a 37°C, 200 RPM até que a absorbância (OD<sub>600</sub>) atingisse 0,6 (cerca de 30 minutos). Em seguida, 1 mM de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) foi adicionado em um dos inóculos. Posteriormente, os dois inóculos, um induzido com IPTG e outro não, foram incubados novamente nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Após duas horas de incubação, os inóculos foram centrifugados a temperatura ambiente, 1680 x g durante 10 minutos em tubos *falcon*. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e uma solução de 5 mL de PBS (*phospahte buffered saline* - 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0 1X), PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*) (100mM) e Benzamidina (100mM) foi usada para ressuspender o *pellet*. As amostras contendo as células ressuspendidas foram então sonicadas (Digital Sonifier®, Branson) em uma amplitude de 30%, com intervalos de 4 segundos ON e 10 segundos OFF durante 2 minutos. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 16329.6 x durante 45 minutos a 4°C, e os sobrenadantes, contendo as proteínas solúveis foram transferidos para outros tubos *falcon* de 50 mL. Nos pellets, contendo as proteínas insolúveis de ambas as amostras, foram adicionados 10 mL de tampão carbonato de sódio (50 mM), pH 10,5 contendo *dithiothreitol* (DTT) (10mM) até ressuspender todo o *pellet*. Em seguida foi incubado sob agitação leve, a 16°C *overnight*. Após este período a amostra foi centrifugada a 20916 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante, contendo as proteínas solubilizadas, foram transferidas para novos tubos *falcon* de 50 mL. Uma diálise utilizando membrana (Cheshire Sciences), poro 12000-14000 daltons, foi feita com as amostra solúvel e insolúvel *overnight*, e depois foram liofilizadas (CHRIST, Alpha 1-4 LD Plus n° 13679). Após a liofilização, foi realizada a dosagem de proteína pela reação de *Bradford* (159 µl de ultra pura, 40 µl de *Bradford*, 1 µl de proteína ressuspendida) (Bio-Rad), usando o aparelho *SPECTRA MAX® 190* (Molecular Devices) e o software *SolftMax Pro 5.4*. Amostras de proteínas das frações solúvel e insolúvel (25 µg) foram preparadas adicionando tampão de amostra (1X) (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 10%, SDS (Dodecil sulfato de sódio) 2,3%, Tris 124 mM, Azul de bromofenol 0,01%), fervidas por 5 minutos e centrifugadas a 9676 x g por 5 minutos. Foram aplicados 12µl de amostra em gel de SDS-PAGE 12% (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (SAMBROOK & RUSSELL, 2006), a 15 mA (miliampere), marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). O gel foi corado *coomassie blue* (metanol 40%, ácido acético 10%, água estéril 50%, 2 gramas de *brilliant blue G Sigma –B5133*)

por 4 horas e em seguida descorados usando solução descorante (Metanol 40%, ácido acético 10%, 50% água estéril). Os géis foram analisados através do *scanner ImageScannerIII* (GE) e pelo software *LabScan* (versão 6.0). O sistema de eletroforese utilizado para a corrida foi Bio-Rad (cat. n°165-8003), gel de 8.6 X 6.8 centímetros (cm), 75 milímetros (mm).

3.7 Identificação da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína glucagon fusionada e avaliação da massa molecular.

A sequência da proteína de Glucagon fusionada foi gerada por meio do *software EMBOSS Transeq* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>), que converteu a sequência de nucleotídeos (810 pb) GST, FLAG, Glucagon em resíduos de aminoácidos (281 aa). Após a obtenção da sequência proteica, outro *software, SCIENCE gateway* (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>) gerou o tamanho do fragmento de 31,44 kDa, a ser obtido após a expressão.

3.8 Definição do perfil de expressão da proteína glucagon

Para delinear o perfil ideal de expressão da proteína glucagon foram escolhidas 3 concentrações de IPTG (0,25, 0,5 e 1 mM), 3 temperaturas (25, 30 e 37°C) e intervalos de coleta que inicia em 0 hora (não induzido), seguido de coletas a 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e *overnight* após indução, totalizando 7 amostras coletadas. Em cada tempo 500 µl de amostra foram coletados, centrifugados a temperatura ambiente, 6720 x g durante 5 minutos e armazenadas a -20°. Após as coletas, 50 µl de tampão de amostras 1X (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 10%, SDS 2,3%, Tris 124 mM, Azul de bromofenol 0,01%) foram adicionados deixados 5 minutos no vortex (velocidade máxima), 15

minutos em água fervendo e centrifugado a 13171 x g por 10 minutos. Foram aplicados 15 µl da porção solúvel da amostra em gel SDS-PAGE 12% (SAMBROOK & RUSSELL, 2006) , 15 mA. O gel corado com corante *coomassie blue* (metanol 40%, ácido acético 10%, água estéril 50%, 2 gramas de *brilliant blue G* Sigma –B5133) por 4 horas e em seguida descorados usando solução descorante (Metanol 40%, ácido acético 10%, 50% água estéril). Os géis foram analisados utilizando o *scanner ImageScannerIII* (GE) e software *LabScan* (versão 6.0). O sistema de eletroforese utilizado para a corrida foi Bio-Rad (cat. nº165-8003), gel de 8.6 X 6.8 cm, 75 mm.

### 3.9 Avaliação do crescimento de células bacterianas induzidas e não induzidas

Para avaliar o crescimento celular foram feitos 3 pré-inóculos de 5 mL em meio LB líquido na temperatura de 37°C, 200 RPM, contendo ampicilina, (µg/mL) durante 16 horas. Em dois deles havia a presença do vetor de expressão *pGEX-4-T-3* e em um deles havia a cepa *BL21 (DE3)* não transformada. Após este período, 3 inóculos provenientes dos pré-inóculos foram obtidos, contendo 5 mL de meio líquido LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, foram feitos a partir de 1:10 do pré-inóculo, e incubados a 37°C, 200 RPM até que a OD atingisse absorvância 0,6 (cerca de 30 minutos). Em seguida, foi adicionado 0,25 mM de IPTG em um dos inóculos contendo o vetor. Nos outros dois inóculos não foi adicionado indutor e a OD<sub>600</sub> foi apenas monitorada, no intuito de avaliar o crescimento celular. Os inóculos foram aferidos de hora em hora e *overnight*, coletando 500 µL de cada tempo. As amostras foram inseridas em cuvetas (UVette – eppendorf) e a medição do crescimento celular foi feita em espectrofotômetro (OD<sub>600</sub>) (Eppendorff) diluindo a amostra inicial em uma vez para fazer a leitura (500 µL de células em meio + 500 µL de meio LB). Para validar os dados obtidos neste experimento foi utilizado barras de erros com desvio padrão.

### 3.10 Definição do nível de expressão da proteína glucagon

O nível de expressão da proteína glucagon foi feito através de densitometria. Foram realizadas 3 repetições e média da condição ideal. A análise ocorreu através da utilização do *scanner ImageScannerIII* (GE) e pelo softwares *ImageMaster2D Platinum7.02* e *LabScan* (versão 6.0) (General Electric Company).

### 3.11 Purificação do peptídeo glucagon fusionada a GST por afinidade

A purificação da proteína glucagon fusionada ao *tag* GST foi feita por cromatografia de afinidade. A resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (GE) foi usada neste processo, obedecendo as instruções do fabricante, dois mililitros de resina foram inseridas em coluna (Bio-Rad, 10 mL) e esta ligada a uma bomba peristáltica (Pump P-1, GE) com fluxo de 1 mL por minuto. Após a expressão da proteína em condições pré-estabelecidas, a fração solúvel foi dialisada, concentrada em liofilizador (CHRIST, Alpha 1-4 LD Plus n° 13679) e ressuspensa para quantificação de proteína por *Bradford*. Para a purificação foi utilizada a proporção de 20 mg por mL de resina, proporção indicada pelo fabricante. A proteína glucagon fusionada eluída foi dialisada e concentrada em liofilizador.

### 3.12 Confirmação da presença do peptídeo glucagon fusionada a GST por *Western blot*

Neste ensaio, 3 amostras foram selecionadas: proteína GST (controle positivo), proteínas de *E. coli BL21 (DE3)* (controle negativo), e a proteína glucagon fusionada ao GST. As amostras de controle negativo e controle positivo foram expressas e

processadas nas mesmas condições da proteína glucagon fusionada e induzidas a 1mM de IPTG.

As amostras foram previamente preparadas adicionando tampão de corrida (1X) fervendo por 5 minutos e centrifugadas a temperatura ambiente, a 1680 x g por 5 minutos. Foram aplicados 5 µg de proteína de cada amostra em gel SDS-PAGE 12%, 15 mA. Dois géis foram feitos usando as mesmas amostras, um gel foi transferido para uma membrana (*membrane optimized for protein transfer* - GE) e outro como espelho do gel transferido. O sistema de eletroforese utilizado para a corrida foi Bio-Rad (cat. n°165-8003), gel de 8.6 X 6.8 cm, 75 mm. O gel e a membrana foram tratados com tampão de ativação (tampão de transferência 5X 20%, metanol 20% e água estéril) (tampão de transferência 5X glicina 71,5 gramas (g) e Tris 15g) por 10 minutos. Em seguida as amostras foram transferidas para a membrana através do sistema de transferência *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) 5 volts (V) por 40 minutos.

Após a transferência, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (TBS – Tris buffered saline) 1X (Bio-Rad, código n°170-6435), TWEEN (LGC) 0,05% e leite 5%) *overnigh*. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem (TBS 1X - Bio-Rad, TWEEN 0,05%) e incubado com anticorpo primário anti-GST (GE), produzido em cabra usando na diluição 1:5000 durante 1 hora. Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anticabra conjugado a fosfatase alcalina (ref. A4187, Sigma) usando diluição de 1:5000. Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem e submetida a solução de revelação, de acordo com as instruções do fabricante (*Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit*, Bio-Rad), por

aproximadamente 10 segundos. A reação foi interrompida lavando a membrana com ultra pura.

### 3.13 Reação de digestão com enzima enteroquinase para liberar o peptídeo glucagon da fusão a GST.

A digestão da fusão da proteína glucagon e o *tag* GST ocorreu utilizando a enzima enteroquinase (Invitrogen) em reação de digestão a 37°C por 16 horas. De acordo com as instruções do fabricante: 1 unidade da enzima é capaz de clivar 20 µg de proteína semi-purificada. Na reação de digestão, foi utilizado 1 unidade de enzima enteroquinase, 20 µg de proteína fusionada semi-purificada, tampão (1X) e q.s.p. de água estéril para volume final de 10 µL.

Após a digestão as amostras foram inseridas em gel Tris-Tricina (SCHAGGER, 2006). O gel empilhador foi usado a 7% (367 µL de acrilamida 49,5%, 588 µL de solução gel (3 M de Tris-base e 0,3% de SDS (*Sodium dodecyl*), pH 8,45, q.s.p 100 mL), 1.544 µL de ultra pura, 22,5 µL de persulfato de amônia 10% e 3 µL de TEMED (N, N, N', N'- Tetrametiletilenediamina), o gel espaçador 14% (1.138,5 µL de solução acrilamida 49,5%, 1.333 µL de solução gel, 1.528,5 µL de ultra pura, 22,5 µL de persulfato de amônia 10% e 3 µL de TEMED) e gel fracionador 16% (990 µL de solução acrilamida 49,5%, 990 µL de solução gel, 330 µL de glicerol 99%, 670 µL de ultra pura, 37 µL de persulfato de amônia 10% e 3 µL de TEMED). Os tampões de corrida usados foram: catodo 1X (12,1 g de Tris-Base, 17,9 g de Tricina e 1g de SDS, pH 8,2, q.s.p. 1L) e externo Anodo, usado 1X (5X, 12,1 g de Tris-Base, pH 8,9, q.s.p 1L). Tampão de amostra específico (0,5 mM de Tris-HCl, 4% SDS, 0,4% de azul de bromofenol, 20% de glicerol, pH 6,8) (RIBEIRO, et al., 2011). O sistema de eletroforese utilizado para a corrida foi Bio-Rad (cat. n°165-8003), gel de 8.6 X 6.8 cm, 75 mm, onde 1,8 cm de



espaço da placa para géis fracionador e empilhador e 3,2 cm para gel espaçador. O gel de eletroforese correu a 100 V. O fármaco Glucagen® (Novartis) utilizado como controle positivo neste ensaio foi obtido por recursos próprios.

### 3.14 Purificação do peptídeo glucagon por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa RP-UPLC

As amostras provenientes de digestão foram secas em liofilizador e em seguida ressuspendidas em solução contendo água filtrada, (filtro 0,45 micrometros –  $\mu\text{m}$ ) (*Millex®-HÁ Syringe Driven Filter Unit*, ref. SLHA 025 NB, Millipore), e ácido trifluoracético (TFA) (Mallinckrodt, ref. UN2699) 0,1% em volume final de 500  $\mu\text{L}$ . A amostra foi centrifugada 13171 x g por 20 minutos a temperatura ambiente. O material solúvel foi novamente submetido a filtração (0,45  $\mu\text{m}$ ) e após a filtrado foi aplicado em coluna analítica de fase reversa C<sub>-18</sub> (218TP 5 $\mu$ , ID 4,6 mm, Vydac) acoplada ao equipamento UFLC (*ultra-high performance liquid chromatography*) (LC-20 AD/T LPGE KIT, Shimadzu). As frações retidas foram eluídas utilizando gradiente linear de acetonitrila (J.T. Baker, ref. 9017-03) de 0 a 95%, e posteriormente liofilizado e armazenado em freezer a -20°C.

### 3.15 Sequenciamento do peptídeo glucagon por espectrometria de massa

Para avaliar as frações obtidas pela cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa RP-UFLC (*ultra-high performance liquid chromatography*), as amostras foram preparadas adicionado matriz (**ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico**), na proporção de 3  $\mu\text{L}$  de matriz para 1  $\mu\text{L}$  de amostra. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em uma placa (MTP 384 massive S/N 04456 Bruker) até secarem. Em

seguida foram inseridas no aparelho de espectrometria de massa (Ultra flexIII TOF/TOF, Bruker Daltonics) para análise. Os resultados foram processados pelo software flexcontrol ultraflex TOF-TOF.

### 3.16 Avaliação do rendimento da produção de glucagon por litro de expressão

Um pré-inóculo de 5 mL em meio LB líquido foi feito a partir de um *staby* contendo 100 µg/mL de ampicilina, a 37°C, 200 RPM durante 16 horas. Após este período 4 inóculos – de 250 mL de meio líquido LB em erlenmeyers de 2 litros, na mesma composição acima, contendo 100 µg/mL de ampicilina, foram feitos a partir de 1:10 do pré-inóculo, e incubados a 37°C, 200 RPM até que a OD atingisse absorvância 0,6 (cerca de 30 minutos). Em seguida foi adicionado 0,25 mM de IPTG nos inóculos e colocados em shaker a 30°C por 5 horas, a 200 RPM.

Após o período de expressão os inóculos foram centrifugados em tubos falcon de 50 mL, a 4°C, 1882 x g por 5 minutos. As células, agora no pellet foram ressuspensas em 15 mL de PBS (*phospahte buffered saline*) (1X), PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*) (100mM) e Benzamidina (100mM). As amostras contendo as células ressuspensas foram então sonicadas (Digital Sonifier®, Branson) em uma amplitude de 30%, com intervalos de 4 segundos ON e 10 segundos OFF durante 2 minutos. Após a sonicação, a solução foi centrifugada a 16329 x g durante 45 minutos a 4°C, e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis foram transferidas para outros tubos *falcon* de 50 mL. As amostras foram quantificadas por reagente de *Bradford* (de acordo com as instruções do fabricante) e a purificação da proteína glucagon fusionada ao *tag* GST foi feita utilizando cromatografia de afinidade. A resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (GE) foi usada neste processo. Obedecendo as instruções do fabricante, 2 mL de resina foram inseridos em coluna (Bio-Rad, 10 mL) e

ligada a uma bomba peristáltica (Pump P-1, GE) com fluxo de 1 mL por minuto. Após a expressão da proteína em condições pré-estabelecidas, a fração solúvel foi dialisada, concentrada em liofilizador e ressuspensa para quantificação através da metodologia de *Bradford*. Foram aplicados 40 mg de proteína total a cada purificação, de acordo com as instruções do fabricante. A proteína glucagon fusionada eluída foi dialisada e concentrada em liofilizador. Para saber a concentração de proteínas da amostra semipurificada foi utilizado o quantificador Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

### 3.17 Teste de atividade biológica do peptídeo glucagon *In Vivo*

O teste de atividade realizado *in vivo* foi feito baseando-se no ensaio de Hinke (2000), o qual se trata na monitoração glicêmica dos animais, utilizando medidor glicêmico. Os animais testados foram ratos Wistar adultos (45 dias), machos, separados em 3 grupos de 5 ratos cada: (1) controle positivo (fármaco Novartis), (2) controle negativo (água) e (3) amostras contendo o glucagon semi purificado. Para determinar a concentração de proteínas da amostra, foi utilizado o quantificador Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para obter a quantidade de glucagon que deveria ser aplicada, diante do peptídeo estar semi-purificado, uma proporção foi calculada. Sabendo-se que 100% do peptídeo fusionado a GST representa um tamanho molecular de 31,44 kDa, e que os *tags* GST e FLAG representam 83% dessa massa, os 16% restantes seriam glucagon recombinante. O valor obtido pela quantificação do Qubit foi então descontado, e apenas 16 % foram computados para o cálculo em nanomol. Diante da proteína semi purificada, calculou-se que a quantidade de 10% da concentração seria referente ao peptídeo livre. Para calcular a quantidade aplicada por via subcutânea, do controle positivo e da amostra, os ratos

foram pesados e uma média foi feita para cada grupo. A quantidade utilizada foi de 7,1 nanomolar (nM) de amostra por kilo de animal. Os ratos foram deixados em jejum por 16 horas e em seguida a glicemia basal foi medida. Após a medição a amostra foi aplicada no dorso do animal e a glicemia foi monitorada nos tempos 10 minutos, 20 minutos e 40 minutos, utilizando aparelho de medidor glicêmico e fitas Accu-Chek® Active (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. O experimento foi repetido 3 vezes, e de cada grupo 6 animais foram excluídos. O certificado do comitê de ética para a realização deste ensaio foi obtido junto à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da faculdade União Pioneira de Integração Social – UPIS, sob o número 071/11 (Anexo2). O fármaco Glucagen® (Novartis), usado como controle positivo, e as fitas utilizadas no medidor glicêmico para este ensaio foram obtidos comercialmente. Para validar os dados obtidos neste experimento foi utilizado o software de linguagem estatística R (livre para *download* em <http://www.R-project.org>), modelo linear generalizado misto (semelhante ao teste T) (R Development Core Team, 2010), uma vez que foi necessário comparar a glicemia do tempo 10 minutos em relação aos outros tempos atribuindo assim distribuição normal para a glicemia, considerando os ratos uma variação aleatória.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Clonagem do gene glucagon no vetor *pGEX-4T-3*

A estratégia utilizada para a produção de glucagon em células de *E.coli* foi expressar o peptídeo na sua forma processada em fusão com a proteína GST. A fusão visa proteger o peptídeo da degradação intracelular bacteriana, aumentar a solubilidade, bem como facilitar o processo de purificação, visto que a proteína GST fusionada permite a utilização da resina Glutathione *Sepharose*, para purificação da proteína de fusão por afinidade. Além disso, o códon *usage* foi otimizado para *E. coli*, visando facilitar a expressão.

A sequência que codifica o glucagon, utilizado neste trabalho, foi obtida a partir do banco de dados *Genbank* (GI:30582464). Análises *in silico*, realizadas para identificar a presença de códons raros na sequência nucleotídica de glucagon, indicaram a presença dos mesmos, que foram substituídos, como pode ser observado na Figura 11.

```
>lcl|44415
Length=90

Score = 80.6 bits (88), Expect = 4e-21
Identities = 68/84 (81%), Gaps = 0/84 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 7   CAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGCCCAAGATTTT 66
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7   CAGGGCACCTTCACCAGCGATTATAGCAAATATCTGGATAGCCGCGCGCTCAGGATTC 66

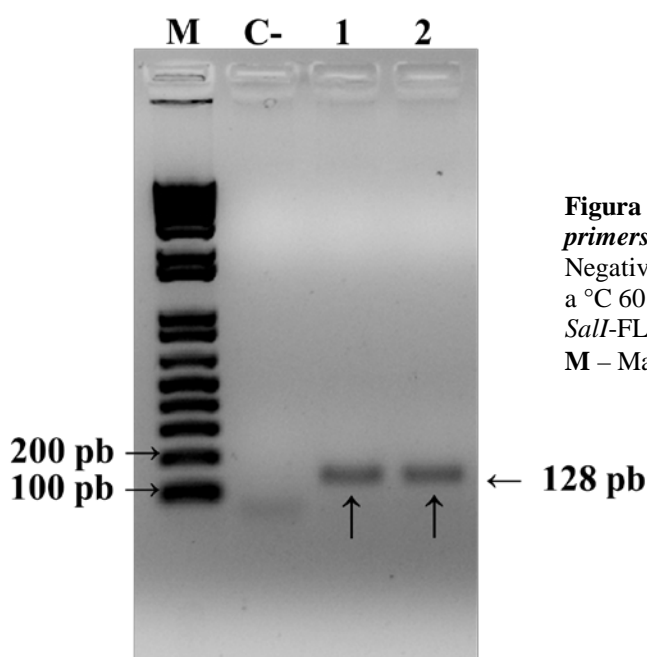
Query 67  GTGCAGTGGTTGATGAATACCTGA 90
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 67  GTGCAGTGGCTGATGAACACCTGA 90
```

**Figura 11. Alinhamento entre sequências do gene glucagon antes e após troca de códons raros.** A sequência *Query* é a sequência depositada no banco de dados *Genebank* (GI:30582464) e a sequência *subject* correspondem a sequência modificada, utilizada para a ligação ao vetor de expressão *pGEX-4T-3*.

A partir destas análises, a sequência codificadora do glucagon foi sintetizada quimicamente, juntamente com um vetor inicialmente idealizado para outra finalidade. Com intuito de expressar o glucagon em *E. coli.*, a sequência do peptídeo foi subclonada e ligada ao vetor *pGEX-4T-3*.

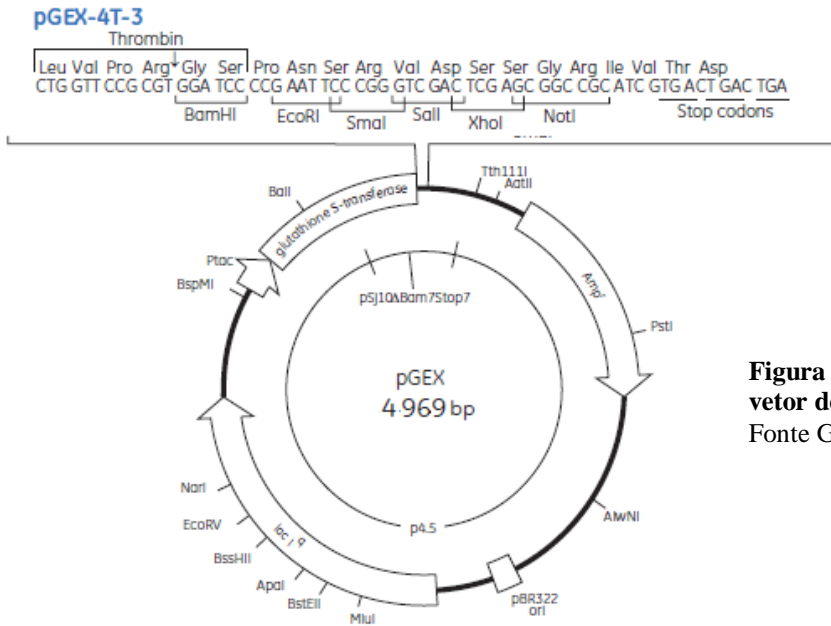
No vetor de expressão existe uma sequência codificadora da proteína GST e de um sítio de clivagem para a enzima trombina. Análises *in silico* apontaram que restariam resíduos de aminoácidos após a clivagem da fusão glucagon/GST utilizando a enzima trombina. Assim, foi necessário adicionar outra sequência de clivagem. Para tal, foram desenhados *primers*, sendo que o primer senso continha a sequência codificadora do sítio de clivagem da enzima enteroquinase (FLAG), além de sítios de restrição para auxiliar a clonagem.

Foi realizada amplificação do fragmento por PCR, que apresentou o tamanho esperado de 128 pb (Figura 12), visualizado em gel de agarose 1%. Duas temperaturas de anelamento foram testadas, 55 e 60 °C, indicando que ambas as temperaturas seriam ideais para amplificação do fragmento.



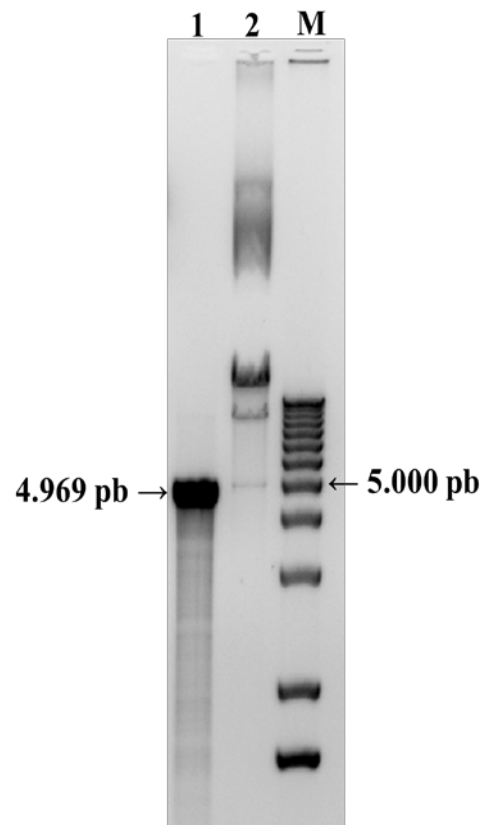
**Figura 12. PCR usando *Taq High Fidelity* e *primers* para o gene glucagon. C-** Controle Negativo (água); **1** – amostra a 55°C; **2** – amostra a °C 60; Setas indicam o fragmento amplificado de *Sall*-FLAG-Glucagon-*NotI*; Gel de Agarose 1%; **M** – Marcador (*1Kb plus* - Invitrogen).

A banda correspondente ao *amplicon* foi retirada do gel e purificada. Em seguida, o fragmento e o vetor foram digeridos para expor os sítios de clonagem, que são observados na Figura 13. A clivagem do vetor foi confirmada em gel de agarose 1% (Figura 14) e procedeu-se à ligação do fragmento ao vetor.



**Figura 13.** Figura esquemática do vetor de expressão *pGEX-4T-3*.  
Fonte GE.

**Figura 14.** Digestão do vetor de expressão *pGEX-4T-3* usando *NotI* e *Sall*.; **1** – Vetor Digerido; **2** – Vetor Não Digerido; **M** – Marcador (*1Kb plus* - Invitrogen).



A reação de ligação do fragmento glucagon ao vetor de expressão resultou em uma sequência nucleotídica contendo *Sall*/GST/FLAG/Glucagon/*NotI*, conforme observado na Figura 15.

```

ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGT
GCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCCTTCTGGATAATGTTTTTGGC
CCGACATCATAACGGTTCCTGGCAAATATCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAAT
GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGTATTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTG
GAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCAT
TTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATC
TTCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAA
GCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGAT
ATTAGATACGGTGTTCGAGAAATGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCA
AGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTCGAAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGT
AACCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGAT
GCGTCCCAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAAT
CCAGCAAGTATATAGCATGGCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAA
ATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCCCCGAATTCCCGGGTCGACGATTACAAAGATGATGATGATAAACAC
AGCCAGGGCACCTTCACCAGCGATTATAGCAAATATCTGGATAGCCGCCGCGCTCAGGATTTTCGTGCAGT
GGCTGATGAACACCTGAGCGGCCGC

```

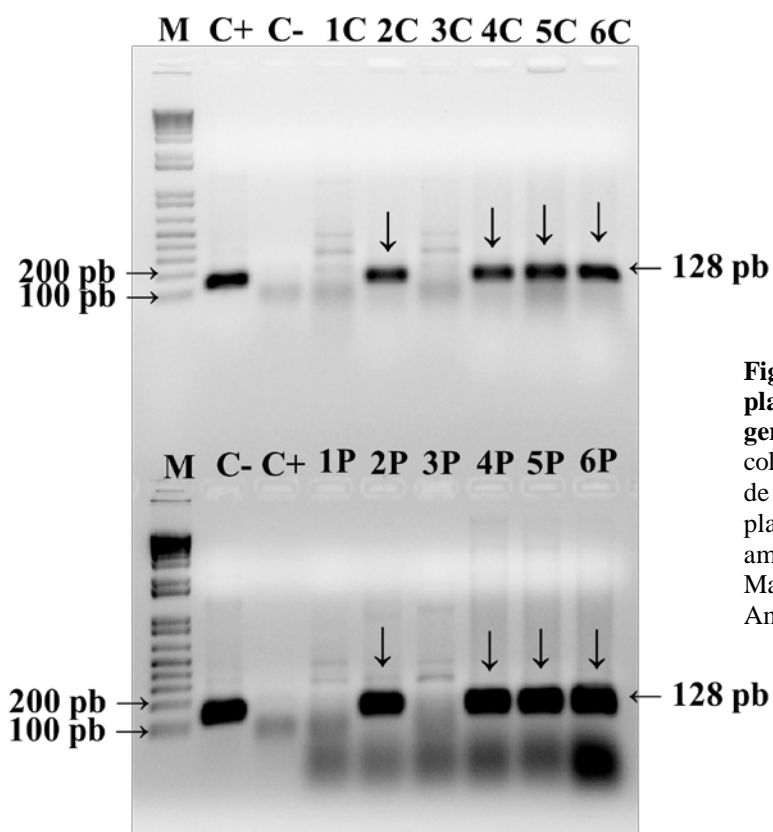
**Figura 15.** Esquema ilustrativo da ligação do fragmento glucagon e *tag* FLAG ao vetor de expressão *pGEX-4T-3*.

**Sall** – GTCGAC    **NotI** – GCGGCCGC    **FLAG**    **Glucagon**    Promotor *Taq*    *Taq* GST

#### 4.2 Confirmação da ligação do gene glucagon ao vetor *pGEX-4T-3*

Após a reação de ligação ser feita, o vetor de expressão ligado a glucagon foi inserido em células *BL21 (DE3)* através de transformação por choque térmico. Várias colônias isoladas foram obtidas e para confirmar a ligação de glucagon ao vetor de expressão, 20 colônias foram selecionadas para análise por PCR (amostras de colônia e plasmídeo) (Figura 16). Destas colônias, quatro foram positivas.





**Figura 16. PCR de colônia e plasmídeo usando primers para o gene glucagon. 1 a 6 – Amostras de colônias e plasmídeos; C – Amostras de colônia; P – Amostras de plasmídeo; Setas indicam as amostras PCR positivas; M – Marcador (*Ikb plus* - Invitrogen) Amostras positivas 2, 4, 5 e 6.**

A partir destes resultados as amostras foram analisadas utilizando uma plataforma de sequenciamento, onde *primers* foram desenhados para sequenciar toda a região nucleotídica de interesse (*Sall*/*GST*/*FLAG*/*Glucagon*/*NotI*). As amostras que foram negativas na PCR também foram sequenciadas, representando um controle negativo para a análise.

As seqüências obtidas pela plataforma de sequenciamento foram analisadas no banco de dados *ORF Finder* do NCBI. Dentre as seqüências analisadas, apenas a amostra de número 5 apresentou a seqüência de glucagon fusionada em fase (Figura 17). As demais amostras apresentaram resultados incompatíveis com o esperado, onde apenas fragmentos de glucagon ou GST foram identificados.

Para confirmar os resultados obtidos pelo sequenciamento e analisado pelo banco de dados, foi realizado um alinhamento entre a sequência de glucagon no vetor de expressão (*in silico*) e a sequência obtida no sequenciamento, utilizando a ferramenta *Nucleotide* BLAST. O resultado indicou identidade entre as sequências analisadas pela ferramenta, conforme demonstrado na figura 18.

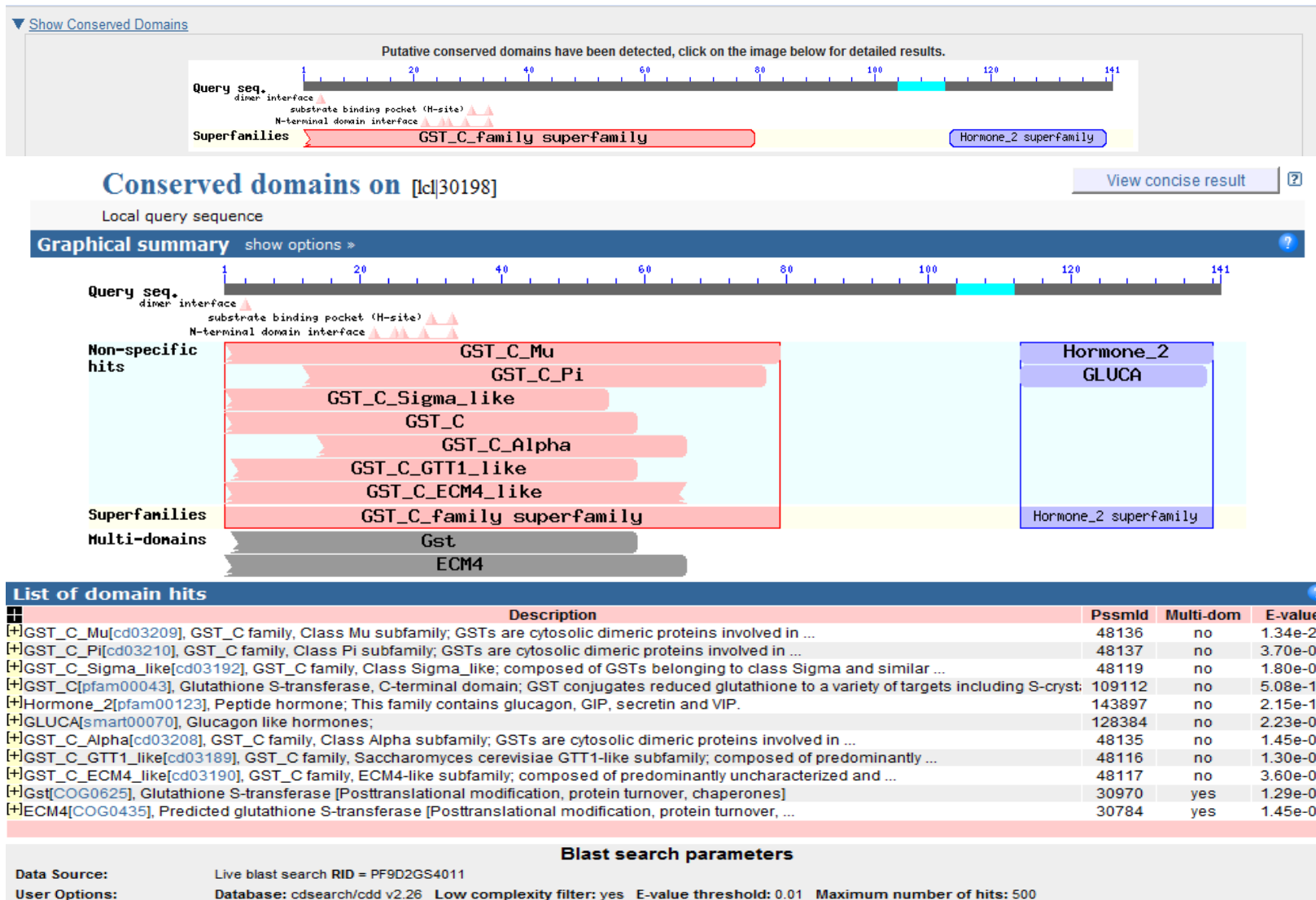
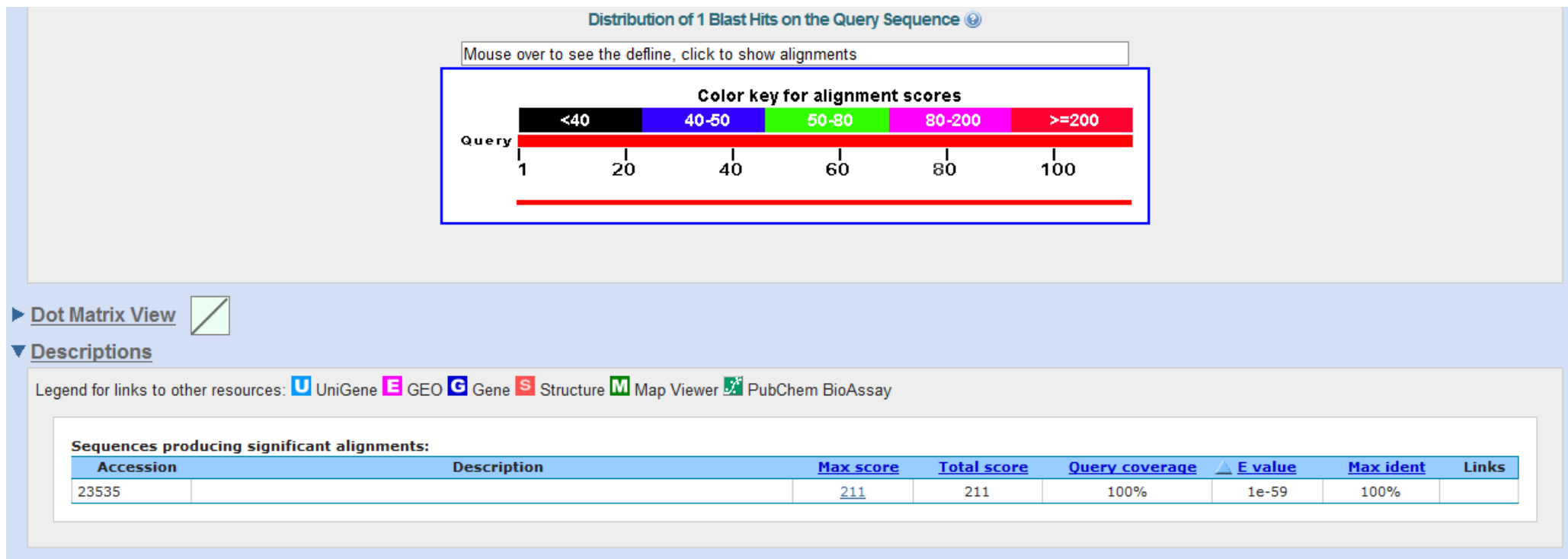


Figura 17. Análise da sequência da amostra 5 feita pelo banco de dados *ORF Finder* do NCBI. A sequência demonstra, em ordem, tag GST, FLAG (região em azul) e o hormônio glucagon.



**Figura 18. Análise por BLAST das sequências do sequenciamento (amostra 5) e a sequência do mapa da ligação, indicando identidade entre as sequências analisadas.**

Fonte:

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROG\\_DEF=blastn&BLAST\\_PROG\\_DEF=megaBlast&SHOW\\_DEFAULTS=on&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=align2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)

#### 4.3 Sequência de resíduos de aminoácidos e massa molecular do peptídeo glucagon fusionado.

Após a confirmação definitiva da subclonagem e ligação do glucagon ao vetor de expressão, a sequência do peptídeo fusionado a FLAG e GST (810 pb) foi analisada no *software* *EMBOSS Transeq* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>) para tradução da sequência de nucleotídeos. Avaliou-se a sequência (269 resíduos de aminoácidos) (Figura 19) em outro *software*, *SCIENCE gateway* (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>), para calcular o tamanho aproximado do peptídeo fusionado, que foi de 31,44 kDa.

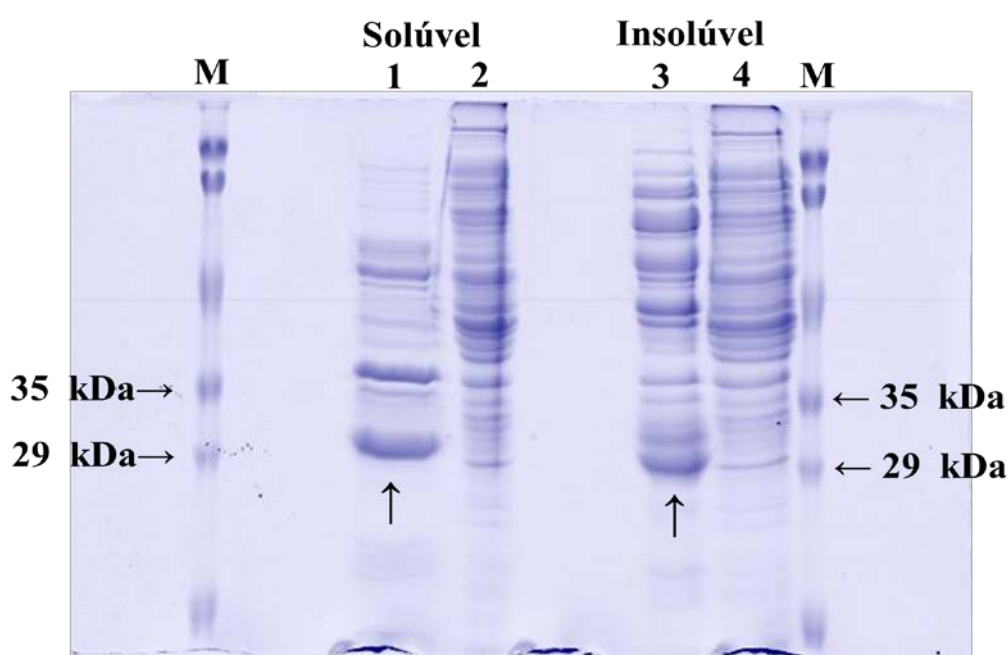
**MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYI  
DGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSDFETL  
KVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLV  
CFKKRIEAIIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSPNSRVD**DYK  
DDDDK**HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT**

**Figura 19.** Sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo glucagon (sublinhado) fusionada aos *Tags* GST (negrito) e FLAG(caixa).

#### 4.4 Expressão de glucagon recombinante fusionado

Após a confirmação de todas as análises moleculares, o vetor de expressão *pGEX-4-T3* inserido em cepa de *E.coli BL21 (DE3)*, foi induzido utilizando o indutor IPTG. A expressão piloto foi feita para avaliar se a proteína glucagon fusionada seria expressa na fração solúvel ou insolúvel durante a expressão de proteínas da bactéria. Para tal fim, a expressão foi monitorada durante os tempos de 0 a 6 horas, utilizando 1 mM de IPTG. As amostras de cada tempo foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12%, demonstrando que os melhores tempos de expressão foram 4 e 5 horas na temperatura de 30°C.

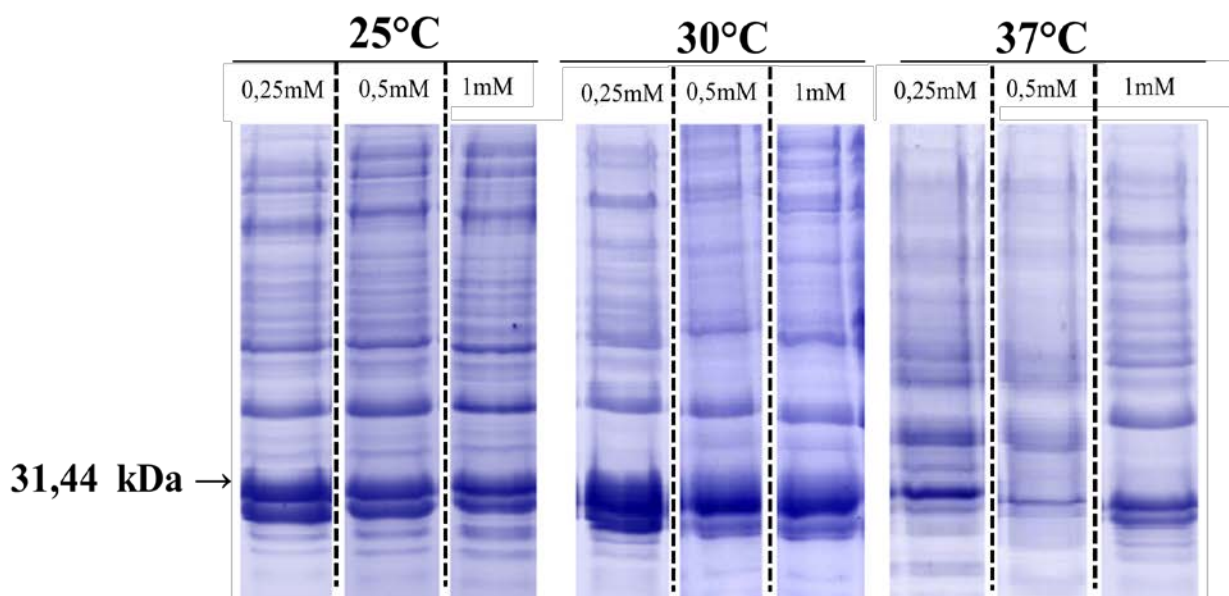
Considerando que os tempos ideais para a expressão, após indução, são de 4 e 5 horas, o experimento de expressão piloto foi repetido, coletando alíquotas da amostra induzida e não induzida no tempo de 4 horas. As amostras foram centrifugadas (concentrar as células), ressuspensas, sonicadas, centrifugadas e separadas em frações solúveis e insolúveis. As amostras solúveis e insolúveis foram processadas de acordo com a sua característica de solubilidade e as mesmas amostras, induzidas e não induzidas, solúveis e não solúveis, foram quantificadas pelo método de *Bradford*. Aplicou-se um volume de 12  $\mu$ L em gel SDS-PAGE 12%. O experimento de eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou que o glucagon fusionado estava presente na fração solúvel e insolúvel (Figura 20). A escolha de concentrações satisfatórias de glucagon fusionado na fração solúvel é devida à praticidade desta fração durante a execução dos experimentos.



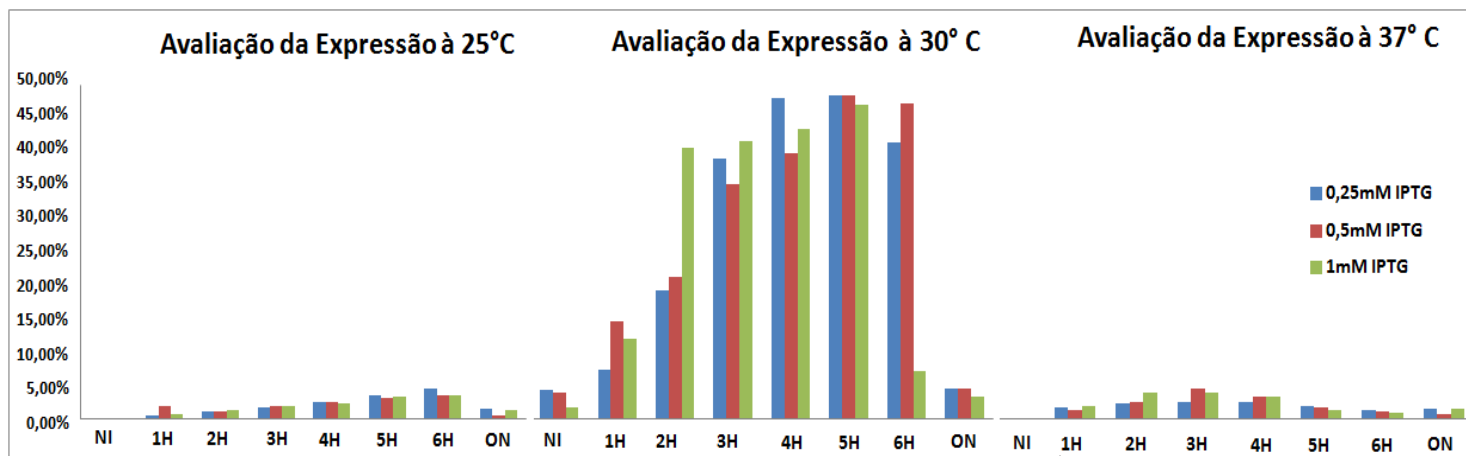
**Figura 20. Análise da presença de glucagon fusionado (31,44 kDa) na fração solúvel e insolúvel.** Expressão em 1 mM de IPTG; 1 – Amostra Solúvel Induzida; 2 – Amostra Solúvel Não Induzida; 3 – Amostra Insolúvel Induzida; 4 – Amostra Insolúvel Não Induzida; Setas indicam presença do glucagon na fração solúvel e insolúvel; Gel SDS-PAGE 12%; M – Marcador *Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range* (Bio-Rad), Corante *Comassie blue*.

#### 4.5 Definição do perfil de expressão do peptídeo glucagon fusionado

O perfil de expressão de uma proteína é necessário para otimizar o tempo e a concentração de indutor, além de utilizar a temperatura que favoreça a expressão da mesma. Para definir o perfil do peptídeo glucagon, foram avaliados alguns parâmetros, tais como, temperatura, concentração de indutor e tempo após indução. Todos os pré-inoculos foram feitos a 37°C e as expressões foram realizadas nos parâmetros escolhidos. Foram avaliadas as temperaturas de 25, 30 e 37°C, nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mM de IPTG, nos tempos de 0 a 6 horas e *overnight* após a indução (Figuras 22, 23 e 24). Os resultados indicaram que a melhor temperatura de indução foi de 30°C, utilizando 0,25mM do indutor IPTG, no tempo de 5 horas após a indução (figuras 21). Este resultado foi confirmado analisando os géis dos diferentes perfis de expressão por densitometria, como observado no Gráfico 2.



**Figura 21.** Expressão do peptídeo fusionado glucagon (31,44 kDa) nas temperaturas de 25, 30 e 37°C nas concentrações de 0,25 , 0,5 e 1 mM de IPTG no tempo de 5 horas após a indução. Corante *Comassie blue*.



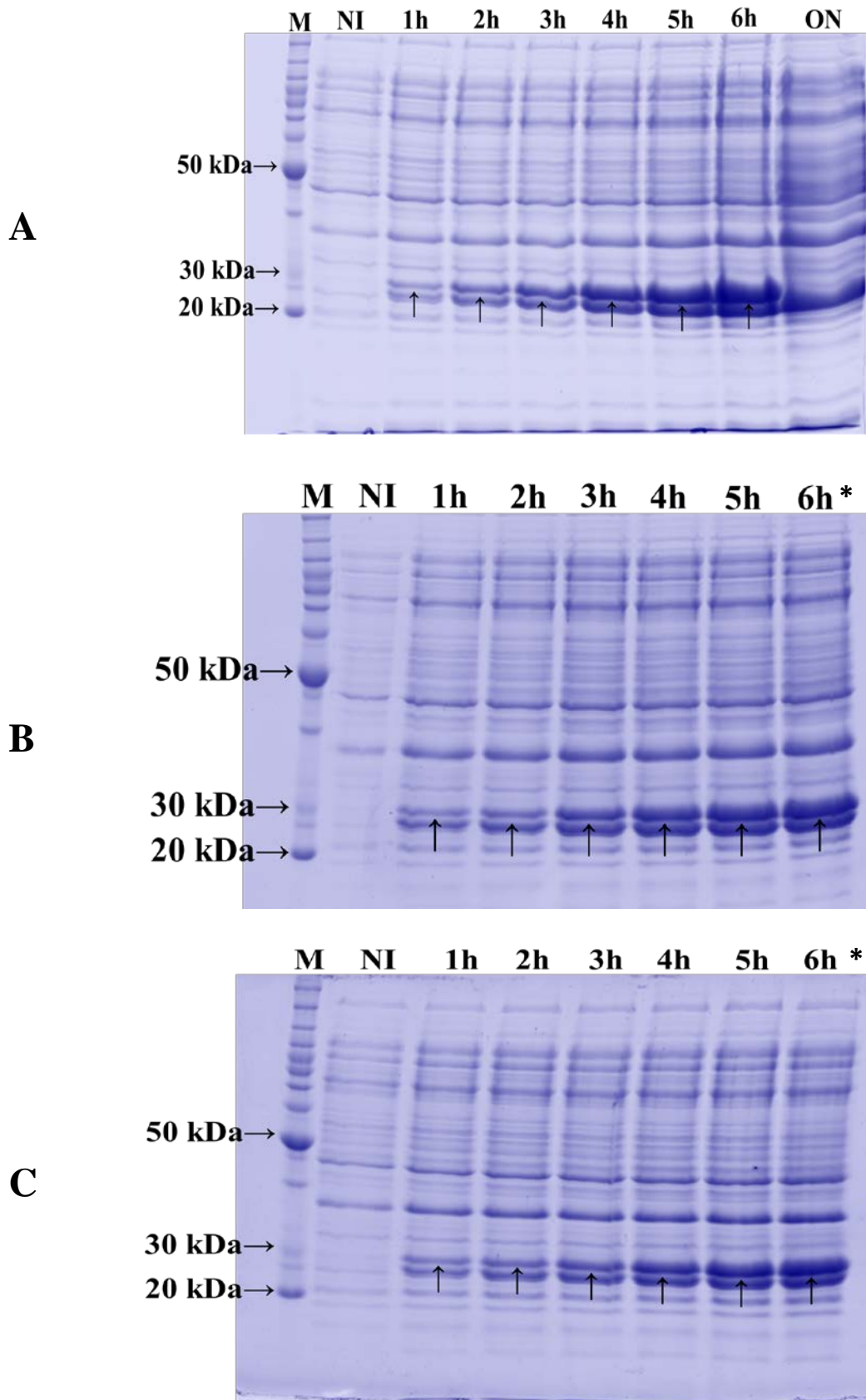
**Gráfico 2. Avaliação da expressão do peptídeo fusionado glucagon nas temperaturas de 25, 30 e 37°C e concentrações de 0,25, 0,5 e 1mM de IPTG utilizando densitometria.** Coleta sequencial de 0 a 6 horas, seguida de amostra *overnight*; NI – não induzido, ON – *overnight*.

Os resultados da análise por densitometria do perfil de expressão demonstrou-se atípico, uma vez a temperatura ideal de expressão foi de 30°C, dentre as temperaturas avaliadas. A temperatura comumente utilizada é de 37°C.

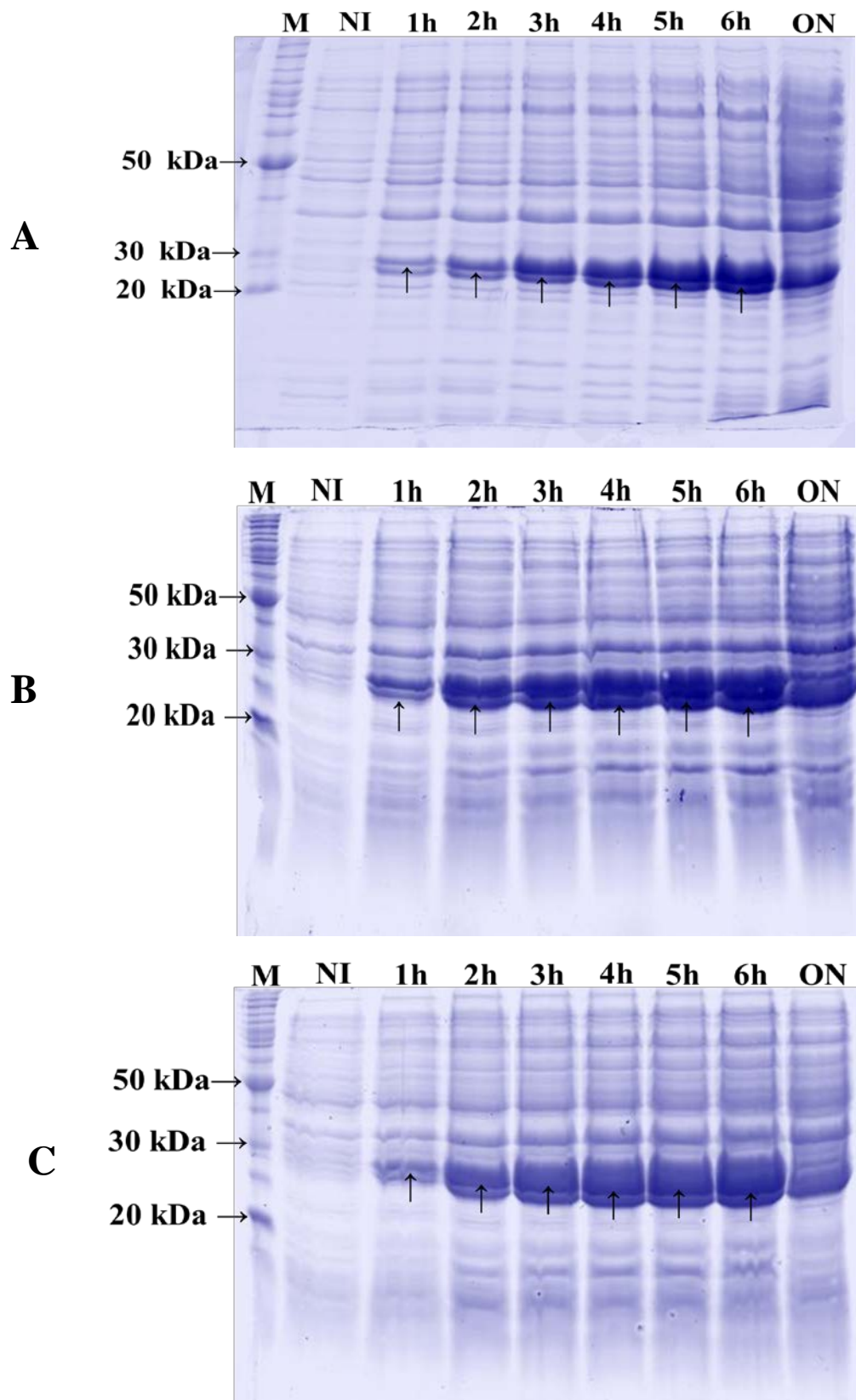
A melhor concentração do indutor IPTG utilizado foi a menor, 0,25 mM e IPTG, dentre todas as concentrações testadas, uma quantidade relativamente baixa e de interesse para a indústria farmacêutica.

Diante destes resultados, foram testados outros parâmetros, tais como temperatura, 17°C, e concentração de IPTG (0,1mM) para confirmar se a temperatura de 30°C e a concentração de 0,25mM seriam os mais adequados para a expressão do peptídeo, porém não houve expressão significativa em ambos os experimentos.

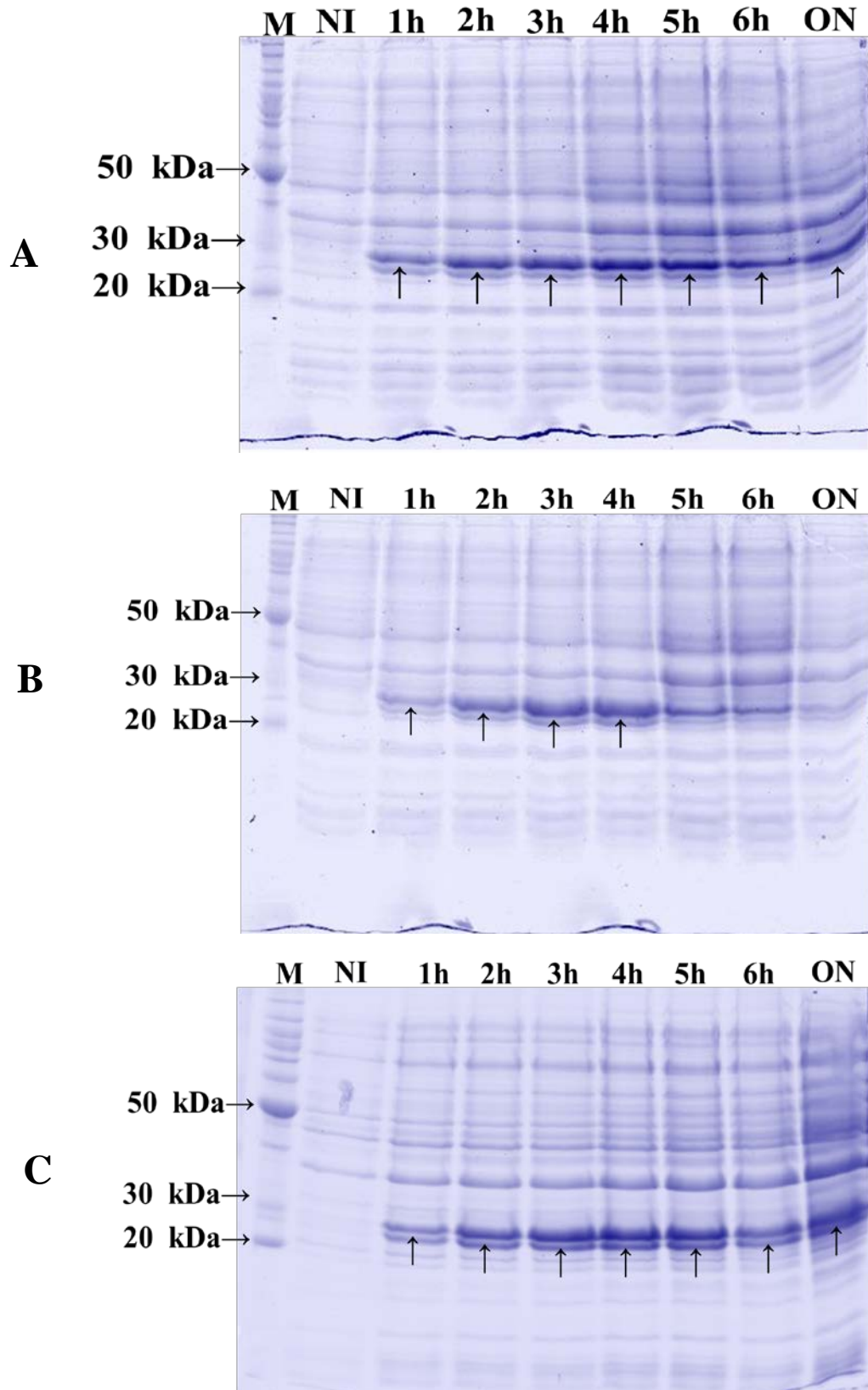




**Figura 22.** Expressão do peptídeo glucagon fusionado a 25°C em gel SDS-PAGE 12%. Concentrações (A) 0,25mM, (B) 0,5 mM e (C) 1 mM de IPTG; NI – não induzido; ON – *overnight* ; Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen); Corante *Comassie blue*. \* O tempo ON não foi inserido nos géis de 0,5 e 1 mM devido a degradação vista neste tempo na expressão usando 0,25mM de IPTG; Setas indicam presença de glucagon-GST durante avaliação do tempo da expressão e concentração de indutor IPTG.



**Figura 23.** Expressão do peptídeo glucagon fusionado a 30°C em gel SDS-PAGE 12%. Concentrações (A) 0,25mM, (B) 0,5 mM e (C) 1 mM de IPTG; NI – não induzido; ON – *overnight* ; Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen); Corante *Comassie blue*; Setas indicam presença de glucagon-GST durante avaliação do tempo da expressão e concentração de indutor IPTG.



**Figura 24.** Expressão do peptídeo glucagon fusionado a 37°C em gel SDS-PAGE 12%. Concentrações (A) 0,25mM, (B) 0,5 mM e (C) 1 mM de IPTG; NI – não induzido; ON – *overnight* ; Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen); Corante *Comassie blue*; Setas indicam presença de glucagon-GST durante avaliação do tempo da expressão e concentração de indutor IPTG.

#### 4.6 Comparação da curva de crescimento antes e após indução com indutor IPTG.

Uma vez estabelecida a temperatura ideal de expressão de 30°C, inóculos contendo bactérias foram feitos nesta temperatura, para avaliar o crescimento celular antes e após a adição do indutor IPTG, bem como avaliar o crescimento celular nas células bacterianas que continham ou não o vetor de expressão *pGEX-4T-3*. Os inóculos foram identificados como: (1) *BL21(DE3)* + *pGEX-4T-3*/Glucagon, (2) *BL21(DE3)*+ *pGEX-4T-3*/Glucagon não induzido e (3) *BL21(DE3)*. Posteriormente, a absorbância (OD<sub>600</sub>) das bactérias foram lidas em espectrofotômetro para avaliar o nível de crescimento. O resultado (gráfico 3) demonstrou que as células induzidas apresentaram uma redução em seu crescimento celular após a expressão e que as células não induzidas apresentaram crescimento celular maior em relação à cepa vazia.

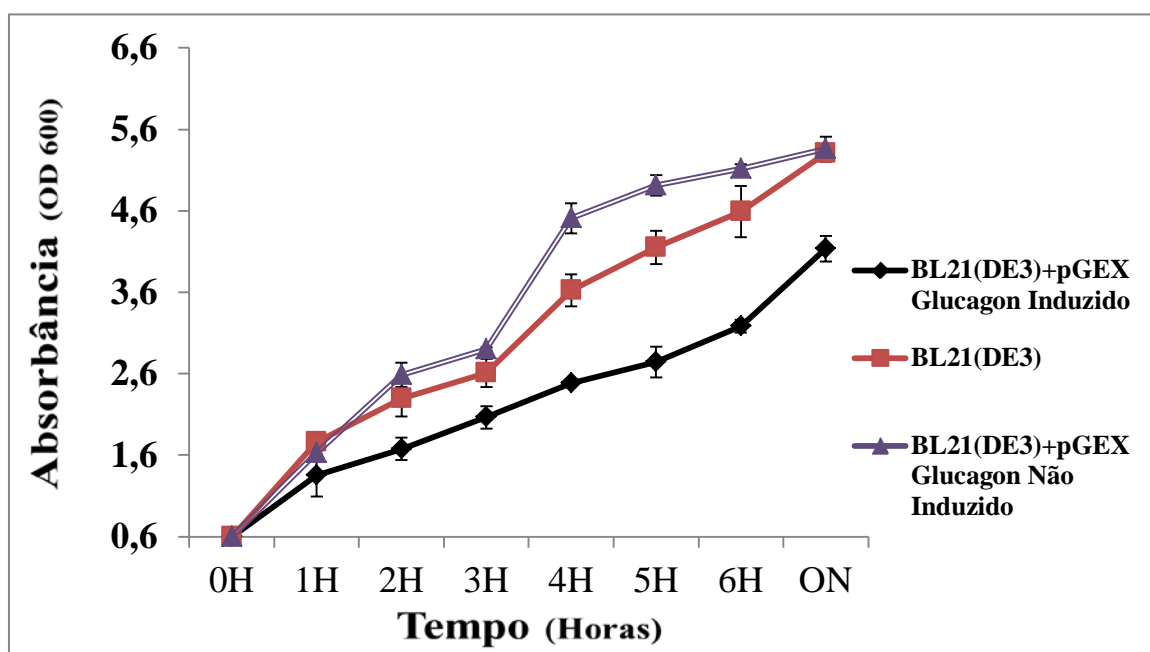


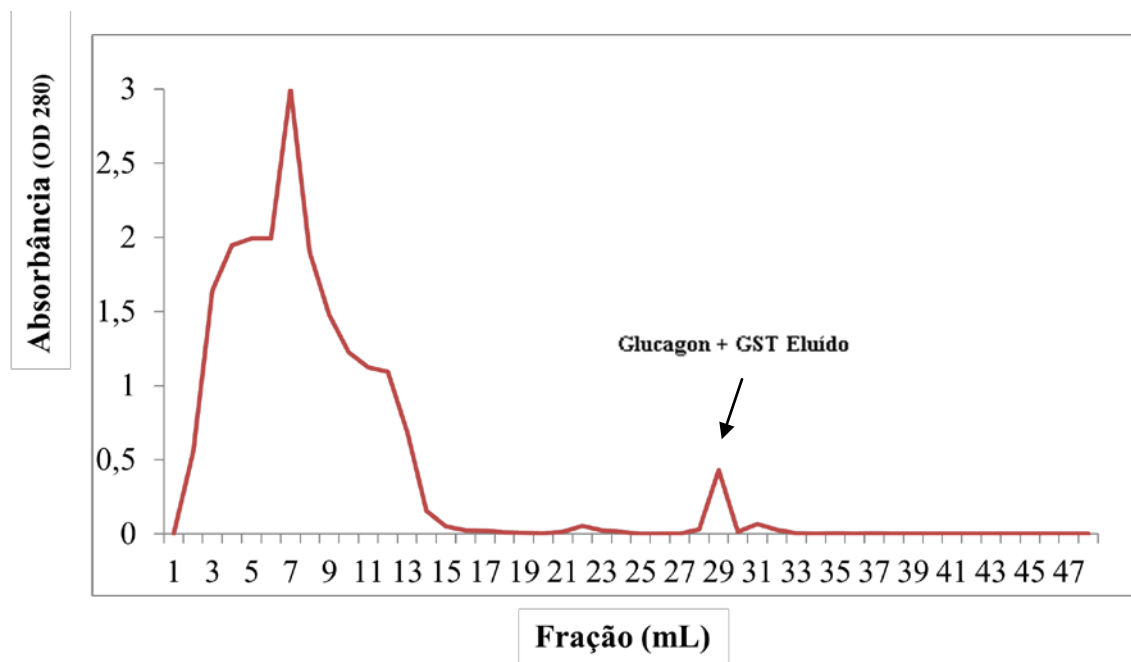
Gráfico 3. Leitura das OD<sub>600</sub> das cepas *BL21(DE3)* contendo o vetor *pGEX-4T-3*, Glucagon induzido, não induzido e cepa *BL21(DE3)*.

#### 4.7 Purificação do glucagon fusionado a GST utilizando cromatografia de afinidade

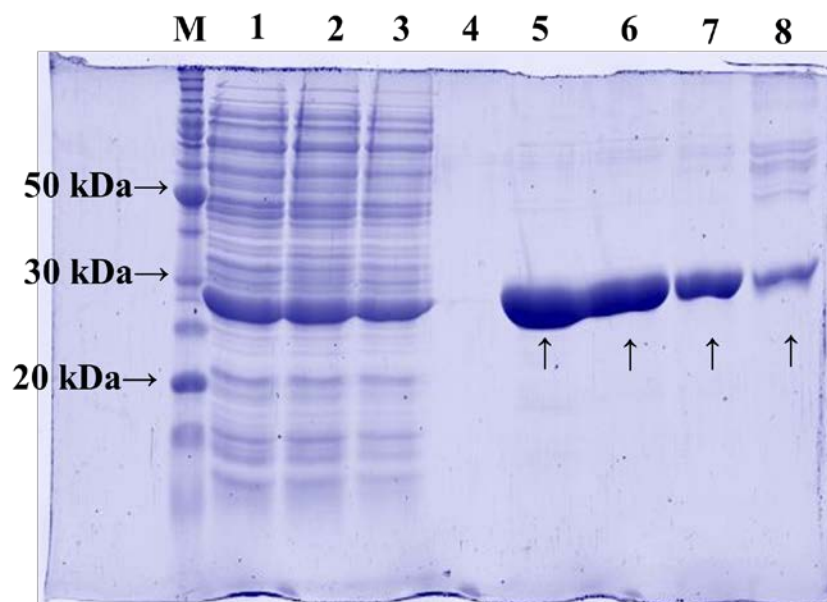
A purificação é uma etapa crucial do processo de expressão de proteínas recombinantes. Para a expressão de peptídeos, é essencial a fusão destes a *tags*, uma vez que bactérias, mesmo deficientes de proteases, podem clivar pequenas proteínas. Atualmente, peptídeos de grande importância são descobertos. Uma das grandes dificuldades em expressar peptídeos é que mesmo utilizando engenharia genética, estas moléculas são alvo de degradação de proteases do citoplasma. A expressão de peptídeos fusionados a *tags* poderia auxiliar no processo de produção.

O *tag* escolhido para ser fusionado ao glucagon foi *tag* GST, utilizado para a expressão e para o processo de purificação. Porém, o sítio de clivagem do vetor *pGEX-4T-3*, utilizado para separar a fusão após a expressão, não foi utilizado devido a análises *in silico* indicarem resíduos de aminoácidos no peptídeo. Para separar o peptídeo da fusão sem adição de resíduos, utilizamos o sítio de clivagem do *tag* FLAG, região utilizada pela enzima enteroquinase para clivagem. Para a purificação foi utilizado cromatografia de afinidade, usando a resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (GE) em um fluxo de 1 mL por minuto. Após a aplicação da proteína total, foi coletada 1 mL de cada amostra e utilizando um espectrofotômetro, no comprimento de onda específico para proteínas (OD<sub>280</sub>), foi monitorado o desempenho da resina e da purificação, como observado no Gráfico 4.

Em seguida, as amostras coletadas foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%, demonstrando que a purificação ocorreu de forma satisfatória ao comparar as amostras das canaletas 1 a 8 no gel (Figura 25).



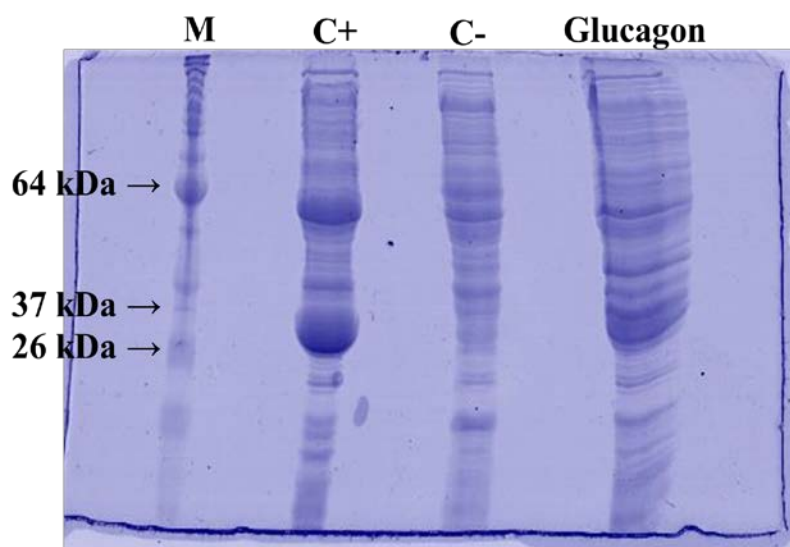
**Gráfico 4. Cromatografia do Peptídeo Fusionado Glucagon e GST.** Foram aplicados 40 mg de proteína total; Seta indica um pico lido por espectrofotômetro (OD 280 nm) indicando a eluição de glucagon-GST durante cromatografia de afinidade.



**Figura 25. Gel de SDS-PAGE 12% evidenciando a eficiência da purificação.** 1 – primeira amostra coletada de proteínas; 2 – última amostra coletada de proteína, 3 – primeiro lavado coletado; 4 – último lavado coletado; 5, 6, 7 e 8 – eluídos coletados em sequência; M – marcador *BechMark Protein Ladder* (Invitrogen), Corante *Comassie blue*; Setas indicam frações de glucagon eluídas em cromatografia de afinidade e observados em gel de SDS-PAGE.

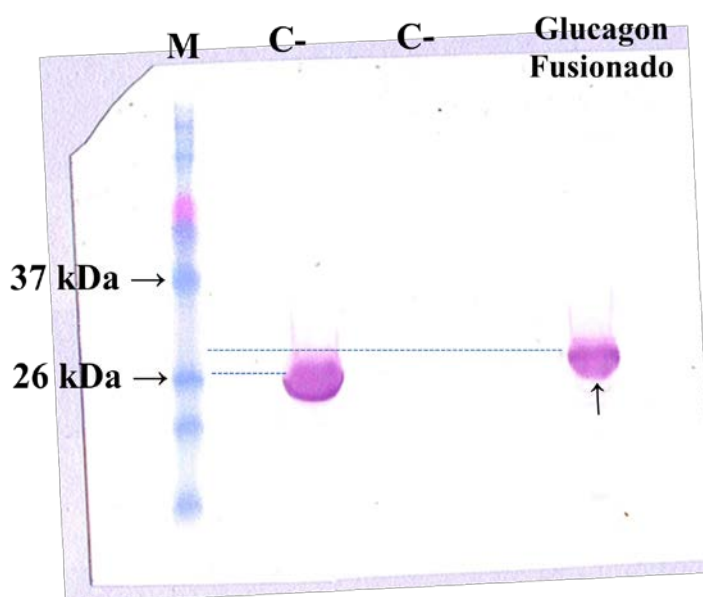
#### 4.8 Western blot do peptídeo glucagon fusionado usando anticorpo anti-GST

A análise da presença de um peptídeo ou proteína de interesse após a expressão é importante, principalmente para avaliar o processo de tradução. Para verificar a presença do glucagon fusionado a GST, análises por *Western blot* usando anti-GST, aplicando 2 µg de proteína total foi realizado. O resultado demonstrou a presença do peptídeo fusionado (Figuras 26 e 27) no tamanho esperado de 31,44 kDa.



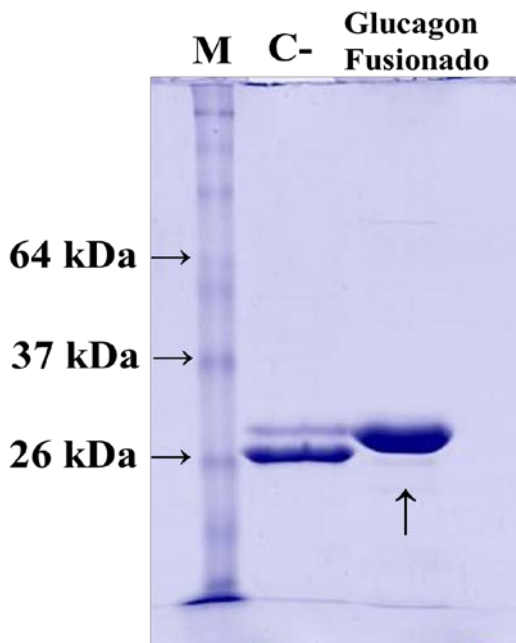
**Figura 26. Gel SDS PAGE 12% usado como espelho para Western blot.** 2 µg de proteína total; C+ - controle positivo GST (26kDa); C- - controle negativo (proteína total de *E.coli BL21(DE3)*); Glucagon Fusionado a GST (31,44 kDa); M – marcador *BechMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen); Corante *Comassie blue*.

**Figura 27. Western blot usando anti-GST.** 2 µg de proteína total; C+ - controle positivo GST (26 kDa); C- - controle negativo (proteína total de *E.coli BL21(DE3)*); **Glucagon Fusionado** – 2 µg de proteína total glucagon/GST (31,44 kDa); Seta indica glucagon fusionado a GST positivo no experimento; M – marcador *BechMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen).



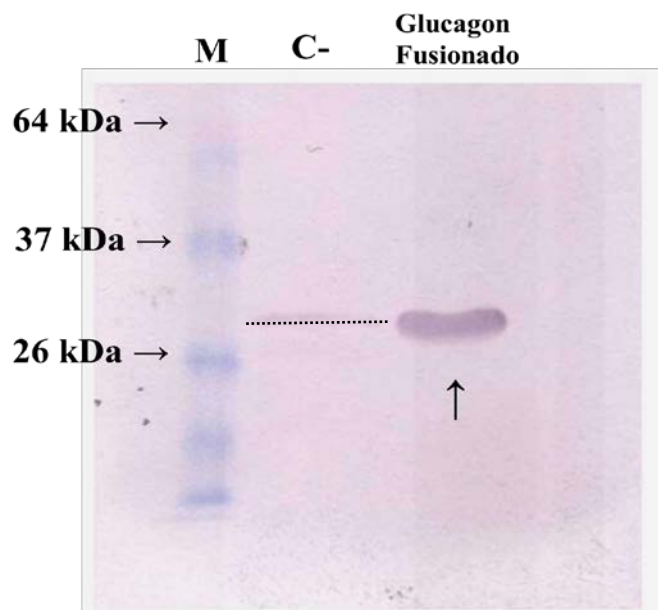
#### 4.9 Western blot do peptídeo glucagon fusionado usando anticorpo anti-glucagon

Ao confirmar a presença do peptídeo glucagon fusionado usando anti-GST, analisou-se a presença do glucagon fusionado através de *Western blot*, utilizando anti-glucagon, aplicando 3 µg de proteína purificada. O resultado demonstrou a presença do peptídeo fusionado, como observado nas Figuras 28 e 29. Além disso, o mesmo localizou-se acima dos 26 kDa do controle negativo (massa molecular do GST não fusionado).



**Figura 28. Gel SDS PAGE 12% usado como espelho para Western blot.**; C- controle negativo GST (26kDa); **Glucagon Fusionado** - 3 µg de proteína; Glucagon Fusionado a GST (31,44 kDa); Seta indica glucagon fusionado a GST em gel de SDS-PAGE; M – marcador *BechMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen); Corante *Comassie blue*.

**Figura 29. Western blot usando anti-glucagon.** C- - controle negativo (GST (26 kDa) 3 µg de proteína total; Glucagon fusionado a GST (31,44 kDa) 3 µg de proteína; Seta indica glucagon fusionado a GST positivo no experimento; M – marcador *BechMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen).

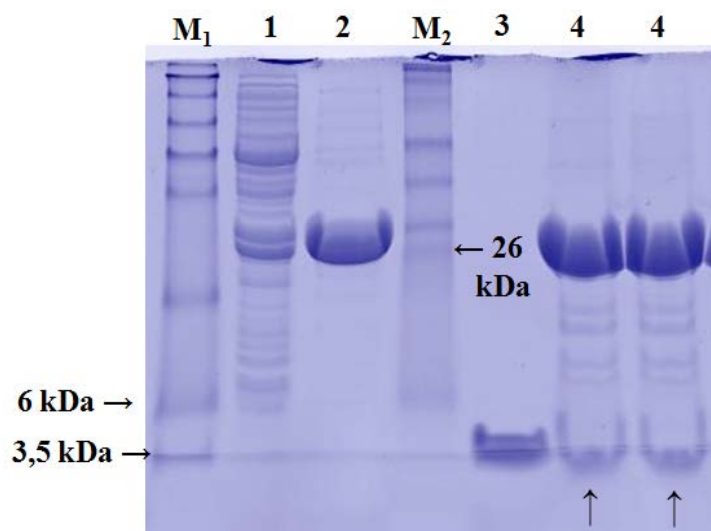




O resultado do *western blot* utilizando anti-glucagon, apresentou uma banda fraca no controle negativo (GST não fusionado). Observando o gel espelho, é possível afirmar que este resultado ocorreu devido a dois fatores: um deles pode ser a contaminação da amostra GST-glucagon de um poço para o outro, ou ainda, a contaminação da resina. O GST expresso não fusionado foi purificado na mesma resina utilizada para purificar o peptídeo glucagon fusionado. Durante o processo de eluição, resíduos de glucagon fusionado foram coletados juntamente com o GST não fusionado, resultando assim na contaminação. Este fato pode ser observado no gel espelho, uma vez que o *tag* GST apresenta 26 kDa e o peptídeo glucagon fusionado a GST apresenta 31,44 kDa.

#### 4.10 Digestão utilizando enzima enteroquinase para liberação da fusão glucagon-GST

Após a purificação do peptídeo fusionado foi realizada digestão usando a enzima enteroquinase (Invitrogen) para separar a fusão entre o peptídeo glucagon e o *tag* GST. A digestão foi analisada através de gel de eletroforese Tris-Tricina 16% (Schagger, 2006), para observar o peptídeo livre da fusão. O experimento em gel (SDS –PAGE 12 %) a liberação da fusão do *tag* GST (Figura 30).

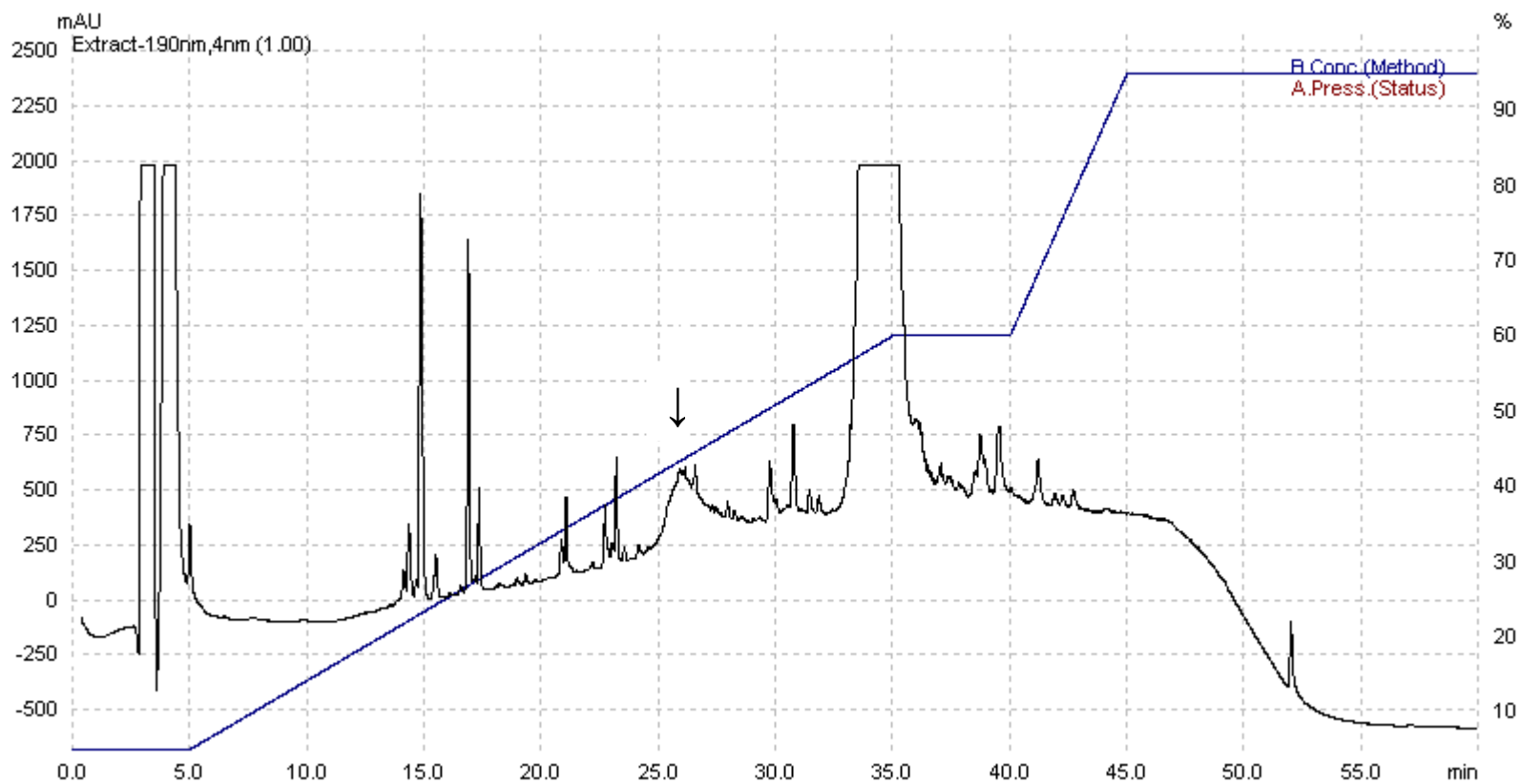


**Figura 30. Gel de Tris-Tricina 16% demonstrando a liberação da fusão entre glucagon e o *tag* GST.** 1 – expressão da proteína GST sem fusão; 2 – peptídeo glucagon fusionado semi-purificado; 3 – controle positivo (Glucagen®, Novartis 5 µg); 4 – Glucagon livre da fusão (120 µg de peptídeo fusionado digerido); Seta indica peptídeo glucagon livre da fusão após digestão; M<sub>1</sub> – *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard* (Invitrogen); M<sub>2</sub> – *BechMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen); Corante *Comassie blue*.

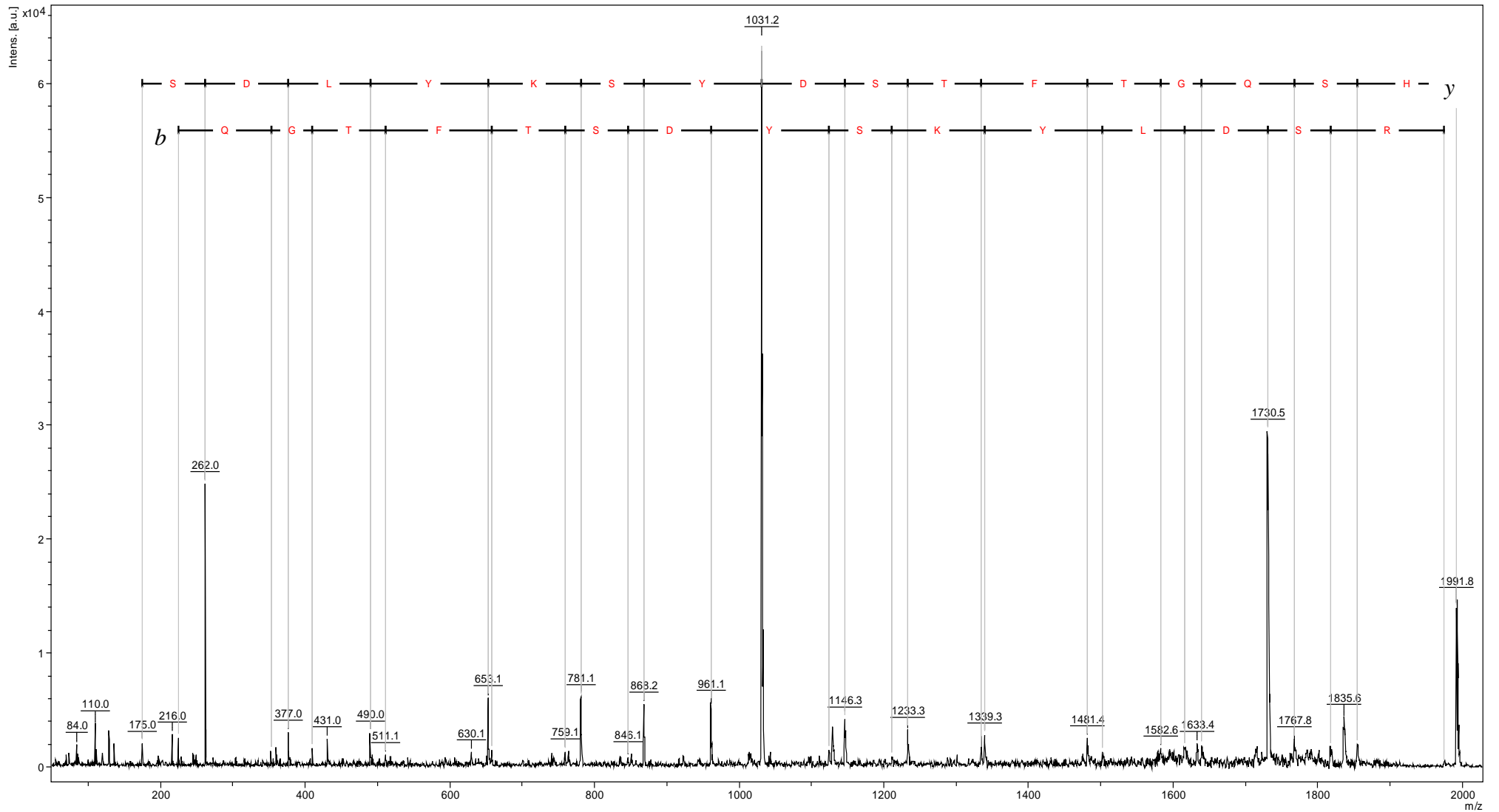
#### 4.11 – Sequenciamento do peptídeo glucagon por espectrometria de massa

Para avaliar a sequência do peptídeo glucagon, após a reação de digestão com enteroquinase, o extrato contendo peptídeo livre da fusão foi submetido a cromatografia UFLC (*ultra-high performance liquid chromatography*). Várias frações foram coletadas (Gráfico 5) e avaliadas quanto à identidade e pureza por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) operada em modo refletido e positivo. Uma fração coletada em 26 minutos apresentou uma  $[M+H]^+$  de 1.991,8 Da e, após obtenção e interpretação do espectro de sua fragmentação em modo LIFT<sup>TM</sup> (MS/MS), revelou uma sequência parcial idêntica à esperada para o glucagon a partir da porção N-terminal. A sequência contendo 16 dos 29 resíduos de aminoácidos apresentou os seguintes resíduos: H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S (Figura 31).

Pode-se concluir que o sequenciamento confirmou a tradução correta do peptídeo e demonstrou que a clivagem ocorreu no sítio exato, liberando glucagon sem a adição de resíduos de aminoácidos residuais provenientes do *tag* FLAG.



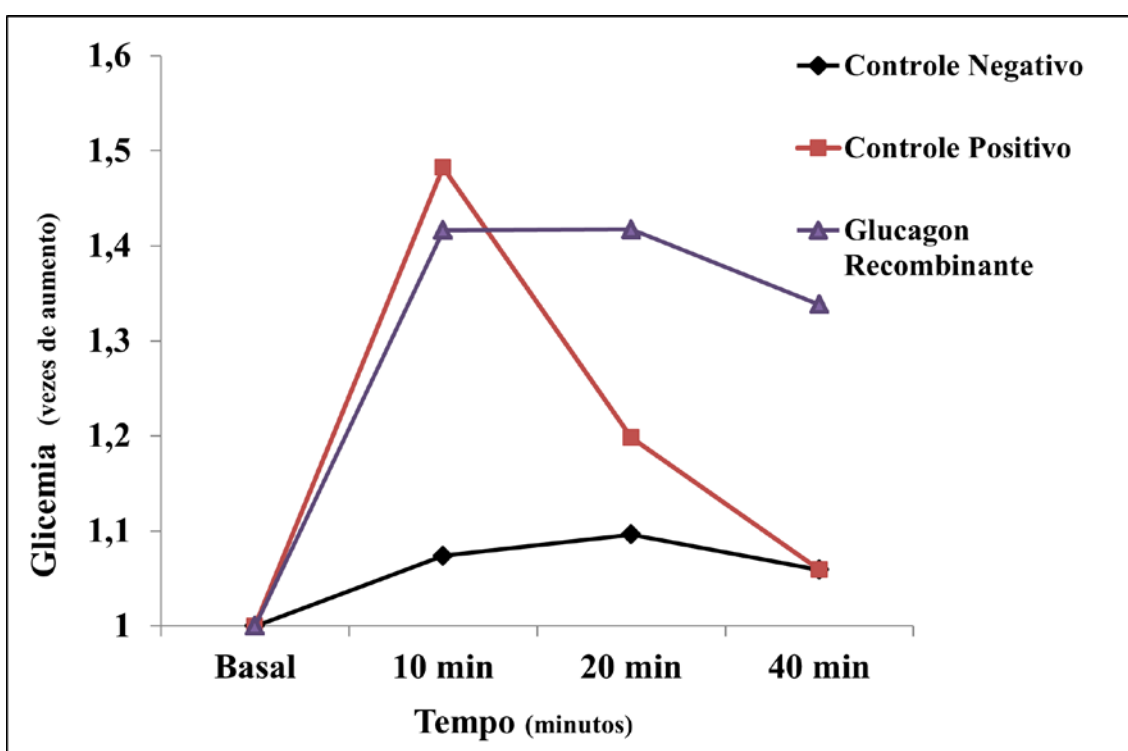
**Gráfico 5. Cromatograma dos picos coletados durante cromatografia.** Purificação do peptídeo glucagon após liberação da fusão junto a GST (figura 32) por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa RP-UPLC Seta indica o pico coletado analisado que resultou na sequência parcial do peptídeo glucagon.



**Figura 31. Sequenciamento por espectrometria de massa utilizando MALDI-TOF/TOF (modo LIFT™).** A fração de parte da sequência de 1.991,83 Da do peptídeo glucagon demonstra a porção N-terminal (y) partindo do aminoácido H (y1) e a sequência reversa (b) partindo do aminoácido Q (b2) (a pesar da ausência de b1, o mesmo revela sua presença na presença na serie y); Calibrante utilizado *peptide calibration standard II Mixture* (Bruker Daltonics); Faixa de detecção m/z de 1000-4000; Tempo de retenção da fração analisada foi de 26 min.

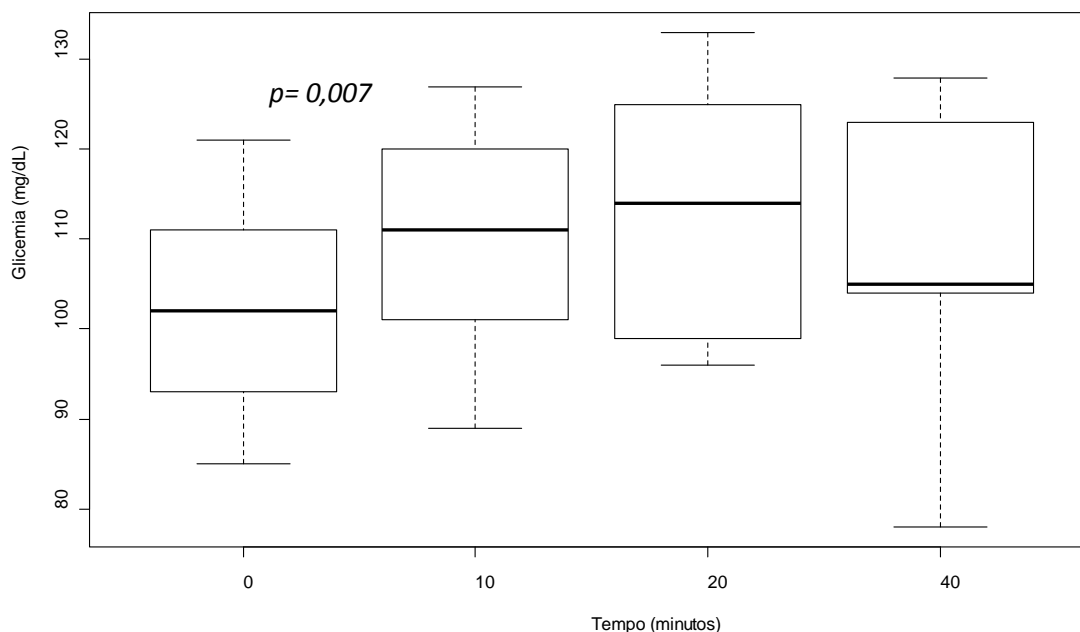
#### 4.12 Teste de atividade biológica *in vivo*

Posteriormente à confirmação da sequência parcial do peptídeo, um teste *in vivo* foi realizado para avaliar a atividade biológica do glucagon. Para isso, foi desenvolvido um ensaio monitorando níveis de glicose em ratos previamente hipoglicêmicos, avaliando os tempos 0 minuto (período anterior à aplicação da amostra), 10, 20 e 40 minutos após aplicação. Os resultados indicaram que, no tempo de 10 minutos após aplicação do glucagon, tanto para o controle positivo (Glucagen® comercial) quanto para o glucagon recombinante houve aumento significativo da glicemia, o que não foi percebido no controle negativo (Gráfico 6). Este experimento foi aprovado e obteve certificado emitido pelo comitê de ética junto à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UPIS sob o número 071/11 (Anexo2).



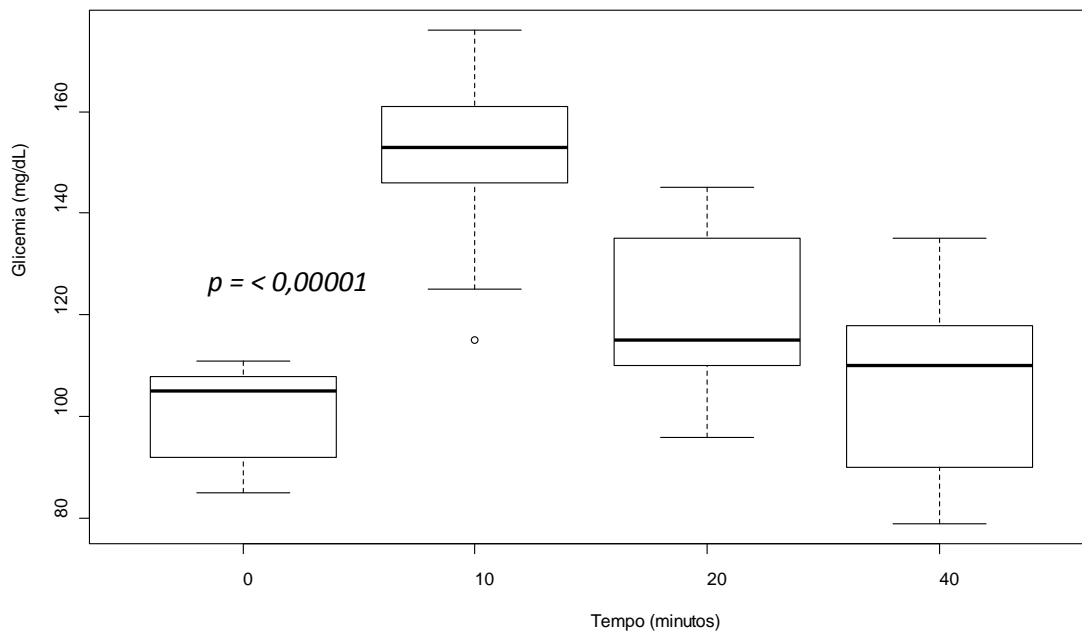
**Gráfico 6.** Teste de atividade biológica *in vivo*. Média glicêmica dos 3 grupos monitorados durante o tempo de 0 a 40 minutos antes e após a aplicação das amostras. Controle negativo (água); controle positivo (Glucagen comercial Novartis®).

Os resultados indicaram que o peptídeo recombinante glucagon está ativo. Porém, para validar o resultado obtido foi aplicado um modelo estatístico linear generalizado misto, utilizando a média glicêmica do tempo de 10 minutos de cada tratamento como parâmetro de comparação entre os tempos 0 (basal), 20 e 40 minutos. O controle negativo apresentou glicemia um pouco elevada, devido ao estresse dos animais durante a manipulação dos mesmos. Porém, não houve um aumento significativo após aplicação de água nos animais entre os tempos basal e 10 minutos, principal tempo avaliado no ensaio (Gráfico 7).



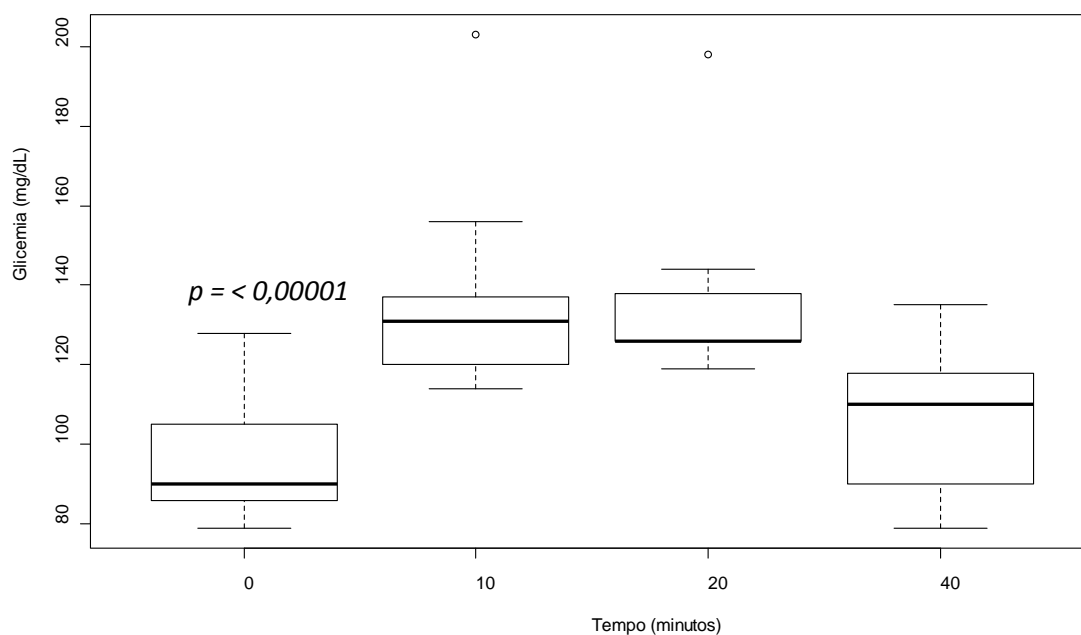
**Gráfico 7. Análise estatística do tratamento do controle negativo.** Os tempos 0 (basal) e 10 minutos, 10 e 20 minutos e 10 e 40 minutos foram analisados. Controle negativo (água). *p* significativo é < que 0,05.

No grupo dos animais do controle positivo, houve aumento significativo de glicemia, como esperado, após aplicação do fármaco Glucagen®, quando comparado somente no tempo basal e 10 minutos (Gráfico 8).



**Gráfico 8. Análise estatística do tratamento do controle positivo.** Os tempos 0 (basal) e 10 minutos, 10 e 20 minutos e 10 e 40 minutos foram analisados. Controle positivo (Glucagen comercial Novartis®). *p* significativo é < que 0,05.

No grupo de animais de glucagon recombinante houve aumento glicêmico significativo (Gráfico 9) entre os tempos 0 e 10 minutos e 10 e 40 minutos, porém entre os tempos 10 e 20 minutos não houve significância ( $p = 0,09015$ ).



**Gráfico 9. Análise estatística do tratamento do glucagon recombinante.** Os tempos 0 (basal) e 10 minutos, 10 e 20 minutos e 10 e 40 minutos foram analisados. *p* significativo é < que 0,05.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de biossimilares no Brasil e glucagon

A produção de peptídeos e proteínas com atividade terapêutica é um campo de grande destaque na biotecnologia atual. Atualmente 151 proteínas recombinantes foram aprovadas pela FDA e pela Agência Européia de Medicina para diferentes tratamentos (HUANG et al., 2012). Vários sistemas de expressão foram desenvolvidos no decorrer dos anos no sentido de obter maior quantidade de produto em custos mínimos de produção, como o sistema em procariotos. Estima-se que 30% de todas as proteínas e peptídeos produzidos na indústria farmacêutica utilizam *E.coli* como sistema heterólogo (HUANG et al., 2012). Este mercado é extremamente promissor, tanto, que em 2009 a indústria gastou 90 bilhões de dólares testando a atividade de 400 fármacos em humanos. Apesar de patentes expiradas de alguns produtos e da crise financeira global, as empresas farmacêuticas continuam crescendo, principalmente devido à venda de anticorpos monoclonais e hormônios (HOU et al., 2011). As patentes expiradas de alguns fármacos (AZEVEDO, 2010) e o alto custo gerado na aquisição dos mesmos pelo Brasil, motivou o Governo Federal a criar a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, que estimula empresas brasileiras a produzir biossimilares e genéricos (ÍNTEGRA BRASIL, 2011). Em 2011, uma parceria público privada firmada pelo Governo Federal assinou vários acordos para a produção de 4 novos medicamentos para doença de Parkinson, AIDS, artrite reumatóide e doença de Crohn, resultando numa economia de compra de R\$ 700 milhões em 5 anos (CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2011). Dentre os medicamentos, que o Brasil atualmente apresenta interesse em produzir, encontra-se o peptídeo glucagon (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2009).



## 5.2 Expressão do peptídeo glucagon

Visando obter uma metodologia de produção inicial em pequena escala, o peptídeo glucagon foi subclonado em um vetor de expressão previamente escolhido, *pGEX4-t3*. Análises *in silico* foram feitas para observar a presença de códons raros, pois estes podem dificultar a tradução, diminuir a expressão, traduzir de forma imatura, aumentar a quantidade de *frameshifts*, deleções e mini incorporações na proteína recombinante (frequentemente associada a códons raros agrupados) (HUANG et al., 2012). No presente trabalho, após análises *in silico*, foram detectados códons raros na sequência de glucagon obtida no banco de dados. Estes códons foram substituídos por outros, baseando-se em uma tabela (*Condon Usage in E.coli*) e novamente analisado.

Para que a produção de um fármaco seja satisfatória, três pontos devem ser analisados: expressão, solubilidade e purificação (HIROSE et al., 2011).

### 5.2.1 Expressão

O sistema utilizado para a expressão do peptídeo foi bacteriano, em espécie de *E. coli*. Este sistema foi escolhido por estar bem caracterizado geneticamente, apresentar um rápido crescimento celular e principalmente, ser o melhor sistema para proteínas não glicosiladas (CHOU, 2007; HUANG et al., 2012), apesar de que Wacker et al., (2002) já tenha aperfeiçoado este sistema tornando cepas *E.coli* capazes de produzir proteínas glicosiladas. A cepa de *E. coli* selecionada para a expressão foi a *BL21(DE3)*. Esta cepa foi escolhida por produzir durante a expressão baixas quantidades de acetato (ácido acético). O acetato é um produto formado durante a expressão aeróbica e, em altas quantidades diminui o pH, prejudicando o crescimento celular e conseqüentemente a

expressão da proteína de interesse (CHOU, 2007; HUANG et al., 2012). Também possui deficiência na atividade de proteases e membrana altamente permeável para inserção de vetores (HUANG et al., 2012). O melhor tempo de expressão de glucagon foi entre 4 a 5 horas após indução com IPTG, cuja análise por densitometria (Gráfico 2) entre os tempos não determinou diferença significativa. A produção de glucagon fusionado alcançou entre 40 a 50% da expressão total; quantidade pouco acima dos 39% utilizando este sistema de *tag* para a expressão (YONG et al., 2012). Porém, mostrou estar dentro da faixa esperada para proteínas solúveis, de acordo com trabalho descrito por Pacheco et al. (2012). O promotor *taq*, presente no vetor, contribuiu para o nível de expressão elevado. Este promotor “forte” é um dos mais utilizados em pesquisas de bancada e na indústria farmacêutica (Tabela 6) (HUANG et al. 2012).

**Tabela 6. Promotores mais utilizados para produção de moléculas terapêuticas em *E.coli*.**

Promotores	Características Chave	Características Chave
<i>lac</i>	IPTG	Expressão Relativamente Baixa
<i>tac, trc</i>	IPTG	Expressão em Níveis Altos
T7	IPTG	Expressão em Níveis Muito Altos
<i>Phage λ</i> pR, pL	Temperatura	Expressão em Níveis Altos
<i>PhoA</i>	Depleção de Fosfato	Expressão em Níveis Altos
<i>plux</i>	Homoserina Lactona	Expressão em Níveis Altos

Fonte: HUANG et al. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.39,n.3,p.383-399. 2012. Com Adaptações.

As temperaturas usadas para clonagem e expressão foram distintas entre si. Durante a clonagem, a temperatura ideal para manipulação das cepas bacterianas foi de 37°C, entretanto, para a expressão a temperatura ideal de crescimento e produção de proteínas recombinantes foi de 30°C, caso semelhante ao trabalho de Wen (2000) e Bommarius (2010). De acordo com Huang et al., (2012) uma temperatura atípica, neste caso 37°C, causa um aumento de estresse na cepa bacteriana e favorece a expressão da proteína recombinante. Porém, este estresse pode comprometer a quantidade e a

integridade da proteína, o que não foi observado no presente trabalho. Foram feitas expressões a 17 (dados não apresentados), 25 e 37°C para confirmar a temperatura de 30°C como ideal para a expressão do peptídeo (Figuras 24, 25 e 26).

A concentração de indutor IPTG que apresentou melhor expressão foi de 0,25 mM, uma quantidade aceitável para custos de produção em larga escala, uma vez que este indutor é oneroso e, em alguns casos, tóxico para algumas cepas bacterianas (o que não se aplicou a este trabalho) e ao meio ambiente (EINSFEDTS et al., 2011; HIROSE et al., 2011). Uma alternativa para substituir este indutor seria a adição de grande quantidades de lactose (JIA et al. 2011; XU et al. 2010), gerando uma indução na expressão. Açúcares como lactose, presentes em meio de cultura são convertidos em alolactose, que induz o início da expressão (AFFONSO, 2000). Porém, Kroll et al., (2011) utilizaram a lactose no meio de cultura em 0 e 24 horas após o início da expressão, o que talvez não seja vantajoso para o glucagon, uma vez que a expressão de 16 horas demonstrou degradação do mesmo. No entanto, a utilização de grandes quantidades de lactose é indicada em sistemas que utilizam biorreatores, o que não foi utilizado durante a expressão do glucagon recombinante. Além disso, a indução por lactose é melhor empregada em vetores contendo o promotor T7 (JIA et al. 2011), o qual não foi usado neste trabalho. Desta forma, optou-se pela utilização de IPTG como indutor. As expressões foram feitas nas concentrações de 0,5 e 1 mM de IPTG para confirmar a concentração de 0,25 mM como ideal para utilização na expressão do peptídeo (Figuras 24, 25 e 26).

### 5.2.2 Solubilidade

O peptídeo foi observado na fração solúvel, resultado devido ao *tag* GST e a temperatura de 30°C. O *tag* GST é utilizado frequentemente, pois apresenta a

característica de agregar solubilidade às proteínas. Porém, algumas proteínas podem se tornar insolúveis apesar de estarem fusionadas a *tags*, tais como GST, MPB (maltose-binding-protein) e Trx (tioredoxina), acarretando custos adicionais para a solubilização das mesmas. A presença de glucagon na fração solúvel é importante para o custo de produção final, pois algumas proteínas terapêuticas recombinantes formam corpos de inclusão durante a expressão, agregando custos, diminuição da quantidade produzida e em alguns casos perda da atividade (WALLS & LOUGHRAN, 2011). Temperaturas menores do que a convencional, podem diminuir o crescimento celular e a expressão da proteína, porém previne a síntese de outras proteínas no citoplasma, que influenciam na agregação de proteínas e formação de corpos de inclusão. Este fato poderia explicar uma das razões da solubilidade do peptídeo glucagon neste trabalho, assim como de outras moléculas mencionadas na literatura, tais como interferon  $\alpha$ -2 e o hormônio de crescimento (HEARN & ACOSTA, 2001; HIROSE et al., 2011; DISCIPIO et al., 2011). Pacheco e colaboradores (2012) sugeriram que, a utilização de pequenas quantidades de indutor auxilia na solubilidade da proteína, pois geram estresse menor para a célula bacteriana.

### 5.2.3 Purificação parcial

Para evitar problemas comuns em expressão, proteínas e peptídeos de interesse são expressos fusionados a *tags*, que foram criados ou isolados para auxiliar no processo de cromatografia (WALLS & LOUGHRAN, 2011). Além disso, a expressão e purificação de peptídeos é mais simplificada utilizando sistema de *tags* fusionados (GAO, 2010). A purificação parcial do glucagon ocorreu utilizando cromatografia de afinidade contendo resina *glutathione sepharose*. O peptídeo fusionado a GST após a purificação indicou aproximadamente 90% de pureza, após análise por densitometria.

Este dado corrobora com o trabalho de *Harper & Speicher (2011)*, os quais relatam que a utilização deste sistema de purificação atinge aproximadamente 90% de pureza da proteína fusionada. A quantidade de glutathione reduzida utilizada para eluir o peptídeo fusionado foi de 20 mM, pois a quantidade inicial de 10 mM indicada pelo fabricante, não foi suficiente para eluir totalmente as proteínas fusionadas presente na resina.

Inúmeros trabalhos mencionam uma alta produção de peptídeos usando sistemas de *tags* fusionados, tais como Trx e GST (GAO, 2010). Em 1 litro de expressão, não utilizando fermentador, a quantidade de glucagon fusionado semi purificado obtida apresentou uma estimativa de 6,5 a 7 mg. Uma ampola de Glucagen® apresenta 1 mg de glucagon, ou seja, em um litro de expressão de glucagon recombinante, poderiam ser produzidos de 6 a 7 ampolas do peptídeo comercialmente.

Wen e col. (2000) obtiveram em seu trabalho 80 mg por litro de expressão de glucagon. Porém, a duração de expressão de glucagon foi de 23 horas, o que provavelmente contribuiu para uma quantidade elevada. Uma das possíveis causas para a produção elevada de glucagon é a monitoração de pH 9, feita pelo autor durante as 23 horas de expressão.

Contudo, é possível afirmar que a utilização de escalonamento e de equipamentos apropriados, além de baratear o custo final consequentemente aumentará o rendimento de glucagon consideravelmente.

### 5.3 Análise do crescimento celular antes e após a indução com IPTG

A avaliação do crescimento celular de cepas *BL21 (DE3)* contendo o vetor *pGEX4-t3* antes e após indução utilizando o indutor IPTG, revelou que células induzidas demonstraram uma diferença de crescimento quando comparada a células não induzidas. As células presentes em meio contendo indutor demonstraram crescimento

menor, o que era esperado, uma vez que o crescimento celular é menor para favorecer o processo de expressão. Adicionalmente, Einsfeldts e colaboradores (2011) argumentam que, a presença de um promotor “forte”, como o caso deste trabalho, induz a uma queda de crescimento, pois o metabolismo das células está sobrecarregado. Curiosamente, as células *BL21(DE3)* contendo o vetor de expressão (*pGEX-4T-3 GST/Glucagon*), que não foram induzidas cresceram mais do que células *BL21 (DE3)*. De acordo com Chou (2007) a literatura relata um melhoramento bioquímico, genético e metabólico nos sistemas de expressão, e conseqüentemente nos vetores, no decorrer dos anos, no intuito de aumentar os níveis de expressão e de densidade celular em meio de cultura. Isto poderia explicar o significativo aumento celular das cepas contendo o vetor de expressão quando comparado à células *BL21(DE3)*, uma vez que alguma região presente no vetor comercial poderia estar favorecendo um maior crescimento.

#### 5.4 Digestão usando enteroquinase para liberar a fusão glucagon-GST

A remoção de um *tag* da proteína de interesse é fundamental, pois sua permanência pode causar perda de função ou alteração na estrutura, o que não condiz com os padrões de proteínas terapêuticas (EINHAUER & JUNGBAUER, 2001; WALLS & LOUGHRAN, 2011). A utilização de *tags* fusionados a proteínas de interesse facilita a purificação e permite que a proteína permaneça na fração solúvel. No caso de peptídeos, como o glucagon, a fusão é imprescindível, pois a bactéria *E. coli* degrada peptídeos produzidos no citoplasma (WHEN et al., 2001; KIM et al., 2011). Para auxiliar neste contexto, foram desenvolvidas cepas deficientes em proteases (BROWN, 2010), como a utilizada neste trabalho. Porém, mesmo com a atividade proteolítica diminuída, esta ainda está presente, acentuando-se em relação aos peptídeos recombinantes produzidos pela *E.coli*.

Para a remoção de GST da fusão ao glucagon, uma reação de digestão utilizando a enzima enteroquinase foi montada, pois o sítio de clivagem para Trombina presente no vetor de expressão não foi o escolhido para este estudo. O uso da trombina foi descartado, pois, durante análises *in silico*, o seu sítio de clivagem poderia deixar um resíduo de aminoácidos na cadeia N-terminal do glucagon, podendo inviabilizar sua atividade. Entretanto, o sítio de clivagem da enzima enteroquinase não demonstrou a permanência de resíduos de aminoácidos na sequência do glucagon. Assim, as condições indicadas para a digestão, de acordo com o fabricante, foram de 37°C durante 20 minutos, na proporção de 1 unidade de enzima para cada 20 µg de proteína fusionada. A atividade da enzima enteroquinase na digestão apresentou 74% de eficiência no sítio de clivagem à jusante, quando a sequência da proteína liberada da fusão inicia-se com histidina (HOSFIELD & LU, 1999). Contudo, existem relatos na literatura de que a atuação da enteroquinase apesar de apresentar um sítio de clivagem específico (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (SUN et al., 2011), possui uma atividade inespecífica, inclusive clivando outros peptídeos ligados aos *tags* (KUO & CHASE, 2011, GASPARIAN et al., 2011; YOUNG, 2012). Contudo, a atividade inespecífica da enzima pode ser reduzida diminuindo a temperatura da digestão para 22-23°C por 16 horas, como relatado na literatura por Zhao et al. (2011), Sun et al. (2011), Meng et al. (2011), ou ainda, deixar à temperatura ambiente por 8 horas (CAO et al., 2011). Neste trabalho, a digestão ocorreu na temperatura de 22°C por 16 horas, uma vez que, a incubação à temperatura ambiente poderia resultar na perda da atividade ou degradação parcial do glucagon.

A proporção de enzima para proteína fusionada na reação de digestão difere na literatura quando comparada às instruções do fabricante. O fabricante indica 1 unidade para cada 20 µg de proteína fusionada, porém, na literatura descreve-se a utilização de 1

unidade para cada 500 µg de proteína fusionada (ZHAO et al., 2011), ou 0,5 unidades para cada 1 miligrama de proteína fusionada (CAO et al., 2011) ou ainda 1 unidade para cada 1 miligrama de proteína fusionada (SUN et al., 2011). Neste trabalho, as proporções da concentração indicadas pelo fabricante foram utilizadas para a reação de digestão utilizando enteroquinase.

A enzima enteroquinase é de custo elevado, o que restringe o seu uso para produção na indústria farmacêutica, apesar de ser utilizada para a produção de alguns fármacos (GAO, 2010; SUN et al., 2011; GASPARIAN et al, 2011). Porém, várias alternativas podem solucionar a questão do custo, tais como, a imobilização da mesma em resina de agarose glioxil, que proporciona a sua reutilização, podendo chegar a 18 vezes e ao mesmo tempo diminuir a atividade inespecífica de clivagem (GAO et al., 2010; PEPELIAEV et al., 2011) ou ainda a produção autônoma da enzima. Comparando as duas opções, a segunda alternativa seria mais vantajosa, devido a sua utilização na clivagem da fusão GST ao glucagon. A produção em larga escala de enteroquinase também pode reduzir os custos de produção do peptídeo, ou ainda, poderia ser utilizada para outras estratégias de produção de proteínas recombinantes. Portanto, este será um dos próximos objetivos deste trabalho, cuja produção ocorreu pela primeira vez em 1988 (EINHAEUER, A. & JUNGBAUER, 2001) e teve seu processo de produção patenteado anos mais tarde.

#### 5.5 Confirmação da presença do peptídeo glucagon semi purificado e sequenciamento parcial de resíduos de aminoácidos

A análise utilizando anticorpos policlonais anti-glucagon demonstrou a presença do peptídeo glucagon fusionado ao *tag* GST. O anticorpo usado foi escolhido devido à sua especificidade única pelo glucagon, pois alguns peptídeos pertencentes à família do



mesmo, tais como GLP-1 e GLP-2, que apresentam sequências semelhantes, poderiam indicar um resultado falso positivo. A maioria dos anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente não oferece esta opção de especificidade apenas por glucagon.

A análise feita por Espectrometria de Massa confirmou a presença de 16 (**H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S**) dos 29 resíduos de aminoácidos do peptídeo glucagon, indicando a conservação de uma grande parte da sequência. Conforme relatado na literatura, os resíduos de aminoácidos próximos à porção N-terminal Histidina (1), Asparagina (9) e Serina (16) são extremamente importantes para a ligação do peptídeo ao receptor e conseqüentemente para a sua atividade (KAHN, 2009). Na sequência obtida por Espectrometria, foram encontrados os 3 resíduos de aminoácidos importantes para a interação (H, D e S), o que reforça a preservação da atividade do glucagon. Apesar de não conseguir sequenciar todo o peptídeo, a região do domínio C-terminal também é essencial para a ligação de alta afinidade ao receptor de glucagon (KAHN, 2009). No ensaio de atividade *in vivo* ficou evidenciada a atividade do peptídeo, o que reforça a integridade dos resíduos de aminoácidos não sequenciados.

Conclui-se que, através do sequenciamento, confirmou-se que a tradução ocorreu corretamente e que a atividade desempenhada pela enzima enteroquinase foi eficiente, clivando no sítio esperado e não deixando nenhum resíduo de aminoácido pertencente ao FLAG.

## 5.6 Análise cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa RP-UFLC

A purificação utilizando sistema de UFLC com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Vydac), foi utilizado com êxito para o sequenciamento do peptídeo. Apesar das soluções utilizadas na cromatografia serem em pH 3, ótimo para o glucagon, que apresenta solubilidade em pH abaixo de 3 e acima de 10 (STAINER, 2011), apenas

fragmentos do peptídeo foram identificados em espectrometria de massa, após a separação no tempo de 26 minutos. Uma alternativa para a purificação seria recromatografar o peptídeo livre da fusão, após digestão, em resina de afinidade para reter o GST livre e coletar o peptídeo glucagon. Outras metodologias também serão empregadas para purificar o peptídeo, tais como, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. A utilização de cromatografia de filtração em gel seria utilizada para separar o peptídeo por massa molecular, uma técnica muito utilizada pela indústria para proteínas recombinantes (JASON, 2011). Além disso, Sun (2011) utilizou a cromatografia de troca iônica para purificação após digestão utilizando enteroquinase, e obteve um grau de pureza maior que 95%, valor este exigido pelos órgãos regulamentares brasileiros (ANVISA, 2011).

### 5.7 Teste de atividade biológica

O estudo de moléculas utilizando animais em procedimentos científicos é voltado para vários ramos de interesse, tais como em diagnósticos (<5%), universidades (25%), desenvolvimento de medicamentos (30%), testes de toxicidade (40%) e novos produtos (5%) (CARAZIN, 2004).

O teste de atividade biológica deste trabalho ocorreu, baseando-se nos ensaios de Hinke (2000). A média de peso dos grupos neste experimento foi de 200 a 230 g. No trabalho já mencionado os animais apresentavam peso com média de 270 g, porém outros autores como Rosic (2010) utilizaram em seus experimentos animais de 200 a 250 g. Os animais (ratos) foram deixados em jejum por 16 horas antes do início do ensaio. Porém, um grupo de ratos foi excluído do jejum e sua glicemia foi mensurada para avaliar se os ratos em jejum estavam ou não hipoglicêmicos (grupo controle). A média glicêmica dos ratos não deixados em jejum foi de 125 mg/dL, demonstrando que

os ratos que estavam em jejum (80 a 100 mg/dL) apresentavam baixos níveis de glicose. O melhor local encontrado para coletar amostras de sangue dos animais, gerando o menor estresse possível, localizou-se entre a cauda e a região do ânus, onde uma agulha estéril foi inserida e uma gota de sangue sobre a fita de medição foi coletada.

Em situações fisiológicas de estresse, observa-se um aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que libera os hormônios adrenalina e cortisol, visando a homeostasia e aumento da quantidade de energia disponível (FERNANDES et al., 2010; COSTA et al., 2011). O cortisol disponibiliza resíduos de aminoácidos como substrato para a gliconeogênese e a adrenalina ativa a glicogenólise, aumentando assim a glicose no sangue (MACEDO, 2010). Neste contexto, dos 15 ratos utilizados como controle negativo, 6 indivíduos foram eliminados por apresentarem níveis glicêmicos acima dos níveis hipoglicêmicos permitidos, devido ao estresse.

Dos indivíduos pertencentes ao controle positivo e glucagon recombinante, 6 ratos de cada grupo foram eliminados, pois não apresentaram variações de glicemia (área de dispersão, Gráficos 8 e 9), ou seja hiperglicemia. Um dos principais problemas de ensaios biológicos é a variação fisiológica entre os indivíduos de um mesmo grupo testado. No entanto, a maioria destes testes biológicos fornece um limite de confiança de 5% dentro da faixa dos 20% tolerados para este tipo de ensaio (RANG & DALE, 2008). Nos testes de atividade biológica do controle positivo e glucagon recombinante, o limite de confiança foi de 5% e significativo ( $p < 0,00001$ ), concluindo que o teste ocorreu com sucesso e a atividade é confiável. O limite de confiança do controle negativo foi menor que 0,005, neste caso conveniente, uma vez que alguns ratos apresentaram aumento de glicemia não relacionado ao peptídeo, confirmando o aumento por estresse.

Outro fator determinante para um aumento glicêmico inexpressivo é a meia vida extremamente rápida do glucagon, de cerca de 5 minutos (KAHN et al., 2009), principalmente quando metabolizado pelos rins. Contudo, uma alternativa para aumentar a meia vida das proteínas, é carrear outra molécula à proteína de interesse, como a *PEGylation*, usada principalmente em peptídeos. Esta metodologia passou a ser tão comum, que algumas proteínas já apresentam essa tecnologia, tais como G-CFS, IFN- $\alpha$ , hormônio de crescimento e fragmentos anti-TNF  $\alpha$  Fab (KAMIONKA, 2011; HUANG, 2012)

Após 10 minutos de aplicação de glucagon recombinante purificado, foi observado que o mesmo apresentava um aumento glicêmico semelhante ao controle positivo. Contudo, o peptídeo purificado demonstrou uma atividade “prolongada” nos tempos entre 10 a 20 minutos quando comparado ao controle positivo (glucagon comercial), que apresentou uma queda na glicemia entre os mesmos tempos avaliados. Uma das possibilidades deste “prolongamento” seria a presença de outras proteínas na mesma solução do glucagon recombinante, neste caso GST livre. Esta proteína estaria “prolongando” a interação do peptídeo ao seu receptor, e conseqüentemente sua atividade biológica. Contudo, é importante destacar que o receptor do glucagon é específico ao peptídeo, havendo então a necessidade de mais estudos que indiquem a causa desta atividade “prolongada”.

Para avaliar de fato o que causa este “prolongamento,” novos ensaios serão realizados adicionando mais um tempo de coleta, no intervalo de 60 minutos. O teste será realizado com grau de pureza do peptídeo acima de 95%, para descartar a interferência de qualquer outra proteína durante o ensaio.

## 5.8 Estimativa do custo de glucagon com valor da produção embutida

O uso de GST para purificação, embora barato, é demorado devido à lenta cinética de ligação à resina de afinidade. Contudo, é um dos *tags* mais utilizados e conhecidos para estudos de interações biomoleculares (WALLS & LOUGHRAN, 2011). As moléculas utilizadas no processo de produção de glucagon apresentam a vigência das patentes válidas, porém com poucos anos para seu término. (Tabela 7).

**Tabela 7.** Moléculas utilizadas no processo de obtenção de glucagon recombinante.

<b>Tecnologia Usada</b>	<b>N° da Patente</b>	<b>Ano da Patente</b>	<b>Vencimento da Patente</b>
Vetor <i>pGEX4t-3t</i>	US 5654176	1997	2017
Tag GST	US 5654176	1997	2017
Tag FLAG	US 4703004	1987	2007
Cepa <i>BL21(DE3)</i>	US 5693489	1997	2017
Enzima Enteroquinase	US 5665566	1997	2017
Resina Glutathione Sephare	US 5654176	1997	2017
Glucagen®	US 5652216	1997*	2017

Fonte: Basso, AMM. 2012. \* Primeira Patente foi depositada em 1989. Esta é uma patente estendida tipo *evergreening*.

Para definir o valor do custo final da produção de glucagon recombinante em um litro de expressão, tabelas foram elaboradas (Tabela 8 e 9).

**Tabela 8.** Aparelhos utilizados para a produção de glucagon recombinante e respectivos gastos para expressão de 1 litro.

<b>Aparelho</b>	<b>Preço (R\$)</b>	<b>Tempo Usado</b>	<b>Preço Final Gasto (R\$)</b>
Água e Esgoto	4,79*	1 Litro	0,0974
Bomba Peristáltica	0,28662**	24 horas	0,1375
Centrífuga	0,28662**	2 horas	0,9080
Fluxo Laminar	0,28662**	50 min	0,1193
Liofilizador	0,28662**	16 horas	6,4202
Milli-Q (Água)	0,28662**	1 Litro***	0,0845
Skaker	0,28662**	21 horas	4,8151
Sonicador	0,28662**	10 minutos	0,0210
<b>TOTAL</b>			<b>12,603</b>

Fonte: Basso, AMM. 2012. \*Valor de acordo com a ADASA/DF, cuja tarifa é de 4,79 R\$/0-10m<sup>3</sup>; \*\* Valor de acordo com a CEB (2011), cuja tarifa é de 0,28662 R\$/kW, incluindo encargos financeiros. \*\*\* Cálculo de energia utilizada com base na quantidade usada.

**Tabela 9.** Produtos utilizados para produção de glucagon recombinante e respectivos gastos para expressão de 1 litro.

<b>Produto</b>	<b>Preço (R\$)</b>	<b>Quantidade Usada</b>	<b>Valor Final Gasto(R\$)</b>
Ampicilina	343,00	100 µg / mL	6,9972
Benzamidina	319,60	100 mM / 15mL	3,0029
Enteroquinase 1	958,00	1 U/20 µg de proteína fusionada	1.341,20*
Enteroquinase 2	958,00	1 U/ 1mg de proteína fusionada	26,83
Extrato de Levedura	192,50	5 g / L	1,9629
Glutationa reduzida	189,20	20 mM / 500mL	58,1979
IPTG	225,98	0,25 mM / L	13,4740
KCl	188,70	2,7 mM / 15mL	0,077
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	421,60	1,8 mM / 15mL	0,2095
NaCl	11,90	5 g / L	0,1021
NaCl	11,90	140 mM / 15mL	0,1663
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	491,30	10 mM / 15mL	1,4152
PMSF	323,00	100 mM / 15mL	84,3999
Ponteiras	34,50	1	0,345
<i>Glutathione Sepharose</i>	2703,99	4 mL	108,1596
Triptona	218,25	10 g / L	4,7223
TrisHCl	501,50	50 mM / L	3,9518
<b>Total com Enteroquinase 1</b>			<b>1.625,33</b>
<b>Total com Enteroquinase 2</b>			<b>314,0136</b>

Fonte: Basso, AMM. 2012. Cotações feitas com produtos Acumedia, Axygen, Invitrogen, GE, Himedia, Sigma e Vetec. \* Valor passível de mudança dependendo da concentração utilizada para a digestão.

O gasto total utilizado para produzir glucagon em 1 litro de meio de cultura, incluindo produtos e aparelhos utilizados, foi de R\$ 326,61. Em 1 litro de expressão obteve-se um valor de 6,5 a 7 mg de glucagon semi-purificado. Desta forma, dividindo esse valor pela quantidade de 7 miligramas de glucagon produzido em 1 litro de expressão tem-se R\$ 46,65. Ou ainda, em 1 litro de expressão produziu uma quantidade

de proteína purificada de 6,5 miligramas, tem-se o custo final de sua produção é R\$ 50,24.

O peptídeo comercial custa em torno de R\$ 150,00 (Brasília) e R\$ 100,00 (São Paulo), contendo 1 miligrama de glucagon. Portanto, em 1 litro de expressão é possível fazer cerca de 7 ampolas de peptídeo glucagon ao preço final de 3,3 vezes (7 mg) ou 3 vezes (6,5 mg) menos em Brasília e 2,1 vezes (7 mg) ou 1,9 vezes (6,5 mg) menos em São Paulo, comparando-se com o produto comercial Glucagen®.

O preço do peptídeo vendido em drogarias, possivelmente, não é o mesmo repassado ao Governo Federal. Infelizmente não foi possível obter o custo de uma unidade do fármaco adquirido pelo Ministério da Saúde. Entretanto, como se observa na Tabela 4, é possível saber o preço, em Euros, que a empresa produtora do Glucagen® cobra por 1 unidade do produto, o qual é de EUR 22,73. De acordo com a cotação do dia 13 de Março de 2012, EUR 1,00 euro equivalia a R\$ 2,27 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2012). Portanto, o preço de EUR 22,73 do produto comercial glucagon corresponde a R\$ 51,59, valor ligeiramente mais caro quando comparado aos R\$ 46,65 ou R\$ 50,24 gastos com a produção do peptídeo recombinante. Deve ser mencionado que, para o produto europeu, impostos e taxas seriam incididos sobre este valor convertido de euros para reais, devido à importação.

Ademais, o fato de que a proteína estar semi purificada, indica que outro processo de cromatografia será utilizado para a purificação a níveis aceitáveis (> 95%). Desta forma, é possível que o preço de custo final mencionado, não seja o definitivo.

Uma das causas para aumentos no custo dos fármacos nacionais e importados são os impostos cobrados sobre os mesmos. Uma possibilidade para diminuir o preço final cobrado ao consumidor, seria a diminuição de tributação sobre o preço pago pelo consumidor, que é de 23% aproximadamente. Esta idéia é discutida para os

medicamentos genéricos (SFAIR, 2011), porém poderá ocorrer uma extensão para similares, que o Governo Federal irá produzir.

Um fator determinante no custo final é o emprego de produção em larga escalada, que pode diminuir gastos e aumentar a eficiência da expressão. Dessa forma alguns produtos utilizados durante o processo de produção do produto, poderiam ser usados em quantidades menores, sem que houvesse perda de qualidade na obtenção do fármaco, como o caso dos reagentes PMSF e Glutathione reduzida. A enzima enteroquinase foi utilizada na concentração de 1 unidade para cada 20 µg de proteína GST fusionada a glucagon. Esta proporção encareceu o custo final de produção e influenciou a utilização de proporções menores. Foi encontrado na literatura diversos trabalhos indicando o uso de enteroquinase na proporção de 1 unidade para cada 1 miligrama de proteína fusionada (SUN et al., 2011). Como não havia conhecimento, até então, se a enzima clivaria de maneira satisfatória, foi preferível utilizar a proporção indicada pelo fabricante da enzima. Após a confirmação, por sequenciamento via MALDI TOF-TOF, de que a proteína apresentava sua sequência a partir da porção N-terminal íntegra (Figura 31) e a atividade demonstrada era confiável (Gráficos 7 a 9), certamente será possível usar a enzima nas proporções indicadas na literatura. Desta forma, o valor embutido ao custo final de produção foi da proporção de 1 unidade para 1 miligrama de enteroquinase, apenas para verificar o custo final utilizando esta concentração. Contudo, apesar de se utilizar uma proporção que diminui o custo, o valor final é de R\$ 26,83. Desse modo, como perspectiva deste trabalho, propõe-se a produção de enteroquinase em escala laboratorial e industrial, visando à diminuição de gastos com a produção de glucagon recombinante.

O levantamento do custo de produção, em níveis de bancada, foi realizado apenas como uma estimativa no sentido de averiguar se o valor gasto resultaria na



viabilidade do processo de produção. O valor do custo, como mencionado anteriormente, foi elevado principalmente devido ao preço da enzima enteroquinase. Contudo, a produção da mesma poderá não só baratear o custo de produção do peptídeo glucagon, bem como ser usada em outras estratégias de produção.

### 5.9 Síntese química de glucagon ou produção em *E.coli* de glucagon

A produção de biofármacos e biossimilares utilizando microorganismos pode ser dispendioso, como no caso do poli(3-hidroxi-butarato) (PHB), um tipo de poliéster proveniente de fontes renováveis. Este poliéster é produzido por uma série de bactérias do solo (*Alcaligenes eutrophus* e *Rhodospirillum rubrum*), podendo ser utilizado em implantes médicos e substrato para crescimento celular. A utilização comercial deste polímero atualmente encontra dificuldades devidas, dentre muitos fatores, ao seu alto custo de produção. Na literatura, afirma-se que a síntese química é altamente eficiente, contudo é complexa e de custo elevado (LI, 2011). Além disso, o autor afirma que a síntese química não é uma plataforma ideal para produção em larga escala para peptídeos. A síntese de substâncias com propriedades semelhantes (ROA, 2010) ou de forma simplificada, é uma alternativa para sintetizar a molécula alvo.

Desta forma, para comparar o valor gasto na compra por síntese química peptídica e o valor gasto na obtenção peptídica utilizando *E.coli* (em 1 litro de expressão), foi feita uma cotação da síntese de 5 mg de peptídeo glucagon com níveis acima de 95% de pureza (Tabela 10).

**Tabela 10.** Cotação de custo da síntese de glucagon e respectivas empresas.

<b>Empresa</b>	<b>Grau de Pureza</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor (USD\$)</b>
China Peptides	> 95%	1-5 mg	300,00
GenScript	> 95%	1-4 mg	464,00
RS Synthesis	> 90%	5 mg	581,25

Fonte: Basso, AMM. Cotação de custo da síntese de glucagon, na quantidade de 1 a 5 mg, com níveis de pureza > de 95%.

Apesar do pedido da pureza ser acima de 95%, a empresa *RS Synthesis* enviou uma cotação com grau de pureza inferior. Sabendo que a cotação em reais do dólar americano no dia 13 de Março de 2012 era de R\$ 1,7162 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2012), o custo da síntese mais barata do peptídeo glucagon foi de R\$ 514,86. Este valor é elevado quando comparado ao custo final de produção em reais deste trabalho, R\$ 326,61 para 7 mg de peptídeo obtido em 1 litro de expressão, do que os 5 mg cotado custando R\$ 514,86.

Desta forma, neste caso, é mais viável economicamente produzir o peptídeo utilizando *E.coli*. do que sintetizá-lo quimicamente.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos pelo presente trabalho e seus resultados, conclui-se que a expressão do peptídeo glucagon foi realizada com sucesso, uma vez que se obteve de 6,5 a 7 mg do produto em 1 litro de expressão, sem a utilização de qualquer tecnologia de escalonamento. Deste modo, é possível afirmar que o emprego de escalonamento para a expressão resultará em uma quantidade maior de peptídeo e um custo menor de produção.

Atualmente a utilização de sistemas de expressão integrados a *tags* são muito utilizados na indústria farmacêutica, por apresentar baixo custo, facilitar a purificação, aumentar a densidade celular, e, principalmente, gerar grandes quantidades de proteína na fração solúvel, o que foi observado neste trabalho.

A expressão de glucagon fusionado a GST apresentou vários pontos interessantes. A temperatura durante a expressão foi atípica, porém influenciou positivamente na expressão. A quantidade do indutor IPTG utilizada foi relativamente baixa, favorecendo o custo final. O melhor tempo de expressão foi em um intervalo de 4 a 5 horas, sem diferenças significantes.

A utilização da enzima enteroquinase para separação do *tag* GST do peptídeo glucagon encareceu o custo final de produção. Algumas alternativas podem diminuir este custo, como a utilização de proporções menores de enzima–proteína fusionada, reutilização por imobilização ou a produção autônoma da enzima.

O peptídeo glucagon foi semi purificado, a sequência a partir da extremidade N-terminal parcialmente obtida e a atividade biológica confirmada.

## 7. PERSPECTIVAS

Os próximos experimentos visam a obtenção, através de cromatografia de troca iônica ou filtração em gel, do peptídeo puro. Após a purificação, novas análises serão feitas para o sequenciamento do restante dos resíduos de aminoácidos via MALDI TOF-TOF.

Além disso, o ensaio de atividade biológica será repetido, adicionando mais um ponto de monitoramento glicêmico (60 minutos), no intuito de, observar a prolongação do nível elevado de glicose após aplicação do glucagon recombinante em ratos.

Alguns produtos no processo de obtenção do peptídeo terão sua quantidade reduzida ou serão substituídos, no intuito de diminuir o custo final, sem que isso cause problemas no processo de purificação ou perda de atividade.

A produção de enteroquinase se faz necessária, uma vez que seu custo é elevado. Neste contexto, propõe-se o desenvolvimento de processos de produção de enteroquinase, bem como a sua purificação e utilização nos procedimentos de clivagem seja com glucagon e GST ou outras proteínas de interesse.

Por fim, estudos serão feitos para realizar um escalonamento do processo de produção do peptídeo glucagon, produzido neste trabalho em níveis de bancada.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSEN, N. et al. Regulation of glucagon receptor in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270,n.26,p.15853-15857. 1995.

AFFONSO, R. **Estudo da Expressão Citoplasmática Bacteriana de uma Forma de Prolactina Humana e de sua Solubilização e Renaturação a Partir de Corpos de Inclusão**. 2000, 117 f. Tese (Doutora Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo – USP.

AGARWAL, D. R. et al. **Application to add glucagon to the model list of essential medicines**. Disponível em: <[http://www.who.int/selection\\_medicines/committees/expert/18/applications/Glucagon/en/](http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/applications/Glucagon/en/)> Acesso em: 19 de fev de 2012.

ALBERTS, B. JOHNSON, A., LEWIS, J. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Editora Artmed. Porto Alegre, 2004.

ALMEIDA, H. et al. Drugs obtained by biotechnology processing. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.2,p.199-207. 2011.

AMES, J. & SOUZA, D.Z. Counterfeiting of drugs in Brazil. **Revista Saúde Pública**, Ahead of print, p.0-0, São Paulo, Jan, 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº55, 16 de Dezembro de 2010**. 22f. Apostila. Disponível em: <[http://www.sivs.org/images/stories/RDC\\_55\\_\\_2010.pdf](http://www.sivs.org/images/stories/RDC_55__2010.pdf)> Acesso em: 04 de jul de 2011. (a)

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Registro de produtos biológicos. Bases legais e guias. Coletânea**, 2011. 462f. Apostila. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/935aed0048bd2755a7cdaf9a6e94f0d0/Registro\\_Produtos\\_Biologicos\\_Hemoterapicos\\_10102011\\_WEB.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/935aed0048bd2755a7cdaf9a6e94f0d0/Registro_Produtos_Biologicos_Hemoterapicos_10102011_WEB.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em 15 de jan de 2012.

AZEVEDO, Valderilio Feijó. Estamos preparados para prescrever biossimilares? **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 50,n.3, São Paulo, 2010.

ANZOLINO, M.R. **Concessão de licença compulsória, no Brasil, para produção de medicamentos antirretrovirais patenteados: uma breve análise do caso efavirenz, nelfinavir e kaletra**. 2009. 66 f. Monografia (Bacharel em Direito) – Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

BANCO CENTRAL DO BRASIL. Taxas de câmbio. Disponível em: <<http://www4.bcb.gov.br/pec/taxas/port/PtaxRPesq.asp?idpai=TXCOTACAO>> Acesso em: 13 de Mar de 2012.

BARBOSA, D.B. **Inconstitucionalidade das Patentes Pipeline**. 2006. Disponível em: <<http://denisbarbosa.addr.com/pipeline.pdf>> Acesso em: 08 de jul de 2011. 74f.

BARREIRO, E.J.L. & PINTO, A.C. Generic Pharmaceutical Drugs: Import Them, Till When? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n.5, p. 776, 2010.

BLATT, C.R. et al. General awareness and use of generic medication among citizens of Tubarão, state of Santa Catarina, Brazil. **Ciência Saúde Coletiva**, v.17,n.1,p.79-87, 2012

BOMMARIUS, B. et al. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in Escherichia coli. **Peptides**, v.31,n.11,p.1957-1965. 2010.

BORG, M.A. et al. Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v.99,n.2,p.361-365. 1997.

BORG, W. et al. Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v.93,n.4,p.1677-1682. 1994.

BRAUN, M. & RORSMAN, P. The glucagon-producing alpha cell: an electrophysiologically exceptional cell. **Diabetologia**, v.53,p.1827-1830, 2010.

BROWN, T.A. **Gene cloning & DNA analysis: an introduction**. 6 ed. Editora John Wiley & Sons. 2010.

CALDERON, B.D. & ESCALANTE, I.M.M. Medicamentos e Biosimilares Controverias Científicas y Legales. **Farmacia Hospitalaria**, v.34, n.1, p.29-44, 2010.

CAO, J. et al., Expression and purification of a natural N-terminal pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1 PLAD) and preliminary activity determination. **The Protein Journal**, v.30,p.281-289. 2011.

CARIAS, C.M., et al. Medicamentos de Dispensação Excepcional: Histórico e Gastos do Ministério da saúde do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.45,n.2,p.233-240, 2011.

CAZARIN, K.C.C. et al. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40,n.3,p.289-299. 2004.

CHEN, V.J. et al. Glucagon-Like insulinotropic peptide analogs, compositions, and methods of use. **United States Patent**, n.5,512,549. 1996.

CHOU, C.P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in Escherichia coli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.76,p.521-532. 2007

CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM SAÚDE. **Informe**. v.4,n.26, 8 f. 2011

COSTA, M.B. et al. Possível relação entre estresse ocupacional e síndrome metabólica. **HU Revista**, v.37, n.1,p.87-93. 2011.

DAY, J.W et al. A New Glucagon and GLP-1 Co-Agonist Eliminates Obesity in Rodents. **Nature Chemical Biology**, v.5, p.749-757, 2009.

DECLERCK, P. Biologicals and biosimilars: a review of the science and its implications. **Generics and Biosimilars Initiative Journal**, v.1,n.1,p.13-16. 2012.

DISCIPIO, R.G. et al. Expression of soluble proteins in *Escherichia coli* by linkage with the acidic propiece of eosinophil major basic protein. **Protein Expression and Purification**, v.79,p.72-80. 2011.

EINHAEUER, A. & JUNGBAUER, A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification or recombinant proteins. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.49,p.455-465. 2001.

EINSFELDT, K. et al., Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of influence of kanamycin and IPTG concentration on cell grown, recombinant protein production and plasmid stability. **Vaccine**, n.29, p.7136-7143. 2011.

EMA – European Medicines Agency. Evaluation of Medicines for Human Use. **Guideline on Similar Biological Medicinal Products**, 2005. 7 f. Disponível em: <[http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003517.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003517.pdf)> Acesso em: 22 de mai de 2011.

**ESTADÃO**. Disponível em:  
<[http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100827/not\\_imp601086,0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100827/not_imp601086,0.php)>  
Acesso em: 08 de out de 2011. 2010.

FARINAS, C. S. Cromatografia IMAC: **Estudos de Adsorção de Glucagon e Insulina em Sílica-IDA-ME2+**. 2001. 108 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas – SP.

FERNANDES, P.M. et al. Abordagem odontológica em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. **Pediatria (São Paulo)**, v.32,n.4,p.274-280. 2010.

FERRO, E.S. Biotecnologia Translacional: Hemopressina e Outros Peptídeos Intracelulares. **Estudos Avançados**, v.24, n.70.p.109-121, 2010.

FILHO, S.B. **Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos no Brasil: estratégias de Fomento**. 2006. 192 f. Dissertação (Doutor) - Universidade de São Paulo – SP.

FURATA, M. et al. Severe Defect in Proglucagon Processing in Islet A-cells of Prohormone Convertase 2 Null Mice. **Journal of Biological Chemistry**. v.276,n.29. p.27197-27202, 2001.

GADELHA, C. **Seminário Valor Econômico Perspectivas do Setor Saúde no Brasil. A Perspectiva do Complexo Industrial da Saúde: o Desenvolvimento Industrial e Científico do Setor e Rumos para a Assistência Farmacêutica**. Disponível em:  
<<http://www.interfarma.org.br/site2/images/carlos%20gadelha.pdf>> Acesso em: 27 de ago de 2011.

- GAO, M. et al. Production and purification of an analog of glucagon-like peptide-1 by auto-induction and on-column cleavage in *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.26,p.1675-1682. 2010.
- GASPARIAN, M.E. et al. Strategy for improvement of enteropeptidase efficiency in a tag removal processes. *Protein Expression and Purification*, v.79,p.191-196. 2011.
- GEETHING, N.C. Gcg-XTEN: An improved glucagon capable of preventing hypoglycemia without increasing baseline blood glucose. *PLoS ONE*, v.5n.4,p.e10175. 2010.
- GHODKE, S. et. al. Mapping out the multistage fibrillation of glucagon. *FEBS Journal*, v.279, n.5,p.752-765. 2011.
- GROMADA, J. et al.  $\alpha$ -cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine Reviews*, v.28,n.1,p.84-116. 2007.
- HABEGGER, K.M. et al. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature Reviews Endocrinology*, v.6,p.689-697. 2010.
- HARPER, S. & SPEICHER, D.W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Protein Chromatography*, v.681,n.2,p259-280. 2011.
- HARVEY, R.A. & FERRIER, D.R. **Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry**. 5 ed. Editora Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore. 2011
- HAVEL, P.J. et al. Pancreatic sympathetic nerves contribute to increased glucagon secretion during severe hypoglycemia in dogs. *The American Journal of Physiology*, v.270,p.E20-E26. 1996.
- HAYASAKI, M.W.H. et al. Histologic distribution of insulin and glucagon receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.31,n.2,p.243-256. 1998
- HEARN, M.T.W. & ACOSTA, D. Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for purification of recombinant proteins. *Journal of Molecular Recognition*, v.14,p.323-369. 2001
- HEPPNER, K.M. et al. Glucagon Regulation of Energy Metabolism. *Physiology & Behavior*, v. 100. p.545-548. 2010.
- HINKE, S.A. et al. Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) degradation of glucagon. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275,p.3827-3834. 2000.
- HIROSE, S. et al. Development and evaluation of data-driven designed tags (DDTs) for controlling protein solubility. *New Biotechnology*, v.28,n.3,p.225-231. 2011.
- HO, R.J.Y. & GIBALDI, M. **Biotechnology and Biopharmaceuticals: Transforming Proteins and Genes into Drugs**. 1 ed. Editora John Wiley & Sons. New Jersey. 2003.



HOSFIELD, T. & LU, Q. Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)<sub>4</sub>Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein. **Analytical Biochemistry**, v.269,p.10-16. 1999.

HOU, J.J.C. New frontiers in cell line development: challenges for biosimilars. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, n. 86,p.895-904. 2011.

HUANG, C.J. et al. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.39,n.3,p.383-399. 2012.

ÍNTEGRA BRASIL - Agência de Integração à Saúde, Meio Ambiente e Desenvolvimento Social do Brasil. **III Fórum Nacional Sobre Inovação e Tecnológica na Área de Saúde no Brasil**. Disponível em:  
<<http://www.acaoresponsavel.org.br/acao/2011/ciclosaude/forum07042011.htm>>  
Acesso em: 28 de mar. de 2011. 3f.

**INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial**. Disponível em:  
< [http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/patente/pasta\\_oquee](http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/patente/pasta_oquee)> Acesso em: 08 de jul de 2011 (a).

**INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial**.

Disponível em:

<[http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:CGcXAaea\\_AQJ:www.inpi.gov.br/menu-superior/imprensa/informacoesparaimprensa/Planilhas\\_acoes\\_relevantes\\_Pipeline.pdf+Levantamento+junto+ao+Judici%C3%A1rio+A%C3%A7%C3%B5es+de+Relev%C3%A2ncia+-+Pedido+de+Extens%C3%A3o+de+Prazo+de+Patente+Pipeline&hl=pt-BR&gl=br&pid=bl&srcid=ADGEESgUW2vIC6y1KmKI9dix\\_T87E15\\_M-d1hRp\\_IH\\_yTVsIknC-\\_il486jHYWA-TrNoRbTxMw8E-5P1OfMusSyddrF0NcZgSXjLTBzvuLUUSzIVDm8E9477WLIFwV-J7ZqWYPXKX7y8&sig=AHIEtbTTTTFQrhQgsvsGE0J9X8TrNWlzQw](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:CGcXAaea_AQJ:www.inpi.gov.br/menu-superior/imprensa/informacoesparaimprensa/Planilhas_acoes_relevantes_Pipeline.pdf+Levantamento+junto+ao+Judici%C3%A1rio+A%C3%A7%C3%B5es+de+Relev%C3%A2ncia+-+Pedido+de+Extens%C3%A3o+de+Prazo+de+Patente+Pipeline&hl=pt-BR&gl=br&pid=bl&srcid=ADGEESgUW2vIC6y1KmKI9dix_T87E15_M-d1hRp_IH_yTVsIknC-_il486jHYWA-TrNoRbTxMw8E-5P1OfMusSyddrF0NcZgSXjLTBzvuLUUSzIVDm8E9477WLIFwV-J7ZqWYPXKX7y8&sig=AHIEtbTTTTFQrhQgsvsGE0J9X8TrNWlzQw)>  
Acesso em: 20 de ago de 2011. 19f. mai de 2010 (b).

JASON, J.C. **Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications**. 3 ed. Editora John Wiley & Sons. New Jersey. 2011

JIA, L. et al. From shake flasks to bioreactors: survival of *E.coli* cells harboring pGST-hPHT through auto-induction by controlling initial content of yeast extract. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90,p.1419-1428. 2011.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2004.

KAHN, C.R. et al. **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14 ed. Editora Artmed. São Paulo, 2009.

KAMIONKA, M. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.12,p.268-274. 2011.

- KIM, S.G. et al. Production and solid-phase refolding of human glucagon-like peptide-1 using recombinant *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.78,n.2,p.197-203. 2011.
- KIMBALL, S.R. et al. Glucagon Represses Signaling Through the Mammalian Target of Rapamycin in Rat liver by Activating AMP-activated Protein Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n.52, p.54103-54109, 2004.
- KROLL, J. et al., A novel plasmid addiction system for large-scale production of cyanophycin in *Escherichia coli* using mineral salts medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89,p.593-604. 2011.
- KUO, W.H.K. & CHASE, H.A. Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metals ions. **Biotechnology Letters**, n.33,p.1075-1084. 2011.
- LEE, H. et al. Improvement in erythropoiesis-stimulating agent-induced pure red-cell aplasia by introduction of darbepoetin- $\alpha$  when the anti-erythropoietin antibody titer declines spontaneously. **Journal of Korean Medical Science**, v.25,n.11,p.1676-1679. 2010.
- LI, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. **Protein Expression and Purification**, v.80,p.260-267. 2011.
- LOPES, R.D. et al. **Tratado de Medicina de Urgência e Emergência: Pronto-Socorro e UTI**. 2 vols.1 ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2011.
- LOURENÇO, A.L. et al. Gestão das inovações incrementais, o caso Omeprazole. **Química Nova**, v.33,n.4,p.1000-1004, 2010.
- MACEDO, I. C. **Estresse crônico associado à dieta hipercalórica em ratos wistar: parâmetros ponderais e bioquímicos**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestre em Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.
- MALLAT, A. et al. A glucagon fragment is responsible for the inhibition of the liver  $Ca^{2+}$  pump by glucagon. **Nature**, v.325,n.6105,p.620-622, 1987.
- MALLISON, C.N. et al. A glucagonoma syndrome. **Lancet**, v.2,n.7871,p.1-5. 1974.
- MARQUES-DA-SILVA, A.C. et al.  $Ca^{2+}$  dependence of gluconeogenesis stimulation by glucagon at different cytosolic  $NAD^+$ - $NADH$  redox potentials. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30,n.7,p.827-836, 1997.
- MENG, E. et al. Functional expression of spider neurotoxic peptide huwentoxin-I in *E.coli*. **PLoS ONE**, v.6,n.6,e21608,p.1-5. 2011
- MICMACHER, E. et al. Growth hormone secretion in response to glucagon stimulation test in healthy middle-age men. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.7, p. 853-858, Rio de Janeiro, 2009

**MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA.** Seleção pública MCT/FINEP/FNDCT. Subvenção econômica à inovação. Disponível em: <[http://www.finep.gov.br/fundos\\_setoriais/subvencao\\_economica/documentos/Subven%C3%A7%C3%A3o%20preliminar%2013-07-2009.pdf](http://www.finep.gov.br/fundos_setoriais/subvencao_economica/documentos/Subven%C3%A7%C3%A3o%20preliminar%2013-07-2009.pdf)> Acesso em: 10 de fev de 2010.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE.** Portaria 2.577/GM de 27 de 27 de Outubro de 2006. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2006/GM/GM-2577.htm>> Acesso em: 28 de mar. de 2011.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE.** Portaria 978 de 16 de Maio de 2008. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2008/GM/GM-978.htm>> Acesso em: 28 de mar. de 2011.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE.** Portaria 110 de 10 de Março de 2010. Disponível em: <[http://www.dohms.com.br/sites\\_columbia/files/sempr%203/2/pcdt\\_hipopituitarismo.pdf](http://www.dohms.com.br/sites_columbia/files/sempr%203/2/pcdt_hipopituitarismo.pdf)> Acesso em: 06 de jun. de 2011.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde. Componentes especializados da assistência farmacêutica,** 2012. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=34025&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=34025&janela=1)> . Acesso em: 20 de jan de 2012.

**MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DO PARANÁ. Fim de patente do viagra anima farmacêuticos.** 2010. Disponível em: <<http://www.mp.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2130>>. Acesso em: 10 de fev de 2012.

NELSON, D. L. & COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 4 ed. Editora Sarvier. São Paulo, 2006.

NIEDERWIESER, N. & SCHMITZ S. Biosimilar agents in oncology/hematology: from approval to practice. **European Journal of Haematology**, v.86. p.277-288, 2010.

NWOBIKE, J. C. Empresas farmacêuticas e acesso a medicamentos nos países em desenvolvimento: o caminho a seguir. **Sur - Revista Internacional de Direitos Humanos**, v.3, n.4, Jun. São Paulo, 2006.

PACHECO, B. et al. A screening strategy for heterologus protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. **Protein Expression and Purification**, v.81,p.33-41. 2012.

**PAUTA DO DIA.** Jornalismo Policial. Disponível em: <<http://robertatrindade.wordpress.com/page/56/>> Acesso em: 08 de ago de 2011. 2008.

PEPELIAEV, S. et al. High level expression of human enteropeptidase light chain in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v.156,p.67-75. 2011

PIMENTA, C.G. **O Ambiente Institucional da Biotecnologia Voltada para a Saúde Humana no Brasil**. 2008. 133f. Dissertação (Mestre em Desenvolvimento Sustentável) - Universidade de Brasília – DF.

**PORTAL DE EDUCAÇÃO**. Disponível em:  
<<http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/noticias/43107/generico-de-antidepressivo-volta-ao-mercado-com-permissao-da-justica>> Acesso em: 08 de out de 2011.

PÚBLIO, R.N. **Análise de solicitações de medicamentos excepcionais prescritos aos usuários de planos privados de saúde no estado de Minas Gerais**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestre em Enfermagem) – Universidade Federal de Minas Gerais – MG.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. 2010.

RANG, H.P. & DALE, M.M. **Farmacologia**. 6 ed. Editora Elsevier. São Paulo, 2008.

RIBEIRO, S.M. et. al. Identification of a Passiflora alata Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins. **Peptides**, v.32,p.868-874. 2011.

ROA, J.P.B. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxitirato-co-ε-caprolactona) a partir de poli(3-hidroxitirato) e Poli(ε-caprolactona). **Polímeros**, v.20,n.3,p.221-226. 2010.

ROHDEN, F. **Quantificação e análise da expressão do mRNA de proglucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV e modulação in vitro destes genes por ácidos graxos monoinsaturados (cis ou trans) e glicose em jejuno proximal de obesos Grau III submetidos a cirurgia bariátrica(RYGB)**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestre em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS.

In press: RORSMAN, P. et al. Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ - cell in health disease. **Cell Calcium**, 2011.

ROSENBERG, G., et al. Análise Comparativa da Concentração Industrial e de Turnover da Indústria Farmacêutica no Brasil para os segmentos de medicamentos de Marca e Genéricos. **Economia e Sociedade**. V.19, n.38, p. 107-134. Campinas, 2010.

ROSIC, M. Glucagon effects on ischemic vasodilatation in the isolated rat heart. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, article ID 231832. 2010.

SAFINA, A. et al. Dual Elimination of the Glucagon and GLP-1 Receptors in Mice Reveals Plasticity in the Incretin Axis. **The Journal Clinical Investigation**, v.121,n.5, p.1917-1929, 2011

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **The condensed protocols. From molecular cloning: A laboratory manual**. 1 ed. Editora CSHL. 2006.

SASKI, K. et al. X-ray analysis of glucagon and its relationship to receptor binding. **Nature**, v.257,p.751-757. 1975.

SCHAGGER, H. Tricine SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v.1,p.16-22, 2006.

SECCO, A. et al. The glucagon test in the diagnosis of growth hormone deficiency in children with short stature younger than 6 years. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.94,n.11,p.4251-4257. 2009.

SFAIR, S.A. et al. Estratégias empresariais para medicamentos genéricos no Brasil: um estudo com as dez maiores empresas do setor. **Revista Ibero-Americana de Estratégia**, v.10,n1,p.1-25. 2011.

SMITH, G.C. Atypical antipsychotic drugs induce derangements in glucose homeostasis by acutely increasing glucagon secretion and hepatic glucose output in the rat. **Diabetologia**, v.51.p.2309-2317. 2008.

SPAREMBERGER, R.F.L. & ZONOELO, M. O Impacto das Patentes Farmacêuticas no Brasil e o Direito Social à Saúde como Direito Humano Fundamental: O Longo Caminho da Tecnologia à Realidade. **Revista Jurídica Cesumar – Mestrado**, v.10, n.2, p.389-412, 2010.

STAINER, S.S. Stabilized Glucagon Solutions. **United States Patents Application Publication**, US2011/0097386A1. 2011.

STURM, N.S. et al. Structure activity studies of hydrophobic amino acid replacements at positions 9, 11, and 16 of glucagon. **The Journal of Peptide Research**, v.49, n.4,p.293-299. 1997.

SUN, Y.L. et al. Soluble fusion expression and production of rabbit neutrophil peptide-1 in *Escherichia coli*. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16,n.5,p.6618-6629. 2011.

QUESADA, I. et al. Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. **Journal of Endocrinology**, v.199,p.5-19, 2008.

UNSON, C.G. et al. Glucagon antagonists: contribution to binding and activity of the amino-terminal sequence 1-5, position 12, and the putative  $\alpha$ -helical segment. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264,n.2,p.789-794. 1989.

UTZIG, M.F.K. et al. Verification of the adherence of a community to generic medicines after seven years of implantation of the law. **Visão Acadêmica**, v.10,n.2. Jul, 2010.

VALADARES, C. **DOSEMENSAL**. Boletim do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde. Brasília – Brasil: 2009. 2p. Boletim. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dose\\_mensal\\_3\\_2.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dose_mensal_3_2.pdf)> Acesso em: 10 de mai de 2011.

VANZ, A.L.S. **Clonagem, superexpressão, purificação e caracterização da proteína recombinante humana fator estimulador de colônias de granulócitos**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestre) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS.

VARDANEGA-PEICHER, et al. Comparative effect of glucagon and isoproterenol on hepatic glycogenolysis and glycolysis in isolated perfused liver. **Brazilian Archives or Biology and Tecnology**, v.46, n.4,p.563-568. Dec. 2003.

VIEIRA, F. S. Gasto do Ministério da Saúde com medicamentos: tendência dos programas de 2002 a 2007. **Revista de Saúde Pública**, v.43,n.4,p.674-681, 2009.

VIEIRA, F. S. Assistência Farmacêutica no Sistema Público de Saúde do Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.27,n.2,p.149-156, 2010.

VUGUIN, P.M. & CHARRON, M.J. Novel insight into glucagon receptor action: lessons from knockout and transgenic mouse models. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.13,n.suppl.1,p.144-150. 2011.

THORPE, R. & SWANSON, S.J. Current methods for detecting antibodies against erythropoietin and other recombinant proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12,n.1,p.28-39. 2005.

TITTMANN, K.C. et al. Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the human glucagon-like peptide-1 receptor. **Biochemistry**, v.49,p.7956-7965. 2010.

TONG, J. & SANDOVAL, D.A. Is the GLP-1 system a viable therapeutic target for weight reduction? **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v.12,p.187-195. 2011

WACKER, M. et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. **Science**, v.298, n.5.599,p.1790-1793. 2002.

WAGMAN, M.E. et al. Proton NMR studies of the association and folding of glucagon in solution. **FEBS Letters**, v.119,n.2,p. 265-270. 1980.

WALLS, D. & LOUGHRAN, S.T. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification. **Protein Chromatography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v.681, n.1,p.151-175. 2011.

WALLS, D.; MCGRATH, R.; LOUGHRAN, S.T.. A digest of protein purification. **Protein Chromatography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v.681,n.1,p.3-23. 2011.

WHEN, C. ET AL. Secretion expression of recombinant glucagon in *Escherichia coli*. **Science in China (series C)**, v.44,n.3, 2001.

WHO. World Health Organization. **Memorandum**. Disponível em: <  
[http://www.who.int/selection\\_medicines/committees/expert/18/applications/Mendis.pdf](http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/applications/Mendis.pdf)>  
Acesso em: 19 de fev de 2012.

WRIGHT, D.E. & RODBELL, M. Glucagon 1-6 binds to the glucagon receptor and activates hepatic adenylate cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.254,n.2,p.268-269. 1979.

XOU, D. et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*. **Plasmid**, v.64,p.85-91. 2010.



YOSHIDA, W.B. Studies on biosimilar medications. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.9,n.3,p.141-144, 2010.

YOUNG, C.L. et al. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology journal**, v.7, p.1-15. 2012.

ZHAO, T. et al., Expression of human globular adiponectin-glucagon-like peptide-1 analog fusion protein and its assays of glucose-lowering effect in vivo. **International Journal of Medical Sciences**, v.8,n.3,p.203-209. 2011.

## 9. ANEXOS

- Anexo 1

 GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
SUBSECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
DIRETORIA DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA 

OFÍCIO N.º 016 /2011 – DIASF /SAS /SES - DF

Brasília, 01 de julho de 2011.

À  
Sra. Maria de Fátima Grossi de Sá  
*Pesquisadora*  
*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - EMBRAPA*  
Brasília - DF

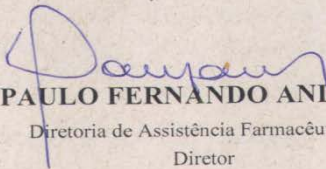
**PROTOCOLO SIGED**  
Embrapa Sede  
DRM/CSA  
PROTOCOLO GERAL  
21148  
Nº 11816 / 2011-25  
07 / 07 / 2011

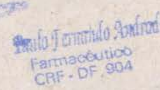
Prezada Senhora,

Em resposta ao solicitado nos documentos encaminhados a esta Diretoria em 18 e 19 de abril, informamos que infelizmente os medicamentos GLUCAGON e IFOSFAMIDA continuam com seus estoques zerados.

Ressalto que existem processos de aquisição em andamento para esses medicamentos, porém não temos previsão para que estes sejam concluídos.

Atenciosamente,

  
**PAULO FERNANDO ANDRADE**  
Diretoria de Assistência Farmacêutica /SAS  
Diretor

  
Paulo Fernando Andrade  
Farmacêutico  
CRF - DF, 904

“Brasília – Patrimônio Cultural da Humanidade”  
Diretoria de Assistência Farmacêutica  
SAIN PARQUE RURAL S/Nº Bloco “A” SALA Nº 107 ASA NORTE  
Brasília/ DF CEP: 70.086-900 – Telefone (61) 3348-6182 – Fax (61) 3348-6183  
e-mail: diasfses@gmail.com





## CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 071/11 "Avaliação da atividade biológica do peptídeo recombinante glucagon *in vivo*.", do experimento, sob a responsabilidade de **Fernanda Mulinari** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – UPIS), em reunião de 05/10/2011.

**Nº de animais utilizados:** 12 ratos.

**Validade do parecer:** 05/10/2012.

Brasília, 08 de dezembro de 2011.

Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA CAMPEBELL  
Presidente – CEUA-UPIS

ADÉLIO CUNHA CHIBINSKI  
Secretário – CEUA-UPIS