

## L-ASPARAGINASE DE SORO DE CUTIA (*DASYPROCTA* SP.). III — ANTICORPOS PRECIPITANTES ANTIENZIMA \*

Vera Lucia Garcia CALICH \*\*  
Rubens Guimarães FERRI \*\*\*

RIALA6/438

CALICH, V.L.G. & FERRI, R.G. — L-asparaginase de soro de cutia (*Dasyprocta* sp.). III — Anticorpos precipitantes antienzima. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 37:27-32, 1977.

**RESUMO:** Dez imune-soros foram estudados quanto à presença de anticorpos precipitantes anti-L-asparaginase. Após reação de precipitação em meio líquido, usando como antígeno preparação enzimática parcialmente purificada do soro de cutia, sobrenadantes e precipitados foram incubados em presença de substrato, a L-asparagina. A presença de enzima convertia a L-asparagina em ácido L-aspártico e ambos os aminoácidos eram posteriormente caracterizados por cromatografia em camada delgada de sílica-gel. Dentre os dez imune-soros, sete possuíam alto nível de anticorpos precipitantes antienzima que inibiam parcialmente a atividade catalítica da L-asparaginase. Três imune-soros possuíam anticorpos anti-L-asparaginase em baixo nível. Não foi encontrada correlação entre o conteúdo protéico dos imune-soros e o nível dos anticorpos antienzima.

**DESCRITORES:** anticorpos anti-L-asparaginase, inibição da atividade catalítica; cromatografia em camada delgada na atividade da L-asparaginase; enzima sérica de cutia.

### INTRODUÇÃO

L-asparaginase é um agente antitumoral de comprovada eficiência<sup>1, 2, 10, 21</sup>, e tem sido utilizada no tratamento de certas leucemias humanas<sup>5, 7, 9, 12</sup>. Um dos efeitos colaterais associados ao uso da enzima em pacientes leucêmicos é o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade<sup>8, 12, 13</sup>. Além de despertar fenômenos imunológicos no ser humano a L-asparaginase é também imunogênica quando inoculada em animais de experimentação<sup>19, 21</sup>. O desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase foi estudado para as enzimas obtidas de *Escherichia coli*<sup>6, 17</sup>, de soro e fígado de cobaio<sup>20</sup>, e de *Serratia marcescens*<sup>15</sup>

Em trabalhos anteriores<sup>3, 4</sup> caracterizamos imunologicamente a preparação enzimática parcialmente purificada e também o componente cromatográfico enzimaticamente ativo. O propósito do presente trabalho é a verificação da antigenicidade da L-asparaginase obtida do soro de cutia. Anticorpos precipitantes antienzima foram pesquisados em dez imune-soros obtidos por imunização de coelhos com a preparação enzimática parcialmente purificada e com soro total de cutia. Em todos os dez imune-soros demonstrou-se a presença de anticorpos antienzima, que inibiram parcialmente a atividade catalítica da L-asparaginase.

\* Realizado com o auxílio da Fundação Nacional de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Conselho Nacional de Pesquisas, Brasil.

\*\* Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

\*\*\* Do Centro de Pesquisas Imunoquímicas do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *L-Asparaginase de soro de cutia\**

A preparação enzimática do soro de cutia foi parcialmente purificada pelo método de Meister<sup>11</sup>. Será abreviadamente referida como L-Ase-Meister.

### *Imune-soros anti-L-Ase-Meister*

Obtidos como descrito anteriormente<sup>3</sup> e purificados por fracionamento com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 50% de saturação. Os soros dos seis coelhos imunizados serão referidos como I, II, III, IV, V e E, e os soros de dois animais reimmunizados serão designados como IIIR e ER.

### *Imune-soros anti-soro total de cutia*

Obtidos como descrito anteriormente<sup>3</sup>, e purificados por fracionamento salino a 50% de saturação; serão referidos como imune-soros AC e ACb.

### *Reação de precipitação em meio líquido*

Todos os imune-soros foram analisados por esta reação. Foi realizada utilizando-se volume constante de L-Ase-Meister (0,10 ml de solução contendo 1,0 g/100 ml), variando o volume de imune-soro (0,01 — 0,05 — 0,10 — 0,20 — 0,30 — 0,50 — 0,70 — 0,90 ml, correspondendo aos tubos numerados de 1 a 8). O volume final da reação foi sempre de 1,0 ml, sendo acertado com tampão borato de sódio 0,01 M, pH 8,5. A todas as séries de precipitação acrescentou-se um controle para antígeno, L-Ase-Meister (tubo 9) e um para anticorpos ou seja imune-soro (tubo 10). Os tubos permaneciam uma hora à temperatura ambiente e durante a noite em geladeira a 4°C. No dia seguinte eram separados os sobrenadantes dos precipitados. Os precipitados, lavados duas vezes com tampão borato gelado, eram finalmente ressuspensos em 0,85 ml do mesmo tampão.

### *Reação enzimática*

Aos sobrenadantes e precipitados obtidos das reações de precipitação em meio líquido foram acrescentados 0,15 ml de L-asparagina 0,1 M. As misturas eram incubadas durante uma hora em banho-maria a 37°C e a reação interrompida por banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada através da verificação da presença dos aminoácidos L-asparagina e/ou ácido L-aspártico por cromatografia em camada delgada de sílica gel. Determinou-se, previamente, que a quantidade de L-Ase-Meister usada nas reações de precipitação possuía capacidade de hidrolisar totalmente 0,15 ml de L-Asparagina 0,1 M, transformando-a em ácido L-aspártico.

### *Cromatografia em camada delgada de sílica gel*

L-Asparaginase age sobre L-asparagina transformando-a em ácido L-aspártico e  $\text{NH}_3$ . Esses aminoácidos não apresentam dificuldades de separação por cromatografia em camada delgada de sílica gel, estabelecidas as condições apropriadas para a realização da mesma. L-Asparagina e ácido L-aspártico possuem  $R_f$  diferentes e coram-se diferentemente pela ninhidrina. São facilmente reconhecíveis, possibilitando a verificação da ação da L-asparaginase sobre a L-asparagina, e a determinação da presença da enzima nos precipitados e/ou sobrenadantes das reações de precipitação.

Foram utilizadas placas de vidro (20x20cm) revestidas com camada uniforme de sílica de espessura de 500 $\mu$ . O solvente utilizado foi fenol —  $\text{H}_2\text{O}$  na proporção de 3:1, e a distância percorrida pela frente do solvente, a partir do ponto de aplicação, foi de 10 cm.

Cinco microlitros, aplicados um a um, de cada amostra eram aplicados em pontos equidistantes da placa, utilizando-se pipeta microlítrica (Hamilton).

Após corrida cromatográfica as placas secavam à temperatura ambiente e eram reveladas, após pulverização com solução de ninhidrina em acetona (0,2 g/100 ml), em estufa a 95°C.

### *Dosagem de proteínas*

Realizada pelo método do biureto segundo GORNALL *et alii*<sup>6</sup>.

## RESULTADOS

Foi verificado em trabalho anterior<sup>3</sup>, através de imunoelctroforese, que a L-Ase-Meister era composta de uma variedade de substâncias antigênicas que, quando convenientemente inoculadas em animais de experimentação, despertavam a formação de anticorpos precipitantes. Verificou-se também que a preparação obtida de soro de cutia possuía atividade enzimática<sup>4</sup>. Faltava ainda determinar a presença de anticorpos precipitantes anti-enzima nos diversos imune-soros. Para tanto foi utilizada reação de precipitação em meio líquido, reação enzimática dos sobrenadantes e precipitados e determinação da atividade enzimática através da verificação da

\* Gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Oswaldo Gonçalves de Lima, do Instituto de Antibióticos do Recife, PE.

presença de asparagina e ácido aspártico por cromatografia em camada delgada de sílica gel.

A reação enzimática dos sobrenadantes e precipitados foi realizada utilizando-se 0,15 ml de L-asparagina 0,1 M que se sabia ser totalmente hidrolisada pela quantidade de L-Ase-Meister utilizada nas reações de precipitação.

A ausência de anticorpos precipitantes anti-enzima levaria à permanência da enzima no sobrenadante que, em presença de quantidade ótima de L-asparagina, a transformaria totalmente em ácido L-aspártico.

Através dos experimentos realizados com os dez imune-soros, foi verificado que todos possuíam anticorpos precipitantes anti-enzima, pois a atividade enzimática era deslocada para o precipitado. As figuras 1 e 2 ilustram os resultados obtidos com o imune-soro do coelho I.

Verificou-se, também, que alguns imune-soros possuíam anticorpos suficientes para precipitar toda enzima contida em 0,10 ml de solução a 1 g/100 ml de L-Ase-Meister. O volume de imune-soro necessário para precipitar toda enzima contida em tal volume de preparação variou de um imune-soro estudado para outro.

Da série de experimentos realizados com imune-soros anti-L-Ase-Meister, verificou-se que 0,10 ml dos soros I, II e V continham anticorpos suficientes para arrastar toda a enzima para o precipitado e que, após a formação dos complexos asparaginase-antiasparaginase, havia inibição parcial da atividade catalítica (o sobrenadante apresentou, no cromatograma, mancha correspondente à L-asparagina e o precipitado converteu somente parte da L-asparagina em ácido L-aspártico apesar de a reação enzimática ter sido realizada com quantidade ótima de substrato) Com 0,20 ml dos imune-soros dos coelhos III e IIIR ocorreu o mesmo fenômeno. Já para os soros dos coelhos IV e ER houve necessidade de um volume maior de imune-soro (0,50 ml), para que toda a enzima contida em 0,10 ml da preparação de L-Ase-Meister se apresentasse sob a forma de precipitado, e se observasse a inibição parcial, da L-asparaginase, produzida pelos anticorpos.

Os resultados obtidos com os imune-soros dos coelhos E, AC e ACb somente permitiram a verificação da presença de anticorpos precipitantes anti-enzima. Mesmo com o maior volume de imune-soro (0,90 ml), parte da enzima permaneceu no sobrenadante.

Realizada a dosagem de proteínas totais dos diversos imune-soros (método do biureto) verificou-se não haver relação entre a quantidade de soro necessária para precipitar toda a enzima contida em 0,10 ml de L-Ase-Meister (solução 1 g/100 ml) e teor protéico dos mesmos (tabela).

TABELA

Comparação entre volumes (dos diferentes imune-soros) necessários à precipitação de toda a enzima contida em 0,10 ml da solução (1 g/100 ml) de L-Ase-Meister e teor protéico dos mesmos

Imune-soros *	Volume ml	Concentração protéica g/100 ml
I	0,10	4,7
II	0,10	3,9
III	0,20	5,2
IIIR	0,20	3,3
IV	0,50	2,1
V	0,10	3,9
ER	0,50	3,0
E	>0,90	2,0
AC	>0,90	3,1
ACb	>0,90	3,5

\* Todos os imune-soros foram purificados por fracionamento com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 50% de saturação.

## DISCUSSÃO

A capacidade de induzir a formação de anticorpos foi investigada, para a enzima obtida de culturas e *E. coli*, em animais de experimentação<sup>18</sup> e em seres humanos<sup>9, 13, 17</sup>, através de manifestações de hipersensibilidade, ou verificação *in vitro* da presença de anticorpos. O comportamento dos anticorpos dirigidos contra L-asparaginases de soro e fígado de cobaio<sup>20</sup>, bem como daqueles dirigidos contra a enzima obtida a partir de culturas de *Serratia marcescens*<sup>15</sup>, foi estudado através de várias técnicas imunológicas de investigação.

O caráter antigênico da L-asparaginase de soro de cutia foi, no presente trabalho, demonstrado. Após reação de precipitação em meio líquido entre L-Ase-Meister e imune-soros I, II, III, IIIR, IV, V e ER, verificou-se que a atividade enzimática deslocava-se totalmente para os precipitados. Com os imune-soros AC, ACb e E foi verificada também a presença de anticorpos precipitantes anti-enzima, apesar de não se obter a situação em que toda enzima se apresentasse sob a forma de precipitado. Observou-se, também, a não proporcionalidade entre a concentração protéica e o volume de imune-soro necessário para arrastar toda enzima, contida em 0,10 ml de L-Ase-Meister (em solução a 1,0 g/100 ml),

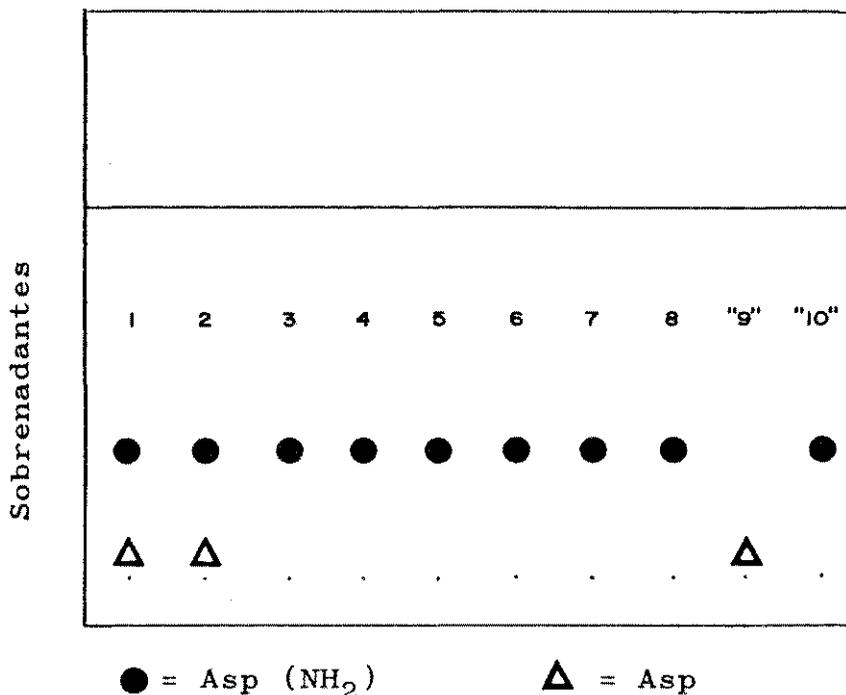


Fig. 1 — Esquema representando cromatograma da reação enzimática dos sobrenadantes obtidos da reação de precipitação em meio líquido, utilizando soro do coelho I anti-L-ASE-Meister.

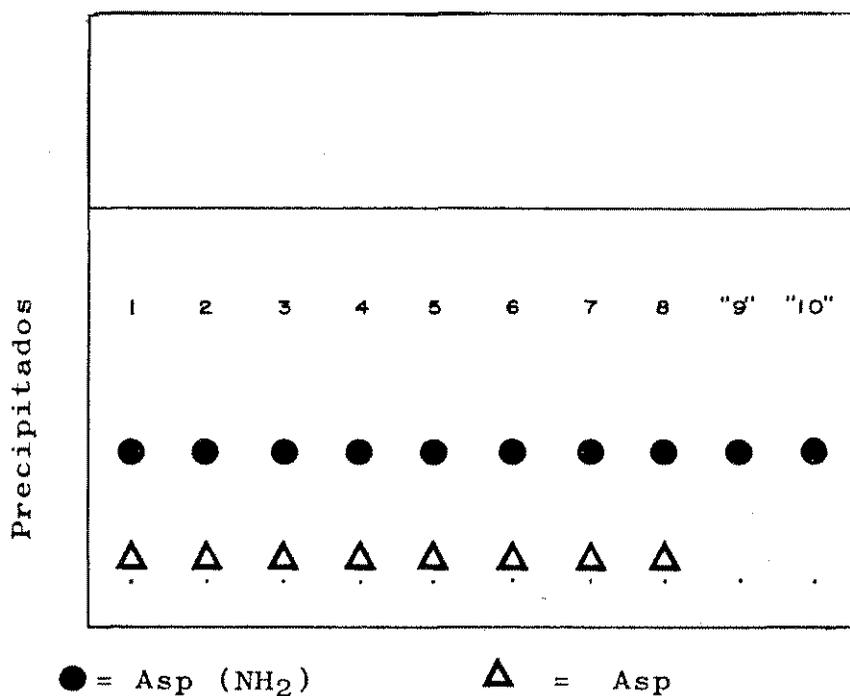


Fig. 2 — Esquema representando cromatograma da reação enzimática dos precipitados obtidos da reação de precipitação em meio líquido, utilizando soro do coelho I anti-L-ASE-Meister.

para o precipitado. Este resultado era esperado desde que, pela análise imunoelectroforética, havia sido verificada a heterogeneidade da L-Ase-Meister e a presença de anticorpos para vários constituintes séricos de cutia, nos diversos imune-soros analisados<sup>3</sup>. Assim, o conteúdo protéico dos imune-soros representa o conjunto dos anticorpos com diferentes especificidades, incluindo-se os que possuem especificidade para o componente enzimaticamente ativo.

Com os resultados das cromatografias em camada delgada de sílica gel verificou-se que anticorpos precipitantes inibem parcialmente a atividade enzimática. Essa inibição parcial poderia ter resultado de dois fatores que poderiam estar interferindo nas reações:

a) soro normal de coelho (proteínas séricas) poderia inibir a reação enzimática;

b) durante a lavagem dos precipitados poder-se-ia estar perdendo parte do complexo enzima-anti-enzima.

Para afastar a primeira hipótese montou-se uma reação nos moldes daquelas realizadas com os imune-soros, usando, no lugar destes,

soro normal de coelho. Mesmo os maiores volumes de soro normal de coelho não alteraram a atividade enzimática.

Com relação à perda parcial dos precipitados, montamos reação de precipitação em duplicata usando um mesmo imune-soro. Após a separação dos sobrenadantes, os precipitados de uma série foram lavados duas vezes com tampão borato gelado e a outra série não. As cromatografias realizadas em seguida às reações enzimáticas mostraram um comportamento idêntico para ambas as séries.

A inibição enzimática produzida por anticorpos anti-L-asparaginase foi investigada por diversos autores. PETERSON *et alii*<sup>14</sup> ROBERTS *et alii*<sup>15</sup> e YAMASHITA & NISHIGAKI<sup>20</sup> verificaram que anticorpos anti-L-asparaginase de *E. coli* inibiam parcialmente a atividade catalítica desta enzima.

SULD e HERBUT<sup>20</sup> verificaram que eram necessários diferentes volumes de imune-soros para precipitar totalmente determinada quantidade de enzima. Os resultados apresentados no presente trabalho são semelhantes aos destes autores, muito embora tenham eles trabalhado com L-asparaginases extraídas de fígado e soro de cobaias.

RIALA6/433

CALICH, V.L.G. & FERRI, R.G. — Agouti serum L-asparaginase. III — Anti-enzyme precipitating antibodies. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 37:27-32, 1977.

**SUMMARY:** Anti-L-asparaginase precipitating antibodies were studied in ten different immune-sera. It was done by precipitation reactions in liquid media using as antigen an enzyme preparation obtained by partial purification of agouti serum. Supernatants and precipitates were incubated with L-asparagine as a substrate. In the presence of L-asparaginase, L-asparagine was converted into L-aspartic acid, and both amino acids were characterized by thin-layer chromatography on silica-gel. Seven of ten immune sera exhibited high levels of anti-enzyme precipitating antibodies, and the three remaining sera contained low levels of these antibodies. A relationship was not found between the immune-sera protein concentration and antibody activity.

**DESCRIPTORS:** Anti-L-asparaginase antibodies; enzyme inhibition; L-asparaginase activity by thin-layer chromatography; agouti serum L-asparaginase.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOYSE, E.A.; OLD, L.J.; CAMPBELL, H.A. & MASHBURN, L.T. — Suppression of murine leukemias by L-asparaginase. Incidence of sensitivity among leukemias of various types: comparative inhibitory activities of guinea pig serum L-asparaginase and *Escherichia coli* L-asparaginase. *J. exp. Med.*, 125: 17-31, 1967.
2. BURCHENAL, H.H.; BENVENISTI, D. & DOLLINGER, M. — Experimental studies with L-asparaginase in mouse leukemias. *Recent Results Cancer Res.*, 33: 102-13, 1970.
3. CALICH, V.L.G. & FERRI, R.G. — L-asparaginase de soro de cutia. I. Caracterização imunológica da preparação enzimática parcialmente purificada. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. S. Paulo*, 31: 334-3, 1976.

4. CALICH, V.L.G. & FERRI, R.G. — Agouti serum L-asparaginase. II. Chromatographic fractionation and characterization of enzymatically active component. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 18: 239-45, 1976.
5. CAPIZZI, R.L.; BERTINO, J.R. & HANDSCHUMACHER, R.E. — L-asparaginase. *Ann. Rev. Med.*, 21: 433-44, 1970.
6. DOHLWITZ, A.; FRAZEN, S.; HOLM-GREEN, A.; KILLANDER, A.; WIDE, L. & AHSTRÖM, L. — Studies on antibody formation in patients treated with L-asparaginase. *Recent Results Cancer Res.*, 33: 198-203, 1970.
7. DOLOWY, W.C.; HENSON, D.; CORNET, J. & SELLIN, H. — Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. Study of mice with lymphoma and normal monkeys and report of a child with leukemia. *Cancer*, 19: 1813-9, 1966.
8. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J. & DAVID, M.M.J. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem.*, 177: 751-66, 1949.
9. HILL, J.M.; LOEB, E.; MACLELLAN, A.; KHAN, A. ROBERTS, J., SHIELDS, W.T. & HILL, N.O. — Response to highly purified L-asparaginase during therapy of acute leukemia. *Cancer Res.*, 29: 1574-80, 1969.
10. KIDD, J.G. — Regression on transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. *J. exp. Med.*, 98: 565-81, 1953.
11. MEISTER, A. — Omega-amidases. In: COLLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., ed. *Methods in Enzymology*. New York, Academic press, 1955. v. 2: 383-4.
12. OETTGEN, H.F.; OLD, L.J.; BOYSE, E. A.; CAMPBELL, H.A.; PHILIPS, F. S.; CLARKSON, B.D.; TALLAL, L.; LEEPER, R.D.; SCHWARTZ, M.K. & KIM, J.H. — Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res.*, 27: 2619-31, 1967.
13. OETTGEN, H.F.; STEPHENSON, P.A.; SCHWARTZ, M.K.; LEEPER, R.D.; TALLAL, L.; TAN, C.C.; CLARKSON, B.D.; GOLBEY, R.B.; KRAKOFF, I. H.; KARNOFSKY, D.A.; MURPHY, L.M. & BURCHENAL, J.H. — Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer*, 25: 253-78, 1970.
14. PETERSON, R.G.; HANDSCHUMACHER, R.E. & MITCHELL, M.S. — Immunological response to L-asparaginase. *J. clin. Invest.*, 50: 1080-90, 1971.
15. PHILLIPS, A.W.; BOYD, J.W.; FERGUSON, JR., D.A. & MARUCCI, A.A. — Immunochemical comparison of L-asparaginases from *Serratia marcescens* and *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 107: 461-7, 1971.
16. PINSKY, C.M.; MITCHELL, S.; OETTGEN, H.F. & SCHWARTZ, M.K. — Immune reaction to L-asparaginase in man. *Proc. am. Ass. Cancer Res.*, 11: 250, 1970.
17. REIS, H.E.; BRAUN, W. & SCHMIDT, C.G. — Antigenicity of *Escherichia coli* asparaginase. *Rev. fr. Etud. clin. biol.*, 14: 906-9, 1969.
18. ROBERTS, J.; PRAGER, M.D. & BACHYNSKY, N. — The antitumor activity of *Escherichia coli* L-asparaginase. *Cancer Res.*, 26: 2213-17, 1966.
19. SCHEIN, P. S.; RAKIETEN, N.; GORDON, B.M.; DAVIS, R.D. & RALL, D.P. — The toxicity of *Escherichia coli* L-asparaginase. *Cancer Res.*, 29: 426-34, 1969.
20. SULD, H.M. & HERBUT, P.A. — Immunological studies on guinea pig serum and liver L-asparaginases. Purification of L-asparaginases by antibody precipitation. *J. biol. Chem.*, 45: 2802-8, 1970.
21. VADLAMUDI, S.; PADARATHSINGH, M.; WARAVDEKAR, V.S. & GOLDIN, A. — Factors influencing the therapeutic activity of L-asparaginase (NSC 109229) in leukemic (L5178Y) mice. *Cancer Res.*, 39: 1467-72, 1970.
22. YAMASHITA, T. & NISHIGAKI, T. — L-asparaginase. 4. Antigenicity of L-asparaginase. *Oyo Yakuri* (Japan), 4(4): 601-6, 1970 apud *Chem. Abstr.*, 76: 12737c, 1972.

Recebido para publicação em 1.º de julho de 1978.