



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LIANDRA ÉLLEN COELHO PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DE L-
ASPARAGINASE HUMANA EXPRESSA EM *Escherichia coli***

FORTALEZA

2022

LIANDRA ÉLLEN COELHO PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE
HUMANA EXPRESSA EM *Escherichia coli*

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora Pedagógica: Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo.
Orientadora Técnico-Científico: Dra. Agnes Magri.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P492d Pereira, Liandra Éllen Coelho.
Desenvolvimento de estratégia de produção de L-asparaginase humana expressa em *Escherichia coli* /
Liandra Éllen Coelho Pereira. – 2022.
76 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Agnes Magri .
Coorientação: Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo.
1. Biofármaco. 2. Leucemia linfoblástica aguda (LLA). 3. Planejamento fatorial. 4. Corpos de
inclusão. I. Título.

CDD 661

LIANDRA ÉLLEN COELHO PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE
HUMANA EXPRESSA EM *Escherichia coli*

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 13/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo (Orientadora Pedagógica)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Agnes Magri (Orientadora Técnico-Científico)
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-CE)

Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, família, amigos, colegas,
professores.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Elivânia, por estar sempre ao meu lado, por fazer todo o possível para me apoiar e por se preocupar com minha felicidade. Ao meu pai Iran, por sempre ter estado presente, contribuindo para o meu crescimento e bem-estar. Ao meu irmão Everton, por ser uma companhia todos esses anos, ao meu primo-irmão Emílio, por trazer leveza e ser sempre amoroso com todos. Não poderia escolher uma criação melhor do que essa, amo muito vocês. Vocês são meu maior alicerce nessa vida.

À Dr^a Agnes Magri, por ter me acolhido maravilhosamente e me orientado durante esse ano. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, oportunidades, risadas e parceria, sua presença na minha trajetória tem sido marcante, e sou muita grata por cultivar uma conexão genuína, tanto pessoal como profissional.

À Prof^a Dr^a Marjory Lima Holanda Araújo, pelas aulas ótimas e leves, pela apresentação a fundamentos da profissão e pelas colaborações neste trabalho e à Dr^a Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento, pelo precioso convívio que tivemos em laboratório e pelos ensinamentos também leves e muito importantes para minha caminhada. Ao Prof Humberto Henrique de Carvalho, pelas aulas sempre muito acessíveis e pela disposição com os alunos, sempre muito cordial. Agradeço por terem aceitado participar dessa banca e por poderem trazer contribuições neste trabalho. Ao Prof Marcos Roberto Lourenzoni, por ter me apoiado nesse projeto também, como coorientador, e a todo o GEPeSS (Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para a Saúde).

À minha família, que sempre acreditou em mim, meus avós maternos, que me acompanham e me protegem lá de cima, José Emílio Rodrigues e Francimar Coelho Rodrigues, meus avós paternos, José Pereira (Nozim) e Francisca Rodrigues. A todos os meus tios e tias, primos e primas e agregados.

A todos os meus amigos, os que passaram pela minha vida, os que permaneceram e os novos que ganhei também. Aos meus companheiros de graduação, em especial a amizade de Lara, Isabela e Melissa, por terem sido tão parceiras desde o começo da graduação e por terem sido muito suporte sempre que precisei. Aos meus amigos, Lucas, que foi fundamental na execução deste trabalho, pois esteve comigo desde o começo como parceiro de laboratório, e sou muito grata pela parceria leve e tão entrosada, Luzia, Daniel, Nicole, Pedro, Natália Rios, João e Cleber, lembro de todas as risadas, conversas, passeios e aprendizados, guardo com

carinho cada momento com vocês. A todos os meus colegas de turma e profissão, com os quais sempre estou aprendendo e crescendo. Ao meu antigo laboratório, Lembiotech, por todas as oportunidades e ensinamentos que ganhei convivendo com todos de lá. A todos os professores e demais profissionais que fizeram parte da minha caminhada, desde a escola até a graduação, com seus ensinamentos, parcerias e empatia.

À minha psicóloga Darliane, por ser sempre tão gentil e tão incrível comigo, e ter me dado tanto suporte e acolhimento.

À Coordenação do Bacharelado em Biotecnologia, que sempre se faz presente. À FUNCAP e Fiocruz/CE, pelo apoio financeiro e estrutural para condução deste trabalho, e todas as outras formas de incentivo financeiro que recebi ao longo da graduação.

A todo o pessoal dos serviços essenciais de limpeza, segurança, saúde, alimentação e recepção, tanto na UFC quanto na Fiocruz.

*“Tell me and I’ll forget; teach me and I may
remember; involve me and I will learn”*

(Diga-me, e eu esquecerei; ensina-me, e eu
poderei lembrar; envolva-me, e eu aprenderei)

(Benjamin Franklin)

RESUMO

A enzima L-asparaginase (L-ASNase) é um importante biofármaco usado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA). As principais L-ASNases oncoterápicas comerciais são bacterianas, mas apresentam efeitos adversos imunogênicos, com isso, busca-se por L-ASNases alternativas, como as similares à estrutura humana. O estudo teve como objetivo otimizar as condições de expressão de uma L-asparaginase humana do tipo 1 (hASNaseI) expressa em *Escherichia coli*, na forma de corpos de inclusão, seguindo planejamento fatorial Box–Behnken 3³. Para isso, foram utilizadas três variáveis independentes que afetam a produção de hASNaseI: tempo de expressão (h), concentração de IPTG (mM) e temperatura de indução (°C), avaliadas em três níveis. Os cultivos de *E. coli* foram inoculados com 2% de inóculo, em duplicata, em meio *Terrific Brith* (TB), suplementado com antibióticos canamicina e cloranfenicol. Para obtenção da hASNaseI intracelular, os *pellets* celulares foram rompidos por sonicação e posteriormente, centrifugados. O sobrenadante e o precipitado foram avaliados por SDS-PAGE e pelo método de BCA, para quantificação da hASNaseI e proteínas totais em cada uma das frações. A caracterização dos corpos de inclusão, a solubilização e o redobramento foram avaliados. Foi observado que hASNaseI é expressa majoritariamente em corpos de inclusão. As análises estatísticas revelaram uma resposta máxima para produção de L-asparaginase no precipitado, na condição de 0,3 mM de IPTG, a 31°C e 6 horas de expressão, em que as condições se encontravam nos seus pontos centrais. O modelo se mostrou com alta significância para avaliação da produção de enzima. Para a otimização, foi realizada a adequação dos níveis das variáveis, a fim de se alcançar o ponto ótimo para produção de hASNaseI em corpos de inclusão, que foi de 0,24 mM de IPTG, a 30,57°C e 8 horas de expressão. Os corpos de inclusão apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de 1000 nm, ausência de estruturas β-amiloides, e sua solubilização foi possível com solução Tris 100 mM pH 12,5 + Triton X-100 0,5%. Esse trabalho trouxe novas reflexões sobre o processo de produção do antileucêmico hASNaseI, assim como a validação desse processo a partir do uso de ferramentas estatísticas ideais para estudos de processos fermentativos em um período otimizado. Além disso, identificou-se uma produção majoritária da enzima na forma de corpos de inclusão e entendeu-se sobre a característica estrutural do corpo de inclusão, assim como estratégias de solubilização e redobramento desses aglomerados, etapas que representam hoje um desafio industrial.

Palavras-chave: Biofármaco; leucemia linfoblástica aguda (LLA); planejamento fatorial; corpos de inclusão.

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase (L-ASNase) is an important biopharmaceutical used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). The main commercial oncotherapeutic L-ASNases are bacterial, but they present immunogenic adverse effects, therefore, alternative L-ASNases, such as those similar to the human structure, are sought. The study aimed to optimize the expression conditions of a human L-asparaginase type 1 (hASNaseI) expressed in *Escherichia coli*, in the form of inclusion bodies, following a Box–Behnken 3³ factorial design. Three independent variables were used that affect hASNaseI production: expression time (h), IPTG concentration (mM) and induction temperature (°C), evaluated at three levels. *E. coli* cultures were inoculated with 2% inoculum, in duplicate, in Terrific Brith (TB) medium, supplemented with kanamycin and chloramphenicol antibiotics. To obtain intracellular hASNaseI, cell pellets were disrupted by sonication and subsequently centrifuged. The supernatant and the precipitate were evaluated by SDS-PAGE and by the BCA method, for quantification of hASNaseI and total proteins in each of the fractions. The characterization of inclusion bodies, solubilization and refolding were evaluated. It was observed that hASNaseI is expressed mainly in inclusion bodies. Statistical analyzes revealed a maximal response for L-asparaginase production in the precipitate, in the condition of 0.3 mM IPTG, at 31°C and 6 hours of expression, where the conditions were at their midpoints. The model proved to be highly significant for evaluating enzyme production. For the optimization, the adequacy of the levels of the variables was carried out, in order to reach the optimal point for the production of hASNaseI in inclusion bodies, which was 0.24 mM of IPTG, at 30.57°C and 8 hours of expression. The inclusion bodies showed a hydrodynamic diameter of 1000 nm, absence of β -amyloid structures, and their solubilization was possible with 100 mM Tris solution pH 12.5 + Triton X-100 0.5%. This work brought new reflections on the production process of the antileukemic hASNaseI, as well as the validation of this process from the use of ideal statistical tools for studies of fermentation processes in an optimized period. In addition, a majority production of the enzyme in the form of inclusion bodies was identified and the structural characteristic of the inclusion body was understood, as well as strategies for solubilization and refolding of these agglomerates, steps that currently represent an industrial challenge.

Keywords: biopharmaceutical; lymphoblastic leucemia acute (ALL); factorial design; inclusion bodies.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	14
1.2 L-ASNase no tratamento de LLA e comercialização	15
1.3 L-ASNase.....	17
1.4 L-asparaginase1 humana (hASNaseI)	18
1.5 Corpos de inclusão.....	21
1.6 Otimização das condições de cultivo para expressão de hASNaseI: Planejamento Fatorial Box-Behnken	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Geral	26
2.2 Específicos	26
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 Desenvolvimento da asparaginase humana (hASNaseI).....	27
3.2 Pré-inóculo	28
3.3 Otimização da produção de hASNaseI via planejamento Fatorial Box–Behnken 3³.....	28
3.4 Inóculo e Expressão	29
3.5 Rompimento celular mecânico por ultrassonicação	30
3.6 Avaliação da produção de hASNaseI utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	30
3.7 Quantificação de hASNaseI e proteínas totais por densitometria de bandas	31
3.7 Quantificação de proteínas totais pelo método de BCA.....	31
3.8 Análises estatísticas e superfície de resposta usando <i>software</i> Minitab	32
3.9 Ensaio de caracterização dos corpos de inclusão quanto à presença de ligações β-amiloide	32
3.10 Testes de solubilização dos corpos de inclusão e determinação de diâmetro hidrodinâmico por dispersão de luz dinâmica após solubilização dos agregados	32
3.11 Testes de redobrimento de hASNaseI após solubilização dos corpos de inclusão....	33

3.12	Produção de hASNaseI solúvel para comparação com os corpos de inclusão	34
3.13	Purificação de hASNaseI solúvel para comparação com os corpos de inclusão	34
3.14	Medida de atividade enzimática de hASNaseI solúvel para comparação com os corpos de inclusão	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Avaliação de proteínas totais produzidas por <i>E. coli</i> nos ensaios do planejamento fatorial	36
4.2	Otimização da produção de hASNaseI expressa em <i>E. coli</i> na forma de corpos de inclusão	38
4.3	Análises estatísticas e geração de gráficos de superfície resposta	41
4.4	Otimização da resposta de produção de hASNaseI em corpos de inclusão	48
4.5	Caracterização dos corpos de inclusão quanto à presença de ligações β -amiloide.....	51
4.6	Solubilização dos corpos de inclusão e determinação de diâmetro hidrodinâmico por dispersão de luz dinâmica após solubilização	52
4.7	Produção, purificação e medida de atividade enzimática de hASNaseI solúvel para comparação com os corpos de inclusão	57
4.8	Testes de redobramento de hASNaseI após solubilização dos corpos de inclusão.....	59
5	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A – TABELA DE REFERÊNCIA PARA ESCOLHA DOS PONTOS FATORIAIS DO DESENHO ESTATÍSTICO BOX–BEHNKEN 3 ³	14
	ANEXO B – GEL DE CALIBRAÇÃO COM A POTEÍNA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA), DE CONCENTRAÇÃO CRESCENTE CONHECIDA (125 μ g/mL a 2000 μ g/mL).	14
	ANEXO C – CURVA DE CALIBRAÇÃO COM A PROTEÍNA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) PELO MÉTODO DO ÁCIDO BICINCHONÍNICO (BCA).	14
	ANEXO D – CURVA DE PADRÃO DE AMÔNIA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA hASNaseI POR NESSLER.	14

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

A leucemia é um tipo de câncer que atinge os glóbulos brancos (leucócitos) do sangue. O tipo de leucemia varia de acordo com o tipo de célula sanguínea que se torna cancerosa; e velocidade de proliferação celular, proliferação rápida (aguda) ou lenta (crônica), ocorrendo mais frequentemente em adultos com mais de 55 anos e em crianças menores de 15 anos (INCA, 2020). Os países que apresentam altos níveis de desenvolvimento humano, como Nova Zelândia, Austrália, América do Norte e grande parte da Europa, também apresentam as maiores taxas de incidência de leucemia (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2020).

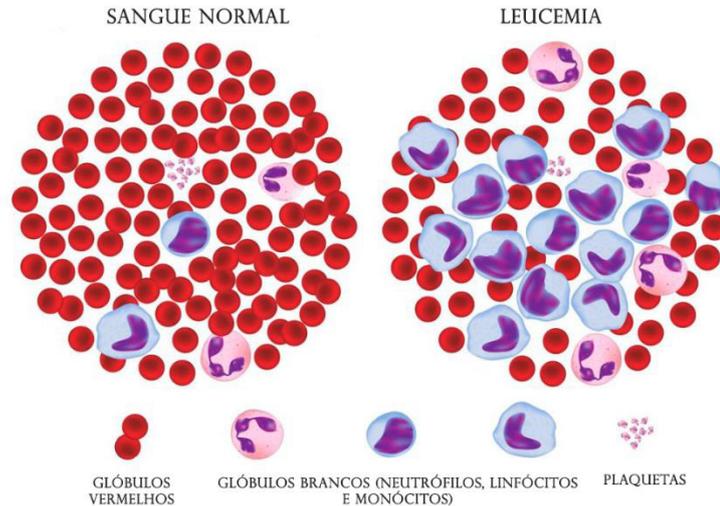
Existem mais de 12 tipos de leucemias, sendo as quatro principais a leucemia mieloide crônica (LMC), a leucemia mieloide aguda (LMA), a leucemia linfocítica crônica (LLC) e a leucemia linfocítica ou linfoblástica aguda (LLA), em que esta última pode estar associada a fatores de risco como exposição a benzeno, radiação ionizante (raios-X e gama) e quimioterapia (INCA, 2020). Os sintomas incluem fadiga, palidez, infecção, dor óssea, manifestações no sistema nervoso central (por exemplo, cefaleia), hematoma fácil e sangramento (EMADI & LAW, 2020).

A LLA é o câncer pediátrico mais comum nos Estados Unidos, e representa 20% de todas as leucemias em adultos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). As populações hispânicas têm incidência mais alta desse tipo de leucemia em comparação a outros grupos raciais/étnicos devido, em parte, a polimorfismos no gene *ARID5B* (ATIENZA, 2016; EMADI & LAW, 2020). No Brasil, a LLA é o 8º tipo de câncer com maior mortalidade, além de ser o tipo de câncer mais frequente na população com até 20 anos de idade (DataSUS, 2021). Essa neoplasia é caracterizada por uma proliferação descontrolada de células de leucócitos imaturos, com origem linfóide no tecido hematopoiético, que comprometem o funcionamento normal da medula óssea em produzir células sanguíneas saudáveis (BARROS *et al.*, 2021; BERRY *et al.*, 2017). Assim, células doentes se acumulam na medula óssea e substituem as células sanguíneas normais (Figura 1).

Esse é o tipo de câncer mais frequente na fase infanto-juvenil, sendo responsável por 75% dos casos de leucemia em pacientes menores de 15 anos e é a 2ª causa mais comum de morte em crianças menores de 15 anos nos Estados Unidos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Do ponto de vista clínico, os tumores pediátricos apresentam menores períodos de latência, e em geral, aparecem rapidamente, além de serem mais invasivos ou agressivos; porém

respondem melhor ao tratamento e são considerados de bom prognóstico (INCA, 2019).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da substituição das células sanguíneas normais pelo acúmulo excessivo de glóbulos brancos na medula óssea em caso de leucemia.



Fonte: (RICHET, 2022).

A principal via de tratamento da LLA combina o uso de quimioterápicos clássicos, como daunorrubicina, vincristina e prednisolona (BERRY *et al.*, 2017), associados a um biofármaco, a enzima L-asparaginase (L-ASNase). Esse biofármaco é considerado essencial para a cura e remissão dos pacientes durante o tratamento de indução da doença (RIZZARI *et al.*, 2013).

1.2 L-ASNase no tratamento de LLA e comercialização

A L-ASNase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é uma enzima que catalisa irreversivelmente a hidrólise de L-asparagina (L-Asn) em L-aspartato (L-Asp) e amônia sob condições fisiológicas (BARROS *et al.*, 2021; ELSHAFEI *et al.*, 2012; KENARI; ALEMZADEH; MAGHSODI, 2011; MIHOOLIYA *et al.*, 2020). Essa enzima tem sido relatada frequentemente em pesquisas clínicas oncológicas devido à sua atividade antineoplásica para tratar desordens linfoproliferativas, como linfoma não Hodgkin e, especialmente, a LLA (ARUMUGAM; THANGAVELU, 2022; BATOOL *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2020).

A L-ASNase representa um dos grupos de enzimas terapêuticas com grande importância biotecnológica e biomédica. De acordo com previsões mercadológicas do Allied Market Research (2015), o mercado global de enzimas especiais, diagnósticos e pesquisa no setor de biotecnologia movimentou US\$ 561,9 milhões de investimentos em 2014 e registrou uma previsão de gerar US\$ 947,5 milhões até 2020, um crescimento líquido anual de 9,4% durante

o período de 2015 – 2020.

A L-ASNase possui um mecanismo de ação que se baseia na lógica de que as células leucêmicas são incapazes de sintetizar o aminoácido não essencial L-Asn, importante na síntese de proteínas e para o desenvolvimento adequado das células. O L-Asn é normalmente sintetizado intracelularmente pela enzima asparagina sintetase (ASNS) a partir do aspartato. As células cancerosas não são capazes de expressar ou expressam a níveis muito baixos a ASNS, o que as torna dependentes de fontes de L-Asn exógenas (do plasma) para continuarem se multiplicando. Dessa maneira, quando ocorre a diminuição de níveis séricos de L-Asn, as células leucêmicas sofrem drástica redução da síntese de DNA, RNA e proteínas, havendo, por consequência, morte celular por apoptose (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; RIZZARI *et al.*, 2013). Por isso, a L-ASNase é administrada estrategicamente para degradar o L-Asn no meio celular e levar à morte seletiva das células cancerosas. As células saudáveis expressam ASNS de forma suficiente para garantir suprimento nutricional de L-Asn, não sendo, portanto, afetadas pela atividade hidrolítica da L-ASNase (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

Atualmente, no mercado, existem três tipos de L-ASNase disponíveis para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda: asparaginase nativa de *Escherichia coli*, a forma peguilada da nativa de *E. coli*, que consiste na enzima conjugada com polímeros de polietilenoglicol, e de *Erwinia chrysanthemi* (Tabela 1).

Tabela 1 – L-asparaginases disponíveis comercialmente para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda.

Nome Comercial	Empresa Farmacêutica	País	Microrganismo produtor
Kidrolase	EUSA Pharma	Reino Unido	<i>Escherichia coli</i>
Elspar	Merck Sharp & Dohme (MSD)	Estados Unidos	<i>Escherichia coli</i>
Crasnitin	Bayer AG	Alemanha	<i>Escherichia coli</i>
Leunase	Sanofi-Aventis	França	<i>Escherichia coli</i>
Medac	Kyowa Hakko	Japão	<i>Escherichia coli</i>
Oncaspar polietilenoglicol [PEG]-asparaginase	Sigma-Tau Pharmaceuticals	Estados Unidos	<i>Escherichia coli</i>
Leuginase	Beijing SL	China	<i>Escherichia coli</i>

Pharmaceutical.			
Spectrila	Wacker Biotech GmbH	Alemanha	<i>Escherichia coli</i>
Erwinase	EUSA Pharma	Reino Unido	<i>Erwinia chrysanthemi</i>

Fonte: adaptado e atualizado de PIETERS *et al.*, 2011.

No Brasil, o biofármaco Elspar® parou de ser fornecido em 2014 (SOUSA, 2013). A Anvisa vem buscando, desde então, alternativas para adquirir L-ASNase com eficácia comprovada e a partir de empresas com qualidade adequada e interesse em registrar o produto para comercialização no país, a exemplo da importação excepcional do medicamento Medac. De forma emergencial e estratégica, o Ministério da Saúde incluiu a L-ASNase na lista de produtos estratégicos para o SUS em 2013 (Portaria nº 2.888/GM/MS – L-ASNase nativa) e em 2017 (Portaria nº 704/GM/MS – L-ASNase nativa e PEG-ASNase) para sanar o desabastecimento em curto prazo no SUS, com produção local e traçar planos de longo prazo para desenvolvimento de novas L-ASNase de menor custo e eventos adversos reduzidos.

1.3 L-ASNase

Diversos organismos produzem L-ASNase, incluindo plantas, animais e microrganismos (BATOOL *et al.*, 2016). Entretanto, somente as enzimas bacterianas de *E. coli* e *Dickeya dadantii* (anteriormente nomeada *Erwinia chrysanthemi*) são produzidas industrialmente e comercializadas, uma vez que as bactérias são fontes muito ricas de L-ASNase e é mais fácil escalonar processos a partir de plataformas microbianas (BARROS *et al.*, 2021).

As L-ASNases bacterianas são subdivididas em tipo I ou II, dependendo de sua expressão celular, sendo classificadas em tipo I (citoplasmática e expressa constitutivamente; apresentam baixa afinidade pelo substrato) e em tipo II (periplasmática, e sua expressão é regulada; apresentam alta afinidade para o substrato) (COSTA *et al.*, 2016; GUIMARÃES; FROTA; LOURENZONI, 2021). Para que a enzima L-ASNase seja eficaz no uso clínico, seu Km deve estar na faixa de μM (micromolar) para hidrolisar eficientemente o substrato Asn extracelular, que tem uma concentração de $50 \mu\text{M}$ no sangue humano (SCHALK *et al.*, 2014).

No entanto, as preparações enzimáticas de L-ASNase derivadas de bactérias apresentam altos níveis de efeitos adversos relacionados à imunogenicidade, frequentemente relatados na literatura. Devido ao alto peso molecular e complexidade estrutural das L-ASNases bacterianas, apresentam desvantagens clínicas, como atividade enzimática secundária como glutaminase,

degradação por proteases séricas e reconhecimento pelo sistema imunológico, o que diminui sua meia-vida e pode causar reações de hipersensibilidade nos pacientes, chegando até 75% dos casos, além de efeitos adversos como riscos de trombose, pancreatite, choques anafiláticos, fadiga crônica e febre (EDEN; HIPKINS; BRADBURY, 2016; ULU; ATES, 2017; WACKER *et al.*, 2007).

A atividade glutaminásica de L-ASNases bacterianas é bastante discutida, pois acredita-se que esse fator seja determinante para a citotoxicidade promovida pela enzima, estando relacionada aos efeitos adversos do tratamento (NGUYEN *et al.*, 2016).

Por conta desses problemas, atualmente, busca-se por L-ASNase alternativas para superar essas desvantagens clínicas. Uma das alternativas consiste na asparaginase PEGilada (PEG ASNase), a exemplo do biofármaco Oncaspar®, de *E. coli*, que apresenta imunogenicidade diminuída e meia-vida prolongada por conta da conjugação covalente das cadeias de polietilenoglicol à enzima, em comparação à forma nativa de L-ASNase (LIMA *et al.*, 2020). Apesar dessas vantagens, há possibilidade de formação de anticorpos pelo sistema imune do paciente contra as moléculas de PEG (anti-PEG), o que pode reduzir a meia-vida da enzima e comprometer o tratamento (YANG; LAI, 2015; ZHANG; LIU; WAN, 2014). Além disso, a conjugação não homogênea do PEG à enzima pode afetar a atividade biológica da biomolécula (MISHRA; NAYAK; DEY, 2016; ZHANG; LIU; WAN, 2014).

Outra alternativa é procurar por L-ASNases similares ao padrão de glicosilação e estrutura humanas: ASNase humanizada e a ASNase humana (hASNase) (RIGOUIN *et al.*, 2017). Assim, a aplicação terapêutica de uma asparaginase de origem humana (hASNase) pode ser uma forma de reduzir os efeitos imunogênicos observados para as L-ASNases de origem bacteriana.

1.4 L-asparaginase1 humana (hASNaseI)

Tendo em vista que as enzimas comerciais disponíveis, por serem de origem bacteriana, causam reações adversas, como reações imunológicas severas e reações de hipersensibilidade, além dos efeitos adversos devido a ações enzimáticas secundárias, como atividade glutaminásica. A enzima L-asparaginase humana (hASNaseI) pode ser uma alternativa menos imunogênica, e sem atividade secundária glutaminásica.

Existem pelo menos três enzimas humanas com capacidade de hidrolisar a asparagina em aspartato e amônia, mecanismo típico da L-asparaginase, sendo as seguintes: aspartilglicosaminidase (hAGA), hASRGL1 e lisofosfolipase de 60 kDa (NOMME *et al.*, 2012). A aspartilglicosaminidase (hAGA) é uma enzima lisossomal que remove grupos de

carboidratos que estejam ligados à asparagina, em uma etapa final de degradação das glicoproteínas da superfície celular (OINONEN *et al.*, 1995). A hAGA não hidrolisa L-Asn livre, pois degrada apenas asparaginas que estejam ligadas a oligossacarídeos, o que limita seu uso no tratamento. O segundo tipo de L-asparaginase humana é a mais estudada, e recebe algumas nomenclaturas, como hASRGL1, ALP (BUSH *et al.*, 2002), CRASH (EVTIMOVA *et al.*, 2004) ou hASNase3, por ser homóloga à asparaginase de *E. coli* tipo III. O último tipo de enzima, lisofosfolipase de 60 kDa, ou hASNaseI, é uma enzima que deriva da porção N-terminal de uma lisofosfolipase humana de 60 kDa (SUGIMOTO; ODANI; YAMASHITA, 1998).

A L-asparaginase humana ainda está sendo estudada para melhorar suas características, como parâmetros cinéticos, já que é observada uma atividade enzimática baixa quando comparada com a atividade de L-ASNases bacterianas. Dessa forma, a estratégia para utilizar a hASNase deve englobar técnicas para aumentar sua atividade. Além disso, não existe atualmente nenhum biofármaco de hASNase no mercado.

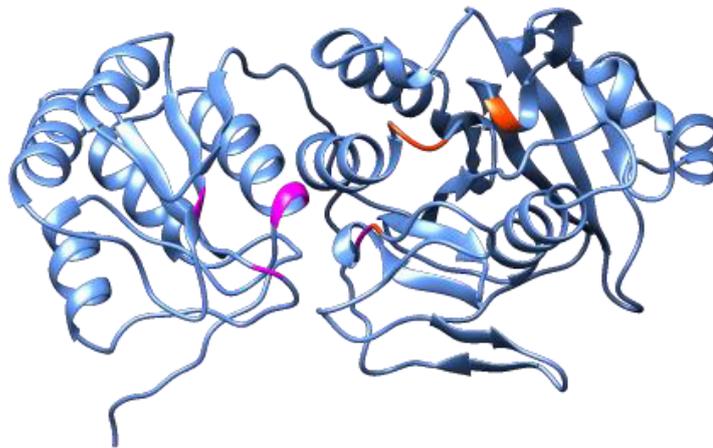
O domínio N-terminal (resíduos 1-369) da lisofosfolipase foi chamado de hASNaseI em razão da semelhança de propriedades cinéticas com a L-ASNase de *E. coli* tipo I (*EcASNase1*), em que tanto *EcASNase1* como hASNaseI exibem alosteria experimentalmente e possuem Km na faixa de mM e baixo k_{cat} (KARAMITROS; KONRAD, 2014). Na modelagem feita por GUIMARÃES; FROTA; LOURENZONI, 2021, foi observado que a presença do substrato L-Asn nos sítios alostéricos promove mudanças conformacionais nos sítios catalíticos de hASNaseI, estabilizando-os. A L-Asn estabiliza a posição de Lys¹⁸⁸, formando a tríade catalítica (Lys¹⁸⁸, Thr¹¹⁶ e Asp¹¹⁷), em todos os protômeros. Dessa forma, a ligação de L-Asn a um sítio ativo favorece a ligação de L-Asn a outro sítio ativo, demonstrando um efeito cooperativo positivo também observado experimentalmente. Com os dados de dinâmica molecular, mutações podem ser sugeridas na enzima para aumentar sua atividade catalítica.

A estrutura de hASNaseI não foi cristalografada, tendo sido apenas projetada em programa de inteligência artificial, AlphaFold, que monta proteínas *de novo* (KARAMITROS; KONRAD, 2014). Esse programa produz uma pontuação de confiança por resíduo (pLDDT) entre 0 e 100, em que pLDDT > 90 o modelo é considerado de confiança muito alta. Todos os resíduos do sítio ativo de hASNaseI apresentaram pontuações de confiança elevadas, sendo as seguintes: Lys¹⁸⁸, com 98,09 (alta confiança), Thr¹¹⁶, com 97,96 (alta confiança), Asp¹¹⁷, com 97,56 (alta confiança) e Thr¹⁹, com 96,09 (alta confiança). Além disso, o sítio alostérico dessa enzima também apresentou resíduos com pontuações de confiança elevadas: Glu²⁶⁶, com 97,66 (alta confiança), Ser³²⁷, com 98,31 (alta confiança), Cys²⁹⁹, com 91,56 (alta confiança), Trh¹⁸⁷,

com 98,26 (alta confiança) e Glu³²⁸, com 98,67 (alta confiança) (KARAMITROS; KONRAD, 2014).

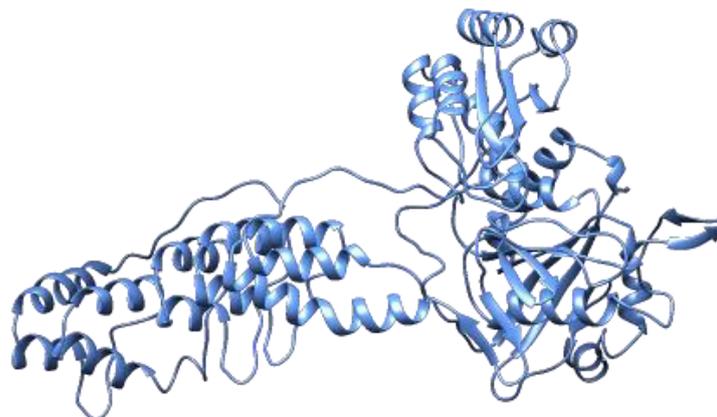
Neste estudo, trabalhou-se com a expressão, em *E. coli*, do domínio L-asparaginase localizado na região N-terminal (resíduos 1-369) (Figura 2) da lisofosfolipase humana de 60 kDa (573 resíduos) (Figura 3).

Figura 2 – Estrutura de hASNaseI, (resíduos de 1 a 369 da lisofosfolipase humana de 60 kDa).



Fonte: UniProt (Q86U10), modificado no *software* Chimera 1.16. O sítio ativo está sendo mostrado em laranja avermelhado e o sítio alostérico em magenta.

Figura 3 – Estrutura completa de hASNaseI, que corresponde à lisofosfolipase humana de 60 kDa (573 resíduos).



Fonte: UniProt: Q86U10.

Considerando as condições adequadas que permitem produtividade e rendimento proteico economicamente viável no desenvolvimento de um bioprocesso para expressão

heteróloga de proteínas recombinantes humanas, a plataforma bacteriana ganha destaque. Com microrganismos, é possível controlar vários fatores ambientais, como as fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, pH e oxigenação, o que confere maior facilidade de escalonamento do processo e estudos mais acurados de produção, caracterização e fatores bioquímicos e farmacológicos das L-ASNases de potencial terapêutico (VIDYA *et al.*, 2017).

A *E. coli* é um dos principais sistemas de expressão para produção heteróloga, pois apresenta algumas vantagens, como genética e fisiologia bem esclarecidas, e facilidades operacionais, como rápido crescimento, baixo custo do meio de cultura e altos níveis de expressão proteica (BARROS *et al.*, 2021; ROSANO; CECCARELLI, 2014; SINGHVI *et al.*, 2020). No entanto, altos níveis de expressão proteica em sistemas bacterianos podem levar a formação de corpos de inclusão.

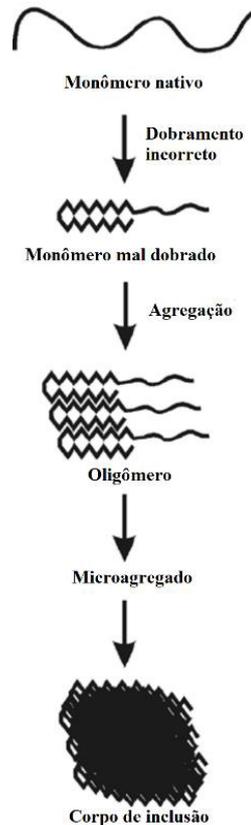
1.5 Corpos de inclusão

Os processos de produção de proteínas recombinantes em hospedeiros bacterianos comumente levam à formação de estruturas conhecidas por corpos de inclusão (Figura 4), que são agregados proteicos insolúveis derivados de uma elevada expressão dessas proteínas. Estas são obtidas após a ruptura da célula, para então serem solubilizadas e enoveladas para sua estrutura nativa ativa de acordo com as condições do meio onde elas forem liberadas. Isso representa um grande desafio para a recuperação de moléculas bioativas em larga escala, visto que o processo de recuperação em si é trabalhoso e os rendimentos da solubilização/enovelamento dessas proteínas recombinantes são normalmente baixos (SINGH *et al.*, 2015).

Atualmente, expressar proteínas recombinantes na forma de corpos de inclusão tem recebido grande atenção para diversas aplicações nas áreas de biotecnologia industrial e médica (SINGHVI *et al.*, 2020). Aproximadamente, 30% do total de biofármacos produzidos pelas indústrias hoje ainda usam sistemas de expressão baseados em *E. coli*, mesmo que a probabilidade de formação de corpos de inclusão seja muito alta com esse hospedeiro (WALSH, 2018). Ainda assim, a expressão em corpos de inclusão pode ser preferível em alguns casos, em relação à expressão solúvel de proteínas terapêuticas bioativas, já que há possibilidade de isolar facilmente os corpos de inclusão devido diferenças no tamanho e densidade, em comparação às proteínas do hospedeiro, resistência à degradação proteolítica, especificidade dos agregados proteicos nos corpos de inclusão, estabilidade mecânica, quantidade muito alta de proteína superexpressa, expressão de proteínas tóxicas, estrutura secundária de proteína nativa em corpo de inclusão e presença de atividade biológica (DE MARCO *et al.*, 2019; GARCÍA-FRUITÓS

et al., 2012; RAMÓN; SEÑORALE-POSE; MARÍN, 2014).

Figura 4 – Esquema de desdobramento e agregação dos monômeros de proteínas até a formação do corpo de inclusão.



Fonte: Adaptado de (PRIL, 2011)

Alguns fatores podem contribuir para a formação dos corpos de inclusão: o uso de uma elevada temperatura de expressão da proteína, uma alta concentração do indutor, sistema de expressão sob um promotor forte, um ambiente reduzido no citosol da bactéria, ausência de chaperonas eucarióticas e sistema pós-traducional (CARRIÖ; CUBARSI; VILLAVERDE, 2000; SINGH *et al.*, 2015). Nessas situações, o sistema de controle de qualidade da proteína recombinante acaba se esgotando, levando a dobramentos parciais ou a mal dobramentos, que resultam na agregação das moléculas, formação das estruturas de corpos de inclusão, acúmulo no citoplasma celular e eventualmente também podem ocorrer no periplasma (CARRIÖ; CUBARSI; VILLAVERDE, 2000; CARRIÓ; VILLAVERDE, 2005; SINGH *et al.*, 2015).

É possível reverter a formação dos corpos de inclusão (CARRIÖ; VILLAVERDE, 2001) por meio de solubilização desses agregados. Essa etapa e a de renovelamento podem ser otimizadas no intuito de melhorar os rendimentos da proteína recuperada. A escolha de métodos

de solubilização dos agregados que preservem a estrutura nativa das proteínas, como condições mais brandas, tem ganhado destaque (SINGH *et al.*, 2015). Essas estratégias podem fornecer melhores recuperações se comparadas aos métodos que utilizam elevadas concentrações de agentes caotrópicos, uma vez que os agentes de solubilização fracos podem proteger até certo ponto as estruturas secundárias da proteína, inibir a agregação durante reenovelamento e permitir uma melhor recuperação (SINGH *et al.*, 2015).

No caso de enzimas como a L-ASNase, embora ainda sejam utilizadas altas concentrações do agente caotrópico ureia (CHOHAN *et al.*, 2018; KANTE *et al.*, 2018), é possível realizar a solubilização desses corpos de inclusão utilizando baixa concentração de ureia e realizar o reenovelamento/redobramento por meio de diluição pulsátil (UPADHYAY *et al.*, 2014). Outras maneiras de realizar essa solubilização branda, e com possibilidade de recuperação da enzima já na forma nativa, sem necessidade de reenovelamento, é por meio do uso de agentes como Triton X-100, sarcosil, CHAPS, ácido perfluorooctanóico (PFOA) (PLUCINSKY; ROOT; GLOVER, 2018; TAO *et al.*, 2010), além de estratégias de aquecimento (CAI *et al.*, 2020).

De forma geral, os corpos de inclusão são considerados depósitos amorfos formados por precipitação passiva e inespecífica de cadeias proteicas não dobradas, desprovidos de regularidade estrutural (CARRIÓ *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2015), como os de TDP-43, uma proteína nuclear multifuncional (CAPITINI *et al.*, 2014). No entanto, esses agregados podem compartilhar uma organização de características estruturais e biológicas importantes de natureza amiloide (CARRIÓ *et al.*, 2005).

A agregação amiloide observada em corpos de inclusão pode ser constatada por uma análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), que revela riqueza de conteúdo beta e sinais correspondentes à estrutura beta cruzada (CARRIÓ *et al.*, 2005), ou por padrão de difração de raios X, que revela semelhança com o padrão gerado por fibrilas amiloides (WANG *et al.*, 2008).

Apesar de sua heterogeneidade e independente da fonte, todos os polipeptídeos envolvidos em agregados de fibrilas amiloides apresentam características semelhantes: ligação a certas moléculas corantes, como vermelho do Congo (CR: C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂) ou tioflavina-T (Th-T: C₁₇H₁₉ClN₂S), morfologias fibrilares semelhantes e organização das proteínas agregadas em estruturas de folhas β cruzadas (CARRIÓ *et al.*, 2005).

A agregação amiloide é um fenômeno baseado em nucleação e agregados de uma proteína podem atuar como sementes para agregação de proteínas semelhantes, o que pode acontecer com corpos de inclusão do hospedeiro *E. coli* (SINGH *et al.*, 2015). A cinética de

formação desses agregados pode ser controlada através da manipulação das condições de cultivo bacteriano; no entanto, a natureza da proteína superexpressa e seu comportamento de agregação decide a natureza e as propriedades dos corpos de inclusão (UPADHYAY *et al.*, 2012).

1.6 Otimização das condições de cultivo para expressão de hASNaseI: Planejamento Fatorial Box-Behnken

Uma vez que as condições de cultivo da proteína superexpressa determina a cinética de formação dos corpos de inclusão, a otimização das condições de cultivo para expressão torna-se extremamente importantes. Para isso, a análise das melhores condições de um processo produtivo, com o objetivo de determinar a melhor combinação dos valores das variáveis envolvidas, pode ser realizada utilizando-se de métodos estatísticos de análise univariada. Nesses casos, a resposta de interesse, que pode ser a concentração de um determinado produto, é mensurada em função da variação de um único fator, enquanto os demais fatores permanecem fixos. À medida que se vai alcançando máximas respostas com os valores dos fatores estudados, esses valores vão sendo mantidos constantes nos experimentos subsequentes. Com isso, os melhores níveis de cada fator são encontrados progressivamente e utilizados para formar as condições do processo final (SILVESTRE, 2007).

No entanto, essa abordagem traz algumas desvantagens, como elevado número de experimentos, elevado tempo demandado até o ajuste do modelo e o fato de que as interações entre as variáveis não são verificadas.

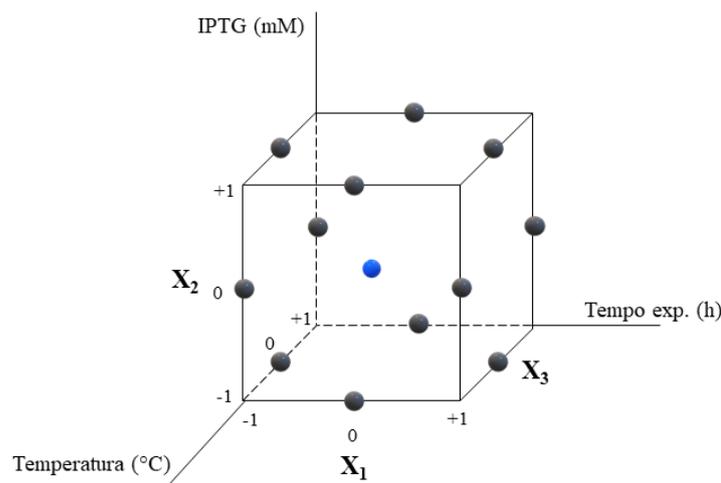
A estatística multivariada é uma ferramenta que pode contornar essas limitações do método "um fator de cada vez", pois não mede apenas a influência de cada variável de entrada (fator) na variável de saída (resposta), mas também as interações entre as variáveis e permite avaliar a sua significância. Nesses experimentos multivariados, os valores dos fatores investigados são estudados em "níveis", que vão de um mínimo a um máximo. A combinação dos níveis de cada fator é utilizada para gerar um planejamento fatorial de experimentos em que uma variável é estudada segundo o comportamento de outras que são investigadas ao mesmo tempo. Logo, com planejamento fatorial pode-se multiplicar o número de variáveis independentes, ou fatores, estudadas e o número de níveis de cada variável (FERREIRA, 2008).

A otimização de processos fermentativos pode ser feita alterando tanto um fator de cada vez quanto vários fatores ao mesmo tempo (UPPULURI *et al.*, 2013). Nos experimentos multivariados, há uma grande economia de tempo e é possível chegar à condição de ajuste mais rapidamente, já que pode fornecer dados estatísticos com um número relativamente pequeno de

experimentos e é uma ferramenta valiosa para medir interações entre fatores e para a previsão de condições ótimas de fermentação (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018; UPPULURI *et al.*, 2013).

O experimento Box–Behnken é um tipo de planejamento fatorial muito útil para melhoria de processos em que se deseja gerar um modelo de otimização de variáveis para determinar a combinação das variáveis de entrada mais relevantes de um determinado sistema analítico capaz de gerar a máxima resposta da variável de saída (BOX; BEHNKEN, 1960). A combinação de três variáveis, por exemplo, com dois níveis cada uma, daria um total de 2^3 experimentos, equivalente ao número de vértices de um cubo, que é igual a 8. Cada fator, ou variável independente, é colocado em um dos três valores que estão nos pontos médios das bordas do cubo (Figura 5) e são igualmente espaçados, sendo codificados geralmente como -1, 0, +1 (BOX; BEHNKEN, 1960). O desenho experimental precisa ter pelo menos três níveis para se alcançar o objetivo do projeto experimental, sendo suficiente para se ajustar a um modelo quadrático. Nos experimentos Box–Behnken, não há pontos axiais fora do “cubo”, de modo que todos os pontos do experimento permanecem dentro de uma zona segura de operação, garantindo que todos os fatores não sejam fixados nos seus níveis máximos ao mesmo tempo.

Figura 5 – Diagrama representativo do planejamento fatorial com três variáveis X_1 , X_2 e X_3 : tempo de expressão (h), concentração de IPTG (mM) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$).



Fonte: elaborado pela autora. Os pontos no diagrama representam os ensaios experimentais conduzidos. Os valores -1, 0 e +1 representam o nível de cada variável. No ponto azul, todas as variáveis encontram-se no nível 0 (ponto central).

Em cada bloco experimental, certo número de fatores é colocado em todas as

combinações para o planejamento fatorial, enquanto os outros fatores são mantidos nos valores centrais. No caso do projeto Box–Behnken para 3 fatores adotado na metodologia desse estudo, 2 fatores são variados por meio das 4 combinações possíveis de alto e baixo, enquanto o terceiro fator encontra-se no nível central (BOX; BEHNKEN, 1960; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018). Nesse caso, também é necessário incluir os pontos centrais, nos quais todos os fatores estão em seus valores centrais (BOX; BEHNKEN, 1960; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018).

O planejamento fatorial resulta em um diagrama de quantificação da influência de cada variável de entrada e das suas interações em relação à variável de saída (BOX; BEHNKEN, 1960; PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018). Dessa forma, é possível conhecer as variáveis que têm um impacto positivo ou negativo e qual é a intensidade desse impacto na resposta. Por isso, os planejamentos fatoriais permitem selecionar as variáveis que efetivamente possuem significância e devem ser consideradas para a melhoria do processo.

Essa ferramenta pode ser utilizada para otimizar as condições de cultivo para favorecer a expressão de proteínas recombinantes em sistemas de expressão bacterianos, seja a expressão da proteína na forma solúvel ou em corpos de inclusão. Neste estudo, buscou-se avaliar variáveis no cultivo que fossem significantes para a expressão de hASNaseI em frascos agitados, usando o desenho experimental estatístico Box–Behnken. Com isso, espera-se otimizar as condições de cultivo para posterior aumento da escala de produção de hASNaseI em biorreator.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as variáveis de cultivo e otimizar as condições para obtenção de alto rendimento na produção do biofármaco antileucêmico hASNaseI na forma de corpos de inclusão utilizando frascos agitados, assim como caracterizar, solubilizar e testar o redobramento dos corpos de inclusão. Em paralelo, expressar e purificar hASNaseI na forma solúvel, a nível de comparação.

2.2 Específicos

- I. Estabelecer e otimizar a concentração de indutor (IPTG), temperatura (°C) e tempo de expressão (h) para obtenção de alto rendimento de expressão intracelular de hASNaseI em *E. coli* em frascos agitados, seguindo planejamento fatorial Box–Behnken 3³.
- II. Desenvolver o método de rompimento celular, para obtenção da enzima hASNaseI

intracelular.

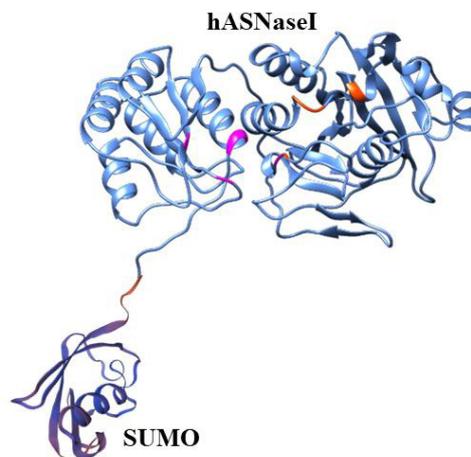
- III. Avaliar o rendimento da produção de hASNaseI solúvel e em corpos de inclusão.
- IV. Quantificar a expressão de proteínas totais e hASNaseI.
- V. Analisar estatisticamente os resultados para obtenção da otimização das melhores condições de produção da hASNaseI por planejamento fatorial.
- VI. Caracterizar os corpos de inclusão quanto à presença de ligações β -amiloide e diâmetro hidrodinâmico.
- VII. Estabelecer protocolo de solubilização dos corpos de inclusão e caracterizá-los.
- VIII. Testar condições de redobramento de hASNaseI solubilizada.
- IX. Produzir, purificar e medir atividade enzimática de hASNaseI na fração solúvel, a fim de comparar com os corpos de inclusão.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenvolvimento da asparaginase humana (hASNaseI)

No presente estudo, trabalhou-se com a expressão em *Escherichia coli*, com vetor Pet28a-Sumo, do domínio L-asparaginase localizado na região N-terminal (resíduos 1-369) da lisofosfolipase humana, expresso juntamente a uma TAG SUMO e His TAG (His₆-SUMO-hASNase1), na forma de corpos de inclusão (Figura 6), totalizando uma massa de 60 kDa.

Figura 6 – Ilustração do produto recombinante expresso em *E. coli* neste trabalho (His₆-SUMO-hASNase1).



3.2 Pré-inóculo

As cepas de *E. coli* Rosetta, com vetor pET28a-Sumo, contendo o plasmídeo com o gene codificador da enzima de interesse (hASNaseI) do aminoácido 1 ao 369 foram pré-inoculadas com o inóculo do lote de trabalho (armazenado a -80°C) diluído 3:5 em *Terrific Brith* (TB) e glicerol 20% ao final. Anteriormente, as células foram crescidas a 37 °C, 16 h, 200 rpm, sob agitação orbital (Eppendorf), em frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio TB.

O pré-inóculo foi preparado em meio TB (20 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 4 mL/L de glicerol, 100 mL/L de tampão fosfato (0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M K₂HPO₄). O tampão fosfato foi adicionado apenas após a autoclavagem do meio (2,5 mL do tampão (10%) em 22,5 mL de meio). A 25 mL do meio foi adicionado 40 µL do antibiótico Canamicina 25 mg/mL (concentração de 40 µg/L no meio) e 25 µL do antibiótico Cloranfenicol 34 mg/mL (concentração de 34 µg/L no meio). Uma alíquota do estoque (armazenado a -80°C) de *E. coli* Rosetta, com vetor pET28a-Sumo, foi adicionada ao meio de cultura. O frasco foi mantido em agitador orbital durante 16 h, com agitação de 200 rpm, a 37 °C.

3.3 Otimização da produção de hASNaseI via planejamento Fatorial Box–Behnken 3³

Para otimização da expressão, foi realizado um planejamento fatorial Box–Behnken 3³ (Tabela 1). Os pontos fatoriais foram escolhidos com base na literatura (Anexo A) e em protocolos de expressão estabelecidos anteriormente pelo Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para a Saúde (GEPeSS) - Fiocruz/CE, sendo estudados em três níveis (3³). Cada ensaio foi conduzido em duplicata, sendo realizada a expressão de hASNaseI em *Escherichia coli* com vetor pET28a-Sumo, em 51 mL de volume total em cada frasco.

Tabela 1 – Planejamento Fatorial Box–Behnken 3³: avaliação das variáveis tempo de expressão (X₁), [IPTG] (X₂) e temperatura (X₃).

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas		
	X ₁	X ₂	X ₃	Tempo de Expressão (h)	IPTG (mM)	Temperatura (°C)
1	+	+	0	8	0,4	31
2	+	-	0	8	0,2	31

3	-	+	0	4	0,4	31
4	-	-	0	4	0,2	31
5	+	0	+	8	0,3	37
6	+	0	-	8	0,3	25
7	-	0	+	4	0,3	37
8	-	0	-	4	0,3	25
9	0	+	+	6	0,4	37
10	0	+	-	6	0,4	25
11	0	-	+	6	0,2	37
12	0	-	-	6	0,2	25
13	0	0	0	6	0,3	31

Fonte: elaborado pela autora. IPTG: Isopropil β -D-1-tio galactopiranosídeo

3.4 Inóculo e Expressão

Para a inoculação dos meios para expressão de hASNaseI nos ensaios do planejamento fatorial, os erlenmeyers foram separados em duplicata, cada um contendo 50 mL do meio TB. A cada frasco foram adicionados antibiótico Canamicina 25 mg/mL (concentração de 40 μ g/L no meio) e Cloranfenicol 34 mg/mL (concentração de 34 μ g/L no meio). A cada um foi adicionado também 1 ml do pré-inóculo (2%) de *E. coli* Rosetta, com vetor pET28a-Sumo. Os frascos foram mantidos em agitador orbital (shaker) para crescimento durante 3 h, a 37 °C e 200 rpm.

Após as 3 h de crescimento (O.D._{600nm} de 0,6-0,8), induziu-se a expressão com IPTG. Aos frascos dos ensaios 1, 3, 9 e 10 foi adicionado IPTG na concentração final de 0,4 mM. Aos frascos dos ensaios 2, 4, 11 e 12 a concentração final foi de 0,2 mM, e para os ensaios 5, 6, 7, 8 e 13 foi de 0,3 mM. A expressão ocorreu sob agitação de 200 rpm em diferentes temperaturas de acordo com as combinações exibidas na Tabela 1. As culturas expressas foram centrifugadas

a 15 °C, 8000 x g, por 10 min. Os *pellets* contendo as células foram armazenados na temperatura de -30 °C para lise posterior.

3.5 Rompimento celular mecânico por ultrassonicação

Os *pellets* celulares foram pesados em duplicata, no intuito de comparar a quantidade de asparaginase em cada cultivo, e colocados em tampão Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,5, para posterior rompimento celular. As células foram lisadas, utilizando-se o processador ultrassônico *QSonica Sonicators*, configurado para amplitude 4%, por 10 minutos com ciclos de 20 segundos de ultrassom e 40 segundos em repouso até a amostra ficar homogênea. Quando os *pellets* decantavam, a sonicação era parada para que os tubos com os *pellets* fossem agitados, sendo esse passo repetido até a dissolução completa do material. As amostras ficavam em tubos de 2 mL, parcialmente submersos em recipiente com água, a qual cobria o volume presente nos tubos. Após o rompimento, os lisados celulares foram centrifugados a 10.000 x g, por 5 min a 20 °C. As alíquotas de sobrenadante e precipitado após a lise celular foram preparados em tubos de 2 mL; ao precipitado pós-sonicação, foi adicionado o mesmo volume de tampão Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,5. Foi estabelecido 1 mL de tampão para cada 5,4 mg de biomassa úmida pesada.

3.6 Avaliação da produção de hASNaseI utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Todas as condições dos ensaios do planejamento fatorial foram avaliadas por eletroforese (SDS-PAGE) para a análise das melhores condições de cultivo para expressão heteróloga de hASNaseI na forma solúvel (fração solúvel) e hASNaseI expressa em corpos de inclusão (fração insolúvel). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes e redutoras, na presença de β -mercaptoetanol. Foram adicionados para o gel de corrida (considerando para 2 géis): 4,95 mL de água, 3,75 mL de acrilamida/bis-acrilamida 40%, 3 mL de solução lower Tris pH 8,8 1,5 M, 120 μ L de SDS 10%, 120 μ L de APS (persulfato de amônio) e 12 μ L de TEMED. Para o gel de empilhamento (considerando para 2 géis) utilizou-se: 4,35 mL de água, 1,125 mL de acrilamida/bis-acrilamida 40%, 1,875 mL de upper Tris pH 6,8 1,5 M, 75 μ L de SDS 10%, 75 μ L de APS 10% e 7,5 μ L de TEMED.

Em seguida, 20 μ L das alíquotas de sobrenadante e precipitado pós-sonicação, foram adicionados em 5 μ L de tampão de amostra (5X) aquecido a 100 °C, por 10 minutos para desnaturação, e foram aplicados 10 μ L de amostra e 5 μ L do marcador molecular *TrueColor*

High Range Protein Marker (10-245 kDa). O gel foi corado com solução de Coomassie Brilhante Blue R-250 para visualização das bandas.

3.7 Quantificação de hASNaseI e proteínas totais por densitometria

A partir do *software* ImageJ, foi possível realizar uma triagem das quantidades da hASNaseI e proteínas totais nos géis de eletroforese, com base em suas densidades ópticas, para quantificar os níveis de expressão da hASNaseI. O *software* gerou uma medida de área correspondente à densidade das bandas selecionadas no gel. Com isso, foi possível chegar a uma estimativa indireta de quantidade de hASNaseI, usando uma das bandas do marcador molecular para formar um fator de conversão adimensional (Equação 1). Nesta metodologia, foi escolhida a banda de 60 kDa do padrão de migração do marcador *TrueColor High Range Protein Marker* (10-245 kDa). As quantificações foram feitas em triplicata.

$$[\text{Enz}] = \text{fc} \times [\text{MM}] \quad (1)$$

Em que: [Enz] é a concentração de enzima ($\mu\text{g/mL}$ ou mg/mL); fc é o fator de conversão adimensional obtido da razão entre a área da banda de hASNaseI em corpos de inclusão e a área de uma banda do marcador molecular fixada como padrão para as análises; [MM] é a concentração de proteína no marcador molecular ($\mu\text{g/mL}$ ou mg/mL).

Um gel de calibração com a proteína albumina sérica bovina (BSA) (Anexo B), de concentração crescente conhecida (125 $\mu\text{g/mL}$ a 2000 $\mu\text{g/mL}$) foi feita para gerar o valor de concentração do marcador molecular e encontrar a concentração de corpos de inclusão de hASNaseI, em $\mu\text{g/mL}$, a partir da Equação 1. O valor de [MM] obtido foi de 99,2217 $\mu\text{g/mL}$. A massa de corpos de inclusão de hASNaseI em g/L também foi obtida com base nos volumes de meio total e massas totais de *pellet*.

3.7 Quantificação de proteínas totais pelo método de BCA

A quantificação de proteínas foi realizada pelo *PierceTM BCA Protein Assay Kit*, sendo um método colorimétrico para quantificação de proteínas totais. Esse método se baseia na reação de redução do Cu^{2+} com proteínas. O reagente de trabalho BCA foi preparado na proporção 50:1 (50 partes Reagente A: 1 parte Reagente B), ficando, para um volume total de 25,5 mL, 25 mL do Reagente A e 0,5 mL do Reagente B. Na microplaca, a proporção em cada poço era de 1 de amostra para 8 do reagente de trabalho BCA, ficando 25 μL da amostra para

200 µL do reagente BCA. As microplacas foram incubadas a 37 °C na estufa por 30 min. A medida de absorvância foi feita a 570 nm.

Uma curva de calibração foi feita com a proteína albumina sérica bovina (BSA) (Anexo C), com as concentrações variando de 0 a 1500 µg/mL. A equação do gráfico da curva de calibração é mostrada abaixo (2), juntamente com o coeficiente de correlação linear (R^2):

$$y = 0,0009x \quad (2)$$

$$R^2 = 0,9983$$

3.8 Análises estatísticas e superfície de resposta usando *software* Minitab

As variáveis foram estudadas em três níveis e as análises estatísticas foram feitas no Minitab. Foram medidas as interações entre as variáveis independentes e a influência de cada variável de entrada na variável dependente, assim como foram avaliadas as significâncias das interações e influência. Com os ensaios gerados por Box–Behnken Design (BBD), foi possível selecionar as variáveis e modificar seus níveis em busca da máxima produção de hASNaseI, ou seja, do ajuste da resposta.

3.9 Ensaios de caracterização dos corpos de inclusão quanto à presença de ligações β -amiloide

Os corpos de inclusão de hASNaseI foram testados para ligação ao corante vermelho do Congo (CR: $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) por meio do ensaio de desvio de banda espectroscópico (adaptado de UPADHYAY *et al.*, 2012). Os corpos de inclusão foram diluídos em tampão de lise (Tris 50 mM, pH 8, contendo NaCl 300 mM) com vermelho do Congo 0,01 mM, sem padronização da concentração de proteínas. As amostras foram lidas à temperatura ambiente logo após adição do corante, em espectrofotômetro NanoDrop One Micro-UV/VIS (*Thermo Scientific*), nos comprimentos de onda variando de 250 nm a 650 nm. Os espectros de absorção foram coletados juntamente com solução de controle negativo, na ausência de corante, e de corante na ausência de proteína (branco).

3.10 Testes de solubilização dos corpos de inclusão e determinação de diâmetro hidrodinâmico por dispersão de luz dinâmica após solubilização dos agregados

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS) foi usada para determinar o diâmetro hidrodinâmico das amostras conjugadas, também conhecida por Espectroscopia de Correlação de Fótons (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS). Com isso, é possível estabelecer uma combinação da relação proporcional entre a difração do laser e a concentração e tamanho de aglomerados. O equipamento determina o diâmetro da partícula de

acordo com a sua intensidade, por meio de uma distribuição gaussiana. Então, se há mais partículas de um determinado tamanho, maior vai ser a intensidade pelo espalhamento de luz para essa partícula. Assim, tem-se populações de partículas, em que no meio da distribuição há majoritariamente partículas de um diâmetro X, com intensidade Y (multiplicando, chega-se ao número de partículas com esse diâmetro). Com isso, é possível saber o tamanho da partícula de corpo de inclusão, bem como se esse tamanho de partícula diminui após os ensaios de solubilização.

Neste estudo, foi medido o DLS das amostras em duplicata solubilizadas com ureia 2M e 4M, Triton X-100 0,5%, DMSO 5%, solução Tris 100 mM pH 12,5 (ajuste com NaOH 1 M), solução Tris 100 mM pH 12,5 combinado a Triton X-100 0,5%, assim como de amostras não solubilizadas (sobrenadante e precipitado), para formar um controle. O equipamento utilizado foi Zetasizer Nano ZS90, da *Malvern*, e os resultados foram analisados no *software* Zetasizer v8.02.

Os *pellets* que foram solubilizados com ureia, triton X-100 e DMSO passaram anteriormente por uma lavagem com água destilada gelada (JEVŠEVAR *et al.*, 2005) a 10.000 x g, por 5 min a 20 °C. Após a lavagem, foi acrescentado 1 mL de cada solução de solubilização em cada tubo com *pellet* e esse sistema foi deixado *overnight* à temperatura ambiente, sem agitação. No dia seguinte, adicionou-se solução Tris 100 mM pH 12,5 a outros dois tubos contendo *pellets*, deixou-se à temperatura ambiente por 1h e depois agitaram-se os tubos por 3 h (LU; LIN, 2012, adaptado). Em seguida, todos os tubos foram centrifugados a 10.000 x g, por 10 min a 20 °C (LU; LIN, 2012), para separar sobrenadante dos precipitados, caso houvesse.

Em uma segunda etapa de análises, foi avaliado se a homogeneização poderia ser significativa na redução dos corpos de inclusão, se o tempo de exposição ao agente desnaturante/solubilizante (1 h, 6 h e 16 h) seria importante para a redução do corpo de inclusão e se a temperatura (4, 21 e 25 °C) teria influência nesse processo.

3.11 Testes de redobramento de hASNaseI após solubilização dos corpos de inclusão

A proteína solubilizada passou por troca de tampão em concentrador *Amicon*[®] *Ultra-15 Centrifugal Filters* (30kDa MWCO, Merck, Millipore), sob condições de centrifugação de 5000 x g, 5 min, a 4 °C, até que o agente de solubilização fosse removido, sem precipitar a proteína novamente. Os testes de redobramento prosseguiram em tampão Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0, na presença de arginina 100 mM e 10 mM, PEG 4000 0,5% e glicerol 25%. O mesmo procedimento foi adotado para solução Tris 100 mM pH 12,5 e solução fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e NaOH pH 8,0 (adaptado de CHOCHAN *et al.*, 2018; UPADHYAY *et*

al., 2014). Em seguida, foi medida atividade enzimática, de acordo com o descrito em 3.11, para avaliar se o redobramento foi bem-sucedido.

3.12 Produção de hASNaseI solúvel para comparação com os corpos de inclusão

Para o pré-inóculo, uma alíquota do estoque (armazenado a -80 °C) de *E. coli* Rosetta, com vetor pET28a-Sumo, foi adicionada ao meio de cultura. O frasco foi mantido em agitador orbital durante 16 h, com agitação de 200 rpm, a 37 °C.

Para a inoculação dos meios para expressão de hASNaseI solúvel, foram preparados 3 erlenmeyers contendo cada um 100 mL do meio TB (20 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 4 mL/L de glicerol, 100 mL/L de tampão fosfato (0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M K₂HPO₄)). A cada frasco foram adicionados antibiótico Canamicina 25 mg/mL (concentração de 40 µg/L no meio) e Cloranfenicol 34 mg/mL (concentração de 34 µg/L no meio). A cada um foi adicionado também 2 ml do pré-inóculo (2%) de *E. coli* Rosetta, com vetor pET28a-Sumo. Os frascos foram mantidos em shaker para crescimento durante 3 h, ou até que a densidade óptica a 600 nm estivesse entre 0,6 e 0,8, a 37 °C sob agitação de 200 rpm.

Após 3 h de crescimento, adicionou-se o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,3 mM. A expressão ocorreu sob agitação de 200 rpm, 15 °C. Após 16 h de expressão, os conteúdos foram centrifugados, a 15 °C, 8000 x g, durante 10 min. Os *pellets* contendo as células foram armazenados a -30 °C.

Para o rompimento celular, foram empregados 5 mL de tampão (Tris 50 mM, NaCl 300 mM pH 8,0, imidazol 20 mM, Triton X-100 1% e inibidor de serina protease, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1%), para o *pellet* derivado de 50 mL de cultura expressa. Os *pellets* ressuspendidos foram reunidos em gelo e lisados no processador ultrassônico *QSonica Sonicators*, configurado para amplitude 20%, por 5 minutos com ciclos de 10 segundos de ultrassom e 40 segundos em repouso até a amostra ficar homogênea. Após o rompimento, os lisados celulares foram centrifugados a 10.000 x g, por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante foi separado para posterior etapa de purificação em bancada.

3.13 Purificação de hASNaseI solúvel para comparação com os corpos de inclusão

Para a purificação de bancada, 1 mL da coluna de afinidade por cauda de histidina HisLink™ foi lavada com água ultrapura e, em seguida, com tampão Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0, imidazol 20 mM para a etapa de equilíbrio, por 1h, a 100 rpm e 15 °C. Após essa etapa, retornou-se à coluna para coleta do *flow through* (FT), que não interagiu com a coluna. Em seguida, lavou-se com tampão Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0, imidazol 60 mM para

retirada de contaminantes. O tampão para eluição da proteína de interesse (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0, imidazol 300 mM) foi deixado em contato com a coluna e a amostra sob leve agitação, por 30 min, antes de eluir a fração de interesse que foi utilizada para realização de atividade enzimática.

O tampão de eluição foi trocado para retirada de imidazol por meio de concentrador *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filters* (30kDa MWCO, Merck, Millipore), centrifugada a 5000 x g, 5 min, a 4 °C, até que o imidazol fosse removido e a enzima concentrada.

3.14 Medida de atividade enzimática de hASNaseI solúvel para comparação com os corpos de inclusão

A atividade enzimática foi quantificada por meio do método colorimétrico de Nessler (tetraiodomercurato (II) de potássio), em que o reagente de Nessler reage com a NH₃, a qual é liberada durante a conversão de L-Asn em L-Asp (MEISTER, 1944). Na primeira etapa, hASNaseI foi adicionada, a partir de uma solução concentrada de 33,5 µM, ficando nas concentrações finais de reação de 8,04 µM, 9,38 µM e 10,72 µM, em fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) com NaOH pH 7,4 (pH fisiológico), juntamente a 65 µL de L-asparagina 94,5 mM (volume total de reação de 250 µL). A reação foi parada com 22 µL de ácido tricloroacético (TCA) 12%, após 30 min a 37 °C. Após a hidrólise de L-Asn, na etapa de coloração, foram adicionados 75 µL de cada reação em 200 µL de água ultrapura e 75 µL de reagente de Nessler. A atividade enzimática foi calculada segundo a Equação 3:

$$U/mL = \frac{(concentração\ de\ amônia) \times (vol. etapa\ 1) \times (vol. da\ etapa\ 2)}{(vol.\ transferido\ da\ etapa\ 1\ para\ 2) \times (tempo\ de\ reação) \times (vol.\ de\ amostra\ da\ enzima)} \quad (3)$$

A concentração de NH₃ de cada reação foi então determinada por espectrofotometria a 450 nm em leitora de microplacas, Multiskan GO, VWR – *Thermo Scientific*. A curva de calibração (ANEXO D) foi preparada por meio da reação do reagente de Nessler com múltiplas diluições de uma solução estoque de 5,9 mM de cloreto de amônio (NH₄Cl), correspondendo à faixa de concentração de 0,10 a 1,18 µmol de NH₃.mL⁻¹. Uma unidade de atividade da hASNaseI (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária à liberação de 1 µmol de NH₃ por min da reação em pH 7,4 e 37 °C. A equação do gráfico da curva de calibração é mostrada abaixo (4), juntamente com o coeficiente de correlação linear (R²):

$$y = 1,756x \quad (4) \\ R^2 = 0,9993$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação de proteínas totais produzidas por *E. coli* nos ensaios do planejamento fatorial

Por meio da quantificação de proteínas totais, foi possível traçar um perfil de produção de proteínas pela bactéria durante os ensaios de expressão de hASNaseI (Figuras 7 e 8). É possível observar uma maior concentração de proteínas totais na fração sobrenadante do lisado de células, no entanto, pelas análises de eletroforese (Figura 9), identificou-se que o precipitado contém majoritariamente hASNaseI, que se encontra na forma de corpo de inclusão. Isso pode ser explicado pelo fato de que o método de quantificação dos corpos de inclusão pelo BCA não é o mais adequado quando estes ainda estão na forma insolúvel. Essas informações diretas foram valiosas para a tomada de decisões mais assertivas com relação aos próximos ciclos de ensaios fatoriais, uma vez que a purificação é favorecida pela menor quantidade de proteínas contaminantes, que estão presentes na fração solúvel. Dessa forma, optou-se em prosseguir o estudo para otimização da produção de hASNaseI em corpos de inclusão.

Figura 7 – Avaliação da produção de proteínas totais nos sobrenadantes dos cultivos provenientes do planejamento fatorial Box–Behnken 3^3 em frascos agitados.

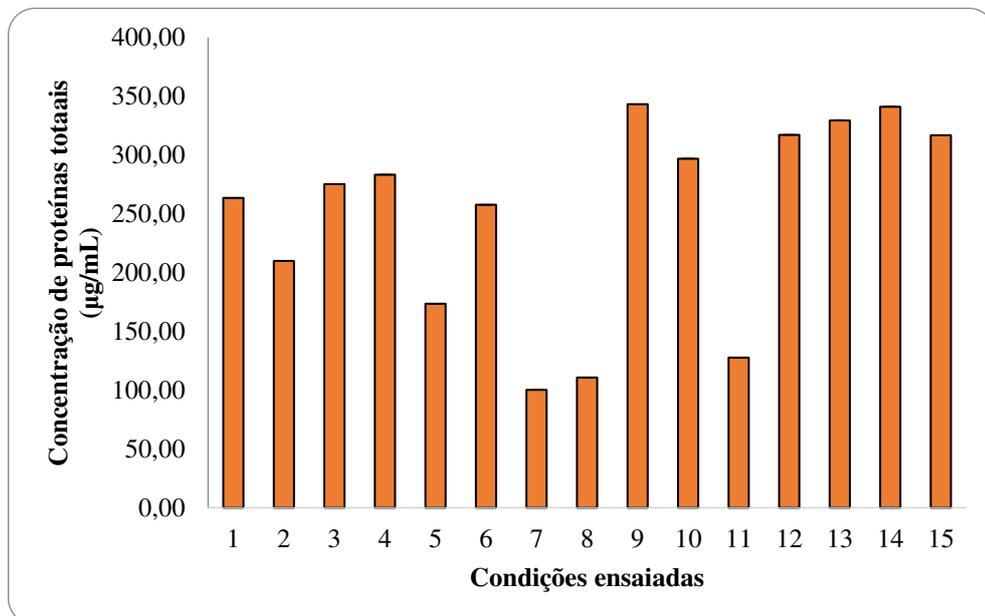


Figura 8 – Avaliação da produção de proteínas totais nos precipitados dos cultivos provenientes do planejamento fatorial Box–Behnken 3^3 em frascos agitados.

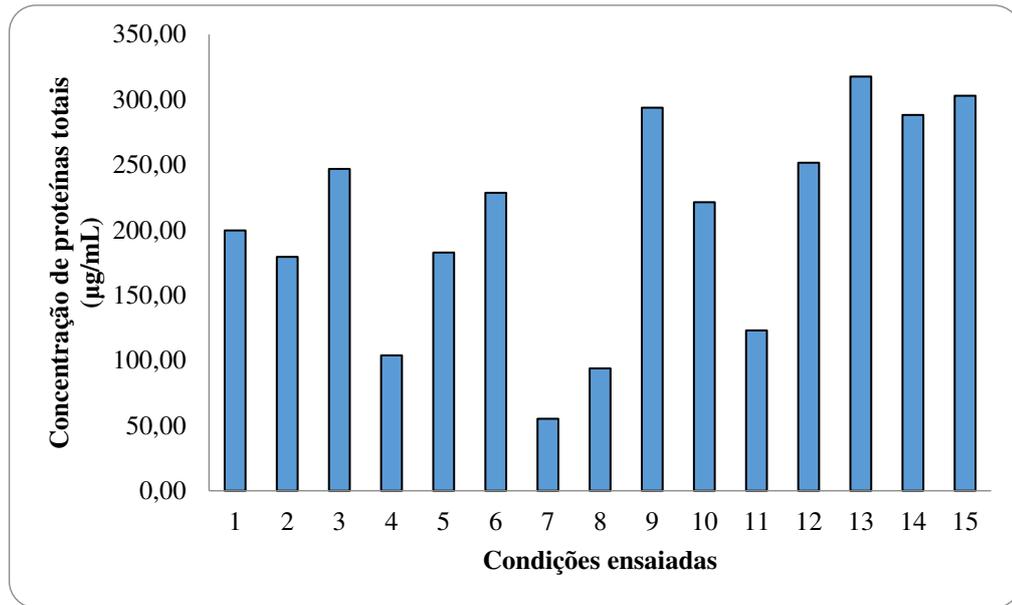
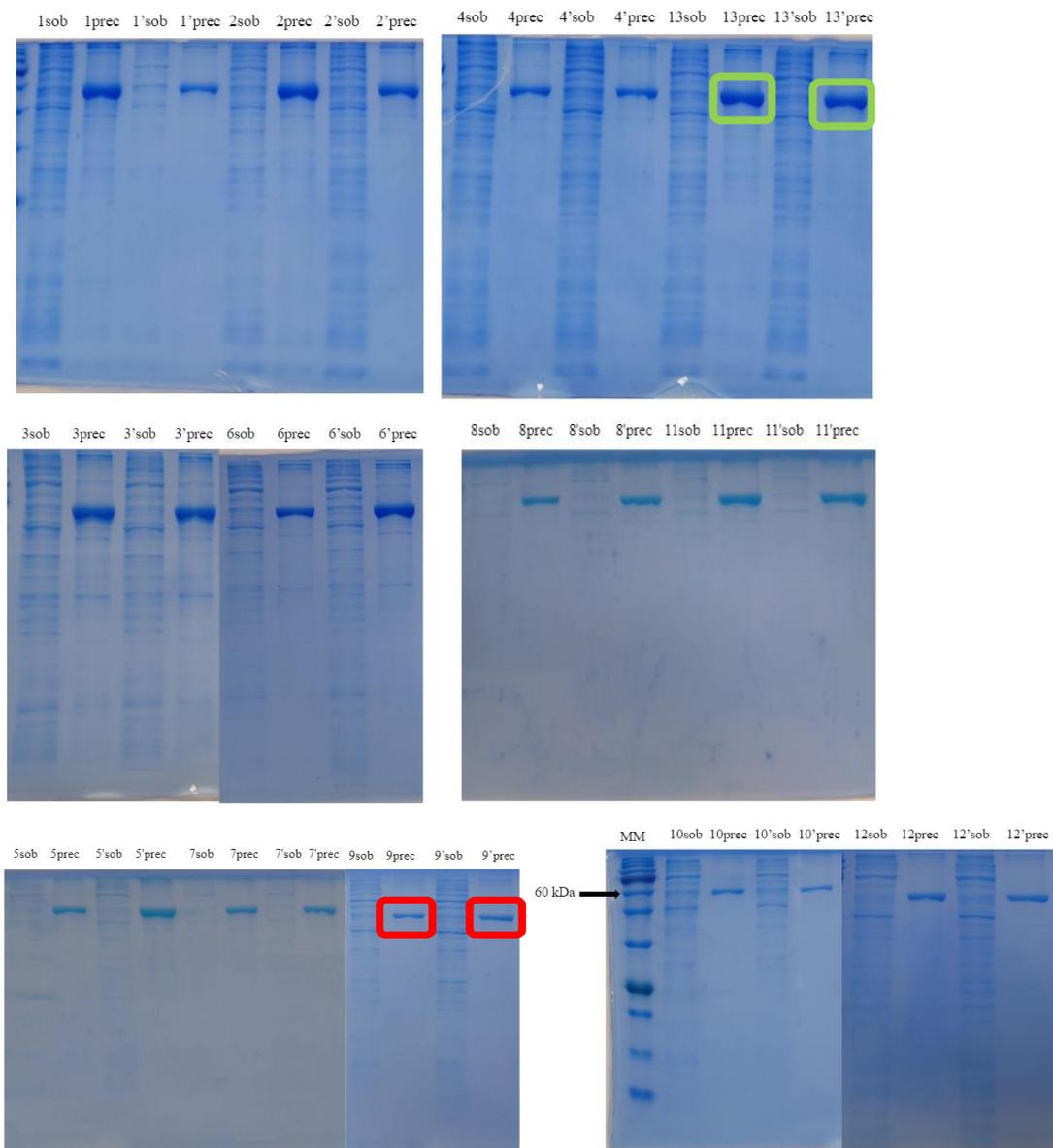


Figura 9 – Géis de eletroforese SDS-PAGE para visualização das proteínas intracelulares, incluindo hASNaseI, de *E. coli*.



Fonte: elaborado pela autora. Xsob e Xprec representam, respectivamente, as bandas de migração eletroforética das proteínas das amostras de sobrenadante e precipitado provenientes do rompimento das células de *E. coli* produzidas em cada ensaio do planejamento fatorial (1 a 13). A seta preta está indicando a banda do marcador molecular *TrueColor High Range Protein Marker* (10-245 kDa) correspondente a 60 kDa, de mesmo peso molecular que hASNaseI (39 kDa da hASNaseI humana + aproximadamente 20 kDa da TAG SUMO + 0,8 kDa da cauda de poli-histidina).

4.2 Otimização da produção de hASNaseI expressa em *E. coli* na forma de corpos de inclusão

Durante o rompimento celular, observou-se que diferentes condições de expressão levavam ao aumento ou diminuição do tempo de homogeneização do *pellet*, devido a produção maior ou menor de biomassa. Com base nesses dados, estipulou-se que o tempo de sonicação necessário seria realizado de acordo com a homogeneização total do *pellet*, e portanto, cada condição do cultivo teve um período de sonicação diferente, não ultrapassando 15 minutos. O volume de tampão utilizado para sonicação foi padronizado em todas as condições. Para isso, os *pellets* foram aliquotados e padronizados, sendo que, para cada 0,0054 g de *pellet*, foram adicionados 1 mL de tampão para sonicação.

A enzima hASNaseI foi expressa em *E. coli* em todas as condições testadas nos ensaios do planejamento, e a lise celular por sonicação mostrou-se eficiente para obtenção da hASNaseI, como pode ser verificado nos géis de eletroforese SDS-PAGE (Figura 9), sendo a hASNaseI correspondente à banda de aproximadamente 60 kDa.

A partir dos resultados, foi possível observar que a enzima foi majoritariamente expressa em corpos de inclusão se comparada com a forma solúvel (Tabela 2), tendo em vista a aparição no gel de bandas espessas de hASNaseI relativa à fração do precipitado das amostras. A Tabela 2 traz esse compilado de percentuais de hASNaseI na fração insolúvel e na fração solúvel.

A produção majoritária da enzima na forma de corpos de inclusão está de acordo com relatos da literatura, pois, em geral, a superexpressão de proteínas recombinantes em *E. coli* acarreta na agregação citoplasmática dessas proteínas na forma de corpos de inclusão, os quais correspondem a >90% da proteína recombinante alvo (KANTE *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2015). Essas estruturas são insolúveis em água e impõem barreiras nos processos downstream, como isolamento, solubilização, renaturação (reenovelamento) e purificação para adquirir a proteína bioativa (KANTE *et al.*, 2018) quando não funcionais (UPADHYAY *et al.*, 2014). Por outro lado, os corpos de inclusão para expressão de proteínas podem representar vantagens, como um nível muito alto de expressão dessas proteínas, como avaliado nesse trabalho, e

resistência ao ataque de proteases, podendo auxiliar na etapa de purificação da biomolécula (UPADHYAY *et al.*, 2014).

Tabela 2 – Percentual de hASNaseI expressa em corpos de inclusão (CIs) e na fração solúvel (FS) para cada ensaio do planejamento fatorial.

Ensaio	% CIs	% FS	σ
1	89,82	10,18	$\pm 0,447$
2	94,65	5,35	$\pm 0,542$
3	96,81	3,19	$\pm 0,728$
4	84,85	15,15	$\pm 0,564$
5	94,43	5,57	$\pm 1,605$
6	96,80	3,20	$\pm 0,192$
7	99,45	0,55	$\pm 0,069$
8	58,32	41,68	$\pm 4,694$
9	72,43	27,57	$\pm 3,754$
10	60,58	39,42	$\pm 2,463$
11	71,50	28,50	$\pm 6,074$
12	93,58	6,42	$\pm 0,409$
13	91,92	8,08	$\pm 0,470$

Fonte: dados da pesquisa. Essa é uma medida obtida da análise indireta, usando o *software* ImageJ, de quantificação de hASNaseI do sobrenadante (fração solúvel) e do precipitado (corpos de inclusão).

No que diz respeito à quantidade de hASNaseI expressa em relação ao total de proteínas para cada ensaio do planejamento fatorial conduzido, esses dados foram compilados de acordo com as estimativas indiretas obtidas por meio da comparação das bandas de proteínas em SDS-PAGE usando *software* ImageJ, conforme apresentados na Tabela 3.

Chohan *et al.*, 2018 conseguiram observar em seu estudo uma grande quantidade de L-asparaginase recombinante (Pcal_0970), sendo cerca de 30% do total de proteínas das células de *E. coli*. Comparativamente, neste trabalho a indução com IPTG resultou na produção de hASNaseI em quantidade razoável (Tabela 3), tendo os ensaios de 1 a 6 as melhores combinações das condições de cultivo e expressão para uma boa produção de hASNaseI, com destaque para o ensaio 3, que correspondeu a uma produção de 18% de hASNaseI com relação

ao total de proteínas de *E. coli*. Nesse ponto 3, as condições eram de 4 h o tempo de expressão da enzima, 0,4 mM do indutor de expressão IPTG e 31 °C de temperatura de indução. Com um período de até 8h de expressão, foi alcançada uma boa quantidade de hASNaseI, o que pode ser um resultado promissor em comparação aos achados similares no trabalho de Chohan *et al.*, 2018.

Tabela 3 – Percentual de hASNaseI com relação às proteínas totais produzidas pela célula de *E. coli* em cada ensaio.

Ensaio	% hASNaseI em proteínas totais
1	10,84
2	11,63
3	18,00
4	15,26
5	0,32
6	14,41
7	4,67
8	2,89
9	2,22
11	2,40
12	3,01
13	7,48

Fonte: dados da pesquisa. A quantificação de proteínas totais nesse caso foi feita usando o ImageJ, a fim de comparar as bandas de proteínas totais em SDS-PAGE com as de hASNaseI também feitas nesse *software*.

A partir dos dados apresentados na Tabela 3, foi possível observar uma produção de hASNaseI em relação às proteínas totais de *E. coli* nos ensaios 1, 2, 3, 4 e 6, sempre em corpos de inclusão. Dessa maneira, para a otimização e avaliação por superfície de resposta, foram levados em conta apenas os dados de produção de hASNaseI expressas em corpos de inclusão. Além disso, observou-se a menor presença de proteínas contaminantes, o que pode contribuir para realizar menos etapas de purificação, o que é possivelmente uma economia para o bioprocessamento.

4.3 Análises estatísticas e geração de gráficos de superfície resposta

Pela análise da variável resposta do planejamento fatorial, foram considerados apenas os valores de produção de hASNaseI, de acordo com a Tabela 4. É possível observar que o ponto central (cultivos 13 a 15) chegou à produção de hASNaseI acima de 1,70 g/L, a maior dentre todas as combinações testadas, enquanto o cultivo 9 representou uma produção de 0,14 g/L, a menor dentre as observadas.

Tabela 4 – Avaliação da produção de hASNaseI dos cultivos usando planejamento fatorial Box–Behnken 3³ em frascos agitados.

E	hASNaseI (g/L)	Desvio padrão (σ)	hASNaseI (g/L) prevista pelo modelo	Eficiência da equação do modelo (%)
1	1,33287	0,057	1,33731	99,67
2	1,65492	0,170	1,83071	90,40
3	1,61868	0,240	1,45735	111,07
4	1,11661	0,071	1,12675	99,10
5	0,46314	0,071	0,39815	116,32
6	0,80316	0,212	0,72215	111,22
7	0,17170	0,035	0,26723	64,25
8	0,18968	0,049	0,26915	70,47
9	0,13967	0,000	0,22529	62,00
10	0,24519	0,035	0,34385	71,31
11	0,34623	0,007	0,26229	132,00
12	0,54124	0,057	0,46965	115,24
13	1,77179	0,064	1,77893	99,60
14	1,89607	0,064	1,77893	106,59
15	1,64751	0,064	1,77893	92,61

Fonte: elaborado pela autora. E: condições ensaiadas.

De acordo com a Tabela 4, foi possível notar que o ensaio 14 (tempo de expressão de 6h, IPTG de 0,3 mM e temperatura de indução de 31 °C) produziu $1,89 \pm 0,064$ g/L, a maior produção dentre as condições ensaiadas, seguido pelo ensaio 13, de mesmas condições do 14, com $1,77 \pm 0,064$ g/L de produção, e 2 (tempo de expressão de 8 h, [IPTG] de 0,2 mM e temperatura de indução de 31 °C) com uma produção de corpos de inclusão de $1,65 \pm 0,170$ g/L. O ensaio 9 foi responsável pela menor produção de corpos de inclusão, $0,14 \pm 0,000$ g/L.

Os resultados do teste estatístico do modelo, feito pelo teste F para análise de variância (ANOVA), são apresentados (Tabela 5), assim como o gráfico de pareto (Figura 10), os gráficos fatoriais de efeitos principais e de interação (Figuras 11 e 12) e os de superfície de resposta (Figuras 6 a 8). O cálculo da análise de regressão dá o valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9773$), o que indica que 97,73% das variações totais são explicadas pelo modelo. O valor do coeficiente de determinação ajustado (aj. $R^2 = 0,9365$) indicou uma alta significância do modelo. Com isso, foi observado um excelente ajuste do modelo preditivo. Essa grande semelhança entre os valores previstos e observados experimentalmente reflete a precisão e aplicabilidade do modelo Box–Behnken nos processos de otimização (UPPULURI *et al.*, 2013). O ajuste de modelo alcançado neste estudo mostrou-se superior em relação a outros trabalhos de otimização da produção de L-asparaginase (ABDELRAZEK *et al.*, 2019; CHAKRAVARTY *et al.*, 2021; DORIYA; KUMAR, 2018; EL-HADI *et al.*, 2017; UPPULURI *et al.*, 2013).

A aplicação do desenho Box–Behnken 3^3 produziu a Equação 5 de regressão, em que a função matemática que explica a variável resposta por meio de uma relação empírica entre a concentração de hASNaseI em corpos de inclusão e as variáveis de teste em unidades codificadas:

$$\begin{aligned} \text{Massa total de hASNaseI (g/L)} = & -37,01 + 0,968x + 17,52y + 2,149z - 0,0315x^2 - \\ & 21,49y^2 - 0,03441z^2 - 1,030xy - 0,00671xz + 0,037zy \end{aligned} \quad (5)$$

Em que: x é tempo de expressão (h); y é [IPTG] (mM); z é temperatura (°C).

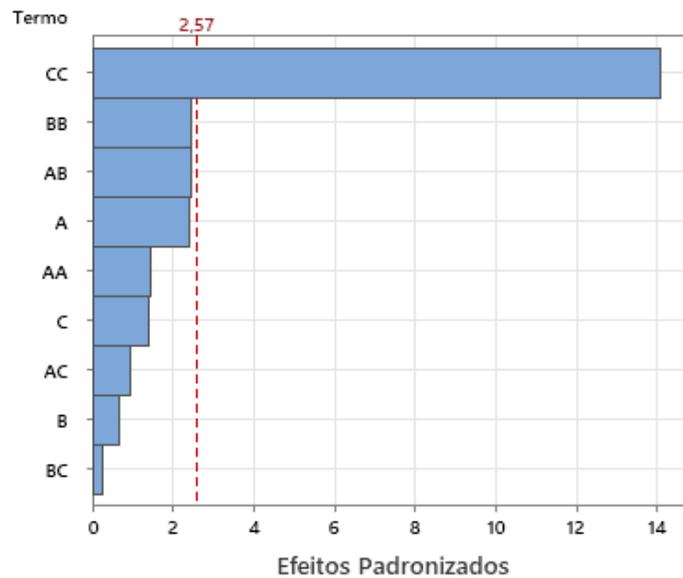
A partir das análises estatísticas, pela tabela de análise de variância, por exemplo, é possível verificar que a variabilidade total do erro está sendo fracionada nos termos estudados (tempo de expressão, temperatura e [IPTG]). A temperatura elevada ao quadrado é o termo que tem o maior valor de F (198,45), que é a razão entre as variâncias da regressão e do erro e permite dizer se a regressão é significativa ou não. Isso condiz com o gráfico de pareto (Figura 10), o qual indicam quais fatores que afetam ou não a resposta.

Neste estudo, a temperatura é o fator que mais influencia na expressão da proteína, consequentemente, a temperatura elevada ao quadrado (termo CC) é o termo que tem o menor valor de P, o que significa que se aceita a hipótese alternativa de que a temperatura influencia na resposta de produção de hASNaseI em corpos de inclusão. O menor valor de F, e consequente maior valor de P, está para a interação entre IPTG e temperatura, o que significa inicialmente que essa interação não tem influência significativa na produção da enzima.

Tabela 5 – Análise de Variância do modelo estatístico gerado por planejamento fatorial Box–Behnken 3³.

Fonte	Contribuição	Valor F	Valor-P
Modelo	97,73%	23,95	0,001
Linear	3,73%	2,74	0,153
Tempo de expressão (h)	2,66%	5,86	0,060
IPTG mM	0,21%	0,46	0,530
Temperatura (°C)	0,86%	1,90	0,227
Quadrado	90,87%	66,79	0,000
Tempo de expressão (h)*Tempo de expressão (h)	0,03%	2,06	0,211
IPTG mM*IPTG mM	0,84%	5,97	0,058
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	89,99%	198,45	0,000
Interação com 2 Fatores	3,14%	2,31	0,194
Tempo de expressão (h)*[IPTG] mM	2,70%	5,95	0,059
Tempo de expressão (h)*Temperatura (°C)	0,41%	0,91	0,384
IPTG mM*Temperatura (°C)	0,03%	0,07	0,802
Erro	2,27%		
Falta de ajuste	1,78%	2,41	0,306
Erro puro	0,49%	*	*
Total	100,00%		

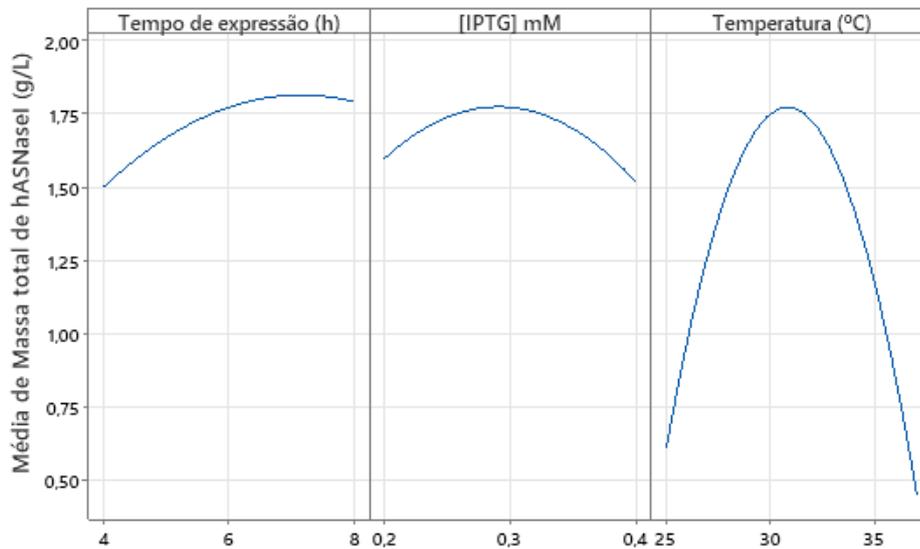
Figura 10 – Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para resposta de massa total de hASNaseI (g/L); $\alpha = 0,05$.



Fator A: tempo de expressão (h); fator B: IPTG mM; fator C: temperatura (°C).

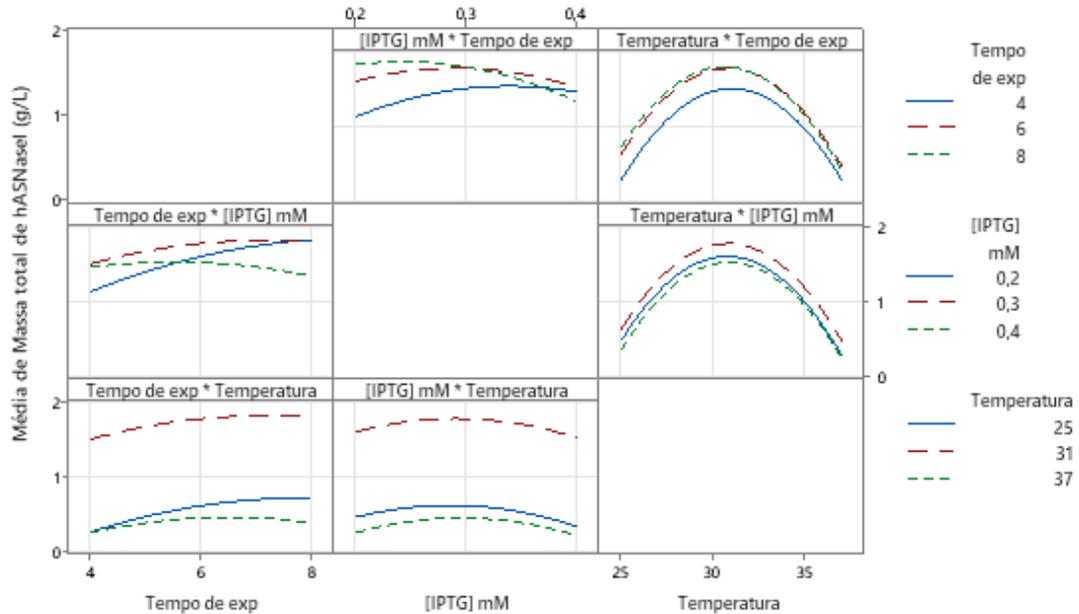
Os gráficos fatoriais destacam como os fatores influenciam na resposta (Figura 11). Nesses gráficos, é indicado como a resposta é alterada em função da mudança de nível dos fatores. Aumentar o tempo de expressão reflete em uma maior produção de corpos de inclusão, sendo que a partir de 8 h é possível observar o começo de um platô na produção. O aumento da temperatura para até 31 °C acompanha o aumento na produção de corpos de inclusão, assim como acontece com a concentração de IPTG até 0,3 mM. Em todos esses casos, o aumento mais significativo na resposta é observado alterando-se a temperatura, o que torna esse fator mais influente na resposta em relação aos demais.

Figura 11 – Gráfico de efeitos principais para Massa total de hASNaseI (g/L); médias ajustadas.



Pela análise dos gráficos de interação (Figura 12), é possível confirmar algumas informações já mencionadas e entender o sinergismo entre as variáveis analisadas. A variação de temperatura em função do tempo de expressão e da concentração de IPTG confirma o valor de 31 °C como sendo a melhor temperatura para a produção. Da mesma forma, a variação do tempo de expressão em função da temperatura e da concentração de IPTG, assim como a variação da concentração de IPTG em função da temperatura e do tempo de expressão, também confirmam os valores de 8 h de expressão e 0,3 mM de IPTG, respectivamente.

Figura 12 – Gráfico de interação entre os fatores temperatura, concentração de IPTG e tempo de expressão, dois a dois, para massa total de corpos de inclusão de hASNaseI (g/L); médias ajustadas.



A temperatura de expressão frequentemente utilizada em outros trabalhos é de 37 °C (BARROS *et al.*, 2021; KISHORE; NISHITA; MANONMANI, 2015; MEENA *et al.*, 2015, 2016), valor maior do que o ótimo encontrado nesse estudo, o que pode ser uma vantagem dependendo do processo. Além disso, a faixa de concentração de IPTG testada nesse estudo chega a ser bem menor do que a concentração de IPTG usada com frequência em muitos trabalhos, que é de 1 mM ou mais, o que representa uma redução de, pelo menos, 70% nos custos de consumo de IPTG para o processo (FARAHAT; AMR; GALAL, 2020; GHOSHON *et al.*, 2015; KEBEISH *et al.*, 2016; KISHORE; NISHITA; MANONMANI, 2015; LIMA *et al.*, 2020; MEENA *et al.*, 2015, 2016; MIHOOLIIYA *et al.*, 2020; SAEED *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2017). A concentração de IPTG ótima, de 0,3 mM, condiz com valores próximos na literatura (BARROS *et al.*, 2021; CHOCHAN *et al.*, 2018; GHASEMI *et al.*, 2017; RADHA; ARUMUGAM; GUMMADI, 2018; SAFARY *et al.*, 2019).

Os resultados mostram que a temperatura ótima para a produção está localizada próxima ao ponto central, 31 °C, sendo a temperatura de 25 e 37 °C desfavoráveis ao aumento da produção de hASNaseI. A concentração do indutor seguiu a mesma tendência, os pontos extremos de 0,2 e 0,4 mM de IPTG, e de expressão (4 e 8 h) não foram favoráveis à expressão da proteína específica. O tempo de expressão, por sua vez, apresentou uma relação linear com o aumento da produção da enzima, pois à medida em que foi aumentado, mais produção foi

observada. Isso mostra que o planejamento está abrangendo toda a faixa necessária para otimização, e evidencia que o modelo preditivo está muito bem ajustado.

Os gráficos de superfície de resposta (Figuras 13, 14 e 15) foram gerados em função de dois fatores ao mesmo tempo, mantendo todos os outros fatores em níveis fixos. A concentração de hASNaseI para diferentes valores da variável independente também pode ser previsto a partir dos respectivos gráficos de superfície de resposta. Os gráficos de superfície de resposta gerados a partir desses dados confirma a hipótese de que nos pontos centrais (ensaios 13 a 15), encontra-se o conjunto de parâmetros ótimos para expressão da proteína alvo.

Figura 13 – Curva de superfície de resposta para produção de hASNaseI em frascos agitados, representando a interação entre tempo de expressão (h) e IPTG (mM).

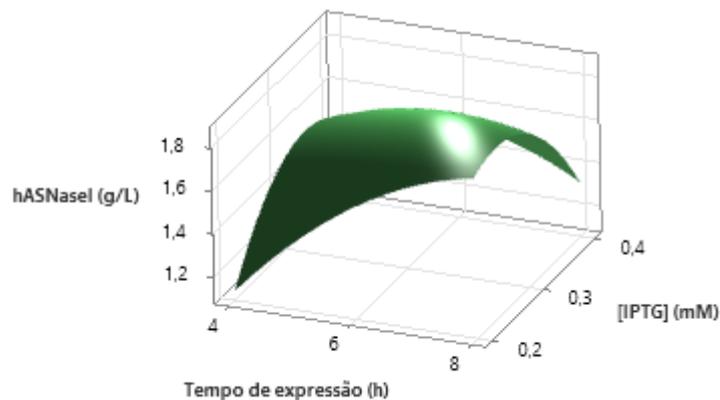


Figura 14 – Curva de superfície de resposta para produção de hASNaseI em frascos agitados, representando a interação entre temperatura de indução (°C) e tempo de expressão (h).

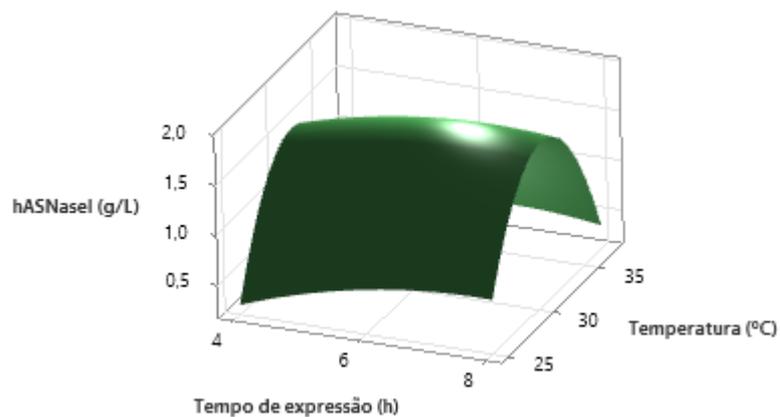
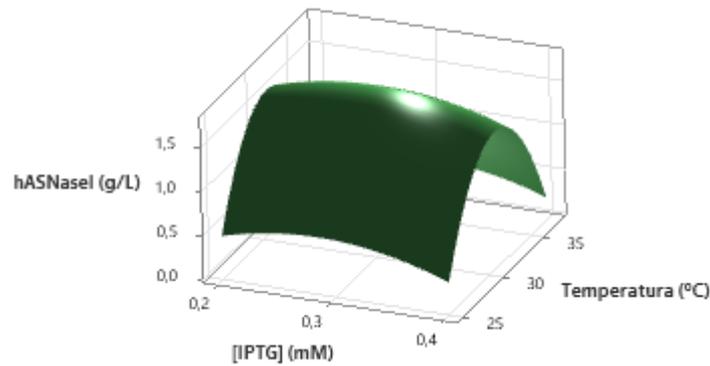


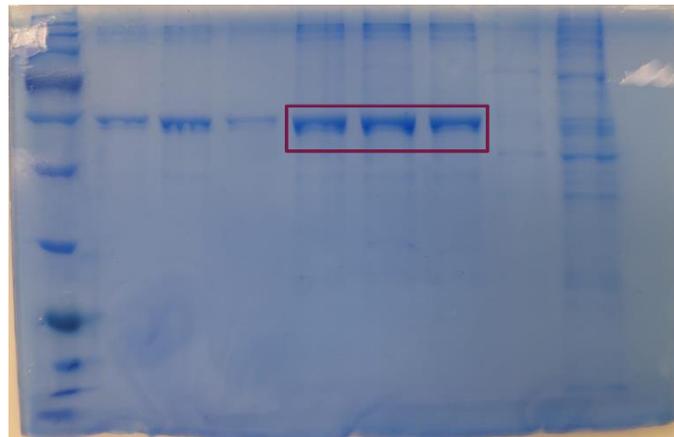
Figura 15 – Curva de superfície de resposta para produção de hASNaseI em frascos agitados, representando a interação entre temperatura de indução (°C) e IPTG (mM).



4.4 Otimização da resposta de produção de hASNaseI em corpos de inclusão

Usando o otimizador de resposta do *software* Minitab, verificou-se que o tempo de expressão de 8 h, a temperatura de 30,57 °C e a concentração de IPTG de 0,24 mM é a combinação ideal para a expressão da proteína neste estudo. O gel de eletroforese da condição otimizada (Figura 16) confirma a predição, todavia a temperatura abaixo de 31 °C pode ter contribuído para a diminuição da produção, uma vez que a banda ficou mais fina do que nos outros ensaios, apresentando a concentração de proteínas de $354,78 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 32,654$.

Figura 16 – Gel de eletroforese SDS-PAGE para visualização de hASNaseI intracelular no ensaio de validação da otimização.

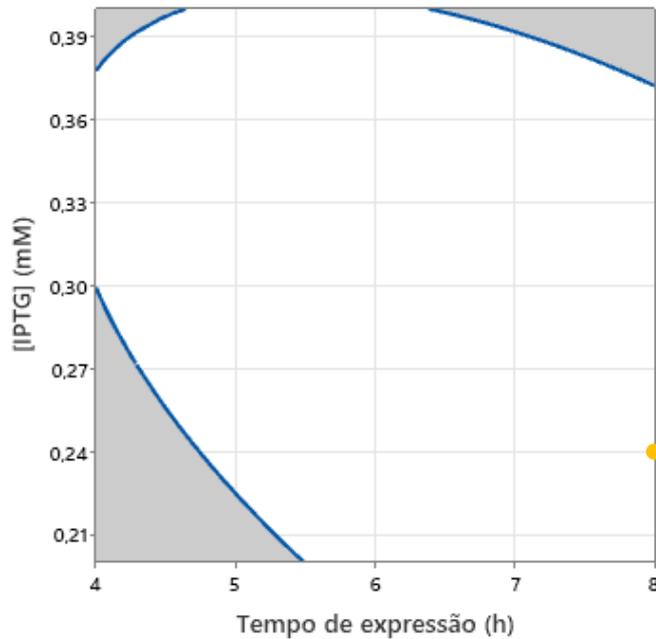


As bandas destacadas representam a migração eletroforética das proteínas das amostras de precipitado provenientes do rompimento das células de *E. coli* produzidas no ensaio de validação com 8 h de expressão.

Para se alcançar uma produção de hASNaseI dentro da faixa de 1,5 a 2 g/L, foram previstas pelo otimizador de resposta do *software* combinações de IPTG (mM) e tempo de expressão (h) (Figura 17), IPTG (mM) e temperatura (°C) (Figura 18) e tempo de expressão (h)

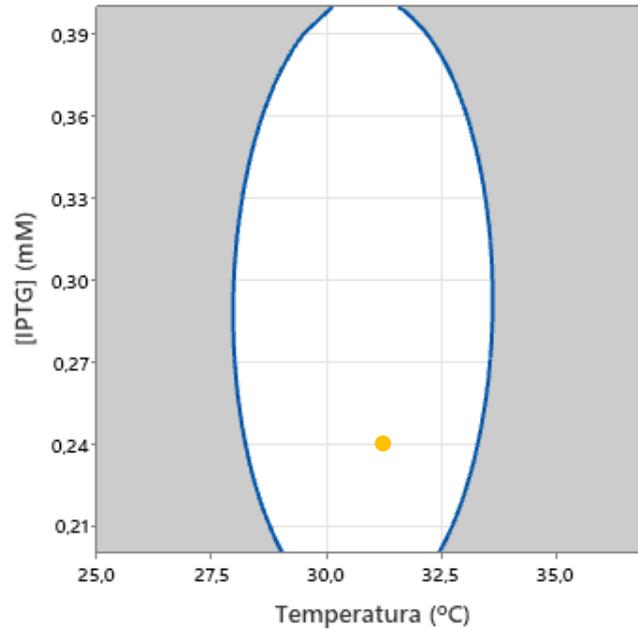
e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (Figura 19), em que dentro da região branca observada nos gráficos tem-se a máxima produção de hASNaseI.

Figura 17 – Gráfico de contorno sobreposto de hASNaseI (g/L) para um valor mínimo de produção de 1,5 g/L e máximo de 2 g/L, considerando a influência das variáveis IPTG (mM) e tempo de expressão (h).



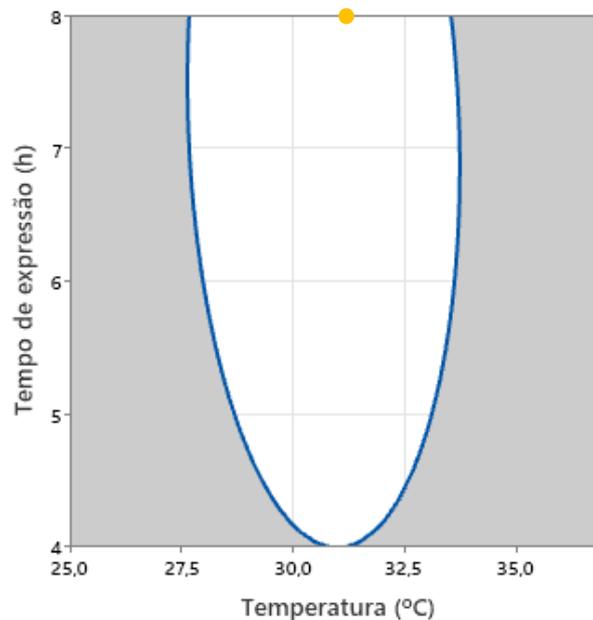
A linha contínua em azul representa o limite inferior de 1,5 g/L de hASNaseI, enquanto a linha pontilhada em azul representa o limite superior de 2 g/L de hASNaseI. No ponto amarelo, encontra-se a combinação ótima: 0,24 mM de IPTG e 8 h de expressão.

Figura 18 – Gráfico de contorno sobreposto de hASNaseI (g/L) para um valor mínimo de produção de 1,5 g/L e máximo de 2 g/L, considerando a influência das variáveis [IPTG] (mM) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$).



A linha contínua em azul representa o limite inferior de 1,5 g/L de hASNaseI, enquanto a linha pontilhada em azul representa o limite superior de 2 g/L de hASNaseI. No ponto amarelo, encontra-se a combinação ótima: 0,24 mM de IPTG e temperatura de 31,57 °C.

Figura 19 – Gráfico de contorno sobreposto de hASNaseI (g/L) para um valor mínimo de produção de 1,5 g/L e máximo de 2 g/L, considerando a influência das variáveis tempo de expressão (h) e temperatura (°C).



A linha contínua em azul representa o limite inferior de 1,5 g/L de hASNaseI, enquanto a linha pontilhada em azul representa o limite superior de 2 g/L de hASNaseI. No ponto amarelo, encontra-se a combinação ótima: 8 h de expressão e temperatura de 31,57 °C.

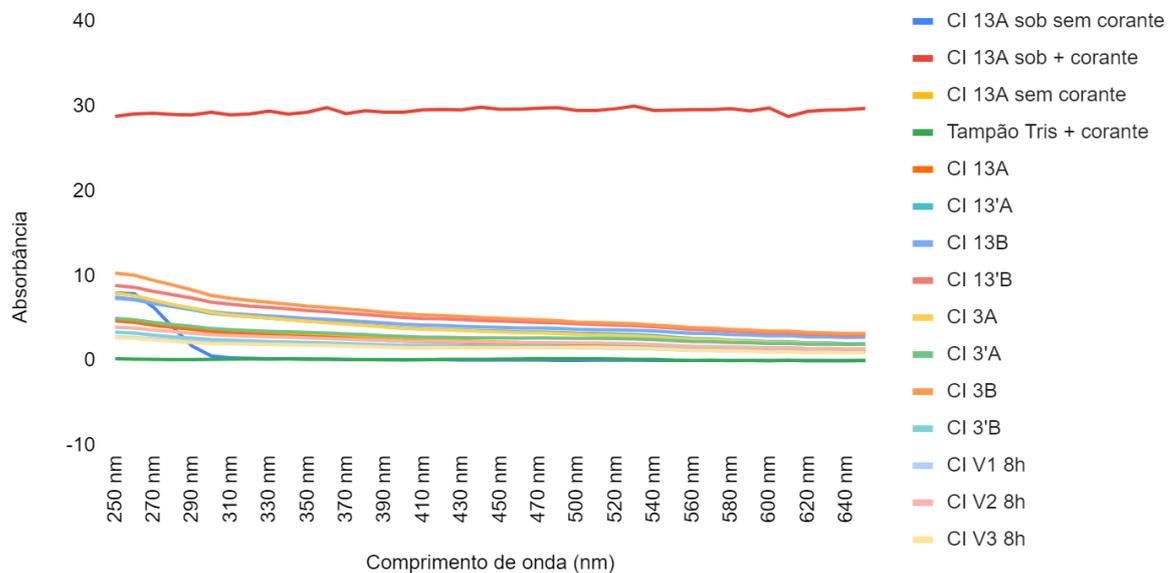
As condições estudadas nesse trabalho estavam dentro de uma região ótima. A combinação de tempo de expressão (h) e temperatura (°C), assim como concentração de IPTG (mM) e temperatura (°C), também seguiu a mesma tendência. A análise dessas faixas de trabalho e resposta são fundamentais para auxiliar na tomada de decisões das faixas de trabalho no biorreator, em termos de escalonamento de processo.

4.5 Caracterização dos corpos de inclusão quanto à presença de ligações β -amiloide

Pela análise da presença de ligações β -amiloide nos corpos de inclusão, foi possível observar que essa estrutura não está formada nos corpos de inclusão obtidos nesse estudo pois não houve deslocamento nos picos de absorbância (Figura 20).

Sobre essa caracterização dos aglomerados proteicos, de maneira geral, as propriedades tintoriais dos corpos de inclusão, quando na presença de corante vermelho Congo, confirma que eles compartilham características estruturais comuns com fibrilas amiloides (CARRIÓ *et al.*, 2005). Com base na investigação das características conformacionais dos corpos de inclusão de hASNaseI por meio da ligação ao corante vermelho Congo, é possível inferir que não há estruturas β -amiloides sendo formadas nesses agregados, pois não foram formadas ligações com o corante, o que seria constatado pelo deslocamento da absorbância máxima de ~490 nm para ~505 nm (CARRIÓ *et al.*, 2005; UPADHYAY *et al.*, 2012). Essa formação de ligações β -amiloides é comparável com o mecanismo de cristalização, em que o crescimento de agregados requer a formação de um núcleo, a espécie de maior energia na via. Com a formação de um núcleo, a subsequente adição de monômeros ao polímero em crescimento é favorecida energeticamente e o crescimento prossegue de forma mais rápida (CARRIÓ *et al.*, 2005). Isso embasa o entendimento sobre a agregação de proteínas para formação dos corpos de inclusão, que depende dessa nucleação. O fato de essas estruturas não serem formadas nos corpos de inclusão analisados neste estudo pode ser uma vantagem para a estratégia de solubilização desses agregados, já que essas estruturas β -amiloides rígidas não estão presentes.

Figura 20 – Espectro de absorção do vermelho do Congo das proteínas insolúveis produzidas em *E. coli*.



Fonte: elaborado pela autora. O corante vermelho do Congo foi incubado com as amostras 13 e 3 do planejamento fatorial e validação (V1, V2 e V3). CI: corpo de inclusão.

Essas informações são importantes para a etapa seguinte, de solubilização dos corpos de inclusão, uma vez que métodos mais brandos podem ser escolhidos para alcançar uma solubilização eficiente desses agregados, uma vez que não são observadas essas estruturas rígidas (SINGH *et al.*, 2015).

4.6 Solubilização dos corpos de inclusão e determinação de diâmetro hidrodinâmico por dispersão de luz dinâmica após solubilização

Devido à estrutura não possuir estruturas β -amiloides, métodos de solubilização branda dos agregados foram adotados (SINGH *et al.*, 2015). Além disso, como os agregados não apresentaram atividade quando testados pelo método de Nessler, a etapa de solubilização foi necessária.

A partir dos ensaios de solubilização, foi observado quais condições eram mais favoráveis qualitativamente. O critério analisado nesse caso foi a formação de *pellet* após centrifugação das amostras solubilizadas, em que, havendo formação de *pellet*, a solubilização não foi bem-sucedida e não havendo formação a solubilização foi eficiente (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação qualitativa da solubilização dos corpos de inclusão de hASNaseI.

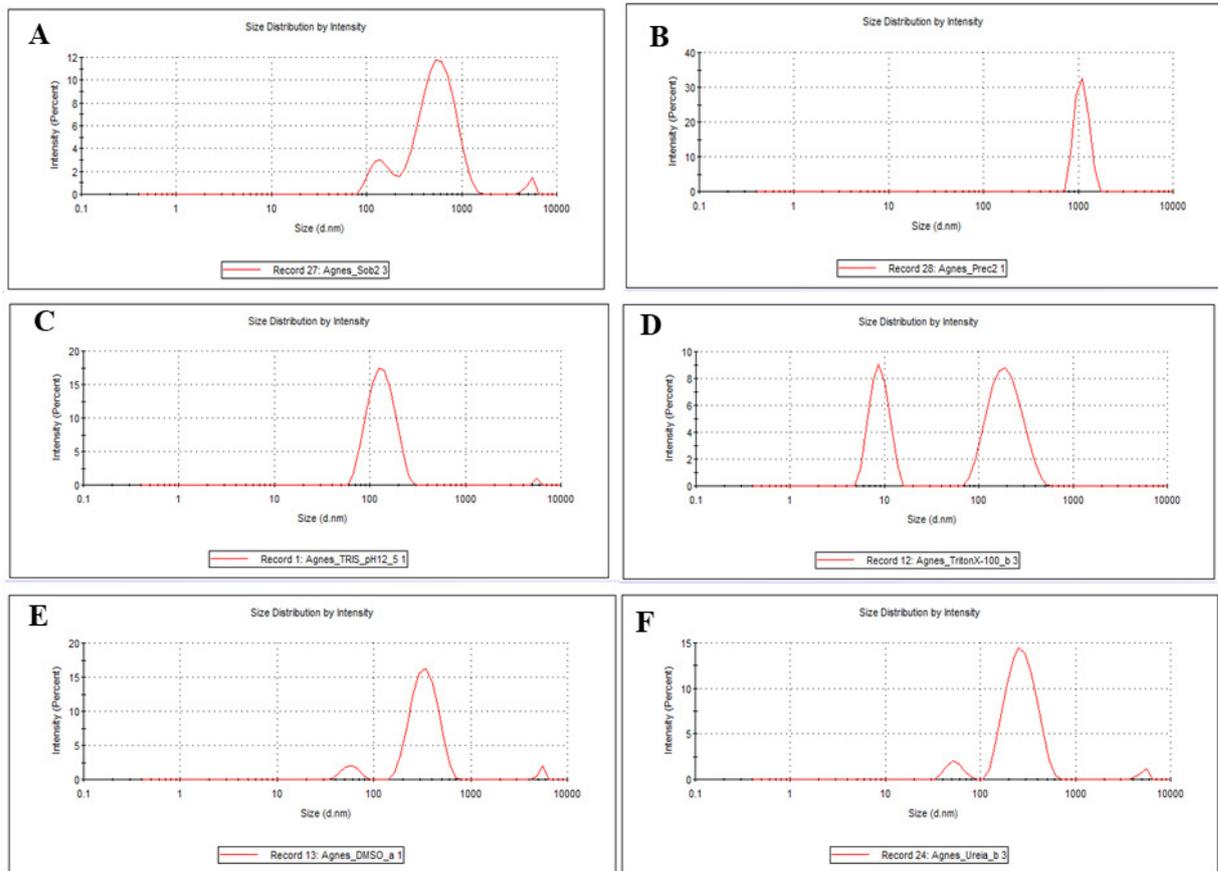
	<i>Overnight</i> (16 h)			6 h			1 h
	4 °C (s/hom.)	25 °C (s/hom.)	Com homog.	4 °C (s/hom.)	25 °C (s/hom.)	Com homog.	Com homog.
T1	++	++	++	+	+	+	
T2	++	++	+++	+	+++	x	
T3			+++				+++
T4	+	x	x	x	x	x	

Análise qualitativa) dos tubos após centrifugação 10000 x g, 20 °C, 5 min. O sinal de + representa presença de *pellet* após a centrifugação, e x representa ausência de *pellet* após a centrifugação. Com homog. Significa com homogeneização e s/hom. significa sem homogeneização. Condições analisadas: Tris pH 12,5 (T1), Triton X-100 0,5% (T2), Ureia 4 M (T3) e Triton X-100 em Tris pH 12,5 (T4).

A avaliação quantitativa também foi conduzida para determinar qual a melhor condição de solubilização dentre as analisadas. Uma triagem inicial foi feita, utilizando agentes de solubilização ureia 2M, DMSO 5%, Triton X-100 0,5% e solução Tris 100 mM pH 12,5 (Figura 21). Nessa triagem inicial, foi observado que a condição mais promissora foi a solução Tris pH 12,5 e Triton X-100. Portanto, essas duas condições foram combinadas para novos testes e revelaram-se ideais para a solubilização dos corpos de inclusão tanto qualitativamente quanto quantitativamente, por meio de dispersão de luz dinâmica (DLS) (Tabela 7).

Esses resultados podem ser explicados devido ao fato de que, em pH ácido, os corpos de inclusão se contraem e estando em pH básico, a proteína pode ser solubilizada (SINGHVI *et al.*, 2020). Embora o tampão Tris tenha pouca ou nenhuma capacidade de tamponamento em pH além de $8,0 \pm 1,0$, ele foi usado nos estudos de faixa de pH para eliminar possíveis efeitos dos componentes do tampão na solubilidade do corpo de inclusão (LU; LIN, 2012). Todavia, a elevação do pH deve ser feita com cautela para evitar possível hidrólise da proteína de interesse.

Figura 21 – Gráficos de polidispersão de luz dinâmica.



Fonte: elaborado pela autora. Um controle negativo com sobrenadante do cultivo não solubilizado foi usado (A), assim como para o precipitado do cultivo (B) e para os sistemas após solubilização dos corpos de inclusão por Tris 100 mM pH 12,5 (C), Triton X-100 0,5% (D), DMSO 5% (E) e ureia 2 M (F).

Para comparação com os valores obtidos no DLS, foi feita a medição do diâmetro hidrodinâmico de hASNaseI (resíduos 1 a 369) e proteína SUMO, usando a ferramenta PyMOL (Figura 22). O corpo de inclusão apresentou uma distribuição de diâmetros em torno de 1000 nm, o que foi utilizado como parâmetro para determinar se houve solubilização ou não, pois se houver solubilização, a população de diâmetro médio de 1000 nm seria diminuída, e irá aparecer novas populações de menores diâmetros.

A condição de solubilização com solução Tris 100 mM, pH 12,5, Triton X-100 0,5% foi a única dentre as condições avaliadas, mostradas na tabela 7, em que se pôde observar uma distribuição de diâmetros entre 7,7 e 10 nm, que corresponde aproximadamente ao diâmetro hidrodinâmico da enzima solúvel. A partir disso, seguiu-se para determinar outros parâmetros, como tempo de exposição ao agente de solubilização, a temperatura de solubilização e a presença ou não de homogeneização.

Dentro dessas condições, percebeu-se que com a homogeneização realmente houve uma redução do tamanho da partícula/corpo de inclusão, mas como essa diferença não foi significativa entre o homogeneizado ou não, escolheu-se a melhor condição como sendo sem homogeneização, porque assim se retira uma etapa do processo, o que representa redução de custo em etapa industrial. O mesmo raciocínio foi adotado para a escolha do tempo de solubilização, de 6 h. Foi observado também que em temperaturas mais baixas, foi alcançado um menor tamanho de partícula em alguns casos, mas em outras condições, de mais tempo de solubilização por exemplo, isso não foi significativo, por isso optou-se por trabalhar a 25 °C. Logo, as condições brandas (25 °C, sem homogeneização e por um período de 6h) (SINGH *et al.*, 2015), foram escolhidas como ideais para a solubilização.

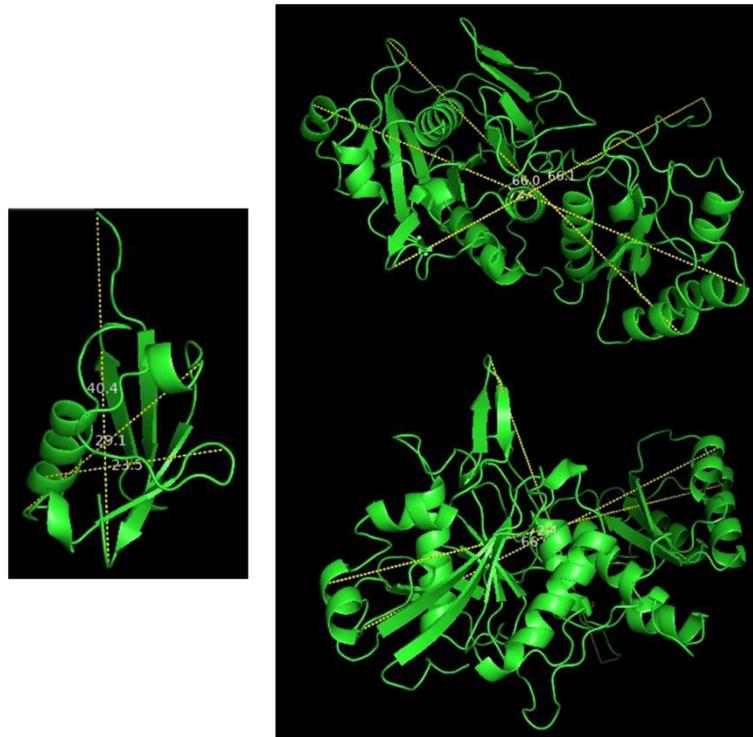
Após a solubilização, as amostras também foram testadas quanto à presença de atividade enzimática pelo método de Nessler, uma vez que em condições brandas de solubilização poderia ser possível manter a conformação nativa da proteína, sem necessidade de redobrimento (SINGH *et al.*, 2015). No entanto, ainda assim não foi observada atividade enzimática das amostras solubilizadas neste estudo.

Tabela 7 – Avaliação quantitativa por dispersão de luz dinâmica (DLS) após solubilização dos corpos de inclusão por Triton X-100 + Tris pH 12,5 (T4), variando-se o tempo de exposição ao agente de solubilização, a temperatura e a presença de homogeneização.

Condição	Distribuição de diâmetro (d.nm)	% Intensidade	Desv. Pad.
T4 + hom por 16 h	8,55	64,67	2,2697
T4 s/hom por 6 h a 4 °C	9,00	64,13	2,0523
T4 s/hom por 6 h a 25 °C	9,14	71,08	2,4387
T4 + hom por 6 h	9,65	72,13	2,3918
T4 s/hom por 16 h a 4 °C	9,35	66,17	2,2202
T4 s/hom por 16 h a 25 °C	8,80	65,76	1,8200
T4	9,65	100	2,4597
Sob 2 sem solubilização	520,00	93,37	223,3333
Prec 2 sem solubilização	1097,67	100	174,5000

Sob 2: sobrenadante do cultivo 2, sem solubilização. Prec 2: precipitado do cultivo 2, correspondendo aos corpos de inclusão sem solubilização.

Figura 22 – Estimativas de diâmetro hidrodinâmico da enzima recombinante livre.

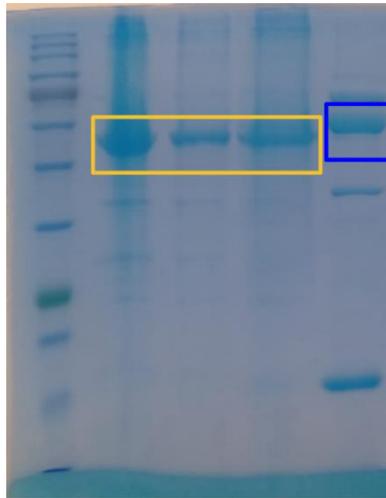


Fonte: elaborado pela autora. À esquerda, distâncias das extremidades da proteína SUMO, 4,04 nm; 2,91 nm e 2,35 nm. À direita, distâncias das extremidades de hASNaseI, 7,24 nm; 6,61 nm e 6,60 nm. Essas distâncias aproximadas estão sendo consideradas como diâmetro hidrodinâmico da enzima recombinante livre/solúvel (~ 8 a 11 nm).

A análise da solubilização dos corpos de inclusão foi feita também a partir de uma corrida eletroforética (Figura 23) após troca do tampão de solubilização em concentrador *Amicon*[®] *Ultra-15 Centrifugal Filters* (30kDa MWCO, Merck, Millipore). A solução de solubilização Tris 100 mM pH 12,5 com Triton X-100 0,5% foi trocado para tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8, para solução fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) com NaOH pH 8 e para solução Tris 100 mM pH 12,5.

Nesse perfil eletroforético, foi possível observar bandas eletroforéticas na fração solúvel que não foram encontradas na fração precipitado após solubilização, o que pode indicar que os corpos de inclusão têm menos contaminantes, ou que a ausência dessas outras bandas pode indicar um enovelamento incorreto no corpo de inclusão, o que explicaria sua ausência de atividade. No trabalho de KARAMITROS; KONRAD, 2014, essa banda pouco acima da banda correspondente à hASNaseI foi atribuída a uma chaperona endógena de *E. coli*, GroEL, e a banda mais abaixo pode significar a proteína SUMO clivada. Mais análises são necessárias para esclarecer essas observações.

Figura 23 – Gel de eletroforese SDS-PAGE para visualização de hASNaseI intracelular solúvel e após solubilização dos corpos de inclusão.



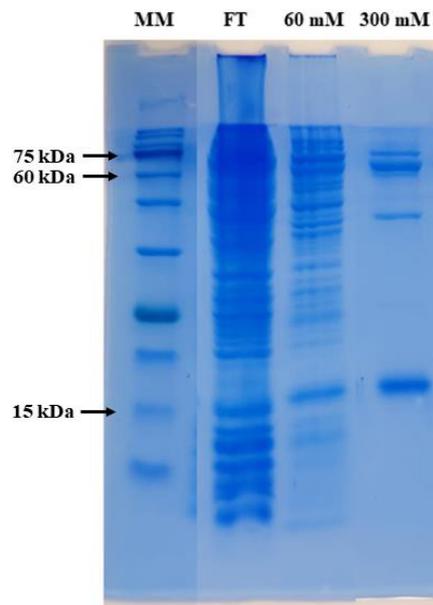
As bandas destacadas em amarelo representam a migração eletroforética de hASNaseI solubilizada na presença de tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8, na presença de solução fosfato/NaOH pH 8 e na presença de solução Tris pH 12,5, respectivamente. A banda destacada em azul representa a migração eletroforética de hASNaseI solúvel após um passo de purificação em coluna HisLink™.

4.7 Produção, purificação e medida de atividade enzimática de hASNaseI solúvel para comparação com os corpos de inclusão

Esses ensaios com a enzima expressa na fração solúvel foram conduzidos para que se pudesse comparar a atividade da asparaginase humana obtida a partir do corpo de inclusão, após solubilização e redobramento. Um gel de eletroforese para as frações proteicas do extrato solúvel passadas em coluna de purificação HisLink™ foi feito (Figura 24), a fim de demonstrar o padrão de migração eletroforético de hASNaseI solúvel.

Foi possível observar que com 300 mM de imidazol, eluiu-se hASNaseI, com uma banda logo acima, identificada por KARAMITROS; KONRAD, 2014 como uma chaperona endógena de *E. coli*. A contaminação por chaperonas co-purificadas pode ser um obstáculo na expressão de proteínas recombinantes e etapas de purificação (KARAMITROS; KONRAD, 2014). No caso deste trabalho, esse tipo de contaminação não foi observada para os corpos de inclusão. A banda dessa chaperona pode ser visualizada tanto na figura 23, da seção anterior, quanto na figura 24 desta seção.

Figura 24 – Gel de eletroforese SDS-PAGE para visualização de hASNaseI solúvel após um passo de purificação em coluna HisLink™.



Fonte: elaborado pela autora. As bandas FT, 60 mM e 300 mM representam a migração eletroforética do *flow through* (FT), que não interagiu com a coluna, os contaminantes proteicos que eluíram com 60 mM de imidazol e, por último, hASNaseI, que eluiu com 300 mM de imidazol.

A atividade observada para hASNaseI nas concentrações 8,04 μM , 9,38 μM e 10,72 μM está resumida na Tabela 8 e pode ser visualizada na Figura 25. Essas informações foram importantes para traçar uma faixa útil de detecção da atividade de hASNaseI.

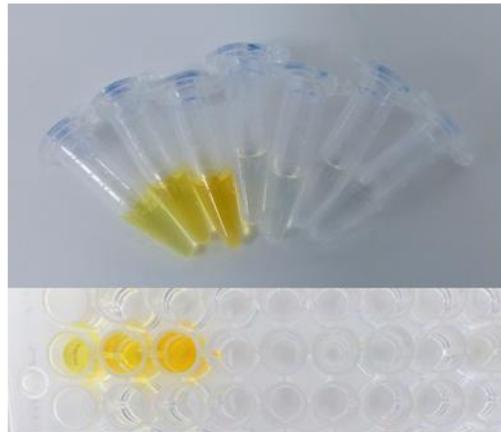
Tabela 8 – Atividade enzimática de hASNaseI em diferentes concentrações.

Amostra hASNaseI (μM)	Amônio ($\mu\text{mol/mL}$)	Atividade enzimática (U/mL)	Concentração hASNaseI (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
8,04	0,216	0,153	0,432	0,3532
9,38	0,375	0,227	0,504	0,4497
10,72	0,582	0,308	0,576	0,5344

Fonte: a autora. U: unidade equivalente à quantidade de μmol de amônia/mL produzido por minuto a 37 °C.

Figura 25 – Atividade enzimática observada para hASNaseI solúvel.

8,04 μM 9,38 μM 10,72 μM C- 8,04 μM C- 9,38 μM C- 10,72 μM B



Fonte: elaborado pela autora. Da esquerda para a direita, estão sendo mostradas as concentrações de 8,04 μM , 9,38 μM e 10,72 μM , seguida dos respectivos controles negativos e o branco.

As concentrações de enzima estabelecidas para obtenção de atividade de hASNaseI solúvel foram usadas como padrão para análise de atividade de hASNaseI após testes de redobramento.

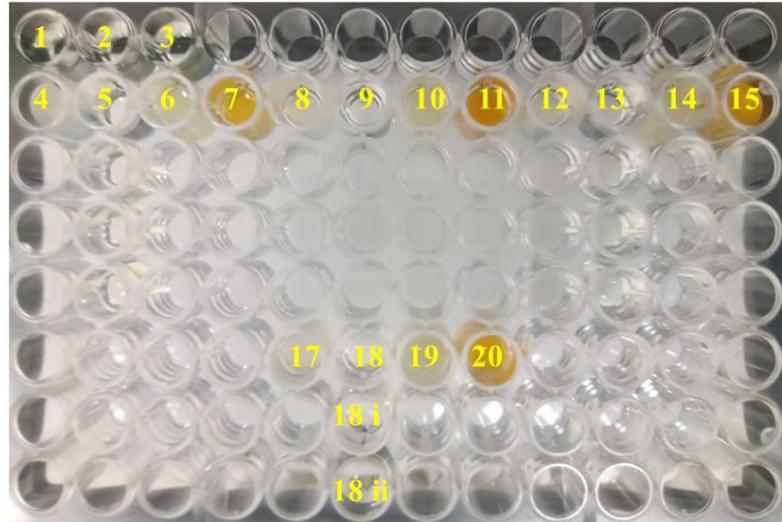
4.8 Testes de redobramento de hASNaseI após solubilização dos corpos de inclusão

Não foi observada atividade enzimática de hASNaseI para as condições de redobramento testadas, o que sugere que o redobramento não ocorreu de maneira correta. A figura 26 mostra na segunda linha da placa os controles negativos, que, como observado, apresentam coloração e turbidez, que nesse caso indica interferência com o reagente de Nessler (falsos positivos), não sendo possível realizar a análise de atividade. As condições em que havia arginina 10 mM não apresentaram interferência com o reagente, mas também não apresentaram atividade enzimática.

Com relação aos reagentes usados para o redobramento, algumas observações podem ser feitas sobre o porquê de não ter funcionado o redobramento. A arginina, embora muito usada no redobramento de proteínas recombinantes a partir de corpos de inclusão, pode atuar como desnaturante de proteínas, e pode interferir nas propriedades de fluorescência da proteína (ALIBOLANDI; MIRZAHOSEINI, 2011). Já o PEG estabiliza as conformações das proteínas, prevenindo a agregação durante o redobramento; e o glicerol é um estabilizador suave da conformação proteica, levando ao aumento das interações hidrofóbicas como consequência de um aumento na ordenação do solvente em torno das proteínas (ALIBOLANDI;

MIRZAHOSEINI, 2011). A concentração de glicerol é crítica para estabilizar a proteína e atuar sobre a cinética de dobramento (ALIBOLANDI; MIRZAHOSEINI, 2011).

Figura 26 – Atividade enzimática não observada para hASNaseI solubilizada e após testes de redobramento.



Fonte: elaborado pela autora. Os poços de 1 a 3 representam os brancos, solução Tris 100 mM pH 12,5, solução fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) com NaOH pH 8 e tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8. A segunda linha, poços de 4 a 15, representam os controles negativos, sendo de 4 a 7 os controles negativos em solução Tris 100 mM pH 12,5 na presença de arginina 100 mM, arginina 10 mM, PEG 4000 0,5% e glicerol 25%, respectivamente. Esses grupos se repetiram de 8 a 11, para solução fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) com NaOH pH 8 e de 12 a 15, para tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8. Dos poços 17 a 20, encontra-se hASNase solubilizada e na presença de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) com NaOH pH 8 e com arginina 100 mM, arginina 10 mM, PEG 4000 0,5% e glicerol 25%, respectivamente

Em virtude de a troca de tampão de solubilização ter acontecido na ausência dos agentes de redobramento, além de ter sido uma troca muito rápida, pode sinalizar um motivo para a ausência de atividade. Mais ensaios são necessários para desenvolver uma metodologia de redobramento eficiente para essa proteína.

O presente trabalho permitiu reunir dados sobre a melhor combinação de parâmetros para a expressão de hASNaseI por *E. coli* Rosetta com vetor pET28a-Sumo, empregando um planejamento fatorial Box–Behnken 3^3 . A enzima recombinante foi principalmente expressa na forma de corpos de inclusão e as condições dos pontos centrais (tempo de expressão de 6 h, concentração de IPTG de 0,3 mM e temperatura de indução de 31 °C) possibilitaram uma maior expressão da hASNaseI de $1,89 \pm 0,064$ g/L. A partir da otimização, foi possível observar uma redução de 20% no uso do IPTG e da temperatura para 30,57 °C. Os testes de solubilização dos

corpos de inclusão revelaram que o Triton X-100 em solução Tris pH 12,5, sem homogeneização, incubado por 6h à temperatura ambiente foi a condição que permitiu maior redução do corpo de inclusão. Por fim, foi verificado que esses agregados proteicos não apresentam característica estrutural de formação de ligações β -amiloides rígidas.

5 CONCLUSÃO

Esse trabalho permitiu *insights* importantes sobre o desenvolvimento de uma estratégia de expressão insolúvel da enzima hASNaseI em *E. coli*, por meio de ferramentas estatísticas. Com este estudo, foi possível avaliar as condições de cultivo, IPTG (mM), temperatura de expressão (°C) e tempo de expressão (h), e otimizá-las para obtenção de alto rendimento na produção do biofármaco antileucêmico hASNaseI na forma de corpos de inclusão, utilizando planejamento fatorial Box–Behnken 3³, em frascos agitados. Além disso, foi possível compreender como está estruturado o corpo de inclusão, assim como determinar estratégias de solubilização desses aglomerados, que representa hoje um desafio industrial, e testar o redobramento. Expressou-se e purificou-se, ainda, hASNaseI na forma solúvel, bem como padronizou-se a atividade enzimática pelo método de Nessler, a fim de comparação com os corpos de inclusão. As próximas etapas incluem estabelecer e otimizar a etapa de redobramento, caracterização de cinética, estrutura e estabilidade da enzima, verificar ausência de atividade glutaminásica e análises econômicas por meio de escalonamento em biorreator.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAZEK, N. A. *et al.* Experimental and bioinformatics study for production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 2019.
- ALIBOLANDI, M.; MIRZAHOSEINI, H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. **Biochemistry Research International**, v. 2011, 2011.
- ALLIED MARKET RESEARCH. Disponível em: <<https://www.alliedmarketresearch.com/specialty-enzymes-market>>. Acesso em 26 de maio de 2022.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (Estados Unidos). **Cancer Facts & Figures 2020**. Atlanta, 2020. 76 p.
- ARUMUGAM, N.; THANGAVELU, P. Purification and anticancer activity of glutaminase and urease free intracellular L-asparaginase from *Chaetomium* sp. **Protein Expression and Purification**, v. 190, 1 fev. 2022.
- ATIENZA, A. Lassaletta. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. Madrid: **Pediatría Integral**, 2016. 10 p.
- BARROS, T. *et al.* Development of processes for recombinant L-asparaginase II production by *Escherichia coli* B121 (De3): From shaker to bioreactors. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2021.
- BATOOL, T. *et al.* A Comprehensive Review on l-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Humana Press Inc., 2016.
- BERRY, D. A. *et al.* Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 7, 2017.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. **Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS- DataSUS. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde – SAS. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2020-2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BUSH, L. A. *et al.* A novel asparaginase-like protein is a sperm autoantigen in rats. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 2, p. 233–247, 2002.
- CAI, H. *et al.* One-step heating strategy for efficient solubilization of recombinant spider silk protein from inclusion bodies. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, 2020.
- CAPITINI, C. *et al.* TDP-43 inclusion bodies formed in bacteria are structurally amorphous, non-amyloid and inherently toxic to neuroblastoma cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- CARRIÓ, M. *et al.* Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. **Journal of Molecular Biology**, v. 347, n. 5, p. 1025–1037, 2005.
- CARRIÖ, M. M.; CUBARSI, R.; VILLAVERDE, A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. **FEBS letters**, v. 471, n. 1, p. 7-11, 2000.
- CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 10, p. 3599–3601, 2005.
- CARRIÖ, M. M.; VILLAVERDE, A. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. **FEBS letters**, v. 489, n. 1, p. 29-33, 2001.
- CHAKRAVARTY, N. *et al.* A potential type-II L-asparaginase from marine isolate *Bacillus australimaris* NJB19: Statistical optimization, in silico analysis and structural modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 174, p. 527–539, 2021.
- CHOHAN, S. M. *et al.* Pcal_0970: an extremely thermostable L-asparaginase from *Pyrobaculum calidifontis* with no detectable glutaminase activity. **Folia Microbiologica**, 2018.
- COSTA, I. M. *et al.* Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: An allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- DE MARCO, A. *et al.* Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. **FEMS Microbiology Reviews**. Oxford University, 2019.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Optimization of solid substrate mixture and process parameters for the production of L-asparaginase and scale-up using tray bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 244–250, 2018.

EDEN, D.; HIPKINS, R.; BRADBURY, C. A. Cerebral Thrombotic Complications Related to L-Asparaginase Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 22, n. 6, p. 589–593, 2016.

EL-HADI, A. *et al.* Statistical optimization of L-asparaginase production by using *Fusarium solani*. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 16, n. 1, p. 16, 2017.

ELSHAFEI, A. M. *et al.* Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 158, 2012.

EMADI & LAW, 2020. Leucemia linfoblástica aguda (LLA). Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/hematologia-e-oncologia/leucemia/leucemia-linfoblástica-aguda-lla>>. Acesso em 26 de maio de 2022.

EVTIMOVA, V. *et al.* Identification of CRASH, a gene deregulated in gynecological tumors. **International Journal of Oncology**, v. 24, n. 1, p. 33-41, 2004.

FARAHAT, M. G.; AMR, D.; GALAL, A. Molecular cloning, structural modeling and characterization of a novel glutaminase-free L-asparaginase from *Cobetia amphilecti* AMI6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 685–695, 2020.

FERLAY, J. *et al.* (ed.). Cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. (IARC CAnceRBase, n. 15). Available at: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2020--2020>. Access in: 18 Jun. 2022.

FERREIRA, D. F. (2008). Estatística multivariada (pp. 662p-662p). Lavras: Editora Ufla.

GARCÍA-FRUITÓS, E. *et al.* Bacterial inclusion bodies: Making gold from waste. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 65-70, 2012.

GHASEMI, A. *et al.* Cloning and characterization of Halomonas elongata L-asparaginase, a promising chemotherapeutic agent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 19, p. 7227–7238, 2017.

- GHOSHON, M. B. *et al.* Extracellular production of recombinant L-Asparaginase II in *Escherichia coli*: medium optimization using response surface methodology. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 21, n. 4, p. 487–495, 2015.
- GUIMARÃES, A. V. F.; FROTA, N. F.; LOURENZONI, M. R. Molecular dynamics simulations of human L-asparaginase 1: Insights into structural determinants of enzymatic activity. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 109, 2021.
- JEVŠEVAR, S. *et al.* Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 2, p. 632–639, 2005.
- JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.
- KANTE, R. K. *et al.* Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization. **Biologicals**, v. 56, p. 45–53, 2018.
- KARAMITROS, C. S.; KONRAD, M. Human 60-kDa lysophospholipase contains an N-terminal L-Asparaginase domain that is allosterically regulated by L-Asparagine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 19, p. 12962–12975, 2014.
- KEBEISH, R. *et al.* Molecular cloning, biochemical characterization, and antitumor properties of a novel L-asparaginase from *Synechococcus elongatus* PCC6803. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 10, p. 1173–1181, 2016.
- KENARI, S. L. D.; ALEMZADEH, I.; MAGHSODI, V. Production of L-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 315–321, 2011.
- KISHORE, V.; NISHITA, K. P.; MANONMANI, H. K. Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large scale production in *E. coli* BL21. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p. 975–981, 2015.
- LIMA, G. M. *et al.* Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, 2020.
- LU, S. C.; LIN, S. C. Recovery of active N-acetyl-d-glucosamine 2-epimerase from inclusion bodies by solubilization with non-denaturing buffers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 1, p. 65–70, 2012.

- MEENA, B. *et al.* L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: Optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of l-asparaginase gene. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- MEENA, B. *et al.* Molecular expression of L-asparaginase gene from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: A prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. **Gene**, v. 590, n. 2, p. 220–226, 2016.
- MEISTER, A. Glutaminase, asparaginase, and α -keto acid- ω -amidase. **Journal of the National Cancer Institute**, 1955.
- MIHOOLIYA, K. N. *et al.* Studies on efficient production of a novel L-asparaginase by a newly isolated *Pseudomonas resinovorans* IGS-131 and its heterologous expression in *Escherichia coli*. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, 2020.
- MISHRA, P.; NAYAK, B.; DEY, R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 3, p. 337-348, 2016.
- NACIONAL DE CÂNCER, I.; GOMES DA SILVA, J. A. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. [s.l: s.n.]. 2020.
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leucemia. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 3, p. 208-221, 2007.
- NGUYEN, H.; SU, Y.; LAVIE, A. Structural Insight into Substrate Selectivity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 55, p. 1246-1253, 2016.
- NOMME, J. *et al.* Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: Insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, v. 51, n. 34, p. 6816–6826, 2012.
- OINONEN, C. *et al.* Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. **Nature structural biology**, v. 2, n. 12, p. 1102-1108, 1995.
- PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. Application of free computational program in experimental design: A tutorial. **Quimica Nova**, v. 41, n. 9, p. 1061–1071, 2018.
- PIETERS, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-249, 2011.

PLUCINSKY, S. M.; ROOT, K. T.; GLOVER, K. J. Efficient solubilization and purification of highly insoluble membrane proteins expressed as inclusion bodies using perfluorooctanoic acid. **Protein Expression and Purification**, v. 143, p. 34–37, 2018.

PRIL, R. DE. The ubiquitin proteasome system in Huntington disease: impairment of the proteolytic machinery aggravates huntingtin aggregation and toxicity. **Leiden University**, 2011.

RADHA, R.; ARUMUGAM, N.; GUMMADI, S. N. Glutaminase free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: Heterologous expression, purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 129–138, 2018.

RAMÓN, A.; SEÑORALE-POSE, M.; MARÍN, M. Inclusion bodies: Not that bad... **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 56, 2014.

RICHET, Medicina & Diagnóstico. Entenda a Leucemia. Disponível em:<<https://www.richet.com.br/clientes/novidades/entenda-a-leucemia/>>. Acesso em 26 de maio de 2022.

RIGOUIN, C. *et al.* Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

RIZZARI, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leucemia. **Current opinion in oncology**, v. 25, p. S1-S9, 2013.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SAEED, H. *et al.* Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* L-asparaginase in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1041–1051, 2018.

SAFARY, A. *et al.* Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halo-thermotolerant *Bacillus* strain. **BioImpacts**, v. 9, n. 1, p. 15–23, 2019.

SANTOS, J. H. P. M. *et al.* Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* host. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 2, p. 416–424, 2017.

SCHALK, A. M. *et al.* Identification and structural analysis of an L-asparaginase enzyme from guinea pig with putative tumor cell killing properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289,

n. 48, p. 33175–33186, 2014.

SHI, R. *et al.* Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 93–99, 2017.

SILVESTRE, A. Análise de dados e estatística descritiva. Escolar editora, 2007.

SINGH, A. *et al.* Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2015.

SINGHVI, P. *et al.* Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 474-486, 2020.

SOUSA NDR. Coordenação Geral de Análises das Contratações de Insumos Estratégicos para a Saúde – CGIES/DLOG/SE/MS. 2013;1–24.

SUGIMOTO, H.; ODANI, S.; YAMASHITA, S. Cloning and expression of cDNA encoding rat liver 60-kDa lysophospholipase containing an asparaginase-like region and ankyrin repeat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 20, p. 12536–12542, 1998.

TAO, H. *et al.* Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. **BioTechniques**, v. 48, n. 1, p. 61–64, 2010.

ULU, A.; ATES, B. Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. **Bioconjugate chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1598-1610, 2017.

UPADHYAY, A. K. *et al.* Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

UPADHYAY, A. K. *et al.* Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 486, 2014.

UPPULURI, K. B. *et al.* Optimization of L-asparaginase production by isolated *Aspergillus niger* C4 from sesame (black) oil cake under SSF using Box-Behnken design in column bioreactor. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 11, n. 1, p. 103–109, 2013.

VIDYA, J. *et al.* Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: An overview. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1775-1781, 2017.

WACKER, P. *et al.* Allergic reactions to *E. coli* L-Asparaginase do not affect outcome in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia a children's oncology group study. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 29, n. 9, p. 627-632, 2007.

WANG, L. *et al.* Bacterial Inclusion Bodies Contain Amyloid-Like Structure. **PLoS biology**, v. 6, n. 8, p. e195, 2008.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1136–1145, 2018.

YANG, Q.; LAI, S. K. Anti-PEG immunity: Emergence, characteristics, and unaddressed questions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 655–677, 2015.

ZHANG, F.; LIU, M.-R; WAN, H.-T. Discussion about several potential drawbacks of PEGylated therapeutic proteins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 335-339, 2014.

**ANEXO A – TABELA DE REFERÊNCIA PARA ESCOLHA DOS PONTOS FATORIAIS DO DESENHO ESTATÍSTICO BOX–
BEHNKEN 3³.**

Tipo de asparaginase	Fonte de C/ Concent.	Fonte de N/ Concent.	Meio/ Volume	Tempo de Indução	O.D	Indutor	Expressão	Agitação	Temperatura	Cepa	Atividade enzimática	Referência
L-Asparaginase II	Glicose Shaker (5 g/L) Biorreator (27,5 g/L)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (4 g/L)	Definido Shaker (50 ml) Bat simples (1,3 L) Bat aliment (3L)	5h após o início do cultivo (no meio da fase exponencial)	0,4-0,8	IPTG (0,45 ou 1 mmol L ⁻¹) Lactose no biorreator (10 gL ⁻¹)	-	180 rpm (shaker) 200-900 rpm (biorreator)	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	43.954,79 U L ⁻¹ (com a batelada alimentada) 1,08 U mg ⁻¹ (atividade específica do extrato bruto)	Barros <i>et al.</i> , 2020
L-Asparaginase II (de <i>E. coli</i> YG 002) extracelular	Ext. de levedura (9 g/L)	Triptona (7,75 g/L) Peptona (5,25 g/L)	TY (50 ml)	após 3h de crescim.; 4h crescendo após induç.	0,6	IPTG (1 mM)	extracelular	160 rpm	34 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	17.386 U/L	Ghoshoon <i>et al.</i> , 2015
L-asparaginase II (de <i>E. coli</i>) *sem expressão heteróloga	Lactose (1,08%)	Extrato de levedura (1,6%)	LB** (50 ml)	-	-	-	-	150 rpm	-	<i>E. coli</i> (ATCC 11303)	1,03 UmL ⁻¹	Kenari, Alemzadeh & Maghsodi, 2011
L-asparaginase II (de <i>E. coli</i>) extracelular	Glicose (20 g/L)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (4 g/L)	Definido (100 ml)	24h	0,8-1,2	IPTG (0,2 mM)	extracelular	200 rpm	20 °C	<i>E. coli</i> BL21 star (DE3)	34,6 U/mg (ativ. específ. no meio de cultural) e 40,8 U/ml por fermentação descontínua	Kim <i>et al.</i> , 2015
L-asparaginase (de <i>Pseudomonas fluorescens</i>)	Ext. de levedura (5 g/L)	Triptona (10 g/L)	LB (6 L)	16h	-	IPTG (1 mM)	intracelular	180 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21	0,94 IU/mg (ativ. especif.)	Kishore, Nishita & Manonmani, 2015

L-ASNase II	Ext. de levedura (0,5%)	Triptona (1%)	LB (200 ml)	22h	0,7	IPTG (1 mM)	intracelular	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21	88,94 ± 1,82 U/mg	Lima <i>et al.</i> , 2020
L-Asparaginase (de <i>Streptomyces griseus</i> NIOT-VKMA29)	Amido (1,48%) <i>S. griseus</i>	Ext. de levedura (2,04%) L-asparagina (1,53%) <i>S. griseus</i>	LB (100 ml)	4h 5% de inóculo	0,6-0,7	IPTG (1 mM)	intracelular	-	37 °C	<i>E. coli</i> M15	123 UI mL ⁻¹	Meena <i>et al.</i> , 2015 uso de Box- Behnken p/ otimizar prod. c/ <i>S.griseus</i>
L-asparaginase (de <i>Nocardioopsis alba</i> NIOT-VKMA08)	-	-	LB (100 ml)	4h	0,6-0,7	IPTG (1,5 mM)	intracelular	-	37 °C	<i>E. coli</i> M15	158,1 IU/mL	Meena <i>et al.</i> , 2016
L-asparaginase II (de <i>Pseudomonas resinovorans</i> IGS-131)	Glicerol (2 ml/L)	L-asparagina (30 g/L)	LB (50 ml)	4h 2% de inóculo	0,4-0,6	IPTG (1 mM)	intracelular	200 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> rosetta DE3	45,7 IU/mL	Mihooliya <i>et al.</i> , 2020
L-asparaginase II (de <i>Aspergillus terreus</i>)	Ext. de levedura (5 g/L)	Triptona (10 g/L)	LB (1 L)	18h	0,6	IPTG (1 mM) IPTG (0,1 mM)	intracelular Corpos de inclusão amorfos e inativos Fração ativa solúvel citoplasmática + 60% corpos de inclusão	200 rpm	37 °C 22 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Atividade asparaginásica de 42,46 U/mg e atividade glutaminásica de 38,2 U/mg (fração ativa solúvel citoplasmática)	Saeed <i>et al.</i> , 2018
L-asparaginase I (de <i>Acinetobacter soli</i> Y-3)	-	-	LB	20h	0,6-0,8	IPTG (100 mg ml ⁻¹)	intracelular	-	16 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	42 ± 4 UI/ml (AsAsnase bruta) 35,2 UI/mg (atividade específica da AsAsnase bruta) 400 UI/ml	Jiao <i>et al.</i> , 2020

											(atividade específica após purificação com Ni-NTA)	
L-asparaginase (de <i>Anoxybacillus flavithermus</i>)	-	-	LB	6h	0,4-0,6	IPTG (0,5 mM)	Enzima solúvel e ativa (intracelular)	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	165 unidades mg ⁻¹ (purificada)	Maqsood <i>et al.</i> , 2020
L-asparaginase (de <i>Thermococcus kodakarensis</i>)	-	-	LB	8h	0,4-0,5	IPTG (0,5 mM)	intracelular (enzima solúvel)	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21	767 μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ para L-asparagina; atividade de 10% em relação à D-asparagina (100% para L-asparagina) e nenhuma atividade detectável para L- ou D-glutamina	Chohan <i>et al.</i> , 2020
L-asparaginase II (de <i>Cobetia amphilecti</i> AMI6)	-	-	LB (100 ml)	4h	0,6	IPTG (1 mM)	intracelular (enzima solúvel ativa)	180 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	778 U/mg	Farahat, Amr & Galal, 2020
L-Asparaginase II (de <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393)	-	-	LB	4h	0,6-0,8	IPTG (0,05 mM)	intracelular (enzima ativa em fração solúvel)	-	- estável a 37 °C e ensaios de atividade, meia-vida, estabilidade conduzidos a 37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Atividade específica de 0,419 IU/mg de proteína purificada e 0,0428 IU/mg no extrato bruto	Aishwarya <i>et al.</i> , 2019
L-asparaginase (de <i>Bacillus</i> sp. SL-1)	-	-	LB	-	0,6	IPTG (0,4 mM)	intracelular (enzima solúvel)	140 rpm	20 °C	<i>E. coli</i> (Origami™ B e BL21)	-	Safary <i>et al.</i> , 2019
L-asparaginase (de <i>Vibrio cholerae</i>)	-	-	LB	6h	-	IPTG (0,3 mM)	intracelular	180 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Atividade específica de 648,9 U/mg após purificação	Radha, Arumugam & Gummadi, 2018

L-asparaginase (de <i>Pyrobaculum calidifontis</i>)	-	-	-	6h	0,4	IPTG (0,2 mmol/L)	intracelular (fração insolúvel que passou por refolding) Os agregados não possuíam atividade, mas a proteína redobrada solubilizada sim	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21- Codon Plus (DE3)- RIL	-	Chohan <i>et al.</i> , 2018
L-asparaginase (de <i>Pseudomonas fluorescens</i>)	-	-	LB	4h	0,6	IPTG (0,5 mM)	intracelular (fração solúvel)	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Atividade específica de 26 U/mg	Sindhu & Manonmani, 2018
L-asparaginase (de <i>Halomonas elongata</i>)	-	-	LB (150 ml)	3h	0,5-0,6	IPTG (1 mM) 0,3-0,5 mM (otimizado)	intracelular (grande quantidade expressa na forma de agregados de proteína)	160 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Atividade específica total de 200 U/mg na condição otimizada (atividade da enzima solúvel foi estimada com base no aumento da atividade específica total) Sem atividade na fração precipitada (agregados)	Ghasemi <i>et al.</i> , 2017
L-asparaginase (de <i>E. coli</i>)	-	-	LB (500 ml)	3h	-	IPTG (0,5 mM)	intracelular	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	-	Zhang, Li & Li, 2017
L-asparaginase (de <i>Paenibacillus barengoltzii</i>)	-	-	LB	overnight	0,6-0,8	IPTG (1 mM)	intracelular (proteína ativa solúvel)	200 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Atividade específica de 35,2 U/mg	Shi <i>et al.</i> , 2017

L-asparaginase (de <i>Synechococcus elongatus</i> PCC6803)	-	-	LB (1,5 L)	3h	0,4	IPTG (1 mM)	intracelular	200 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Atividade da fração purificada em torno de 45-46 μmol NH ₃ /min por mg de proteína	Kebeish <i>et al.</i> , 2016
L-asparaginase I (de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	-	-	LB	3h	0,6-0,7	IPTG (1 mM)	intracelular (corpos de inclusão insolúveis)	180 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Atividade específica de 110,1 IU.mg ⁻¹ (enzima purificada)	Santos <i>et al.</i> , 2016
L-asparaginase I (de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	-	-	LB (1 L)	3h	0,6-0,8	IPTG (1 mM)	intracelular (fração solúvel)	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	196,2U/mg	Costa <i>et al.</i> , 2016
L-asparaginase (de <i>Erwinia carotovora</i>)	-	-	LB (1 L)	6h	0,6-0,8	IPTG (1 mM)	intracelular (proteína solúvel)	-	37 °C	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	12,5 U/mg	Labrou & Muharram, 2016
L-Asparaginase (L- ASPG86) (de <i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i>)	-	-	LB (250 ml)	24h	0,6	IPTG (0,5 mM)	intracelular	200 rpm	30 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	687,1 U/mg	Lee <i>et al.</i> , 2016
L-Asparaginase (de <i>Rhodospirillum rubrum</i>)	-	-	LB (200 ml)	17-20h de crescimento da biomassa após indução	1,0	Lactose (0,2%)	intracelular	-	-	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	140–210 U/mg	Pokrovskaya <i>et al.</i> , 2015
L-asparaginase II (de <i>Escherichia coli</i>)	Glicose (0,5%)	Triptona (1%) Ext. de levedura (0,5%)	LB modificado	3,5h	0,6	IPTG (1 mM)	Corpos de inclusão (passou por solubilização e refolding)	200 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	190 IU/mg (purificada)	Upadhyay <i>et al.</i> , 2014
L-Asparaginase (de <i>Staphylococcus sp.</i>)	-	-	LB	4h	fase exponencial	IPTG (0,5 mM)	intracelular (enzima solúvel)	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	113,06 U/mg	Han, Jung & Park, 2014

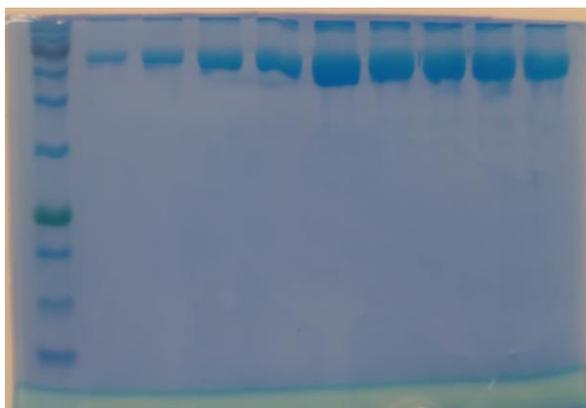
L-asparaginase (de <i>Erwinia carotovora</i>)	-	-	LB	5h	0,5	IPTG (0,1; 0,5; 1 e 2 mM)	intracelular (fração solúvel usada p/ purificação, precip. não)	150-180 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	430 IU/mg	Pourhossein & Korbekandi, 2014
L-asparaginase II (de <i>Erwinia carotovora</i>)	-	-	LB (50 ml) TB (1L) Batelada alimentada	6h (shaker) Com 18h de cultivo, houve a indução. 10h após indução, houve maior atividade no extrato bruto (Biorreator)	0,4-0,6 ~58 (Biorreator)	IPTG (1 mM)	intracelular	180 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> C43 (DE3)	-	Roth <i>et al.</i> , 2013
L-asparaginase (de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	-	-	LB (200 ml)	-	1,5-1,6	Arabinose (0,001 M)	intracelular	200 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	-	Pokrovskii <i>et al.</i> , 2013
L-Asparaginase II (de <i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>)	-	-	LB (50-200 ml)	Atividade máxima (20 U/ml) foi atingida em culturas com indução em OU ₅₀ 2,3 17h após a adição do indutor	0,5-2,3	Arabinose (0,02- 0,5%) 0,2%	intracelular	180 rpm	37 ou 28 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	62 U/mg	Sidoruk <i>et al.</i> , 2011
L-asparaginase (de <i>Withania somnifera</i> L.)	-	-	LB (500 ml)	5h	0,6-0,8	IPTG (1 mM)	intracelular (extrato solúvel)	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	17,3 IU/mg	Oza <i>et al.</i> , 2011
L-asparaginase (de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	-	-	LB (200 ml)	8h após indução foi observada	0,5-2	Arabinose (0,02- 0,5%)	intracelular (solúvel)	150-180 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	62 IU/mg (purificada)	Pokrovskaya <i>et al.</i> , 2012

				máxima atividade específica								
L-asparaginase (de <i>Flammulina velutipes</i>)	-	-	LB	-	0,7	IPTG (0,5 mM)	intracelular (solúvel e ativa)	190 rpm	30 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	16 U/mL	Eisele <i>et al.</i> , 2011
L-asparaginase (de <i>Glycine max</i>)	-	-	-	3h	0,5	IPTG (0,5 mM)	- intra	-	30 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	-	Cho <i>et al.</i> , 2007
L-asparaginase (de <i>Escherichia coli</i>)	-	-	LB	-	-	-	intracelular (precipitado de extrato bruto)	-	37 °C	<i>E. coli</i> JM109	120-130 U/ml	Jianhua <i>et al.</i> , 2006
L-asparaginase (de <i>Erwinia carotovora</i>)	-	-	LB (1 L)	5h	0,6-0,8	IPTG (1 mM)	intracelular	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	-	Kotzia & Labrou, 2005
L-asparaginase (de <i>Erwinia carotovora</i>)	-	-	LB	16-20h	1,5-2	IPTG (0,1 mM)	intracelular (proteína solúvel)	150-180 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	632 IU/mg (purificada)	Krasotkina <i>et al.</i> , 2004
L-asparaginase (de <i>Escherichia coli</i> AS1.357)	-	-	LB (50 ml)	5h	0,3	Heat	intracelular 50% proteína solúvel	200 rpm	30 °C	<i>E. coli</i> JM105, TG1, JM109, DH5α, e AS1.357	Expressão/Atividade (IU/ml) JM105: 153 JM109: 58,6 TG1: 167 DH5α: 42,3 AS1.357: 228	Wang <i>et al.</i> , 2001
L-asparaginase II (de <i>Escherichia coli</i>)	-	-	LB	4h	0,4-0,6	IPTG (0,1 mM)	Espaço periplasmático	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 JM105,ou CU1783	58; 46; 20 U/mg atividade específica do sobrenadante p/ cada sistema	Harms <i>et al.</i> , 1991
Asparaginase humana (ASPG)	-	-	LB	3h	-	IPTG (0,5 mM)	intracelular	-	37 °C	<i>E. coli</i> BL21	-	Belviso <i>et al.</i> , 2017

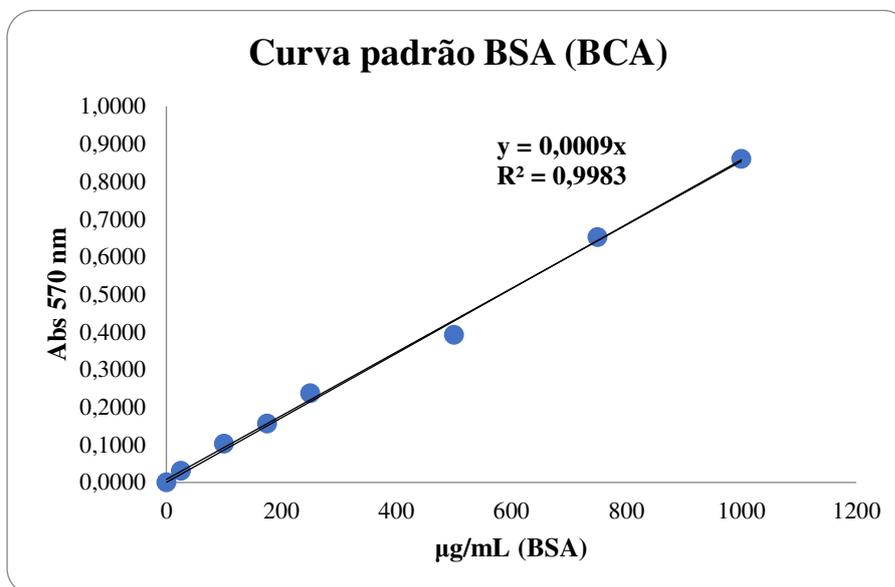
Asparaginase humana (rhASP)	-	-	LB	4h (pré-inóculo de 12h)	-	IPTG (1 mM)	Corpos de inclusão (passou por solubilização e refolding)	200 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	44,8 U/mL	Kante <i>et al.</i> , 2018
ASNase (de <i>E. coli</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Célula de mamífero HEK-293	-	Dantas <i>et al.</i> , 2019
L-Asparaginase II (de <i>E. coli</i>)	Glicerol (0,4%)	Ext. de lev. (24 g/l) Triptona (12 g/l)	TB (1 L)	24h	4,5	IPTG (0,1 mM)	extracelular	220 rpm	37 °C	<i>E. coli</i> BLR (DE3)	A produtividade específica (atividade total/OD ₆₀₀) aumentou 3 vezes com a indução da fase log tardia (380 UI/OD ₆₀₀)	Khushoo <i>et al.</i> , 2004
L-Asparaginase II (de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> SCRI 1043)	-	-	LB (100 ml)	6h	0,8-1	IPTG (1 mM)	intracelular	212 rpm	30 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	282,45 U/mg	Goswamia, Veeranki & Mishra, 2019
L-asparaginase II (de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Glicose (5% p/v)	-	LB (1 L)	20h	0,5-0,7	IPTG (0,1 mM)	intracelular (proteína solúvel)	250 rpm	15 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	5,4 IU mg ⁻¹	Lopes <i>et al.</i> , 2019
L-asparaginase II (de <i>Bacillus subtilis</i> ETMC-2)	-	-	LB (50 ml)	5h	~0,6-0,8	IPTG (1 mM)	intracelular (proteína ativa solúvel)	200 rpm	25 °C	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	250 U/mL	Agrawal, Jana & Kango, 2021

Fonte: elaborado pela autora.

ANEXO B – GEL DE CALIBRAÇÃO COM A PROTEÍNA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA), DE CONCENTRAÇÃO CRESCENTE CONHECIDA (125 µg/mL a 2000 µg/mL).



ANEXO C – CURVA DE CALIBRAÇÃO COM A PROTEÍNA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) PELO MÉTODO DO ÁCIDO BICINCHONÍNICO (BCA).



ANEXO D – CURVA DE PADRÃO DE AMÔNIA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA hASNaseI POR NESSLER.

