TESES 2017

**Título:**

Escalonamento da purificação, estudo estrutural e formulação de asparaginase II de Saccharomyces cerevisiae clonada e expressa em Pichia pastoris.

**Autor:**

LUCIANA FACCHINETTI DE CASTRO GIRAO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

GIRAO, L. F. C.

**Data da Defesa:**

18/08/2017

**Resumo:**

O principal medicamento para o tratamento da leucemia linfocítica aguda tem como princípio ativo a enzima asparaginase de origem bacteriana. Apesar dos efeitos terapêuticos comprovados, esta asparaginase causa sérias reações adversas e imunológicas. O medicamento existente no mercado brasileiro é importado, existindo uma situação inadequada em relação ao abastecimento do produto pelo seu preço e dependência tecnológica. Sedimentada nas afirmações anteriores, a importância do estudo de asparaginase proveniente de outras fontes se apresenta. Dentro deste contexto, a asparaginase II do eucarioto Saccharomyces cerevisiae, codificada pelo gene ASP3, apresenta potencial para uso terapêutico e estudos anteriores do grupo demonstraram sucesso na clonagem e superexpressão deste gene na levedura Pichia pastoris. O presente trabalho teve como objetivo determinar uma metodologia de purificação escalonável, estudar estruturalmente e formular a asparaginase II de S. cerevisiae clonada e expressa em P. pastoris (ASP) visando à produção de um biofarmaco antileucêmico. A metodologia de purificação passível de escalonamento envolveu duas etapas em sequência: cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL-4B e cromatografia de troca iônica em coluna Capto-Q, com recuperação de atividade enzimática de 66,1% e atividade específica da enzima de 336,9 UI/mg. Resultados de avaliação das modificações pós-traducionais indicaram que a asparaginase não é fosforilada e que possui duas glicoformas principais; os estudos de mudanças estruturais ocasionados por diferenças de temperatura e pH indicaram estabilidade na faixa de pH entre 6 e 10 e até 45 °C. Duas formulações foram desenvolvidas para a ASP: X-ASP, sob avaliação de viabilidade patentária, e lipossomas. A formulação X-ASP se mostrou promissora por apresentar atividade antiproliferativa contra a linhagem de leucemia mielóide crônica K562 semelhante à da asparaginase livre. Para a linhagem de leucemia linfocítica aguda Jurkhat, a inibição foi semelhante em 48 h e superior em 72 h de ensaio. A resposta antiproliferativa da construção X-ASP contra a linhagem Jurkhat, apesar de inferior à da asparaginase de E. coli comercial em 48 h, foi similar em 72 h, indicando uma equivalência em termos de propriedades terapêuticas para tempos prolongados. Os resultados obtidos dão suporte a continuação da pesquisa visando o desenvolvimento de um biofármaco.

**Palavras-chave:**

Pichia pastoris;enzimas terapêuticas;câncer;leucemia;purificação de enzimas;asparaginase

**Abstract:**

The main drug used for the treatment of acute lymphocytic leukemia is bacterial asparaginase, only available in Brazil by means of importing, which configures an inadequate situation as related to supply, pricing and technological dependence. Despite its proven therapeutic effectiveness, the enzyme causes severe side effects and immunological reactions, therefore motivating the interest in screaning alternative sources. Asparaginase II from the eukaryote Saccharomyces cerevisiae, coded by the ASP3 gene, is a potential candidate for such purposes and previous works from our laboratory have successfully cloned and expressed this gene in the yeast Pichia pastoris. The present work aimed at developing a scalable purification methodology, performing structural studies and formulating asparaginase II from S. cerevisiae cloned and expressed in P. pastoris (ASP) in order to develop an antileukemic drug. The purification methodology involved two steps in sequence: hydrophobic interaction chromatography on Phenyl Sepharose CL-4B and ion exchange chromatography on Capto-Q column, resulting in an enzyme activity recovery of 66.1% and enzyme specific activity of 336.9 IU/mg. Results of posttranslational modifications indicated that asparaginase is non-phosphorylated and has two major glycoforms; structural alteration studies motivated by differences in temperature and pH indicated enzyme stability in pH range 6 to 10 and up to 45 °C. Two formulations were developed for ASP: X-ASP, under patentability evaluation, and liposomes. X-ASP formulation was promising for showing antiproliferative activity against the K562 (chronic myeloid leukemia) cell line similar to that of the free asparaginase. For the Jurkhat (acute lymphocytic leukemia) strain, the inhibition was similar at 48 h and higher at 72 h assay. The antiproliferative response of this formulation against the Jurkhat line, though inferior to that of the commercial E. coli asparaginase at 48 h, was similar at 72 h, indicating equivalence in terms of therapeutic properties for prolonged times. These results support continuation of the research aiming at developing a biopharmaceutical drug.

**Keywords:**

asparaginase;Pichia pastoris;therapeutic enzymes;Cancer;leukemia;enzyme purification

**Título:**

Obtenção, caracterização e formulação de um fator sanguíneo recombinante.

**Autor:**

ALINE GUIMARAES DE ALMEIDA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

ALMEIDA, A. G.

**Data da Defesa:**

21/07/2017

**Resumo:**

O Fator IX é uma proteína que atua no processo de coagulação sanguínea cuja deficiência causa uma coagulopatia denominada de hemofilia do tipo B. O tratamento é feito através da reposição do fator sanguíneo deficiente, seja de origem plasmática ou recombinante. Este trabalho teve como objetivo a produção do Fator IX recombinante (FIXr) utilizando células animais originadas da linhagem CHO, a sua purificação, caracterização da estrutura proteica comparativamente ao produto de referência Benefix® e um estudo de formulação farmacêutica e estabilidade do FIXr. As condições operacionais de cultivo das células CHO em biorreatores foram definidas no modo de batelada e batelada alimentada e foi identificado que o melhor tempo de adição da vitamina K no meio de cultivo, no modo de batelada, foi o 3º dia. O sobrenadante obtido desses cultivos (8 litros) foi submetido a duas etapas de purificação (troca aniônica e interação hidrofóbica) utilizando membranas acopladas em sequência, em vez de colunas empacotadas com as respectivas resinas, reduzindo o tempo de processamento do sobrenadante. Uma vez purificado, diversas técnicas de caracterização foram empregadas na comparação do FIXr obtido neste trabalho com o produto comercial de referência Benefix®, os quais apresentaram resultados semelhantes. Amostras foram liofilizadas e armazenadas por 3 meses em diferentes temperaturas. Os resultados do estudo de formulação e estabilidade indicaram que 3 das formulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram resultados comparáveis à formulação empregada no produto Benefix®, quando utilizado o método de liofilização adaptado de Tang e Pikal e armazenado à 4°C por 3 meses, após a liofilização. Adicionalmente, a avaliação da transfecção transiente com o gene da proteína p58 em células HEK-293 HP e CHO FN76 apresentam um maior nível de expressão de FIXr quando comparado ao grupo controle, sugerindo ser esta uma estratégia promissora para o aumento da produtividade do FIX recombinante nessas células.

**Palavras-chave:**

Biofármacos;Fator sanguíneo;Cultivo de células animais;Biossimilares;Caracterização de proteínas terapêuticas;Formulação;Liofilização;Estudo de estabilidade

**Abstract:**

Factor IX is a protein that plays an important role in blood coagulation, a deficiency in which, causes type B haemophilia. Treatment for this disease involves the replacement of the deficient blood factor, either plasma-derived or recombinant. The aim of this work was to investigate the production, purification and characterization of recombinant Factor IX (rFIX) from a CHO cell line, with comparative analysis against the reference product Benefix®. Formulation and stability studies of rFIX were also undertaken. The bioreactor operating conditions for CHO cells were established for batch and fed batch modes and that the optimum time to add vitamin K to a batch mode culture was on the third day. The clarified supernatant (8 litres) underwent two purification steps (anion exchange and hydrophobic interaction chromatography) using membrane adsorbers in sequence, as opposed to columns packed with the equivalent resin, decreasing the processing time. Once purified, several characterization techniques were used to compare the rFIX produced in this work with the commercial reference product Benefix®, with similar results. Samples were freeze-dried and stored for 3 months at different temperatures. These results indicated that 3 formulations developed as part of this work showed comparable results with the Benefix® formulation using a freeze-drying protocol adapted from Tang and Pikal and stored at 4ºC for 3 months after lyophilisation. Finally, the results of transient transfection with the gene of p58 protein on HEK-293 HP and CHO FN76 cells showed an increase in FIX expression compared with the negative control. Therefore, this may represent a promising strategy for increasing of recombinant FIX productivity in these cell lines.

**Keywords:**

Biopharmaceuticals;Blood factor;Culture of animal cells;Biosimilars;Characterization of therapeutic proteins;Formulation;Freeze-drying;Stability study

**Título:**

Produção de um bioinseticida baseado na técnica de RNA de interferência para o controle do mosquito Aedes aegypti.

**Autor:**

SHEILA BARBARA GUTIERREZ LOPEZ

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

LOPEZ, S. B. G.

**Data da Defesa:**

17/05/2017

**Resumo:**

Os vírus da dengue, chikungunya, zika e febre amarela causam doenças febris graves, que afetam regiões tropicais e subtropicais do mundo, levando à morbidez e à mortalidade. Estes vírus e outros agentes etiológicos de doenças graves são transmitidos pelo vetor mosquito Aedes aegypti. Uma das principais estratégias de controle tem sido o uso de inseticidas, mas o aumento da resistência do vetor aos diferentes compostos usados aponta a necessidade de mudar para estratégias biorracionais, específicas da população de insetos alvo do controle. A quitina, polímero de N-acetilglicosamina, abundante em estruturas importantes que garantem a sobrevivência, encontrada em todos os estágios do desenvolvimento dos insetos, é um bom alvo. As quitinas sintases A e B (CHS) são as enzimas chaves na biossíntese do polímero da quitina em tecidos de origem ectodérmica e matriz peritrófica, respectivamente. Utilizando a técnica de RNA interferente (RNAi) é possível o silenciamento gênico específico, diminuindo desta forma a expressão da proteína alvo. O objetivo deste trabalho foi procurar uma alternativa biológica, delineando um possível bioinseticida baseado na técnica de RNAi para o controle da população do mosquito. Para isso, foram produzidos dsRNAs in vitro que tem como alvo cinco diferentes regiões nas sequências das CHS A e B. Para a produção do dsRNA in vivo, as diferentes regiões alvo para cada CHS foram clonadas no vetor de expressão L4440 e o dsRNA foi expresso na bactéria Escherichia coli cepa HT115 (deficiente de RNAse III), utilizando IPTG 1mM ou lactose 10 g/L. Foi verificada a atividade larvicida dos diferentes dsRNAs, produzidos in vitro, prova de conceito, e in vivo, colocando-os na água de criação de larvas L1. No grupo tratado com dsRNAE, produzido in vitro foi observada uma taxa de mortalidade significativa, 90%, associada à redução da expressão gênica das CHSA e B, de 50 e 80%, respectivamente. No tratamento com dsRNAE produzido in vivo, o lisado bacteriano produzido mediante indução com IPTG 1mM e previamente inativado por choque térmico, observou-se uma mortalidade significativa, em torno de 40%, redução da expressão dos genes das CHSA e B em torno de 50%, assim como alterações morfológicas que se mantiveram ao longo do desenvolvimento do inseto sobrevivente. Além disso, foi testada a capacidade adjuvante do lisado bacteriano produtor de dsRNAE, o bioinseticida, em conjunto com o diflubenzuron (DFB), um inibidor da síntese de quitina. Verificou-se efeito adjuvante, traduzido em maior mortalidade, quando administrado o bioinseticida em conjunto com o DFB, sendo 1,7 vezes maior no que diz respeito à administração do DFB sozinho. O bioinseticida, inativado com clorexidina e utilizando lactose 10 g/L para indução da expressão, mostrou também atividade larvicida e alterações no desenvolvimento do inseto, mesmo sendo administrado em estádios avançados da fase larval. Foi constatada uma diminuição do conteúdo de quitina na cutícula e no intestino das larvas tratadas com o bioinseticida, inclusive, com duas doses menores de administração. Estes resultados apontam novas alternativas para a redução da população do mosquito. Pois, o produto desenvolvido nesse trabalho poderia ser usado sozinho ou em conjunto com outros inseticidas nas estratégias de controle de populações de vetores de doenças.

**Palavras-chave:**

Aedes aegypti;inseticida;controle de vetor;RNAi

**Abstract:**

Dengue, chikungunya, zika and yellow fever viruses are etiological agents of severe diseases, responsible for high rate of human morbidity and mortality, mainly in tropical and subtropical countries, and are transmitted by Aedes aegypti mosquito´s bite. Due to increasing insecticide resistance among mosquito’s populations, it has become necessary to explore biorrational approaches in order to specifically control the target vector population. Chitin, a polymer of N-acetylglucosamine is a good target for biorrational control. It can be found as an abundant component of important structures that ensure survival at all stages of insect development. Chitin synthases A and B (CHS) are key enzymes in the biosynthesis of the chitin polymer in tissues of ectodermal origin and peritrophic matrix, respectively. The use of RNA interference techniques (RNAi) has made possible to achieve specific knockdown of target protein expression levels. The aim of this work was to develop a new product, a bioinsecticide, as a potential strategy to mosquito population control. The dsRNA were synthetized in vitro, targeting five different regions at CHSA and B sequences. The same sequences were cloned in L4440 plasmids for expression ofdsRNAs in E. coli HT115 (RNAse III deficient) induced with IPTG 1mM or lactose 10 g/L. Larvicidal activity was verified with all dsRNAs produced in vitro as proof of concept and,in vivo, placing E. coli lysate containing dsRNA directly in L1 larvae water. The group treated with dsRNAE produced in vitro, showed 90% significant mortality related to the 50 and 80% reduction of CHSA and B gene expression levels, respectively. The group treated with E. coli lysate containing dsRNAE after induction with 1mM IPTG and previously inactivated by thermal shock exhibited significant mortality, around 40%, and reduction of 50 % CHSA and B gene expression. Morphological changes that were maintained throughout the development of the surviving insects were also observed. In addition, the adjuvant ability of the bacterial lysate producing dsRNAE (bioinsecticide) together with diflubenzuron (DFB), an inhibitor of chitin synthesis, was tested. The association of DFB with the bioinsecticide induced a 1.7 times higher mortality rate, in comparison with DFB treatment. The bioinseticide produced by induction with lactose 10 g / L and inactivated with chlorhexidine also evinced larvicidal activity and delay in insect´s development, even when administered at advanced stages of the larval phase. A decrease in the chitin content of cuticle of the bioinseticide-treated larvae was observed even with two lower doses of administration by microscopy techniques. Such results point to new alternatives for reducing mosquito population. The product developed in this work could be used alone or in conjunction with other insecticides in control strategies of disease vector populations.

**Keywords:**

Aedes aegypti;insecticide;vector control;RNAi

**Título:**

Análise Proteômica Quantitativa Aplicada a Modelos Celulares “in vitro” de Diferenciação Neuronal

**Autor:**

JIMMY ESNEIDER RODRIGUEZ MURILLO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

MURILLO, J. E. R.

**Data da Defesa:**

09/02/2017

**Resumo:**

A diferenciação neuronal é um processo celular altamente complexo e regulado. Diversos modelos de cultura celular in vitro permitem simplificar essa complexidade com o objetivo de estudar a função de proteínas ou das vias de sinalização específicas envolvidas nesse processo. Com o avanço significativo das técnicas de quantificação em larga escala e dos espectrômetros de massas, hoje é possível comparar os perfis proteômicos destas células em múltiplas fases de diferenciação e avaliar o impacto das modificações pos-traducionais nestes fenômenos. Neste trabalho, é proposta uma metodologia integrativa de quantificação por iTRAQ (marcadores isóbaros para quantificação relativa e absoluta), enriquecimento de fosfopeptideos e fracionamento por cromatografia de interação hidrofílica que é aplicada à análise da diferenciação neuronal em dois modelos celulares in vitro: células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e células tronco neuronais cultivadas em neuroesferas. A diferenciação das células SH-SY5Y com ácido retinóico e com o fator neurotrófico derivado de cérebro permitiu identificar mais de 5500 proteínas combinando o proteoma total junto com o fosfoproteoma. Destas proteínas, 366 mostraram regulação envolvida com a interação com a matriz extracelular, apoptose e organização do citoesqueleto, processos vitais na migração neuronal, orientação dos axônios e sinapses mostrando o potencial das células como modelo neuronal. Destacaram-se proteínas como a catenina δ, a elastina de interfase microfibrilar, a agrina, o fator indutor de apoptose mitocondrial, a proteína de sobrevivência de motoneurônios e a estatmina 1 que podem ser aprofundadas em futuras pesquisas. Por outro lado, na diferenciação das neuroesferas com os suplementos B27 e N2 foram identificadas quase 7000 proteínas das quais 1048 sofreram regulação, uma parte significativa esteve relacionada com proteínas de adesão celular e interações célula-célula refletindo a natureza deste tipo de cultura, proteínas como o proteoglicano NCAN, a molécula de adesão celular L1, a neurexina e a neuroligina podem ser consideradas como alvos importantes no desenvolvimento de neurônios, como complemento, proteínas como a sinaptotagmina, sinapsina e ROBO1/2 também foram reguladas mostrando a diversidade de eventos que podem ser analisados na diferenciação das neuroesferas. Algumas das proteínas discutidas aqui têm relação direta com desordens neurológicas que mostra o potencial das neuroesferas na caracterização de proteínas que afetam o desenvolvimento de neurônios e que contribuem ao fenótipo dessas doenças. Os resultados proteômicos obtidos a partir de ambos tipos celulares foram complementares e constituem uma fonte de informação valiosa para os futuros estudos de neurobiologia e neuroproteômica.

**Palavras-chave:**

diferenciação neuronal;iTRAQ;fosfoproteoma;células SH-SY5Y;neuroesferas

**Abstract:**

Neuronal differentiation is a highly complex and regulated cellular process. The diversity of in vitro cellular models allows to considerably simplify this complexity aiming to study functions of specific proteins or pathways involved in this process. With the advance in large-scale quantification protocols and mass spectrometry, it is possible to compare proteomic profiles of those cells in multiple differentiation phases and evaluate the impact of post-translational modification in this kind of processes. In this work we propose an integrative pipeline of isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ), phosphopeptide enrichment and off line hydrophilic chromatography fractionation to analyze neuronal differentiation in two cellular in vitro models: human neuroblastoma SH-SY5Y cells and neural stem cells cultured as neurospheres. Retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor-based SH-SY5Y cell differentiation led us to identify more than 5500 proteins by combining total proteome and phosphoproteome, 366 showing regulation involved in extracellular matrix interaction, apoptosis and cytoskeleton organization, relevant processes in neuronal migration, axon guidance and synapses confirming the potential of neuroblastoma cells as neuron-like model. We highlight proteins like d-catenin, elastin microfibril interfacer 1, agrin, mitochondrial apoptosis induction factor, survival of motor neuron protein 1 and stathmin 1 that might be considered in future research. On the other hand, neurosphere differentiation with B27 and N2 supplements rendered almost 7000 proteins, 1048 regulated. A significant part of upregulated proteins was related to cellular adhesion and cell-cell interactions reflecting the nature of neuroespheres, proteins like proteoglycan NCAN, cellular adhesion molecule L1, neurexin and neuroligin could be considered important targets in neuronal development, as complement, synaptotagmin, synapsin and Roundabout homolog 1/2 proteins were also regulated showing the diversity of events that could be explored in neurosphere differentiation. Some proteins discussed here are strongly related with some neurological disorders, demonstrating the potential of neurospheres in characterization of proteins involved in malfunctions of neuronal development and their contribution in this kind of diseases. Proteomic data from two types of cells were complementary and constitute a source of useful information for future research in neurobiology and neuroproteomics. Keywords: , , , , .

**Keywords:**

neuronal differentiation;iTRAQ;phosphoproteome;SH-SY5Y cells;neurospheres