TESES 2019

**Título:**

Produção e purificação do vírus da febre amarela

**Autor:**

LUIZ FERNANDO CARVALHO DE ALMEIDA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

ALMEIDA, L. F. C.

**Data da Defesa:**

27/11/2019

**Resumo:**

A vacina contra o vírus da febre amarela (VFA) produzida em ovos embrionados foi descrita em 1937 por Theiler & Smith. Desde então, esta vacina é produzida em ovos embrionados e foi usada para imunizar mais de cem milhões de pessoas, com um histórico de alta eficácia e segurança. O aumento da demanda e a escassez desta vacina observada recentemente em Angola (2016) e Brasil (2017-2018) demonstram claramente a necessidade de desenvolvimento de tecnologias de produção de VFA mais avançadas e escalonáveis. A primeira parte deste trabalho foi o desenvolvimento de um processo de cultura celular de alto rendimento em células Vero (banco de células da OMS, ECACC) usando microcarregadores Cytodex 3 (2 g L-1) em frascos rotativos de 250 mL nos modos de colheita única (SH) e múltipla (MH) em meio livre de soro fetal bovino (Opti MEM, Gibco, EUA) e o estabelecimento de uma estratégia eficiente de infecção para produzir o vírus da febre amarela. Diferentes estratégias de infecção e colheita foram avaliadas para as cepas 17DD e 17D-204 usadas nas vacinas FA atualmente aprovadas, foram avaliados diferentes tempo de infecção (TOI), multiplicidade de infecção (MOI) e tempos (TOH) e diferentes modos de colheita (SH e MH)). A cromatografia de exclusão estérica (SXC) foi avaliada como principal operação de recuperação e purificação do vírus, utilizando-se três concentrações de PEG-6000 (6%, 8% e 10% v v-1). As variáveis operacionais foram investigadas e as condições cromatográficas selecionadas (10% de PEG-6000) sugerem uma recuperação total das partículas virais obtidas da etapa de cultivo. Foram também alcançados níveis residuais de DNA de acordo com as recomendações do Organização Mundial da Saúde (<10 ng dose-1). O padrão de glicosilação do vírus da febre amarela produzido foi investigado por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC-HPLC). Amostras do VFA purificadas foram tratadas com PNGase F, para liberar os glicanos e estes foram marcados com 2-aminobenzamida. A análise por HILIC-HPLC, das duas cepas de VFA usadas atualmente na produção da vacina, foi realizada utilizando uma coluna TSKgel Amide-80 e foi possível propor estruturas glicosiladas com base no banco de dados Glycobase 3.2.4. Os resultados mostram uma homologia nos perfis de glicosilação encontrados nas duas cepas vacinais, sugerindo que picos encontrados nas cepas testadas possuem as mesmas estruturas de glicanos. No geral, o desenvolvimento de uma plataforma de células de mamíferos baseada na colheita múltipla para propagar o vírus da febre amarela usando a linha celular Vero em condições livres de soro, sua purificação por SXC e a caracterização do perfil de glicosilação nesta plataforma é um passo importante para a produção de uma nova vacina usando uma tecnologia escalonável e econômica.

**Palavras-chave:**

Febre amarela;produção;purificação;colheita múltipla;cromatografia de exclusão estérica;glicosilação

**Abstract:**

The yellow fever virus (YFV) vaccine produced in embryonated eggs was described in 1937 by Theiler & Smith. Since then, this vaccine has been produced in embryonated eggs and has been used to immunize over one hundred million people with a history of high efficacy and safety. The increasing demand and shortage of this vaccine observed recently in Angola (2016) and Brazil (2017-2018) clearly demonstrates the urge for the development of more advanced and scalable VFA production technologies. The first part of this work was the development of a high yield Vero cell culture process (WHO cell bank, ECACC) using Cytodex 3 microcarrier (2 g L-1) in 250 mL spinner flasks in single harvest (SH) and multiple harvest modes (MH) using serum free media (Opti MEM, Gibco, USA) and the establishment of an efficient infection strategy to produce yellow fever virus. Different infection and harvesting strategies were evaluated for 17DD and 17D-204 strains used in currently approved YF vaccines, different infection time (TOI), multiplicity of infection (MOI) and times (TOH) and different harvesting modes (SH and MH). Steric exclusion chromatography (SXC) was evaluated as the main virus recovery and purification operation using three concentrations of PEG-6000 (6%, 8% and 10% v v -1). Operational variables were investigated and the selected chromatographic conditions (10% PEG-6000) suggest a total recovery of viral particles produced during the culture step. It was also observed that the residual DNA levels achieved were in accordance with the World Health Organization recommendations (<10 ng dose-1). The glycosylation pattern of the yellow fever virus produced was investigated by hydrophilic interaction chromatography (HILIC-HPLC). Purified YFV samples were treated with PNGase F to release the glycans which were labeled with 2-aminobenzamide. HILIC-HPLC analysis of the two strains of YFV currently used in vaccine production was performed using a TSKgel Amide-80 column and it was possible to propose glycosylated structures based on the Glycobase 3.2.4 database. The results show a homology in the glycosylation profiles found in the two vaccine strains, suggesting that peaks found in the tested strains have the same glycan structures. Overall, the development of a multi-harvest mammalian cell platform to propagate the yellow fever virus using the Vero cell line under serum free conditions, its purification by SXC and the characterization of the glycosylation profile on this platform is an important step for the production of a new vaccine using scalable and cost-effective technology.

**Keywords:**

Yellow fever;production;purification;multiple harvest;steric exclusion chromatography;glycosylation

**Título:**

A levedura Pichia pastoris como plataforma para a obtenção de dois produtos de interesse biotecnológico: o ácido 3-hidroxipropiônico e uma nova lipase de Ustilago hordei

**Autor:**

GABRIELA COELHO BREDA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

BRÊDA, G.C.

**Data da Defesa:**

04/10/2019

**Resumo:**

No contexto da crescente importância da biotecnologia, novo bioprocessos vêm sendo desenvolvidos para obtenção de uma variedade de produtos, como biocombustíveis, plataformas químicas e biocatalisadores, por rota biológica. Dentre os organismos utilizados nestes processos, a levedura Pichia pastoris se destaca devido ao seu amplo histórico de cultivos em alta densidade celular, além de vantagens como o status GRAS, a glicosilação de proteínas recombinantes e a eficiência no consumo de glicerol, obtido a partir de rejeitos industriais. Com isso, o objetivo deste trabalho foi modificar geneticamente cepas da levedura metilotrófica P. pastoris para a obtenção de dois produtos de interesse biotecnológico. Na primeira parte desta tese, P. pastoris foi, pela primeira vez, modificada geneticamente para a produção do ácido 3-hidroxipropiônico, uma das plataformas químicas das mais promissoras, com principal aplicação na conversão em ácido acrílico. Neste trabalho, uma rota metabólica via malonil-CoA foi inserida no genoma da levedura e um recombinante produtor foi identificado por análises do meio de cultura. As produções obtidas em frascos agitados e bateladas simples em biorreator foram da ordem de até 200 mg/L através do método por CLAE. Metodologias de extração líquido-líquido e análise em CG-MS foram utilizadas para confirmar a identidade do composto analisado e apontaram a co-eluição do mesmo com ácido láctico nas análises por CLAE. Na segunda parte da tese, a levedura P. pastoris foi modificada geneticamente para a produção e secreção para o meio extracelular de uma nova lipase (UhL) recombinante do fungo Ustilago hordei. Esta lipase, prospectada in silico por homologia com a lipase B de Candida antarctica (CaLB), foi, pela primeira vez, clonada e expressa, na forma glicosilada, pela levedura, apresentando atividade em placas contendo tributirina, e também caracterizada em comparação com a CaLB. Na expressão, utilizando o sistema de indução por metanol, foi verificado que a redução da temperatura e aumento na concentração de indutor durante a fase de indução aumentou a atividade obtida nos meios de cultura. No alinhamento proteico e modelagem estrutural, UhL apresentou 78 % de identidade de sequência e capacidade de ajuste à estrutura da CaLB, no entanto foram reveladas diferenças na entrada do sítio ativo e no potencial eletrostático da nova lipase quando comparado ao relatado para CaLB. A diferença na entrada do sítio ativo foi apontada ainda como potencial responsável pela distinta especificidade de substrato da UhL. Já o potencial eletrostático, majoritariamente negativo em pH 7,0 por análises in silico, poderia indicar um pH ótimo da lipase em valores de pH mais alcalinos (acima de 9,0) e estar relacionado ao comportamento da enzima recombinante no planejamento experimental, realizado em faixas de pH próximas ao neutro, em que esta variável de pH não apresentou efeito na atividade. Em comparação com a CaLB, a lipase UhL se mostou menos estável em diferentes temperaturas (30 e 40 ºC) e nos valores de pH mais alcalinos. No planejamento experimental foi ainda possível determinar uma temperatura ótima de atuação em 44 ºC para UhL, enquanto que CaLB obteve maiores atividades nos maiores valores de temperatura e pH estudados.

**Palavras-chave:**

plataforma química;engenharia metabólica;modelagem estrutural;CaLB

**Abstract:**

In the context of the growing importance of biotechnology, new bioprocesses have been developed in order to obtain a variety of products, such as biofuels, chemical platforms and biocatalysts, by biological route. Among the organisms used in these processes, the yeast Pichia pastoris stands out as a successful expression host due to its extensive history of high cell density cultivation, as well as advantages such as GRAS status, recombinant protein glycosylation and efficiency of glycerol consumption, obtained from industrial byproducts. Thus, the objective of this work was to genetically modify methylotrophic yeast P. pastoris strains to obtain two biotechnological products. In the first part of the thesis, P. pastoris was reported for the first time in the production of 3-hydroxypropionic acid, one of the most promising chemical platforms with the conversion to acrylic acid as the main application. In this work, a metabolic pathway via malonyl-CoA was inserted into the yeast genome and a recombinant producer was identified by growth media analysis. The yields obtained in shake flasks and single batches in bioreactor were up to 200 mg/L by HPLC method. Methodologies of liquid-liquid extraction and analysis in CG-MS were used to confirm the identity of the analyzed compound and showed its co-elution with lactic acid in HPLC analyzes. In the second part of the thesis, P. pastoris was genetically modified for the production and secretion into the extracellular medium of a new Ustilago hordei recombinant lipase (UhL). This lipase, that was in silico prospected by homology with the Candida antarctica lipase B (CaLB), was for the first time cloned and expressed, in glycosylated form, by the yeast, showing activity on tributyrin plates, and also characterized in comparison with CaLB. During expression using the methanol induction system it was observed that reduced temperatures and higher inductor concentrations increased activities in the growth media. In protein alignment and structural modeling, UhL showed 78 % sequence identity and ability to adjust to CaLB structure, however differences in the active site entry and electrostatic potential of the new lipase were revealed when compared to that reported for CaLB. The difference in the active site entry was also pointed as a potential responsible for the distinct substrate specificity of UhL. In addiction, the UhL electrostatic potential, mostly negative at pH 7.0 by in silico analysis, could indicate an optimal pH at alkaline pH values (above 9.0) and be related to the recombinant enzyme behaviour in the experimental design, carried out at neutral pH ranges, in wich the pH variable was not significative. In comparison with CaLB, the UhL lipase showed lower stability in different temperatures (30 and 40 ºC) and alkaline pH values. Also, it was possible to identify the optimun temperature for the UhL lipase (44 ºC) in the experimental design, while CaLB showed higher activities at the highest temperature and pH values studied.

**Keywords:**

bulk chemical;metabolic engineering;structural modeling;CaLB

**Título:**

Proteína Celular Ligante de Ácido Retinoico 2 (CRABP2): dinâmica molecular e interação com ácido retinoico.

**Autor:**

CAROLINA LIXA VICTOR NEVES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

LIXA, C.

**Data da Defesa:**

13/09/2019

**Resumo:**

O ácido retinoico (AR), o principal metabólito ativo da vitamina A, é capaz de regular a transcrição gênica através da ativação dos seus receptores nucleares cognatos. A Proteína Celular Ligante de AR 2 (CRABP2) atua como coativadora neste processo, transportando AR do citoplasma para o núcleo e o entregando diretamente aos Receptores de Ácido Retinoico (RARs). A ativação de RARs induz a transcrição de genes relacionados a apoptose e inibição do crescimento, o que confere a CRABP2 o status de proteína antioncogênica com potencial terapêutico para os casos de câncer onde a resistência a AR é observada. Devido à similaridade entre as estruturas tridimensionais de CRABP2 livre (apo) e ligada a AR (holo), os mecanismos responsáveis por mediar a formação do complexo AR:CRABP2 e a interação da proteína com diferentes parceiros moleculares ainda não foram elucidados. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização da interação entre CRABP2 e AR e da dinâmica da proteína na presença e na ausência de ligante, utilizando Ressonância Magnética Nuclear (RMN) como principal ferramenta. Os experimentos de RMN foram coletados em espectrômetros Bruker 600MHz/800MHz/900MHz, a 25 °C e utilizando amostras 15N e/ou 13C-CRABP2 livre ou ligada a AR. A dinâmica rápida e intermediária de CRABP2 livre e na presença de AR foi derivada das taxas de relaxação longitudinal (R1) e transversal (R2) do núcleo 15N e do 15N-{1H} NOE e de experimentos de dispersão de relaxação via 15N-CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), respectivamente. A interação entre CRABP2 e AR foi investigada pela combinação de experimentos de titulação por RMN, Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF) e Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). Na presença de ligante, a dinâmica térmica das alças βC-βD e βE-βF de CRABP2 foi suprimida. Além disso, o aumento dos valores de R2 concomitante a diminuição de R1 observado para o complexo AR:CRABP2 indicou autoassociação da proteína induzida por AR. A superfície de autoassociação de CRABP2, mapeada por experimentos de titulação por RMN, envolve resíduos localizados na região do portal (α1-alça-α2/βC-βD/βE-βF) e nas fitas βI-βA. A superfície de dimerização de holo-CRABP2 em solução foi a mesma observada no dímero cristalográfico do complexo AR:CRABP2 (PDF 2FR3). Um grande número de resíduos de CRABP2 apresentou troca conformacional na escala de μs-ms na ausência de AR. Dezesseis resíduos constituíram o grupo principal de resíduos em troca conformacional por apresentaram valores de kex e pB semelhantes entre si (kex = 320 ± 40s-1/ pB = 0.2 ± 0.03). Os eventos de troca conformacional observados para a proteína livre foram suprimidos com a ligação a AR. Um grupo menor de resíduos apresentou uma flutuação rápida na presença de AR (kex >2000s-1/pB ̴ 0.05) que é independente dos eventos de troca conformacional em apo-CRABP2. Apesar de haver sobreposição entre os resíduos que apresentaram CSP na presença e na ausência de AR e resíduos que mostraram dinâmica lenta na proteína livre, esses dois efeitos não puderam ser relacionados de forma estatisticamente relevante, indicando que o estado de maior energia de CRABP2 é estruturalmente distinto do complexo AR:CRABP2. Além disso, os experimentos de SPR utilizados para a caracterização dos parâmetros cinéticos da interação CRABP2:AR mostraram que a ligação do AR a CRABP2, bem como a liberação do AR do sítio de interação ocorrem em tempos de escala não condizentes com a interconversão entre os estados livre e ligado da proteína caracterizados por CPMG, indicando que esta não pode ser a etapa limitante para a ligação/liberação do AR. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o sítio de interação de CRABP2 com AR encontra-se pré-formado e que a interação com o ligante leva a estabilização da superfície de dimerização de holo-CRABP2 e de outras regiões funcionalmente importantes para a interação com parceiros moleculares. Devido à similaridade entre as estruturas de apo e holo-CRABP2, a execução das funções específicas a cada estado de CRABP2 (livre e ligado) nas células deve ser modulada pela entropia conformacional, incluindo a regulação da interação entre a proteína e seus diferentes parceiros moleculares.

**Palavras-chave:**

CRABP2;Proteínas intracelulares ligantes de lipídeos;Ácido retinóico;Ressonância Magnética Nuclear;Dinâmica de Proteínas

**Abstract:**

Retinoic acid (RA), the major vitamin A active metabolite, regulates gene transcription through the activation of its cognate nuclear receptors. Cellular RA-Binding Protein 2 (CRABP2) is a coactivator of the RA-controlled gene expression, translocating RA from the cytoplasm to the nucleus and directly channeling it to Retinoic Acid Receptors (RARs). RARs activation induce the transcription of apoptosis-related and growth inhibition genes, pointing at CRABP2 as anti oncogenic protein and a potential target for therapy of RA-resistant cancers. Due to similarities between free (apo) and RA-bound (holo) CRABP2 tridimensional structures, the mechanisms in charge of RA:CRABP2 complex formation and CRABP2 recognition by its molecular partners remain unknown. The goal of this work was to characterize the interaction between CRABP2 and RA as well as free and RA-bound CRABP2 dynamics using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as the main tool. NMR spectra were collected on 15N and/or 13C-labeled CRABP2 samples at 25 °C on Bruker 600MHz/800MHz/900MHz spectrometers. Fast and slow backbone dynamics of free and RA-bound CRABP2 were derived from 15N longitudinal (R1), transverse (R2) relaxation rates and 15N–{1H} NOE, and 15N Carr-Purcell-Meiboom-Gill relaxation dispersion (CPMG)-based experiments, respectively. The interaction between CRABP2 and RA was characterized by a combination of NMR titration experiments, Differential Scanning Fluorimetry (DSF) and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (SPR). In RA presence, loops βC-βD and βE-βF fast dynamics was quenched. Besides that, the R2 values increasing associated with the decrease in R1 values for the AR: CRABP2 complex suggested CRABP2 self-association triggered by RA. Holo-CRABP2 self-association interface mapped by NMR titration experiments concerns residues clustered on the CRABP2 portal region(α1-loop-α2/βC-βD/βE-βF) and on β-strands βI-βA. Holo-CRABP2 dimerization surface in solution correlates well with the interface mediating RA:CRABP2 self-association in RA:CRABP2 crystallographic dimer structure (PDB 2FR3). Numerous residues of apo-CRABP2 displayed conformational exchange dynamics in the μs-ms time scale. Sixteen residues constituted the core group that showed the most similar fluctuation parameters (kex = 320 ± 40s-1 / pB = 0.2 ± 0.03). Apo-CRABP2 conformational exchange events were suppressed upon RA:CRABP2 complex formation. A smaller subset of residues showing fast exchange fluctuation, which is independent of apo-CRABP2 intermediate timescale dynamics, was identified in holo-CRABP2 (kex >2000s-1 / pB ̴ 0.05). Even though residues showing CSPs in RA presence and absence agree well with the ones showing intermediate timescale dynamics in apo-CRABP2, both effects could not be correlated in a statistically relevant way, indicating that CRABP2 higher-energy state is structurally distinct from the RA:CRABP2 complex. In addition, SPR experiments used to characterize the kinetic parameters of RA binding to CRABP2 showed that RA-binding to CRABP2 and release from the binding cavity occur in a different timescale than the fluctuation characterized by CPMG and cannot be the rate-limiting step in both cases. Our findings indicate that the RA-binding site is pre-formed and that ligand interaction lead to stabilization of CRABP2 dimerization interface and of other surfaces that mediate protein interaction with different molecular partners. Due to the similarity between apo and holo-CRABP2 tridimensional structures conformational entropy may play a key role in free and RA-bound CRABP2 diverse cellular functions, including protein interaction with different molecular partners.

**Keywords:**

keywords

**Título:**

Estudo das vias de reparo do DNA, em resposta ao estresse oxidativo, em larvas do mosquito Aedes aegypti.

**Autor:**

MARIA BEATRIZ DOS SANTOS MOTA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

MOTA, M. B. S.

**Data da Defesa:**

30/08/2019

**Resumo:**

O Aedes aegypti é atualmente um dos insetos vetores de maior relevância no Brasil, devido a sua capacidade de transmitir dengue, Zika, Chikungunya febre amarela e Mayaro. A alimentação hematofágica dos insetos vetores representa um grande desafio oxidativo devido a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, quando em excesso, causam danos a estrutura do DNA. Danos ao DNA ocorrem frequentemente durante a vida celular, sendo detectadas e corrigidas por uma rede complexa, denominada resposta ao dano ao DNA (RDD). As vias de reparo do DNA têm sido amplamente estudadas em organismos modelo, porém pouco se sabe sobre estas vias em insetos vetores. Todavia, o crescente interesse em gerar insetos transgênicos exige amplo conhecimento da RDD, principalmente das vias de reparo de quebras na dupla fita (DSB). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é estudar a RDD em A. aegypti. Portanto, primeiramente, as proteínas de RDD foram buscadas em A. aegypti através de métodos de bioinformática e, em seguida transcriptomas de larvas tratadas com 0,5 mM de paraquat durante 6h, 12h e 24h foram sequenciados. A análise dos transcriptomas identificou 1848 genes diferencialmente expressos, que foram agrupados em 5 blocos de perfis de expressão. Genes envolvidos em processos de detoxificação, na resposta ao estresse, no reparo de quebras na dupla fita, na mitofagia, na transcrição e metabolismo de aminoácidos apresentaram expressão aumentada mediante ao tratamento com paraquat. Ademais, genes relacionados a fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons apresentaram a expressão diminuída nas larvas tratadas, indicando que o paraquat influencia no metabolismo energético. Ortólogos de proteínas chave da RDD em humanos, como RAD51, PARP, ATM, ATR, DNAPKcs, XPC e LIG4, foram encontrados em A. aegypti, todavia não foram encontrados ortólogos para CSA, CSB, BRCA1, TP53BP1, POLβ e LIG3, possivelmente impactando nas vias TC-NER, sinalização de quebra na dupla fita e SP-BER. Nos transcriptomas, foram encontrados diferencialmente expressos diversos genes relacionados a RDD como PARP1, XRCC1, XPC, HR23B, XPB, RAD50, KU80 e LIG4. Ademais a maioria dos genes de RDD teve sua expressão aumentada mediante ao tratamento com paraquat, evidenciando a ativação das vias de reparo mediante ao estresse oxidativo gerado pelo paraquat.

**Palavras-chave:**

vias de reparo do DNA;Aedes aegypti;paraquat;estresse oxidativo

**Abstract:**

Aedes aegypti is one of the most important insect vectors in Brazil due to its ability to transmit dengue, Zika, Chikungunya yellow fever and Mayaro. The blood-feeding behavior represents an oxidative challenge due to the formation of reactive oxygen species (ROS), that can cause DNA damage. The DNA structure is continuously subjected to damage due to the exposure to endogenous and exogenous genotoxic agents, and its integrity depends on the DNA damage response (DDR). This complex system has been widely studied in model organisms, but little is known about these pathways in insect vectors. However, the growing interest in generating transgenic insects requires extensive knowledge of DDR, especially the double-strand break repair (DSB) pathways. Thus, the objective of this work is to study the DDR in A. aegypti. Therefore, blast reciprocal methodology was used to search for DDR proteins in A. aegypti and then the RNA of A. aegypti larvae treated with paraquat 0.5 mM for 6h, 12h and 24h were sequenced by RNAseq. Transcriptome analysis identified 1848 differentially expressed genes, which were grouped into 5 expression profile clusters. Genes involved in detoxification processes, stress response, double-strand breaks repair, mitophagy, transcription and amino acid metabolism increased expression by treatment with paraquat. In addition, genes related to oxidative phosphorylation and electron transport chain decreased expression in treated larvae, indicating that paraquat influences energy metabolism. Key DDR protein orthologs such as RAD51, PARP, ATM, ATR, DNAPKcs, XPC and LIG4 were found in A. aegypti, however no orthologs were found for CSA, CSB, BRCA1, TP53BP1, POLβ and LIG3, impacting in the TC-NER, double-strand break signaling and SP-BER. In the transcriptomes, several DDR-related genes were differentially expressed, such as PARP1, XRCC1, XPC, HR23B, XPB, RAD50, KU80 and LIG4. In addition, most DDR genes increased the expression by paraquat treatment, showing the activation of DDR through oxidative stress generated by paraquat.

**Keywords:**

keywords

**Título:**

Estudo de estratégias de cultivo utilizando Pichia pastoris como plataforma de expressão gênica constitutiva e reaproveitamento de biomassa.

**Autor:**

JULIA DE MACEDO ROBERT

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

ROBERT, J. M.

**Data da Defesa:**

13/08/2019

**Resumo:**

As lipases têm características que são de interesse para a biotecnologia pois permitem, por exemplo, substituir rotas químicas por enzimáticas com bons rendimentos e alto grau de pureza no produto obtido. Elas apresentam características seletivas mesmo atuando sobre inúmeros substratos. Dentre as lipases mais utilizadas comercialmente encontra-se a lipase B de Candida antactica (CalB), enzima alvo deste trabalho, que possui excelente enancioseletividade sob diversas condições e substratos. Por outro lado, a inserção de genes de interesse industrial em hospedeiros de simples cultivo permite a expressão heteróloga, como por exemplo, a levedura metilotrófica Pichia pastoris que pode crescer até altas densidades celulares. Esta característica é especialmente importante uma vez que o gene da CalB, foi inserido sob controle de um promotor constitutivo, o PPGK, o que conferiu a produção desta lipase associado ao crescimento de biomassa. Assim, a estratégia de produção em biorreator para otimizar a produtividade do sistema está intimamente ligada ao promotor, ao modo de condução do bioprocesso, a escolha apropriada do meio de cultivo e ao sistema de aeração utilizado. No modo contínuo, a produção atingiu 1,89.108 U, número 5,8 vezes maior que o atingido na batelada alimentada considerando 6 semanas de operação. Sendo, portanto, considerado a opção mais vantajosa para operações em maior escala. A influência da salinidade do meio de cultivo foi testada e identificou-se problemas de transporte da lipase para o meio extracelular quanto maior era a força iônica do meio utilizado no cultivo. Por outro lado, a troca do sistema de aeração por borbulhamento para contactor de membrana não foi benéfica para a obtenção da enzima de interesse. Apesar de evitar a formação de espuma, a utilização do sistema de membranas causou diminuição drástica na produtividade, por ter resultado no acúmulo de biomassa e de enzima na membrana. Finalmente o reaproveitamento da biomassa gerada nos cultivos durante a produção de CalB foi investigada e otimizada objetivando a obtenção de extrato de levedura. O extrato obtido deste cultivo gerou uma concentração de aminoácidos livres (FAN) de 2218 mg N/L e um perfil de aminoácidos compatível com os extratos de levedura disponíveis comercialmente.

**Palavras-chave:**

Pichia Pastoris;Komagataella phaffii;Lipase B de Candida antarctica;Estratégias de bioprocessos;Planejamento experimental;Reaproveitamento de biomassa;Oxigenação não-dispersiva;Promotor constitutivo PPGK

**Abstract:**

Lipases have characteristics that are interesting for biotechnology as it allows replacing chemical with enzymatic routes having better yields with a high degree of purity of the product obtained. They have selective characteristics and still catalyze the reactions of numerous substrates. Among the commercial ones, Lipase B from Candida antactica (CalB) is one of the most applied, it has excellent enanciosiletivity and was the target molecule for this work. On the other hand, heterologous expression allows the insertion of genes with industrial interest into hosts that require simple parameters for cultivation, as, for example, the methylotrophic yeast Pichia pastoris. It can achieve high cell densities, a particularly important feature, for this work, since the CalB gene was inserted under the control of a constitutive promoter, PPGK, which causes lipase production to be associated with biomass growth. Therefore, the production strategy used for bioreactor cultivation is linked to the promoter choice, the cultivation mode, medium and aeration system used. On continuous mode, production reaches 1.89.108 U, 5.8 times higher than that reached in the fed-batch considering a 6-weeks operation. Therefore, this mode was considered the most advantageous option on a bigger scale. The influence of salinity in the culture medium was tested and was identified a difficulty on lipase secretion when medium had a higher ionic strength. The exchange of bubbling aeration system for membrane contactor was not beneficial for lipase production. Although foam formation was avoided, it causes a dramatic drop in productivity due to accumulation of biomass and lipase in the membrane. Finally, the reuse of the biomass generated in cultures, during CalB production, was also studied and optimized in order to obtain yeast extract. This extract had a concentration of 2218mgN/L free amino acids with a profile comparable to yeast extracts sold commercially. Keywords: ; ; ; ; ; ; .

**Keywords:**

Pichia Pastoris;Komagataella phaffii;Candida antarctica lipase B;Bioprocess estrategies;Design of experiments;Biomass reuse;Nondispersive oxygenation;Constitutive promoter PPGK

**Título:**

Caracterização estrutural da interação da proteína prion com aptâmeros de DNA

**Autor:**

CAROLINA OLIVEIRA MATOS

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

MATOS, CAROLINA OLIVEIRA

**Data da Defesa:**

09/08/2019

**Resumo:**

A conversão estrutural e agregação da proteína prion (PrP) são eventos-chave para o surgimento de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs). A hipótese ‘protein-only’ propõe que o agente etiológico dessas doenças é uma conformação anormal da PrP, a PrP infecciosa (PrPSc), que pode converter a PrP celular (PrPC) na contraparte desdobrada. Entretanto, evidências experimentais sustentam o papel de cofatores moleculares, além da PrPSc, que podem auxiliar no processo de conversão proteica. Entre estes cofatores, os ácidos nucleicos (NA) foram implicados na ligação e conversão de PrP em espécies semelhantes a PrPSc. Além disso, os aptâmeros de NA também foram propostos para abordagens diagnósticas e terapêuticas para TSEs. Para entender melhor a interação de PrP com NAs e fornecer informações estruturais sobre o complexo PrP:NA, foi estudada a interação do domínio globular da PrP recombinante murina (rPrP90-231) com aptâmeros de DNA selecionados por SELEX. Foi confirmado por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) a interação de rPrP, tanto da proteína inteira quanto no domínio C-terminal, com duas seqüências aptaméricas de DNA de 25 nucleotídeos (A1 e A2). A estrutura dos aptâmeros foi caracterizada por predições teóricas, dicroísmo circular (CD), RMN e SAXS, revelando que A1 adota uma estrutura em hairpin. A ligação ao aptâmero provocou o desenovelamento parcial da rPrP90-231 resultando em agregação dinâmica, altamente dependente da razão molar de proteína:DNA. Com base nesta observação, foi investigado a capacidade de rPrP90-231 de se sofrer separação de fase líquido-líquido (LLPS) por si só e induzida pelos aptâmeros. Foi observado separação de fases para rPrP90-231 sozinha e na presença de A1 e A2. Enquanto a proteína livre rPrP90-231 se separou em gotículas grandes, os aptâmeros aumentaram a quantidade mas reduziram o tamanho dos condensados ricos em proteína. Surpreendentemente, um aptâmero A1 modificado que não adota uma estrutura em hairpin induziu a transição para um estado ordenado, sugerindo a formação de amilóide na superfície de gotículas líquidas. Esta transição de estado líquido para sólido é uma característica de outras IDPs envolvidas em doenças neurodegenerativas. Os resultados descrevem pela primeira vez a interação PrP:NA levando a LLPS e a modulação desse efeito dependendo da estrutura de NA e da estequiometria de ligação, destacando o papel dos NAs no enovelamento da PrP e nas TSEs.

**Palavras-chave:**

palavra chave

**Abstract:**

Prion protein (PrP) structural conversion and aggregation are key events for the onset of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs). The ‘protein-only’ hypothesis proposes that the etiological agent of these diseases is an abnormal conformation of PrP, the scrapie PrP (PrPSc) that can convert cellular PrP (PrPC) into the misfolded counterpart. However, experimental evidences support the role of molecular cofactors, besides PrPSc, that can assist the protein conversion process. Among these cofactors, nucleic acids (NA) have been implicated in PrP binding and conversion into PrPSc-like species. In addition, NA aptamers were also proposed for diagnostic and therapeutic approaches for TSEs. To further understand PrP interaction with NAs and to provide structural information about the PrP:NA complex, the interaction of recombinant murine PrP (rPrP90-231) with DNA aptamer selected by SELEX was studied. We confirmed by isothermal titration calorimetry (ITC) the interaction of rPrP, both full-length and the C-terminal globular domain, with two identified 25-mer aptameric sequences (A1 and A2). Aptamers structure was characterized by theoretical predictions, circular dichroism (CD), NMR and SAXS, revealing that A1 adopts a hairpin structure. Aptamer binding caused partial unfolding of rPrP90-231 resulting in dynamic aggregation, highly dependent on the protein:DNA molar ratio. Based on this observation, we investigated the ability of rPrP90-231 to undergo liquid-liquid phase separation (LLPS) by itself and induced by the aptamers. We observed phase separation for rPrP90-231 alone and in the presence of A1 and A2. While free rPrP90-231 phase separated into large droplets, aptamers increased the amount but reduced the size of the protein-rich condensates. Strikingly, a modified A1 aptamer that does not adopt a hairpin structure induced transition to an ordered state, suggestive of amyloid formation on the surface of liquid droplets. This liquid-to-solid state transition is a hallmark of other IDPs involved in neurodegenerative diseases. Our results describe for the first time PrP:NA interaction leading to LLPS and modulation of this effect depending on NA structure and binding stoichiometry, shedding light on the role of NAs in PrP misfolding and TSEs.

**Keywords:**

Keyword

**Título:**

Mecanismos de ação anti-Pseudomonas aeruginosa de compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona

**Autor:**

ANNA CLARA MILESI GALDINO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

GALDINO, A. C. M.

**Data da Defesa:**

26/07/2019

**Resumo:**

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno humano oportunista. A rápida emergência de mecanismos de resistência em P. aeruginosa resulta em sucessivas falhas terapêuticas, aumentando, assim, as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a este patógeno. Diante da demanda por novas estratégias terapêuticas anti-P. aeruginosa; no presente trabalho, observou-se que os compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), [Ag(fendiona)2]ClO4 (Ag-fendiona) e [Cu(fendiona)3](ClO4)2.4H2O (Cu-fendiona), afetaram significativamente a atividade enzimática da elastase B (LasB), um fator de virulência protagonista na patogênese de P. aeruginosa. As análises in silico (docking molecular) revelaram que fendiona e seus derivados de Ag+e Cu2+ foram capazes de interagir com resíduos de aminoácidos do sítio ativo de LasB, destacando-se o composto Cu-fendiona, que apresentou os valores de energia de interação mais favoráveis. Adicionalmente, os compostos estudados inibiram in vitro a atividade proteolítica de LasB, sendo Cu-fendiona o composto com atividade inibitória mais potente (Ki = 90 nM). Células bacterianas apresentaram uma inibição considerável na expressão do gene lasB bem como na produção/secreção do produto proteico final (LasB madura), quando incubadas em concentrações sub-inibitórias dos referidos compostos. Ag-fendiona e Cu-fendiona exibiram ação protetiva contra os efeitos tóxicos de LasB em células epiteliais pulmonares, reduzindo os danos na monocamada de A549 em aproximadamente 32% e 42%, respectivamente. Cu-fendiona também neutralizou os efeitos tóxicos induzidos por LasB, aumentando a taxa de sobrevivência de larvas de Galleria mellonella inoculadas tanto com sobrenadante de P. aeruginosa, rico nesta enzima, quanto com a enzima purificada. Portanto, esse conjunto de resultados enfatiza a ação anti-virulência de compostos derivados da fendiona, principalmente Cu-fendiona, um potente inibidor de LasB. Em seguida, a ação dos compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona foi investigada in vitro sobre o crescimento bacteriano. Nossos resultados revelaram que Ag-fendiona e Cufendiona apresentaram uma exuberante ação bactericida, inibindo o crescimento planctônico de diferentes isolados clínicos de P. aeruginosa. Além disso, Ag-fendiona e Cu-fendiona em combinação com um antimicrobiano clássico pertencente às cefalosporinas, ceftazidima, agiram sinergicamente no controle do crescimento de P. aeruginosa. Os mecanismos de ação anti-P. aeruginosa dos compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona foram investigados através de diferentes metodologias. Nesse sentido, a indução de estresse oxidativo foi um importante componente para promover a morte das células bacterianas. Verificou-se que os compostos testados induziram a(o): (i) aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, (ii) ativação da resposta antioxidante via produção de catalase e superóxido dismutase, (iii) danos oxidativos a enzimas (inibição da atividade de aconitase), fragmentação do DNA e peroxidação de lipídeos de membrana. Em contrapartida, verificou-se que o co-tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína foi capaz de restaurar o crescimento planctônico de P. aeruignosa incubados na presença de Ag-fendiona e Cufendiona. Os compostos derivados da fendiona promoveram também o colapso das membranas bacterianas (membrana externa e plasmática) bem como alteraram os perfis de estabilidade, permeabilidade e polarização de membrana plasmática. Para uma visão global acerca dos efeitos dos compostos derivados de fendiona, realizamos uma análise metabolômica. Ag-fendiona e Cufendiona promoveram severas alterações no metabolismo bacteriano, dentre as quais destacam-se: a hiperativação do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da enzima NADH:ubiquinona oxirredutase, associada à inativação da via das pentoses fosfato e da via de biossíntese de folato. A inibição destas vias (i) promoveu a depleção do conteúdo intracelular de NADPH e (ii) impossibilitou o turnover de glutationa, uma importante molécula antioxidante. Por fim, demonstrou-se que as alterações metabólicas induzidas pelos compostos derivados da fendiona estão correlacionados à indução do estresse oxidativo. Coletivamente, nossos resultados destacam que a coordenação da fendiona com íons metálicos, em especial, Ag+ e o Cu2+, representa um novo grupo promissor de agentes antimicrobianos contra cepas de P. aeruginosa não-responsivas à antibioticoterapia clássica. Além disso, a indução de estresse oxidativo na célula bacteriana é um evento-chave para o efeito bactericida destes novos compostos antimicrobianos.

**Palavras-chave:**

Pseudomonas aeruginosa;1,10-Fenantrolina-5,6-diona;Compostos de coordenação;Resistência antimicrobiana;Terapia anti-virulência;Mecanismos de ação

**Abstract:**

Pseudomonas aeruginosa is an opportunist human pathogen. The rapid emergence of mechanisms of resistance in P. aeruginosa results in successive therapeutic failure, raising the morbidity and mortality rates related to this pathogen. Given the demand for novel anti-P. aeruginosa therapeutical alternatives, it was observed, in this current study, that coordination compounds derived from 1,10-phenantroline-5,6-dione (phendione), [Ag(phendione)2]ClO4 (Agphendione) and Cu(phendione)3](ClO4)2.4H2O (Cu-phendione) significantly affected the activity of elastase B (LasB), which is a well-known protagonist in the P. aeruginosa pathogenesis. Analysis in silico (molecular docking) has shown that phendione and its Ag+ and Cu2+ derivative compounds were able to interact with amino acid residues into the LasB active site, particularly Cu-phendione that exhibited the most favorable interaction energy parameters. Additionally, the test compounds in vitro inhibited the LasB enzymatic activity, in which Cu-phendione had the most potent inhibitory effect (Ki = 90 nM). Bacterial cells treated with a sub-inhibitory concentration (½×MIC value) of the test compounds caused a significant reduction on both expression of the lasB gene and final proteic product (the mature LasB protein). Ag-phendione and Cu-phendione exhibited protective action against the LasB-iduced toxic effects, reducing A549 monolayer damage by approximately 32% and 42%, respectively. Also, Cu-phendione neutralized the LasB-induced toxic effects, increasing the survival rate of Galleria mellonella larvae when inoculated with either LasB-enriched pseudomonal supernatant or purified LasB. Therefore, these data emphasize the anti-virulence action of phendione-derivative compounds, especially Cu-phendione, which is a powerful LasB inhibitor. Subsequently, it was investigated the in vitro effects of Ag-phendione and Cu-phendione on bacterial growth. Our results revealed that Ag-phendione and Cu-phendione presented a strong bactericidal effect, inhibiting the planktonic growth of different clinical isolates of P. aeruginosa. Further, Ag-phendione and Cuphendione in combination with ceftazidime, a classical antimicrobial agent, acted synergistically to control the P. aeruginosa growth. The anti-P. aeruginosa mechanisms of action of Agphendione and Cu-phendione were also investigated using different methodologies. In this sense, the induction of oxidative stress was an important component that triggers the bacterial killing. In this way, the test compounds induced an: (i) increase in the intracellular reactive oxygen species production, (ii) activation of antioxidant response via catalase and superoxide dismutase, (iii) oxidative damage of enzymes (e.g., aconitase inhibition), DNA fragmentation and membrane lipid peroxidation. In contrast, it was found that the co-treatment with the antioxidant N-acetylcysteine was able to restore the planktonic growth of P. aeruignosa when incubated with either Agphendione or Cu-phendione. Phendione-derivative compounds also promoted collapse of the bacterial membranes (both outer and plasmatic membranes), affecting their stability, permeability and polarization profiles. For an overview on the effects of phendione-derivative compounds, it was carried out a metabolomic approach. Our results showed that Ag-phendione and Cu-phendione promoted extensive alterations on the bacterial metabolism, such as the hyperactivation of both tricarboxylic acids and NADH:ubiquinone oxireductase enzyme, meanwhile the compounds inhibited pentose phosphate pathway and folate biosynthesis. The inhibition of these pathways promoted the depletion of NADPH intracellular content and also impaired the turnover of glutathione, which is an important antioxidant molecule. Finaly, it was demonstrated that metabolic changes induced by phendione-derivative compounds were correlated with the induction of the oxidative stress on P. aeruginosa cells. Collectively, our results accentuate that the coordination of fendione with metal ions, especially Ag + and Cu2+, represent a promising new group of antimicrobial drugs against P. aeruginosa, including resistant strains, Also, the induction of oxidative stress in bacterial cells is a key event for bactericidal effects of these new compounds.

**Keywords:**

Pseudomonas aeruginosa;1,10-Phenanthroline-5,6-dione;Coordination compounds;Antimicrobial resistance;Antivirulence therapy;Mechanisms of action

**Título:**

Análise proteômica aplicada na caracterização subcelular do córtex orbitofrontal de pacientes com esquizofrenia

**Autor:**

ERIKA LOURDES VELASQUEZ NUNEZ

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

Velasquez, E. L.

**Data da Defesa:**

10/07/2019

**Resumo:**

A esquizofrenia é um distúrbio neuropsiquiátrico crônico caracterizado pelo comprometimento das funções mentais que afeta cerca de 1% da população mundial. A caracterização proteômica de frações subcelulares do córtex orbitofrontal podem fornecer informações valiosas sobre os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia desta doença. O proteoma quantitativo de sinaptossomas (SIN), mitocôndrias (MIT), fração nuclear (NUC) e citoplasma (CIT) foi obtido para 12 pacientes com esquizofrenia e para um pool com 8 controles saudáveis livres de doenças mentais usando técnicas quantitativas diferentes como iTRAQ, label-free e targeted (PRM e SRM). Na fração SIN foram identificadas um total de 2018 grupos de proteínas usando uma abordagem label-free e marcação com iTRAQ. Análises estatísticas revelaram a variação significativa na abundância de 12 e 55 proteínas quantificadas por iTRAQ e label-free, respectivamente. As principais proteínas desreguladas estavam relacionadas ao desequilíbrio da via de sinalização do cálcio, estresse do retículo endoplasmático e morte celular programada, refletidas na desregulação de proteínas como o Reticulon-1 e o Citocromo c. Além disso, encontramos um aumento significativo de proteínas associadas à regulação do comportamento humano como a LSAMP e Proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina. Por outro lado, a análises de espectrometria de massas identificou 939 grupos de proteínas na fração MIT, 2021 em NUC e 2433 em CIT. Um total de 358 grupos de proteínas foi encontrado desregulado entre as frações MIT, NUC e CIT. Por meio da análise proteômica quantitativa, detectamos como principais vias biológicas afetadas as relacionadas ao desequilíbrio de cálcio, apoptose, metabolismo de glutamato, ruptura da sinalização celular da ativação de CREB, orientação de axônios e proteínas envolvidas na ativação da sinalização de NF-kB juntamente com o aumento da proteína complemento C3. Com base em nossa análise de dados, sugerimos a ativação do NF-kB como uma possível via que liga a desregulação do glutamato, do cálcio, a apoptose e a ativação do sistema imune em pacientes com esquizofrenia.

**Palavras-chave:**

Esquizofrenia;frações celulares;córtex orbitofrontal;proteômica quantitativa

**Abstract:**

Schizophrenia is a chronic neuropsychiatric disorder characterized by the impairment of mental functions which affects about one percent of the world population. The proteomic characterization of subcellular fractions from the orbitofrontal cortex is useful for providing valuable information about the molecular mechanisms involved in the physiopathology of these disease. The quantitative proteome of synaptosome (SYN) (MIT), crude nuclear (NUC) and cytoplasm fractions (CIT) were obtained from 12 patients with schizophrenia and a pool of 8 healthy controls free of mental illness using different quantitative techniques such as iTRAQ, label-free and targeted (PRM and SRM). In SYN fraction was identified a total of 2018 protein groups using a Label-free and iTRAQ labelling approach. Statistical analyses reveal the significant variation in the abundance of 12 and 55 proteins by iTRAQ and label-free, respectively. The main dysregulated proteins were related to calcium signaling pathway imbalance, endoplasmic reticulum stress and programmed cell death, reflected through the dysregulation of proteins such as Reticulon-1 and Cytochrome c. Also, we found a significant increase of proteins associated to the regulation of human behaviour as limbic system-associated membrane protein and α-calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. On the other hand, mass spectrometry analyses identified 939 protein groups in MIT fraction, 2021 in NUC and 2433 in CYT. A total of 358 protein groups were found dysregulated among MIT, NUC and CYT fractions. Through the quantitative proteomic analysis, we detect as the main biological pathways those related to calcium imbalance, apoptosis, glutamate metabolism, cell signaling disruption of CREB activation, axon guidance and proteins involved in the activation of NF-kB signaling along with the increase of complement proteins C3. Based on our data analysis, we suggest the activation of NF-kB as a possible pathway that links the deregulation of glutamate, calcium, apoptosis and the activation of the immune system in schizophrenia patients Keywords: , , , .

**Keywords:**

Schizophrenia;cellular fractions;orbitofrontal cortex;quantitative proteomics

**Título:**

Fitorremediação de Solos Contaminados com Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos por Medicago sativa L. e Simbionte Ensifer meliloti.

**Autor:**

WILBER DE SOUSA ALVES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

ALVES, W.S.

**Data da Defesa:**

29/05/2019

**Resumo:**

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) são poluentes prioritários mutagênicos e carcinogênicos. Medicago sativa L. (alfafa) e simbionte Ensifer meliloti (cepa BR 7411) são estudados como potenciais biorremediadores destes compostos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de fitorremediação da alfafa em consórcio com BR 7411 em solos contaminados, identificar proteínas envolvidas no processo, como também, monitorar o tráfego desses HPA em tecidos vegetais. Amostras de solo foram alteradas com antraceno, pireno e fenantreno, semeadas com alfafa na presença e ausência de BR 7411, e cultivados por 40 dias após semeadura (DAS). A cada 10 dias, amostras de solo e tecido vegetal foram coletados, para os ensaios biométricos e biomassa seca, análise do potencial de biorremediação e fitorremediação (extração, adsorção em sílica e análise CLAE-FR), identificação de proteínas por análise proteômica quantitativa (Label-free), e detecção dos HPA em tecidos vegetais por técnicas de microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram diminuição na biomassa e comprimento médio dos vegetais, conforme aumento das concentrações de HPA total (150, 300 e 450 ppm), cultivos na presença de BR 7411 diminuíram sintomas de estresse, promovendo melhora na saúde das plantas. Tratamentos com alfafas e BR 7411, (em consórcio ou isolados), promoveram quedas de 85 % em média nos primeiros 10 DAS, na concentração de HPA total em solos contaminados nas diferentes concentrações (Tukey p < 0.0001). 709 proteínas foram identificadas em tecidos aéreos de alfafas cultivadas na presença e na ausência de 300 ppm de HPA durante 20 DAS, dentre estas, 54 foram mais expressas na presença dos HPA, pertencendo as funções biológicas de transporte e catabolismo, resposta ao estresse, metabolismo e degradação de xenobióticos (biodegradação de HPA), e metabolismo de drogas, sendo candidatas a proteínas relacionadas à fitorremediação (PRF). Dentre elas, destacaram-se proteínas com fold change > 2, como a RuBisCO, Citocromo P450 e álcool desidrogenases, dentre outras proteínas com potencial na remediação desses compostos, sendo até agora, o primeiro estudo a analisar o proteoma de Medicago sativa L. (quantitativo e qualitativo) na presença de HPA, em busca de PRF. Além disso, obteve-se a detecção de fluorescência do HPA em tecidos de vegetais, destacando a contribuição da cepa BR 7411 no aumento da absorção dos HPA para todas as concentrações, vide intensidade da fluorescência dos HPA nos órgãos analisados, comparados com as plantas não tratadas com a cepa BR 7411. Como também, a presença de fluorescência dos HPA documentada pela primeira vez em nódulos de alfafa, indicando que esses órgãos podem exercer, não só a função de fixação biológica de nitrogênio (FBN), como também a função de sítios de acúmulo ou degradação desses HPA, tendo em vista a cepa BR 7411 ser capaz de degradá-los e utilizá-los como fonte de carbono, evidenciado nos ensaios de Hanson, contendo HPA como única fonte de carbono, e meio complementado com 50 % de sacarose (co-metabolismo).

**Palavras-chave:**

Fitorremediação;HPA;Medicago sativa L.;Proteômica;BR7411

**Abstract:**

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are mutagenic and carcinogenic priority pollutants. Medicago sativa L. (alfalfa) and symbiote Ensifer meliloti (BR 7411 strain) are studied as potential bioremediators of these compounds. The objective of this study was to evaluate the ability of alfalfa phytoremediation, in consortium with BR 7411, in contaminated soils, to identify proteins involved in the process, as well as to monitor the traffic of these PAH in plant tissues. Soil samples were amended with anthracene, pyrene and phenanthrene, sown with alfalfa in the presence and absence of BR 7411, and cultivated for 40 days after sowing (DAS). Every 10 days, soil and plant tissue samples were collected for biometric and dry biomass assays, bioremediation and phytoremediation potential analysis (extraction, silica adsorption and RP-HPLC analysis), protein identification by quantitative proteomic analysis (Label-free), and detection of PAH in plant tissues by fluorescence microscopy techniques. The results showed a decrease in the biomass and average length of the plants, as the increase of total PAH concentrations (150, 300 and 450 ppm). Crops in the presence of BR 7411 decreased symptoms of stress, promoting improvement in plant health. Alfalfa and BR 7411 treatments (either in consortium or in isolation) promoted 85% drops in average in the first 10 DAS in total PAH concentration in contaminated soils at different concentrations (Tukey p < 0.0001). 709 proteins were identified in alfalfa aerial tissues, grown in the presence and absence of 300 ppm PAH, during 20 DAS, among which 54 were more expressed in the presence of PAH, belonging to the biological functions of transport and catabolism, stress response, metabolism and xenobiotic degradation (PAH biodegradation), and drug metabolism, being candidates for phytoremediation-related proteins (PRF). These include proteins with fold change > 2, such as RuBisCO, Cytochrome P450 and alcohol dehydrogenases, among other proteins with potential for the remediation of these compounds, being so far the first study to analyze the Medicago sativa L. proteome (quantitative and qualitative) in the presence of PAH in search of PRF. In addition, PAH fluorescence detection was obtained in plant tissues, highlighting the contribution of the BR 7411 strain in increasing PAH uptake at all concentrations, see PAH fluorescence intensity in the analyzed organs, compared with non-PAH plants. As well as the presence of PAH fluorescence documented for the first time in alfalfa nodules, indicating that these organs can exert not only the biological nitrogen fixation (BNF) function, but also of sites of accumulation or degradation of these PAH, in view of the fact that the BR 7411 strain is able to degrade them and use them as a carbon source, as evidenced in Hanson's tests, containing PAH as the sole carbon source, and medium supplemented with 50 % of sucrose (co-metabolism).

**Keywords:**

Phytoremediation;PAH;Medicago sativa L.;Proteomics;BR7411

**Título:**

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE FLAVONOIDES OBTIDOS POR REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASE.

**Autor:**

ANETE SOUZA MECENAS GONCALVES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

MECENAS, A. S.

**Data da Defesa:**

14/05/2019

**Resumo:**

Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal. Vários estudos demonstraram a atividade antioxidante dos flavonoides na prevenção das doenças cardiovasculares. Entretanto, a natureza hidrofílica dos flavonoides glicosilados afeta sua utilização e eficácia, tais como solubilidade limitada e pouca compatibilidade com as membranas plasmáticas. Por isso, a modificação química de glicosídeos de flavonoides tem sido um foco de interesse científico e industrial. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi biossintetizar derivados acilados de rutina e naringina e avaliar a atividade antioxidante de produtos de transesterificação destes flavonoides com diferentes ésteres vinílicos (acetato de vinila, propionato de vinila, butirato de vinila, pvalato de vinila, decanoato de vinila, laurato de vinila e benzoato de vinila) utilizando como biocatalisador lipase comercial imobilizada de Candida antarctica, Novozyme 435. A bioatividade in vitro dos derivados de flavonoides e da mistura reacional foram avaliadas considerando a atividade antioxidante (DPPH e ORAC), viabilidade celular (MTT em cultura de células de macrófagos murinos, rim de macaco verde e hepatócito humano) e eritrócitos, bem como efeito da ação dos derivados acilados na proteção da formação de espécies reativas de oxigênio. A quantificação dos produtos de reação foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas. A lipase imobilizada Novozyme 435 foi capaz de catalisar a reação de acilação da rutina com acetato de vinila com conversões acima de 60% em 24h de reação, a 60°C. Além disso, a mesma foi capaz de ser reutilizada por até cinco ciclos reacionais sem perda de conversão. Os produtos de reação foram purificados e caracterizados por Espectrometria de Massas de Alta Resolução e Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensional. A mistura reacional (monoacetato e diacetato de rutina) obtida apresentou um potencial antioxidante em comparação a rutina pelo método do DPPH (Mistura reacional: CE50: 14,41±0,13 μg/mL e Rutina: CE50: 35,22±0,36 μg/mL), porém, com a utilização de substratos de maior cadeia carbônica (propionato e butirato de vinila) o potencial antioxidante foi inferior ao padrão rutina. Pelo método do ORAC a mistura reacional do acetato de vinila (2,69±0,56 μM Trolox. g−1) e rutina apresentou cinco vezes maior potencial antioxidante em comparação ao padrão rutina (0,53±0,08 μM Trolox. g−1). A mistura reacional (monoacetato e diacetato de rutina), bem como a mistura (propionato e dipropionato de rutina) foram avaliadas quanto a capacidade de diminuir a viabilidade celular em modelos de células animais, apresentaram 90% de viabilidade celular na concentração de 280 μg/mL e não apresentaram atividade hemólitica. Além disso, o monoacetato e diacetato de rutina apresentou 100% de proteção para hemólise frente ao peróxido de hidrogênio. Quando a naringina, foi utilizada como substrato a lipase foi capaz de catalisar a reação de acilação utilizando acetato de vinila, propionato e butirato de vinila com conversões acima de 50% em 24 h de reação a 60°C. Os resultados evidenciaram que a acilação enzimática é uma ferramenta de interesse para a melhora da atividade antioxidante dos flavonoides relacionada à neutralização de radicais livres e apresentando baixa toxicidade para diversas linhagens de células animais.

**Palavras-chave:**

Antioxidante;Citotoxicidade;Estresse oxidativo;Flavonoides glicosilados;Lipase;Transesterificação

**Abstract:**

Flavonoids are a class of metabolites. Several studies have demonstrated an antioxidant activity of flavonoids in the prevention of cardiovascular diseases. However, the hydrophilic nature of glycosylated flavonoids has its use and low, as limited solubility and poor compatibility with plasma membranes. For this reason, a chemical chemistry of flavonoids has been a focus of scientific and industrial interest. Thus, this work was biosynthetic for the rutin and narghile derivatives and an antioxidant activity of transesterase products for flavonoids with different vinyl esters (vinyl acetate, vinyl propionate, vinyl butyrate, vinyl pivalate, vinyl decanoate, vinyl laurate and vinyl benzoate). In vitro bioactivity of the flavonoid derivatives and the reaction mixture as an antioxidant activity evaluation (DPPH and ORAC), cell viability (MTT in murine macrophages, green monkey kidney and human hepatocyte cell culture). The quantification of the action products was carried out by High Efficiency Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry Lipase immobilized Novozyme 435 was able to catalyze the rutin reaction with vi acetate nil with conversions above 60% in 24 hours of reaction at 60 ° C. In addition, it was able to be reused for five reaction cycles without conversion losses. The products were purified and characterized by two-dimensional High Resolution Mass Spectrometry and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance. The reaction mixture (monoacetate and rutin diacetate) obtained showed an antioxidant potential compared to rutin by the DPPH method (Reaction Mixture: EC50: 14.41 ± 0.13 μg / mL and Rutin: EC50: 35.22 ± 0.1, 36 μg / mL), but with the use of substrates with a higher carbon chain (propionate and vinyl butyrate) the antioxidant potential was lower than the routine standard. By the ORAC method the reaction mixture of vinyl acetate (2.69 ± 0.56 μM Trolox g-1) and rutin could be 5 times more potent antioxidants to the standard routine (0.53 ± 0.08 μM Trolox. g-1). A reaction reaction (rutin monoacetate and diacetate) is a mixture of ruthenium propylene and dipropionate, with 90 % cell viability at a concentration of 280 μg/mL and not exactly hemolytic activity. In addition, monoacetate and rutin diacetate presented 100% protection for hemolysis against hydrogen peroxide. When a lipase was administered, the lipase was able to catalyze the adrenaline from undergoing treatment with vinyl, propionate and vinyl butyrate with conversions above 50% within 24 h of reaction at 60 ° C. Evidence of an enzyme is a tool of interest for the antioxidant activity of flavonoids caused by the neutralization of free radicals and the low toxicity to several animal strains.

**Keywords:**

Antioxidant;Cytotoxicity;Glycosides Flavonoids;Lipase;Oxidative stress;Transesterification

**Título:**

Formação dos Heterodímeros Wild Type e Mutantes: Correlação Entre a Atividade hSod1 Mutante, Agregação e a Toxicidade Mediada por Espécies Reativas de Oxigênio.

**Autor:**

MARIANA DIAS CASTELA DE CARVALHO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

CARVALHO, M. D. C.

**Data da Defesa:**

29/03/2019

**Resumo:**

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é um distúrbio associado à idade, causado pela degeneração de neurônios motores. Mais de 100 mutações na isoforma Cu, Zn-superóxido dismutase (Sod1) já foram relatadas na forma familiar (ELAf) e esporádica da ELA (ELAs). Neste estudo, foi utilizada a abordagem de microscopia de células vivas para analisar os efeitos de combinações heterodiméricas de proteínas Sod1 WT e mutantes (A4V, L38V, G93A e G93C) em células humanas. Curiosamente, foi descoberto que, embora tanto a proteína WT quanto o mutante Sod1 possam formar dímeros, a Sod1 WT não forma agregados. Em contraste, a co-expressão dos heterodímeros (mutantes de Sod1 associados a forma WT) em ELAf resultou na formação de um maior número de inclusões por célula do que o observado em homodímeros (células que co-expressam WT ou mutante Sod1). O número de inclusões (acúmulo de substâncias, como no caso, de proteínas, em um aglomerado dentro das células) foi maior em células expressando a mutante A4V, que também foram vistas como as inclusões mais estáveis. Para eliminar a contribuição da Sod1 endógena e avaliar melhor o efeito da expressão da Sod1 mutante associada à ELA, foi realizada uma construção em que a Sod1 WT humana e mutantes são expressas em células de levedura deletadas em SOD1 (sod1Δ). Utilizando o modelo de levedura, submetido ao envelhecimento cronológico, pode ser concluído que apenas os heterodímeros humanos apresentaram diminuição da atividade antioxidante, aumento do dano oxidativo e longevidade reduzida. Foi observado que o estresse oxidativo induziu a agregação de Sod1 mutante associado à ELA, e que os heterodímeros de Sod1 formaram mais inclusões do que os homodímeros.

**Palavras-chave:**

Sod1;Heterodímeros;ELAf;Envelhecimento

**Abstract:**

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is an age-associated disorder developed by degeneration of motor neurons. More than 100 mutations in the isoforms of Cu, Zn-superoxide dismutase (Sod1) have been reported in the familial (fALS) and sporadic forms of ALS (sALS). In this study, a live cell microscopy approach was used to analyze the effects of heterodimeric combinations of Sod1 WT and mutant proteins (A4V, L38V, G93A and G93C) on human cells. Interestingly, it was discovered that although Sod1 WT protein or mutant Sod1 are able to form dimers, only WT Sod1 does not form aggregates. In contrast, expression of heterodimers (coexpression of WT and Sod1 mutants) in ELAf shows a higher number of inclusions per cell than that observed in homodimers (WT or Sod1 mutant expressing cells). The number of inclusions (accumulation of proteins in a cluster within the cells) was higher in cells expressing A4V mutant, which were also seen as the most stable inclusions. To eliminate the influence of endogenous WT Sod1 protein, the effect of Sod1 expression was evaluated in yeast cells deleted in SOD1 (sod1Δ). Using yeast model under chronological aging, it was observed that only the expression of human heterodimers was responsible for the reduction of antioxidant activity, increase in oxidative damage and reduced longevity. It was also observed that oxidative stress induced aggregation of mutant Sod1 associated with fALS, and that the Sod1 heterodimers formed more inclusions than the homodimers. In addition, it has also been observed that the expression of Sod1 mutants reduced nuclear localization of Sod1 and, consequently, impaired antioxidant response, suggesting that such a change in location may render the cell more susceptible to oxidative stress, contributing to the pathology of ELAf. Overall, this study provides a new insight into the fundamentals of ELAf and may open new avenues for planning future therapeutic strategies. Keywords: , , ,

**Keywords:**

Sod1;Heterodimers;fALS;Aging

**Título:**

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE DE Bacillus velezensis H2O-1 E SUAS DIFERENTES APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO.

**Autor:**

CAROLINA REIS GUIMARAES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

GUIMARÃES, C. R.

**Data da Defesa:**

19/03/2019

**Resumo:**

Biossurfactantes são moléculas com propriedades tensoativas produzidas por micro-organismos, que podem ser utilizados em diversos setores industriais como, por exemplo, na indústria do petróleo, onde podem ser empregados para auxiliar a extração do óleo e no controle da biocorrosão. Um dos biossurfactantes mais estudados e eficientes é a surfactina, um lipopeptídeo produzido por diversas espécies de Bacillus. Ao contrário dos surfactantes químicos, que são normalmente produzidos a partir de hidrocarbonetos do petróleo, tóxicos e de difícil degradação no ambiente, os biossurfactantes são biodegradáveis e, muitas vezes, mais efetivos que os surfactantes. O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar a surfactina produzida por B. velezensis H2O-1 e avaliar o potencial desta molécula para a utilização na recuperação melhorada do petróleo utilizando micro-organismos (MEOR) e no controle de biocorrosão. Foi observado que B. velezensis H2O-1 produz cinco homólogos de surfactina que diferem no comprimento da cadeia de ácido graxo, sendo estes estáveis a variações de temperatura, pH e força iônica, possuindo alto poder de emulsificação e dispersão de diversos tipos (APIs) de petróleos. Para uso em MEOR, foi observado que a surfactina inverteu 100% da molhabilidade da calcita impregnada com petróleo. Além disso, foi observado que o extrato bruto contendo o tensoativo manteve suas excelentes propriedades interfaciais quando submetidas às condições extremas de pressão, temperatura e salinidade encontradas das camadas pós-sal (70 °C, 70 g/L e 27,58 Mpa) e pré-sal (100 °C, 150 g/L e 48,2 Mpa). Visando verificar a eficácia do biossurfactante no controle da biocorrosão, foi observada inibição da formação de biofilme sobre as superfícies condicionadas (cupons de aço carbono) em reatores com presença de micro-organismos presentes na água de produção. O condicionamento da superfície com a surfactina alterou sua hidrofobicidade, deixando-o menos hidrofóbico, reduziu a formação de biofilme e, consequentemente, reduziu a biocorrosão. Além disso, o tensoativo estudado apresentou baixa toxicidade contra Artemia salina, sendo considerada segura para aplicação ambiental. Estes resultados indicam um excelente potencial de aplicação destas surfactinas para utilização em MEOR e para controle da biocorrosão em superfícies metálicas.

**Palavras-chave:**

B. velezensis H2O-1;biossurfactante;surfactina;MEOR;pós-sal;pré-sal;biofilme;biocorrosão

**Abstract:**

Biosurfactants are molecules with surfactant properties produced by microorganisms, which can be used in several industrial fields, such as in the petroleum industry, where they can be used to aid the oil extraction and to control biocorrosion. One of the most studied and efficient biosurfactants is surfactin, a lipopeptide produced by several species of Bacillus. Unlike chemical surfactants, which are usually produced from petroleum hydrocarbons, toxic and difficult to degradate in the environment, biosurfactants are biodegradable and often more effective than surfactants. The objective of this study was to produce and to characterize the surfactin produced by B. velezensis H2O-1, as well as to evaluate the potential of this molecule for use in the Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) and in the control of biocorrosion. B. velezensis H2O-1 produces five surfactin homologs that differ in the length of the fatty acid chain. These homologs were stable to variations in temperature, pH and ionic strength, having high emulsification and dispersion power of different types (APIs) of petroleum. For use in MEOR, the surfactin inverted 100% of the wettability of calcite impregnated with petroleum. In addition, the crude extract containing the surfactant maintained its excellent interfacial properties when subjected to the extreme conditions of pressure, temperature and salinity found in the post-salt (70 ° C, 70 g / L and 27.58 MPa) and pre-salt layers (100 ° C, 150 g / L and 48.2 MPa). In order to verify the efficacy of the biosurfactant in the control of biocorrosion, it was observed inhibition of the biofilm formation on the conditioned surfaces (carbon steel coupons) in reactors with presence of microorganisms present in the water of production. Surface conditioning with surfactin change the cupons hydrophobicity, leaving them less hydrophobic. Moreover, these treatment reduced the biofilme formation and, consequently, reduced biocorrosion. In addition, this surfactant presented low toxicity against Artemia salina, being considered safe for environmental application. These results indicate an excellent application potential of these surfactins for use in MEOR and in the control of biocorrosion in metallic surfaces.

**Keywords:**

B. velezensis H2O-1;biosurfactant;surfactin;MEOR;post-salt;pre-salt;biofilm;biocorrosion

**Título:**

Assinaturas proteômicas de regiões cerebrais afetadas pela patologia de tau em estágios precoces e tardios da doença de Alzheimer.

**Autor:**

CLARISSA FEROLLA MENDONCA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

MENDONÇA, C. F.

**Data da Defesa:**

01/02/2019

**Resumo:**

A doença de Alzheimer (DA) é a desordem neurodegenerativa mais comum. Depósitos de peptídeo β amiloide (Aβ) e proteína tau estão entre os principais marcos patológicos da DA. O acúmulo de Aβ e tau segue padrões espaciais previsíveis durante a progressão da DA. Contudo, permanece obscuro porque certas regiões cerebrais são mais vulneráveis do que outras; para investigar isto e quais vias são desreguladas durante a progressão da DA, um estudo de proteômica baseado em espectrometria de massas foi realizado. Um total de 103 amostras de tecidos de regiões afetadas precoce (córtices entorrinal e parahipocampal – lobo temporal medial (MTL)) e tardiamente (córtices temporal e frontal - neocórtex) pela patologia de tau foram submetidas à análise de proteômica quantitativa label-free. Considerando proteínas desreguladas durante a progressão da DA, a maioria (681 de um total de 814 proteínas) foi região-específica, enquanto que algumas proteínas foram compartilhadas entre regiões (117 proteínas alteradas em duas áreas e 16 proteínas alteradas em três áreas). Analogamente, muitas vias desreguladas durante a progressão da doença foram exclusivas para certas regiões, sendo poucas vias alteradas em duas ou mais regiões. Mudanças na expressão proteica sugeriram a ocorrência de perda de sinapses em todas as regiões analisadas, enquanto que a desregulação da tradução foi preponderante nos córtices entorrinal, parahipocampal e frontal. Prejuízo na fosforilação oxidativa foi proeminente no MTL. Uma análise de proteômica diferencial de áreas cerebrais de indivíduos saudáveis (controles) mostrou metabolismo mais alto e aumento na expressão de proteínas relacionadas à DA (e.g. APOE) no MTL comparado ao neocórtex. De nosso conhecimento, este trabalho fornece a primeira comparação de alterações proteômicas em regiões cerebrais afetadas pela patologia de tau em diferentes estágios da DA. Este trabalho identificou algumas proteínas e vias comumente reguladas durante o avanço da doença, embora tenhamos encontrado os processos desregulados sendo predominantemente região-específicos. Além disso, foi encontrada uma assinatura proteômica distinta entre o MTL e o neocórtex em indivíduos saudáveis que pode estar relacionada à vulnerabilidade à DA. Estes achados destacam a necessidade da investigação da cascata de eventos da DA em todo o cérebro e estudos abrangendo mais áreas cerebrais são necessários para melhor compreender a etiologia da DA e a vulnerabilidade de regiões à doença.

**Palavras-chave:**

Doença de Alzheimer;proteômica;vulnerabilidade de regiões cerebrais;lobo temporal medial;neocórtex;estágios Braak/Braak

**Abstract:**

Alzheimer’s disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder. Depositions of amyloid β peptide (Aβ) and protein tau are among the major pathological hallmarks of AD. Aβ and tau burden follows predictable spatial patterns during the progression of AD. Nevertheless, it remains obscure why certain brain regions are more vulnerable than others; to investigate this and dysregulated pathways during AD progression, a mass spectrometry-based proteomics study was performed. In total 103 tissue samples from regions early (entorhinal and parahippocampal cortices - medial temporal lobe (MTL)) and late affected (temporal and frontal cortices - neocortex) by tau pathology were subjected to label-free quantitative proteomics analysis. Considering dysregulated proteins during AD progression, the majority (681 of the 814 proteins) was region specific, while some proteins were shared between regions (117 proteins altered in two areas and 16 proteins altered in three areas). Analogously, many dysregulated pathways during disease progression were exclusive to certain regions, but a few pathways altered in two or more areas. Changes in protein expression suggesting that synapse loss occurred in all analyzed regions, while translation dysregulation was preponderant in entorhinal, parahippocampal and frontal cortices. Oxidative phosphorylation impairment was prominent in MTL. Differential proteomics of brain areas in health state (controls) showed higher metabolism and increased expression of AD-related proteins (e.g. APOE) in the MTL compared to the neocortex. To our knowledge, this work provides the first comparison of proteomic changes in brain regions affected by tau pathology at different stages of AD. This work identified some commonly regulated proteins and pathways during disease advancement, although we found the dysregulated processes being predominantly region specific. In addition, a distinct proteomic signature was found between MTL and neocortex in healthy subjects that might be related to AD vulnerability. These findings highlight the need of investigating AD’s cascade of events throughout the whole brain and studies spanning more brain areas are required to better understand AD etiology and region vulnerability to disease.

**Keywords:**

Alzheimer’s disease;proteomics;brain region vulnerability;medial temporal lobe;neocortex;Braak/Braak staging